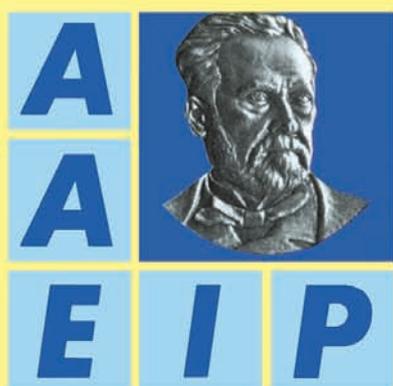

ASSOCIATION DES ANCIENS ELEVES DE L'INSTITUT PASTEUR



SEPTEMBRE 2008

Vol. 50 - N° 196

**AVANCÉES TECHNOLOGIQUES
EN BIOLOGIE**

SOMMAIRE

| | |
|---|---|
| AVANCÉES TECHNOLOGIQUES EN BIOLOGIE | HISTOIRE |
| <ul style="list-style-type: none"> ● ÉDITORIAL : ÉVOLUTION DES TECHNOLOGIES EN BIOLOGIE CLINIQUE p. 107 <i>Edith BAR-GUILLOUX</i> ● LA CRISTALLOGRAPHIE DES PROTÉINES : DU CRISTAL À LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE p. 109 <i>Graham BENTLEY et</i> <i>Brigitte VULLIEZ-LE NORMAND</i> ● NOUVELLES TECHNOLOGIES EN MICROSCOPIE ET EN IMAGERIE p. 115 <i>Olivier RENAUD</i> ● LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DES BIOMOLÉCULES DE PETITE TAILLE DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES p. 121 <i>Jean-François HEILLIER, Erwan WERNER,</i> <i>Céline DUCRUIX, Eric EZAN et Christophe JUNOT</i> | <ul style="list-style-type: none"> ● TOURNÉE D'INSPECTION EN AFRIQUE ÉQUATORIALE FRANÇAISE (Première partie) p. 130 <i>Gaëtan SALEUN</i> VIE DE L'AAEIP * Journée scientifique à Dijon, 28 novembre 2008 p. 137 NOUVELLES DE L'INSTITUT PASTEUR <ul style="list-style-type: none"> * Enseignement p. 139 * Thèses soutenues p. 143 * Recherche p. 143 * International p. 143 INFORMATIONS p. 150 LIVRES <ul style="list-style-type: none"> ● Nos lectures p. 151 BULLETIN D'INSCRIPTION : JOURNÉE SCIENTIFIQUE RÉGIONALE DE L'AAEIP p. 151 CONSEIL D'ADMINISTRATION BIENFAITEURS ET SECRÉTARIAT p. 152 |

COTISATION ET ABONNEMENT

| | |
|---|----------|
| Cotisation annuelle (2008) | 28 euros |
| Abonnement (2008) au tarif préférentiel pour les membres de l'Association | 42 euros |
| Total ¹ | 70 euros |
| Abonnement d'un an : 2008 (4 numéros) pour les non membres | 45 euros |
| Prix du numéro | 13 euros |

¹ Les tarifs sont dégressifs : couples adhérents (84 euros), retraités (58 euros), couples retraités (68 euros), étudiants non titulaires d'un emploi rémunéré (à partir de 5 euros).

Bulletin publié par **L'ASSOCIATION DES ANCIENS ÉLÈVES DE L'INSTITUT PASTEUR**

Directeur de la Publication : **Docteur Michel DUBOS**

La revue comprend 48 pages avec les publicités

ISSN 0183-8849 - Inscription à la Commission paritaire N° 0310 G 86175 - Dépôt légal 3^{ème} trimestre 2008

Conception-Edition : OPAS RCS Paris B 333 953 123

41, rue Saint-Sébastien - 75011 PARIS - Tél. 01 49 29 11 20

Editeur Conseil : J.P. KALFON - Imprimerie : EFPP

Ateliers de formation 2009

192

Cellules souches pluripotentes humaines

Phase I • Le point sur... 8-10 mars 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Claire Rougeulle (UMR Epigénétique et Destin Cellulaire, Paris), Marc Lalande (Université du Connecticut, Farmington, USA)

Conférenciers pressentis : Peter Andrews (Sheffield, UK), Lyle Armstrong (Newcastle, UK), Véronique Azuara (London, UK), Annelise Bennaceur (Villejuif, France), Oliver Brüstle (Bonn, Germany), Carine Camby (Paris, France), Chad Cowan (Boston, USA), John de Vos (Montpellier, France), Kevin Eggan (Boston, USA), Alison Murdoch (Newcastle, UK), Marc Peschanski (Evry, France), Benjamin Reubinoff (Jerusalem, Israel), Ludovic Vallier (Cambridge, UK), Ren-He Xu (Farmington, USA), Franck Yates (Villejuif, France), Lorraine Young (Nottingham, UK).

Phase II • Maîtrise technique : 9-13 novembre 2009 • Université du Connecticut, Farmington, USA

Date limite d'inscription : 19 décembre 2008

193

Polymorphisme et remaniements génomiques : analyse des données de puces CGH et SNP

Phase I • Le point sur... 15-17 avril 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Emmanuel Barillot (Institut Curie, Paris), Yves Moreau (Université de Louvain, Belgique)

Conférenciers pressentis : Alain Aurias (Paris, France), Olivier Delattre (Paris, France), Richard Durbin (Cambridge, UK), Janet Fridlyand (San Francisco, USA), Philippe Hupé (Paris, France), Olli Kallioniemi (Turku, Finland), Björn Menten (Ghent, Belgium), Yves Moreau (Leuven, Belgium), H. Hilger Ropers (Munich, Germany), Steven Scherer (Toronto, Canada), Simon Tavaré (Cambridge, UK), Joris Veltman (Nijmegen, The Netherlands), Joris Vermeesch (Leuven, Belgium), Martin Vingron (Munich, Germany), Bauke Ylstra (Amsterdam, The Netherlands).

Date limite d'inscription : 6 février 2009

194

Ingénierie tissulaire : étude des interfaces cellule/tissu/matériau

Phase I • Le point sur... 27-29 mai 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Joëlle Amédée (Inserm U577, Bordeaux), Jérôme Guicheux (Inserm U791, Nantes), Didier Letourneur (Inserm U698, Paris)

Conférenciers pressentis : Karine Anselme (Mulhouse, France), Mario Barbosa (Porto, Portugal), Odile Damour (Lyon, France), Nicolas L'Heureux (Novato, USA), Laurent Laganier (Mions, France), Patrice Laquerrière (Reims, France), Philippe Lavalle (Strasbourg, France), Didier Mainard (Nancy, France), Ivan Martins (Basel, Switzerland), Josep A. Planell (Barcelona, Spain), Luc Sensebe (Tours, France), Clemens van Blitterswijk (Enschede, The Netherlands), Pierre Weiss (Nantes, France).

Phase II • Maîtrise technique : 2-4 septembre 2009 • Nantes

Date limite d'inscription : 20 mars 2009

195

Nouvelles techniques d'imagerie pour la biologie : super-résolution et super-Localisation

Phase I • Le point sur... 3-5 juin 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Benoît Dubertret (ESPCI, Paris), Olivier Haeberle (Université de Haute Alsace, Mulhouse), Vincent Lorient (ESPCI, Paris)

Conférenciers pressentis : Joerg Bewersdorf (The Jackson Laboratory, USA), Laurent Cognet (Bordeaux, France), Rainer Heintzmann (King's College, UK), Lars Kastrop (Goettingen, Germany), Jérôme Mertz (Boston University, USA), Mark Neil (Imperial College, UK), Raimund Ober (University of Texas, USA), Gleb Shtengel (Howard Hughes Medical Institute, USA), Jean-Baptiste Sibarita (Paris, France), Jean-Luc Vonesch (Strasbourg, France), Tony Wilson (Oxford, UK).

Phase II • Maîtrise technique : juillet 2009 • Paris/Bordeaux

Date limite d'inscription : 20 mars 2009

196

Ubiquitine et protéines apparentées, Protéasomes : fonctions et dysfonctions

Phase I • Le point sur... 10-12 juin 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Olivier Coux (CRBM, Montpellier), Catherine Dargemont (Institut Jacques Monod, Paris)

Conférenciers pressentis : Olivier Coux (Montpellier, France), Catherine Dargemont (Institut Jacques Monod, Paris), Mickaël Glickman (Haifa, Israel), Fred Golberg (Boston, USA), Ron Hay (Dundee, UK), Jon Huibregtse (Austin, USA), Alain Israel (Paris, France), Stefan Jentsch (Munich, Germany), Frauke Melchior (Göttingen, Germany), Martin Scheffner (Constance, Germany), Thomas Sommer (Berlin, Germany), Keiji Tanaka (Tokyo, Japan), William Tansey (Cold Spring Harbor, USA), Rosine Tsapis (Paris, France)

Date limite d'inscription : 27 mars 2009

197

Exploration métabolique et structurale des mitochondries en athologie et perspectives thérapeutiques

Phase I • Le point sur... 16-18 septembre 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Jean-Pierre Mazat (Inserm U688, Bordeaux), Vincent Proccacio (University of California, USA), Pascal Reynier (Inserm U694, Angers)

Conférenciers pressentis : Roderick Capaldi (Eugene, USA), Arnaud Chevrollier (Angers, France), Jean-Paul di Rago (Bordeaux, France), Chittibabu Guda (Rensselaer, USA), Marcia Haigis (Boston, USA), Guy Lenaers (Montpellier, France), Anne Lombes (Paris, France), Carmen Mannela (Albany, USA), Jean-Pierre Mazat (Bordeaux, France) Arnold Munnich (Paris, France), Vincent Proccacio (Irvine, USA), Thierry Rabilloud (Grenoble, France), Manuel Rojo (Bordeaux, France), Pierre Rustin (Paris, France), Douglas Wallace (Irvine, USA).

Phase II • Maîtrise technique : 21-23 septembre 2009 • Bordeaux

Date limite d'inscription : 26 juin 2009

198

Protocoles récents en épidémiologie

Phase I • Le point sur... 30 septembre-2 octobre 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Nadine Andrieu (Inserm U900, Paris), Michel Chavance (Inserm U780, Villejuif), Pascal Wild (INRS, Nancy)

Conférenciers pressentis : Nadine Andrieu (Paris, France), Norman Breslow (Seattle, USA), Michel Chavance (Villejuif, France), Patrick Farrington (Milton Keynes, USA), Bryan Langholz (Los Angeles, USA), Thomas Lumley (Seattle, USA), Helena Marti-Soler (Villejuif, France), Walter Schill (Brême, Germany), Pascal Wild (Nancy, France).

Date limite d'inscription : 17 juillet 2009

199

La mémoire humaine et sa pathologie : approche multidisciplinaire

Phase I • Le point sur... 7-9 octobre 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Béatrice Desgranges (Inserm U923, Caen), Francis Eustache (Inserm, U932, Caen), Bernard Laurent (Hôpital de Bellevue, Saint-Etienne)

Conférenciers pressentis : Hélène Amiéva (Bordeaux, France), Sylvie Belleville (Montréal, Canada), Gaël Chételat (Caen, France, Melbourne, Australia), Julien Doyon (Montréal, Canada), Francis Eustache (Caen, France), Bernard Laurent (Saint-Etienne, France), Stéphane Léhericy (Paris, France), Pascale Piolino (Caen/Paris, France), Michel Poncet (Marseille, France), Bruno Poucet (Marseille, France), Catherine Thomas-Antérion (Saint-Etienne, France), Julie Snowden (Manchester, UK), Martial van der Linden (Geneva, Switzerland).

Date limite d'inscription : 7 juillet 2009

200

Organisation fonctionnelle des génomes dans le noyau : des techniques moléculaires aux approches *in vivo*

Phase I • Le point sur... 19-21 octobre 2009 • Saint-Raphaël

Organisateurs : Frédéric Bantignies (IGH, Montpellier), Angela Taddei (Institut Curie, Paris)

Conférenciers pressentis : Geneviève Almouzni (Paris, France), Giacomo Cavalli (Montpellier, France), Xavier Darzacq (Paris, France), Job Dekker (Worcester, USA), Wouter de Laat (Rotterdam, The Netherlands), Christophe Escudé (Paris, France), Thierry Forné (Montpellier, France) Susan Gasser (Basel, Switzerland), Edith Heard (Paris, France), Terumi Kohwi-Shigematsu (Berkeley, USA), Ulrich Laemmli (Geneva, Switzerland) Rolf Ohlson (Uppsala, Sweden), Yijun Ruan (Singapore, Singapore), Remi Terranova (Basel, Switzerland), Bas van Steensel (Amsterdam, The Netherlands).

Date limite d'inscription : 10 juillet 2009

Ateliers de formation

Renseignements et inscriptions :

Ateliers de formation Inserm

101, rue de Tolbiac

75654 Paris Cedex 13

Tél. : 33 (0) 1 44 23 62 04

Fax : 33 (0) 1 44 23 62 93

ateliers@inserm.fr

www.inserm.fr

ÉDITORIAL

ÉVOLUTION DES TECHNOLOGIES EN BIOLOGIE CLINIQUE

Edith BAR-GUILLOUX

Nous assistons actuellement à une accélération considérable des connaissances en biologie et en médecine. Elles progressent désormais plus rapidement que les connaissances en physique et en chimie qui, cependant, ont été à la base de ces avancées. En biologie médicale, les analyses simples réalisées dans le passé ont fait place à de nouvelles technologies, permettant la réalisation d'expériences *in vitro* et *in vivo* avec, pour résultat, une meilleure connaissance du monde vivant. Grâce à l'informatisation et au progrès dans la numérisation des signaux, les réponses d'organes, à divers stimuli se traduisent en termes de contrastes d'images et de profondeur de champ. L'amélioration des performances du diagnostic médical passe aujourd'hui par la nécessité d'obtenir la situation d'un organe par son image de manière dynamique au cours même de son fonctionnement.

UN PEU D'HISTOIRE

Dès le XVII^{ème} siècle, la microscopie a fait faire à l'étude du vivant un bond prodigieux. La radiologie, quelques trois cents ans plus tard, a provoqué un nouvel essor.

● Microscopie, cristallographie et approche du monde vivant

1611 : Johannes KEPLER propose un moyen pour fabriquer un microscope

1674 : Antonie VAN LEEUWENHOEK rend compte de sa découverte des protozoaires. Neuf ans plus tard, il observe des bactéries et des cellules de levure de bière.

1848 : Au printemps 1848, Louis PASTEUR, en utilisant la loupe et le microscope, sépare les cristaux d'acide paratartrique droits et gauches, ce qui le conduit à établir le principe de la dissymétrie moléculaire¹ (Fig. I).

1861 : Observation du vibrion cholérique par Louis PASTEUR, et début de la microbiologie.

● **L'imagerie médicale macroscopique** est née à la fin du XIX^{ème} siècle (1895) avec la découverte des rayons X par Wilhem RÖNTGEN (1845-1923), découverte qui lui valut le prix Nobel de physique en 1901.

La radiographie a rapidement été utilisée à grande échelle durant la Grande Guerre (1914-1918), puis après la guerre, pour détecter les foyers infectieux, notamment pour la prévention et le traitement de la tuberculose.

D'autres techniques, comme l'**angiographie**², puis le **scanner**³ sont ensuite apparues grâce à la numérisation de tranches d'images et à leur reconstitution dans l'espace en utilisant des logiciels spéciaux. Il faut y ajouter l'**échographie**



Figure I. Modèles de cristaux droit et gauche de tartrate d'ammoniac, réalisé par Louis PASTEUR lors de ses études de cristallographie et de sa découverte de la dissymétrie moléculaire (Coll. Musée Pasteur, réf. D150).

qui utilise la réflexion d'ultrasons par les organes, apparue dans les années 1980 et enfin, la **résonance magnétique nucléaire** (RMN).

Les premières expériences de RMN ont été conduites à la fin de l'année 1945 par deux équipes américaines. Les premiers résultats furent publiés en 1946 par Edward M. PURCELL et Felix BLOCH, prix Nobel de physique en 1952. La méthode prit son essor grâce aux travaux de Richard R. ERNST au début de 1970 (prix Nobel de chimie, 1991). La RMN est une spectrométrie d'absorption associée aux spins des noyaux. En biologie, la RMN a permis d'établir la structure tridimensionnelle de molécules complexes, comme la vitamine B12. Le belge Jean JENNER proposa en 1971 de faire une spectroscopie en deux dimensions. La mise en pratique de la RMN 2D se fit en 1975-1977. Tous ces progrès sont à l'origine du spectaculaire développement de la RMN dans plusieurs domaines : chimie, biologie, biochimie, pharmacie, étude des matériaux, ainsi que des applications en biologie médicale. L'application dans le domaine médical (1985) a donné l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

La **spectrométrie de masse** a pour principe la séparation en phase gazeuse de molécules chargées, en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse, initialement conçu par le britannique Joseph John THOMSON (prix Nobel 1936), est composé : d'un **système d'introduction**, qui peut être associé à une méthode séparative, d'une **source d'ionisation** qui varie en fonction du résultat recherché, d'un **analyseur** et d'un **détecteur**.

L'étape de fractionnement préalable a d'abord été réalisée par chromatographie en phase gazeuse développée dans les

¹ Voir article de G. BENTLEY et B. VULLIEZ-LE NORMAND, p. 108.

² Radiographie des vaisseaux après introduction dans leur lumière de produits de contraste opaques aux rayons X.

³ Tomodensitométrie avec traitement par ordinateur

années 1960. Le couplage avec la chromatographie en phase liquide (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry : LC. MS*) présentait un inconvénient : la nécessité d'évaporer la phase mobile chromatographique afin de faire passer les éléments à analyser en phase gazeuse. Cette dernière difficulté a été surmontée par l'apport de l'ionisation Electrospray (*Electro Spray Ionization*) développée par John B. FERNN en 1983 et publiée en 1988, ce qui valut à ce scientifique le prix Nobel de chimie en 2002.

Wolfgang PAUL reçut le prix Nobel de physique en 1989 pour le "développement de la technique de la capture d'ions".

Une nouvelle avancée dans le domaine de la spectrométrie de masse a été le couplage de la chromatographie liquide à deux spectromètres de masse connectés en série (LC MS MS). De nombreux appareils accessibles à tous (même si leur coût reste relativement élevé) ont été construits sur ce principe.

AVANCÉES ACTUELLES

La spectrométrie de masse appliquée aux petites molécules est à la base de nouveaux développements en biologie clinique : le dosage de l'homocystéine, le dépistage néonatal des maladies métaboliques par spectrométrie de masse en tandem (LC MS MS). En Allemagne⁴, sur douze maladies néonatales dont la loi exige le dépistage, huit sont dépistées par le LC MS MS. En France, un groupe de travail a été créé (SFBC⁵, en collaboration avec l'AFDPHE⁶ et la SFEIM⁷) "pour étudier la faisabilité des dépistages en comparant les différentes machines, ainsi que les réactifs présents sur le marché⁸".

Les domaines d'application des nouvelles techniques ne cessent de s'étendre. Trois technologies, essentielles pour l'avenir de la biologie, sont développées dans les pages suivantes. Leur description ne pourra qu'intéresser les biologistes et les cliniciens car il devient de plus en plus urgent de se familiariser avec les méthodes employées.

1. **La cristallographie** des protéines permet de connaître leur structure tridimensionnelle et de comprendre leurs fonctions au niveau moléculaire. Aujourd'hui, le nombre de structures de protéines déposées est supérieur à 50.000. Ce résultat est obtenu grâce à l'apport de trois facteurs : les protéines recombinantes, l'informatique et l'instrumentation (synchrotron et robotique).

Les auteurs, Graham BENTLEY et Brigitte VULLIEZ-LE NORMAND, expliquent, à l'aide de deux exemples importants, la démarche suivie à partir des résultats cristallographiques. Le premier exemple concerne la reconnaissance immunitaire humorale : structure des anticorps (immunoglobulines) impliquées dans la réponse humorale. Le second, la reconnaissance des protéines impliquées dans la réponse immunitaire cellulaire, récepteur des cellules T et molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

2. Les nouvelles technologies en **microscopie et imagerie** sont présentées par Olivier RENAUD qui en discute les limitations.

En quelques années, on est passé de la microscopie à haute résolution et de la microscopie corrélative à l'imagerie *in vivo* et, enfin, à des systèmes de criblage complexe à haut débit. Le développement de ces systèmes est étroitement lié à celui d'instruments robotiques sophistiqués, de logiciels de traitement ainsi qu'à des instruments de cytométrie de flux.

Les dernières avancées nécessitant le regroupement de technologies parfois distinctes, l'Institut Pasteur a créé une structure unique appelée *Imagopole*, qui regroupe la plate-forme d'imagerie dynamique, à laquelle l'auteur appartient, la plate-forme de microscopie ultrastructurale et la plate-forme de microscopie en flux.

3. Le troisième article a pour sujet **la spectrométrie de masse**. Après une série d'informations données d'une façon très didactique, les auteurs, Jean-François HEILLIER, Erwan WERNER, Céline DUCRUIX, Eric EZAN et Christophe JUNOT, abordent les applications de la spectrométrie de masse en biologie et en médecine, ce qui devrait être d'un grand intérêt pour tous les biologistes et terminent par l'analyse métabolomique.

PERSPECTIVES EN BIOLOGIE MÉDICALE ET NORMALISATION

L'évolution des techniques a rendu obsolètes les normes qui encadraient l'exercice de la biologie médicale. Il fallait donc en changer, comme l'a précisé en avril 2006 le rapport⁹ de l'inspection générale des affaires sociales (IGAS) piloté par Françoise LALANDE¹⁰.

La prise en main, par les pouvoirs publics, du dossier de l'évolution de la biologie s'est concrétisée avec l'installation au Ministère de la Santé d'un groupe de travail fin octobre 2007.

L'organisation de la profession est déjà soumise à la pression européenne. Les laboratoires d'analyses médicales doivent se préparer à une véritable révolution, tant en ce qui concerne la répartition des capitaux de ceux qui les détiennent, que du traitement des prélèvements biologiques. Aujourd'hui, seul un médecin ou un pharmacien peut détenir plus de 25% du capital d'un laboratoire d'analyses. À partir de 2009, n'importe qui pourra devenir propriétaire à 100% d'un centre d'analyses.

Actuellement, une grande majorité du travail doit encore être faite sur le lieu même où les prélèvements ont été effectués, mais bientôt seront créées des plates-formes techniques où seront regroupées les analyses de plusieurs laboratoires à quelques kilomètres à la ronde.

Il y aura donc concentration des laboratoires et mise au point de nouvelles techniques permettant des dosages en grandes séries.

Aux Journées Internationales de Biologie des 7, 8, 9 novembre 2007, on pouvait déjà constater la concentration des moyens (matériel et réactifs étant commercialisés par le même groupe) ainsi que l'apparition de nouveaux automates.

⁴ Stephan BURGHARDT, Tandem mass spectrometry for neonatal screening, *Clinical Laboratory International* (2007), 31, 6, 14-17 - Site web : cli-online.com & search #A23786#

⁵ Société Française de Biologie Clinique

⁶ Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant

⁷ Société Française pour l'Etude des Erreurs Innées du Métabolisme

⁸ Roselyne GARNOTEL, JIB 2007.

⁹ IGAS-Rapport Lalande sur la biologie (05/09/2006).

¹⁰ Membre de l'Inspection générale des Affaires sociales

LA CRISTALLOGRAPHIE DES PROTÉINES : DU CRISTAL À LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

Graham BENTLEY et Brigitte VULLIEZ-LE NORMAND

Institut Pasteur¹, Paris

RÉSUMÉ

La connaissance des structures tridimensionnelles des protéines est essentielle pour comprendre leurs fonctions au niveau moléculaire et pour aborder de nouvelles approches thérapeutiques, telles que la conception rationnelle de médicaments. Parmi les différentes techniques utilisées pour déterminer les structures protéiques, la radiocristallographie détermine les positions atomiques avec la plus grande précision. La méthode repose sur l'utilisation des intensités enregistrées des rayons X diffractés par un cristal afin de reconstituer la structure moléculaire à partir de la distribution de la densité électronique dans la maille élémentaire, motif de base répétitif du cristal. Le premier modèle atomique d'une protéine, celui de la myoglobine, a été publié il y a 50 ans. L'évolution de la cristallographie des protéines est présentée dans cet article en faisant plus particulièrement référence à l'impact de la connaissance des structures sur notre perception et compréhension de la reconnaissance immunitaire humorale et cellulaire.

INTRODUCTION

La connaissance de la structure tridimensionnelle des protéines peut considérablement aider à appréhender leur fonction dans les organismes vivants et fournit les bases pour concevoir des expériences en vue d'évaluer des hypothèses sur leur rôle biologique. La connaissance de ces structures peut, en outre, aboutir à des applications importantes dans le domaine biomédical, et a assurément contribué significativement à de nombreux développements thérapeutiques, plus particulièrement dans le domaine de la conception de médicaments. On peut citer, par exemple, le développement et l'optimisation de nombreux inhibiteurs de la protéase du HIV-1 [10]. L'élucidation de la fonction biologique d'une protéine à partir de sa structure et l'exploitation sous-jacente de cette connaissance en thérapeutique dépend de l'obtention de coordonnées atomiques précises de cette molécule. Parmi les différentes techniques utilisées de nos jours pour déterminer la structure des protéines, la radiocristallographie fournit les détails les plus rigoureux de leur organisation atomique dans les trois dimensions.

1. QU'EST-CE QUE LA RADIOCRISTALLOGRAPHIE ?

L'apparence régulière des cristaux reflète l'ordre microscopique sous-jacent de l'arrangement des molécules formant le réseau cristallin (Fig. I).

En 1849, le jeune Louis PASTEUR avait déjà compris cela, bien avant la détermination de la première structure (NaCl) par diffraction des rayons X en 1915. Son observation perspicace des cristaux racémiques de tartrate d'ammonium et de sodium lui permit de séparer manuellement les cristaux, selon leur morphologie, en deux catégories distinctes qu'il démontra être chimiquement identiques mais différentes sur le

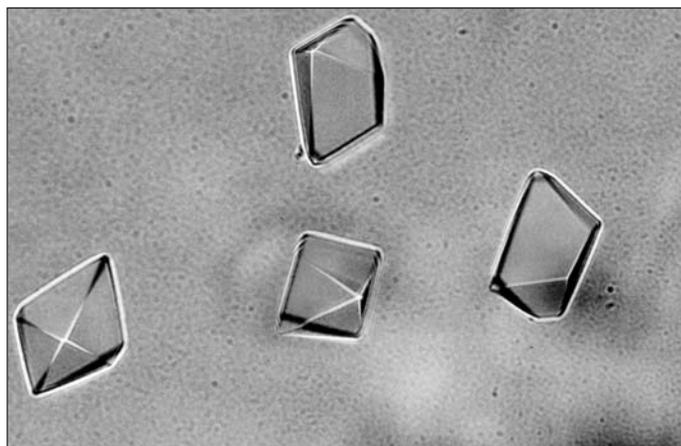


Figure 1 : Cristaux de la Cellobiohydrolase CelS, enzyme digérant la cellulose, en complexe avec un substrat (photo gracieusement fournie par H. SOUCHON)

plan structural en vertu de la chiralité de l'anion tartrate - la symétrie miroir reliant les deux morphologies cristallines identifiées étant la conséquence macroscopique de la symétrie miroir distinguant les formes D et L de l'anion tartrate.

Un cristal est composé d'une brique de base, appelée "maille élémentaire", qui se répète par translation régulière dans les trois dimensions pour donner au cristal son volume. La maille contient une ou plusieurs molécules placées dans un arrangement spatial précis. En raison du réseau tridimensionnel ainsi formé, les photons d'un faisceau de rayons X parallèles frappant le cristal diffusent dans certaines directions seulement, générant des taches d'intensité discrètes que l'on peut enregistrer, par exemple, sur un film ou un détecteur photosensible (Fig. II). Ce phénomène est appelé **diffraction**. Les intensités des taches de

¹ Unité d'Immunologie Structurale, CNRS URA 2185, Département de Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

Tél : 01 45 68 86 10, téléc. : 01 40 61 30 74 - courriel : bentley@pasteur.fr

Site web : www.pasteur.fr/recherche/unites/ImmStr/accueil.html

diffraction dépend de la distribution électronique dans la maille élémentaire, les rayons X interagissant fortement avec les électrons des atomes. Comme les longueurs d'onde des rayons X habituellement utilisés en cristallographie (1-2 Å) sont du même ordre de grandeur que la longueur des liaisons chimiques, la mesure des intensités de diffraction des rayons X par un cristal peut fournir une description structurale du contenu de la maille élémentaire à résolution atomique.

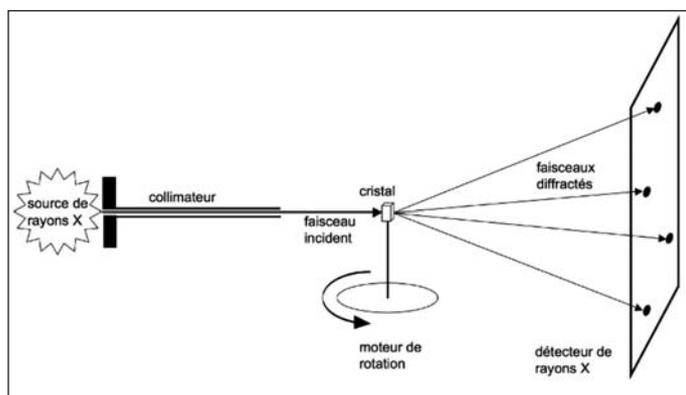


Figure II : Représentation schématique d'une expérience de diffraction. Un faisceau parallèle fin de rayons X produit par un collimateur est dirigé sur le cristal. Les rayons X diffractés par le cristal sont enregistrés sur un détecteur placé perpendiculairement au rayon incident. Le cristal tourne de façon uniforme sur un axe perpendiculaire au rayon incident sur une gamme angulaire qui dépend de l'orientation du cristal et de sa symétrie (typiquement entre 90° et 180°) ; ceci assurant que toutes les données de diffraction sont enregistrées.

La **structure moléculaire tridimensionnelle** peut être reconstituée à partir des intensités de diffraction en calculant la distribution de la densité électronique $\rho(x,y,z)$ dans la maille élémentaire comme une série de Fourier donnée par l'équation de la figure III. Dans cette série, les coefficients sont la combinaison des facteurs de structure F, qui dérivent directement des intensités de diffraction, et des phases ϕ . Contrairement aux facteurs de structure, cependant, les phases ne peuvent être obtenues directement à partir des mesures de diffraction. Elles sont obtenues par l'une des deux techniques utilisées en cristallographie des protéines : le **remplacement isomorphe** (introduisant des données de diffraction supplémentaires de cristaux modifiés par fixation spécifique d'atomes de métaux lourds à la protéine) et le **remplacement moléculaire** (en utilisant l'information d'une protéine homologue dont la structure est connue). À l'aide des facteurs de structure mesurés et des phases dérivées, un modèle atomique préliminaire de la protéine peut être construit dans la densité électronique calculée (Fig. III) puis amélioré par affinement pour obtenir le jeu de coordonnées atomiques concordant le mieux avec les données de diffraction.

2. CRISTALLOGRAPHIE DES PROTÉINES

Au commencement de la radiocristallographie au début du 20^{ème} siècle, l'analyse structurale des petites molécules était aisée, mais la cristallographie des protéines paraissait très au-delà du domaine du possible. Cependant, les premières images de diffraction obtenues avec des cristaux de pepsine en 1934 montrèrent que

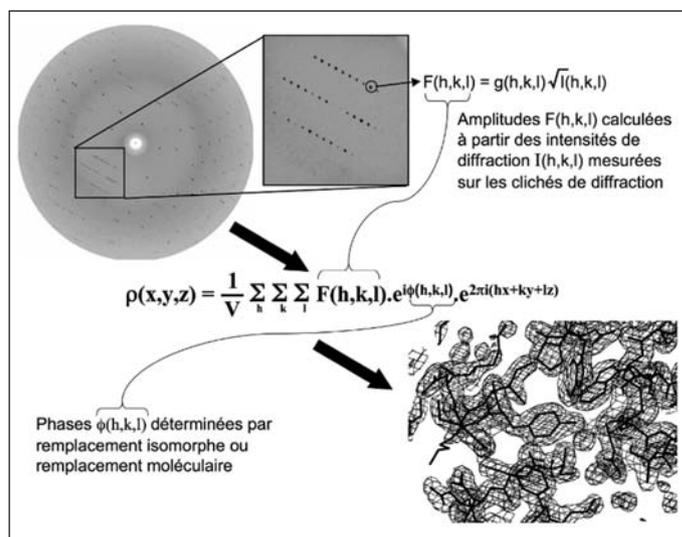


Figure III : Des intensités de diffraction aux densité électronique et structure atomique.

Les intensités des taches de diffraction $I(h,k,l)$ sont enregistrées sur un détecteur sensible aux rayons X (en haut à gauche), et les amplitudes correspondantes $F(h,k,l)$ sont calculées comme décrit (en haut à droite). Chaque intensité (ou amplitude) est identifiée par un jeu de coordonnées dans l'espace de diffraction (h,k,l) qui prend des valeurs intégrales. Le paramètre $g(h,k,l)$ est un facteur de correction géométrique appliqué à chaque intensité ; il dépend de la direction des rayons incidents et diffractés et de la polarisation du faisceau de rayons X incidents. La densité électronique ρ est calculée pour toutes les positions (x,y,z) de la maille élémentaire comme la série de Fourier indiquée dans la partie centrale de la figure. Les coefficients de cette série sont le produit des amplitudes $F(h,k,l)$ et de l'exponentielle de la phase $\phi(h,k,l)$, qui est déterminée par remplacement isomorphe ou remplacement moléculaire (voir le texte). Un détail de la densité électronique d'une protéine, sous la forme d'une isocourbe, et le modèle atomique correspondant de cette région de la molécule, représenté par des lignes pleines pour indiquer les liaisons chimiques covalentes, est représenté dans la partie basse de la figure à droite. Le tracé de la chaîne polypeptidique et l'orientation des chaînes latérales des acides aminés, définis par la densité électronique, peuvent être examinés en utilisant un système graphique et le modèle atomique de la protéine est ajusté pour accommoder les contours de la densité électronique.

l'information structurale à résolution atomique était bien présente dans les données obtenues. Mais trois décades furent nécessaires avant que l'étude de la structure cristalline de la myoglobine en 1958, suivie bientôt par celle de l'hémoglobine, fournisse les premières données structurales tridimensionnelles de protéines - permettant, en l'occurrence, un aperçu des mécanismes moléculaires liés au transport de l'oxygène à partir des poumons et son transfert consécutif aux tissus périphériques.

2.1. PROGRESSION DU NOMBRE DE STRUCTURES PROTÉIQUES DÉTERMINÉES PAR RADIOCRISTALLOGRAPHIE

Aujourd'hui, le nombre de structures de protéines déposées dans la "Protein Data Bank" est supérieur à 50.000 (site web : www.rcsb.org), conséquence de la croissance exponentielle de la détermination de structures par radiocristallographie.

Un certain nombre de facteurs sont responsables de cet accroissement.

2.1.1. La production de protéines recombinantes, qui débuta dans les années 70, est peut-être le facteur le plus important car, précédemment, les protéines devaient être extraites et purifiées à l'échelle du milligramme à partir d'échantillons biologiques (l'hémoglobine et la myoglobine à partir du sang, le lysozyme à partir du blanc d'œuf, les enzymes de la voie de la glycolyse à partir de tissus animaux, pour citer quelques-uns des premiers exemples résolus par cristallographie), limitant l'étendue des questions biologiques qui pouvaient ainsi être abordées. De nos jours, l'utilisation de protéines recombinantes permet aux cristallographes de surmonter ces restrictions et d'aborder une gamme beaucoup plus large de problèmes biologiques.

2.1.2. L'informatique a joué un rôle primordial dans l'évolution de la cristallographie des protéines, avec des conséquences pour le traitement des données brutes (mesures de dizaines de milliers - ou, dans certains cas de millions - d'intensités de diffraction) et la détermination des phases pour les séries de Fourier de densité électronique, de même que l'utilisation des outils graphiques pour analyser les détails de ces molécules présentant des organisations complexes. Les ordinateurs puissants, à notre disposition aujourd'hui, ont ouvert la voie pour développer des algorithmes sophistiqués à ajouter à la panoplie du cristallographe.

2.1.3. L'instrumentation est le troisième domaine du développement technologique qui a contribué à l'impact grandissant de la cristallographie des protéines. Les synchrotrons avec des lignes spécialement aménagées pour les besoins de la cristallographie des protéines fournissent des sources de rayons X très intenses qui permettent d'enregistrer un jeu complet de données de diffraction d'un cristal en un quart d'heure dans les cas typiques, une tâche qui prendrait plusieurs jours sur une source classique. Avec ces sources de rayons X intenses, il est maintenant possible de collecter des données pour un cristal de 5 microns de diamètre. Parallèlement à ces développements pour une acquisition rapide des données de diffraction, la technologie des détecteurs de rayons X a dû s'adapter : enregistrer les données sur un film est à la fois inefficace et consomme beaucoup de temps, ce qui a rendu cette technique obsolète depuis plus de deux décades. La cristallisation des protéines a bénéficié de la robotique car il s'agit d'un problème multiparamétrique ; la recherche des conditions pour lesquelles un cristal se forme peut s'avérer très consommatrice en temps et en matériel, plusieurs centaines de tampons de cristallisation étant susceptibles d'être testés avant l'obtention de résultats satisfaisants. Les robots de cristallisation et les robots de visualisation pour estimer les résultats ont réduit considérablement les efforts pour obtenir des cristaux diffractant convenablement.

2.2. EXTENSION DU NOMBRE DES QUESTIONS SCIENTIFIQUES ABORDÉES

L'étendue des questions scientifiques qui peuvent être abordées par cristallographie des protéines s'est considérablement élargie, résultat de développements technologiques incessants. D'une part ces nouvelles perspectives scientifiques ont été ouvertes par l'apparition de nouvelles possibilités technologiques, d'autre part l'avancement de la technologie a été

orienté par les besoins de la cristallographie des protéines. La complexité des structures qui attestent de cette évolution inclut la description structurale d'une multitude de virus complets, de celles de l'ARN polymérase [3] et de la particule ribosomale. Cette dernière, par exemple, a donné un aperçu des détails moléculaires de la machinerie qui sert à la synthèse des protéines et, sur la base de ces données structurales, de nouveaux antibiotiques sont en cours de développement [9,11].

3. DE L'IMMUNOLOGIE À LA STRUCTURE

La radiocristallographie des protéines a largement contribué à notre connaissance de leur fonction et aux développements d'applications biomédicales. Une illustration en est l'impact de la structure tridimensionnelle sur notre perception de la reconnaissance antigénique.

3.1. RECONNAISSANCE IMMUNE HUMORALE

Les premières protéines du système immunitaire qui ont été analysées par cristallographie furent les **anticorps (ou immunoglobulines)** qui sont impliqués dans la réponse humorale de la reconnaissance antigénique. Les immunoglobulines sont composées de chaînes lourdes et légères, liées l'une à l'autre de façon covalente par des ponts disulfures, comme indiqué sur la figure IV. La séquence des domaines N-termi-

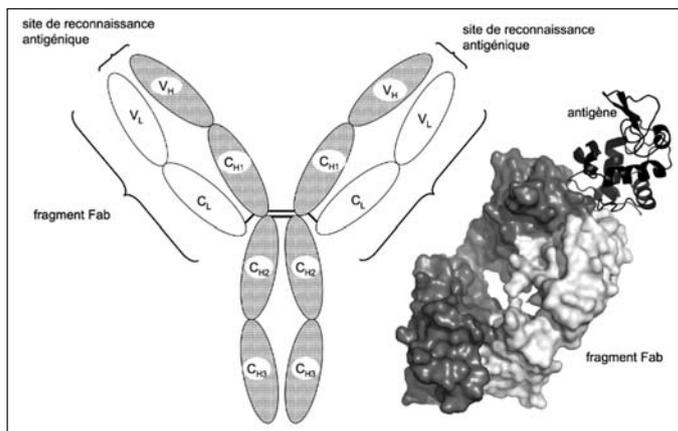


Figure IV : La structure des anticorps.

- A gauche : L'organisation des deux chaînes lourdes et des deux chaînes légères d'une immunoglobuline IgG est représentée schématiquement. Chaque chaîne lourde comprend quatre domaines (ovales foncés) désignés V_H , C_{H1} , C_{H2} et C_{H3} et chaque chaîne légère comprend deux domaines (ovales clairs) nommés V_L et C_L . Les deux chaînes lourdes sont jointes de façon covalente par deux ponts disulfures (indiqués comme de courtes lignes solides) et chaque chaîne légère est liée à la chaîne lourde par un pont disulfure. Les domaines variables, localisés à l'extrémité N-terminale de chaque chaîne, forment deux sites de reconnaissance identiques. Les fragments Fab se lient à l'antigène, comprenant une chaîne légère entière et les domaines V_H et C_{H1} de la chaîne lourde, sont obtenus par coupure protéolytique de la chaîne lourde entre le pont disulfure liant chaîne lourde et chaîne légère et celui liant les deux chaînes lourdes.
- A droite : structure cristalline du complexe anticorps-antigène formé par le fragment Fab de l'anticorps monoclonal D1.3 et son antigène : le lysozyme de blanc d'oeuf de poule (Protein Data Bank code : IFDL). Le Fab est représenté en forme de surface moléculaire (chaîne lourde en gris foncé, chaîne légère en gris clair) ; le lysozyme est représenté sous la forme d'un ruban.

naux des chaînes lourde et légère varie entre les différents anticorps, et chaque domaine variable présente trois régions distinctes qui sont hypervariables. Cette observation suggère que ces régions hypervariables, trois pour chaque domaine, sont regroupées ensemble par repliement des chaînes polypeptidiques et association quaternaire de deux domaines variables (l'un, d'une chaîne lourde et l'autre, d'une chaîne légère) pour créer sur la molécule d'anticorps une surface continue qui forme le site de liaison de l'antigène. La grande variabilité de séquences au site de liaison des différents anticorps expliquerait le vaste répertoire d'antigènes pouvant être reconnus par le système immunitaire.

Les premières structures d'anticorps (fragment Fab = fragment liant l'antigène) qui commencèrent à apparaître dans les années 70 confirmèrent cette hypothèse [1, 4]. Aujourd'hui, des centaines de structures de fragments d'anticorps (ainsi que quelques immunoglobulines entières) sont présentes dans la *Protein Data Bank*. Nombre d'entre elles en complexe avec l'antigène, révélant comment des molécules de diverses formes, tailles et compositions chimiques (protéines, peptides, carbohydrates, acides nucléiques, haptènes) sont reconnues par le répertoire d'anticorps. Sont apparues des règles qui permettent de prédire avec précision la conformation des régions hypervariables et de modéliser les sites de liaison des antigènes. L'accumulation de connaissances sur la structure des anticorps a contribué largement à l'utilisation de l'ingénierie des anticorps pour les applications biomédicales telles que la thérapie anti-cancéreuse.

3.2. RECONNAISSANCE IMMUNE CELLULAIRE

Deux types de protéines jouent un rôle-clé dans la reconnaissance de l'antigène par la réponse immune cellulaire. Ce sont les **récepteurs des cellules T**, qui reconnaissent l'antigène et ont une structure proche de celle des anticorps, et les molécules hautement polymorphes du **complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)** qui présentent l'antigène aux récepteurs des cellules T. Au contraire des anticorps qui reconnaissent les antigènes intacts, les récepteurs des cellules T reconnaissent des fragments de l'antigène transformé, liés aux molécules du CMH. Les molécules du CMH sont de deux types, appelés **classes I et II**.

- Les antigènes peptidiques présentés par les molécules de **classe I** sont générés par le protéosome dans le cytoplasme cellulaire ; des récepteurs sur les cellules T cytotoxiques détectent la présence dans les cellules infectées d'antigènes étrangers provenant de pathogènes intra-cellulaires, qui seront détruits ultérieurement.
- Les peptides présentés par les molécules de **classe II** dérivent de la protéolyse endosomale d'antigènes extracellulaires qui sont internalisés par des cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène : les **cellules B, les dendrocytes et les macrophages**. Ils sont reconnus par les récepteurs des cellules T auxiliaires, qui amorcent, par la suite, la sécrétion des anticorps.

La première structure d'un composant de la machinerie de reconnaissance antigénique cellulaire qui fut déterminée était celle de la molécule du CMH de classe I, HLA-A2 [2]. Bien que sa connaissance ait précédé celle des premières struc-

tures des récepteurs T ou des complexes ternaires récepteur T/CMH/ antigène, elle donna immédiatement une nouvelle perception de la reconnaissance antigénique qui avait jusqu'alors intrigué les immunologistes. Les deux classes I et II des molécules du CMH possèdent un sillon de liaison à l'antigène, formé par deux longues hélices parallèles entre elles mais disposées de façon à y nicher le fragment peptidique antigénique avec une forte affinité. Les deux hélices sont portées par une plate-forme formée par un feuillet β anti-parallèle. La connaissance des structures cristallines a révélé que les résidus polymorphes s'amassent aux alentours du sillon, soit sur les hélices, soit sur le plancher créé par le feuillet β , générant ainsi des sites de liaison spécifique des peptides pour chaque allèle du CMH. Ces résultats suggèrent que le récepteur de cellule T se lie à la partie supérieure du sillon de liaison du peptide, reconnaissant à la fois le peptide antigénique et la molécule du CMH et fournissant une explication, apparemment évidente, de la reconnaissance antigénique CMH restreinte. Ceci fut ultérieurement confirmé, quand les premières structures cristallines de complexes immuns ternaires commencèrent à être décrites. Le site de liaison de l'antigène du récepteur T, comme celui de l'anticorps, est une surface contiguë de la protéine formée par six régions hypervariables - trois pour chaque domaine variable - des deux chaînes polypeptidiques du récepteur (Fig. V).

La connaissance des structures cristallines des molécules du CMH a révélé que les peptides antigéniques liés se trouvent généralement dans une conformation étendue. Ceux des complexes de classe I sont courts, entre 8 et 11 résidus, l'espèce prédominante correspondant à un nonamère, tandis que ceux de classe II sont plus longs : environ 12 à 19 résidus (bien que les peptides puissent aussi comporter jusqu'à une trentaine de résidus).

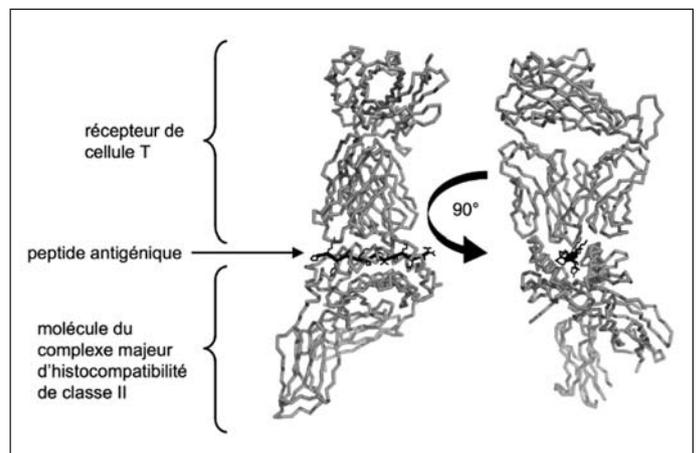


Figure V : Complexe formé par un récepteur de cellule T et une molécule du CMH de classe II portant un peptide antigénique. Deux vues orthogonales du complexe (perpendiculaire et parallèle au peptide antigénique) sont représentées : la molécule du CMH de classe II, HLA DR4, (en bas), l'antigène peptidique de 13 résidus dérivé de l'hémagglutinine d'un virus grippal (au centre) et le récepteur $\alpha\beta$ HAI.7 humain (en haut). Le récepteur de cellule T et la molécule du CMH sont indiqués en gris sous forme de squelette polypeptidique avec ses chaînes latérales (Protein Data Bank code : 1J8H).

- Les peptides de classe I présentent à leurs extrémités des résidus conservés qui ancrent le ligand dans des poches de liaison spécifique du sillon ; bien que, dans une conformation étendue, leur partie centrale dépasse souvent du site de liaison, faisant saillie vers le récepteur de la cellule T. La taille plus courte des peptides liés aux molécules du CMH de classe I est la conséquence de la présence, sur la molécule CMH, à chaque extrémité du sillon de liaison, d'acides aminés présentant des chaînes latérales volumineuses.
- Au contraire, le sillon de liaison des molécules de classe II est ouvert à ses extrémités et peut accommoder des peptides antigéniques plus longs. Les ligands de classe II sont enfouis plus profondément dans le sillon de liaison et sont donc moins exposés au récepteur de cellule T que les antigènes de classe I. Les études cristallographiques ont montré que les antigènes de classe II présentent généralement une conformation proche d'une hélice polyproline de type II. Contrairement aux antigènes de classe I, où les contacts sont largement confinés aux deux extrémités du ligand, les antigènes de classe II établissent de nombreux contacts conservés sur une grande proportion de la chaîne entière par l'intermédiaire des atomes de leur chaîne principale.

À partir de l'ensemble des structures cristallines du CMH, une vision globale se dessine pour expliquer le large répertoire de peptides antigéniques qui lient, de façon spécifique et avec une forte affinité, les produits d'un nombre limité de gènes du CMH présents chez un individu (<20). La spécificité provient du rôle-clé joué par les résidus d'ancrage conservés aux deux extrémités du peptide, dans le cas de la présentation par le CMH de classe I, et l'utilisation prédominante d'interactions par liaisons hydrogènes mettant en jeu la chaîne principale du peptide antigénique, dans le cas de la présentation par le CMH de classe II. La haute affinité pour les peptides des deux classes de CMH, qui est essentielle pour une présentation stable de l'antigène, est assurée par des interactions fortes, polaires et apolaires, efficacement enfouies dans le sillon de liaison formé par les deux longues hélices de la molécule du CMH.

La connaissance des structures cristallines du complexe ternaire récepteur cellule T/peptide/CMH a permis d'affiner nos idées sur la reconnaissance antigénique dans la réponse immune cellulaire [8], bien que le nombre de structures répertoriées jusqu'à présent soit très limitée (environ 20) en comparaison de la richesse des données sur les structures anticorps/antigène. L'orientation relative entre le récepteur et le complexe CMH/peptide semble restreinte par la topologie de la molécule du CMH dans le site de liaison du peptide, présentant ainsi une interface assez conservée entre les deux composants. Globalement, les première et seconde régions hypervariables sur les deux chaînes du récepteur de la cellule T entrent en contact avec les deux hélices de la molécule du CMH, tandis que la troisième région hypervariable, hautement variable, interagit étroitement avec le peptide antigénique. Une telle division des tâches dans la reconnaissance du récepteur de la cellule T assure le contrôle par le système immunitaire, des antigènes provenant de la machinerie protéolytique, à travers un répertoire conservé de contacts avec la molécule du CMH, tout en

maintenant la variabilité nécessaire à la reconnaissance de la diversité des antigènes par l'implication de la région centrale du site de liaison de l'antigène, dominé par la troisième région hypervariable de chaque chaîne de récepteur.

Cependant, la connaissance globale de la reconnaissance antigénique par les cellules T, bénéficierait d'une représentation structurale du complexe du récepteur de cellule T lié à la membrane, qui inclut les polypeptides CD3 et les chaînes de récepteurs antigéniques. De plus, cela pourrait conduire à inclure une image structurale de la synapse immunologique, qui pourrait aussi comprendre l'association entre le complexe CMH/peptide et les co-récepteurs CD4 ou CD8 pour recrutement par la cellule auxiliaire et la cellule cytotoxique respectivement, simultanément avec le complexe du récepteur de la cellule T. Mais ceci pourrait bien dépasser le domaine de la cristallographie et pourrait requérir d'autres approches structurales (voir ci-dessous). Quoi qu'il en soit, les structures cristallines de certaines des chaînes CD3 individuelles et de CD4 et CD8 en complexe avec les molécules du CMH de classes II et I respectivement, ont été déterminées pour accroître notre compréhension des interactions qui ont lieu.

4. AVENIR DE LA CRISTALLOGRAPHIE DES PROTÉINES

4.1. GÉNOMIQUE STRUCTURALE

Les avancées technologiques récentes dans la détermination de la structure des protéines (robotique, synchrotrons, puissance des ordinateurs) ont ouvert la voie à la détermination à haut débit des structures, ou génomique structurale, en aval de la réussite du séquençage du génome complet de nombreux organismes, depuis la bactérie jusqu'à l'homme. Le séquençage du génome a produit une abondance de données mais, pour plusieurs protéines déduites des gènes, leur rôle biologique n'est pas clairement identifié car la séquence n'établit aucune relation évidente avec celles de protéines de fonction connue. L'annotation des génomes et l'identification de protéines ayant un rôle fonctionnel critique est un des objectifs-clés de cette entreprise. Ainsi, un indice de la fonction d'une protéine peut être déduit de sa structure, grâce à la similarité du repliement peptidique avec des protéines de fonction et de structure connues, même si l'identité de séquence est faible.

En conséquence, un des buts majeurs de la génomique structurale est de fournir ces indices de la fonction de façon à accroître l'annotation du génome et, par extension, de fournir des informations structurales utiles pour la conception rationnelle de médicaments (par exemple) pour ces produits de gène qui semblent des cibles judicieuses pour des développements thérapeutiques. De telles initiatives sont couramment menées pour trouver de nouvelles stratégies contre les maladies infectieuses (par exemple, la tuberculose et le paludisme) et pour la recherche anti-cancéreuse.

4.2. APRÈS LE CRISTAL ?

La radiocristallographie est la méthode adéquate pour obtenir des structures protéiques à résolution atomique mais, pour comprendre pleinement leur fonction, ces molécules nécessitent d'être situées dans leur contexte cellulaire où elles

interagissent avec d'autres composants moléculaires. Bien que des structures de grands assemblages moléculaires, tels que le ribosome, aient été déterminées par cristallographie, elles sont l'exception ; l'analyse des structures cristallines est toujours limitée par l'obtention de cristaux diffractant à haute résolution et, pour de grands assemblages de macromolécules biologiques, de tels efforts peuvent échouer.

La cryoélectromicroscopie, cependant, peut établir un lien entre structures atomiques de molécules individuelles et grands assemblages [6]. Cette technique est basée sur la reconstitution de la forme tridimensionnelle des molécules ou d'assemblages de molécules, par analyse détaillée de plusieurs micrographies individuelles, vues sous différentes orientations par microscopie électronique. Cette méthode est bien adaptée à l'analyse d'assemblages isolés de grandes structures, bien qu'elle soit limitée en résolution - typiquement 10 à 20 Å. Cette résolution, cependant, est généralement suffisante pour accommoder de façon non ambiguë les modèles atomiques individuels des protéines déterminés par cristallographie dans le volume moléculaire défini par microscopie électronique. Dans certains cas, où une symétrie interne est présente, la reconstitution d'assemblages macromoléculaires isolés peut approcher 4 Å de résolution ; c'est le cas, par exemple, des virus icosaédraux [7].

La cryoélectromicroscopie peut être réalisée au niveau cellulaire, en utilisant la tomographie, pour reconstituer la distribution tridimensionnelle d'espèces et d'assemblages macromoléculaires dans les différents compartiments cellulaires à partir d'images de la cellule prises dans plusieurs directions différentes. Cette approche peut aisément distinguer des sous-structures avec une résolution de 40-50 Å, permettant d'identifier, par leur forme tridimensionnelle, les ribosomes et les protéasomes dont les structures ont été résolues par cristallographie (ou, peut-être, à partir de l'analyse d'assemblages macromoléculaires isolés à basse résolution). Des avancées techniques pourraient rapidement amener la résolution de cette approche à 20-30 Å, permettant une cartographie plus détaillée des structures de ces assemblages dans la cellule.

Les lasers à électrons libres, générant à partir de sources synchrotrons des rayons X cohérents très intenses, pourraient ouvrir la voie de la biologie structurale du futur. Bien que leur conception et les études de faisabilité en soient encore à un stade initial, les lasers à électrons libres travaillant dans la gamme d'énergie des rayons X seraient suffisamment intenses pour permettre la mesure de diffraction d'agrégats macromoléculaires, voire de molécules de protéines isolées, parant ainsi à la non disponibilité d'un cristal [5]. Cette possibilité deviendra cependant réalité dans une décade ou plus, vu les progrès technologiques requis.

CONCLUSION

La cristallographie des protéines occupe une place centrale dans le domaine de la biologie structurale parce qu'elle peut apporter des informations détaillées au niveau atomique sur les protéines et leurs fonctions. Bien que les structures cristallines fournissent seulement des vues statiques ou des instantanés de ce qui, en réalité, est un processus biologique dynamique, elles peuvent néanmoins engendrer des représentations pertinentes.

Dans les cas favorables, un ensemble de vues statiques peut révéler le déroulement de processus biologiques, comme dans l'exemple de la machinerie hautement dynamique du ribosome [9]. En exploitant la complémentarité entre la radiocristallographie et d'autres techniques structurales, telles que la cryoélectromicroscopie, on peut établir un lien entre les niveaux moléculaire et cellulaire de notre approche de la fonction biologique.

ABSTRACT

PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY - FROM CRYSTALS TO THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE

Three dimensional protein structures are of great utility, both for understanding their function at the molecular level and for the conception of novel therapeutic approaches, such as rational drug design. Among the different techniques used to determine protein structures, X-ray crystallography gives the greatest precision in the atomic positions. This technique relies on using the intensities recorded from X-rays diffracted by a crystal to reconstitute the molecular structure from the electron density distribution in the unit cell, the basic repeating motif of the crystal. The first atomic model of a protein, that of myoglobin, was published exactly 50 years ago; in this article, the evolution of protein crystallography to this day is discussed and particular reference is made to the impact of structure on our perception and understanding of humoral and cellular immune recognition.

MOTS-CLÉS : radiocristallographie, cristal, diffraction, structure tridimensionnelle, macromolécules biologiques

KEYWORDS: X-ray crystallography, crystal, diffraction, three-dimensional structure, biological macromolecules

BIBLIOGRAPHIE

1. ALZARI PM, LASCOMBE MB, POLJAK RJ. Three-dimensional structure of antibodies. *Ann Rev Immunol.* 1988, **6**, 555-580.
2. BJORKMAN PJ, SAPER MA, SAMRAOUI B, BENNETT WS, STROMINGER JL, WILEY DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 1987, **329**, 506-512.
3. CRAMER P, BUSHNELL DA, KORNBERG RD. Structural basis of transcription : RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science.* 2001, **292**, 1863-1876.
4. DAVIES DR, PADLAN EA, SEGAL DM. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Ann Rev Biochem.* 1975, **44**, 639-667.
5. HAJDU J. Single-molecule X-ray diffraction. *Curr Opin Struct Biol.* 2000, **10**, 569-573.
6. ROBINSON CV, SALI A, BAUMEISTER W. The molecular sociology of the cell. *Nature.* 2007, **450**, 973-982.
7. ROSSMANN MG, MORAIS MC, LEIMAN PG, CHANG W. Combining X-ray crystallography and electron microscopy. *Structure.* 2005, **13**, 355-362.
8. RUDOLPH MG, STANFIELD RL, WILSON IA. How TCRs bind MHCs, peptides and coreceptors. *Ann Rev Immunol.* 2006, **24**, 419-466.
9. STEITZ TA. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008, **9**, 242-253.
10. WLODWAR A. Rational approach to AIDS drug design through structural biology. *Annu Rev Med.* 2002, **53**, 595-614.
11. YONATH A. Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism and cellular regulation. *Ann Rev Biochem.* 2005, **74**, 649-679.

NOUVELLES TECHNOLOGIES EN MICROSCOPIE ET EN IMAGERIE

Olivier **RENAUD**¹
Institut Pasteur, Paris

RÉSUMÉ

La microscopie a un grand nombre d'applications dans les sciences du vivant, car elle permet d'imager des processus biologiques. Le terme microscopie, qui vient du grec "micros" et "skopein", signifie "examiner le petit" et regroupe des technologies complémentaires. L'une d'elles, la microscopie optique, permet aux chercheurs d'étudier des processus dynamiques directement sur des échantillons vivants, que ce soit au niveau du tissu ou de la cellule. Malgré des limitations techniques, la microscopie confocale était, jusqu'à ces vingt dernières années, l'outil de choix pour de telles études. Cependant, des développements technologiques apparus récemment permettent de résoudre un grand nombre de ces inconvénients et améliorent significativement les performances de ces outils. Dans cet article, sont présentés les systèmes de microscopie à haute résolution, l'imagerie *in vivo* et les systèmes de criblage en image, ainsi que leurs applications dans la recherche biomédicale.

INTRODUCTION

C'est au XVII^e siècle qu'Antoine VAN LEEUWENHOEK décrit pour la première fois des "animalcules" (microbes) [2] grâce à l'utilisation de microscopes simples de sa fabrication. Par la suite, la microscopie optique deviendra un outil important pour le développement des connaissances en biologie et en particulier en microbiologie (découvertes de Louis PASTEUR). Aujourd'hui, les systèmes de **microscopie optique** sont associés à des systèmes d'imagerie (caméra, détecteur). Ces technologies sont très largement utilisées dans la recherche en biologie [10] et apportent aux chercheurs des outils très puissants pour l'analyse de processus biologiques dynamiques. Ainsi, l'acquisition d'images multidimensionnelles est une méthodologie très employée en biologie cellulaire. L'**imagerie multidimensionnelle** [27] par microscopie correspond à la visualisation et à la quantification d'événements au cours du temps et dans l'espace ; on parle généralement d'**imagerie 3D** (volume), **4D** (volume plus temps), etc. La qualité des images acquises a fortement bénéficié du développement de la microscopie dite **confocale**. En effet, cette technique permet de réaliser des sections optiques et de reconstruire en 3D les échantillons biologiques. Cependant, on peut définir quatre limitations majeures aux systèmes actuels de microscopie optique : le manque de résolution spatiale, la faible pénétration dans les tissus, l'accès physique limité et le faible débit expérimental. Dans de nombreux paradigmes expérimentaux, un ou plusieurs de ces facteurs peuvent être limitants. Par exemple, la résolution spatiale d'un microscope optique est souvent insuffisante pour une caractérisation détaillée de certains processus biologiques. Les nouvelles technologies en imagerie permettent maintenant de dépasser la limite de résolution définie par la diffraction optique (environ 200 nm) et offrent ainsi le moyen de se rapprocher de la résolution nécessaire pour accéder à une information moléculaire.

Dans d'autres cas, les cellules d'intérêt et les tissus sont inaccessibles, car ils sont situés en profondeur dans l'organisme ou ne peuvent être étudiés que lorsque les composants du tissu sont reconstitués artificiellement *ex vivo*. Des innovations dans la **microscopie intra-vitale** (I-V) et dans l'imagerie de tissus épais ou profonds contribuent à surmonter ces problèmes en permettant l'acquisition d'images de ces types de tissus, tout en restant dans des conditions physiologiques. La faible profondeur de pénétration, ainsi que les problèmes d'accessibilité physique sont particulièrement importants pour l'étude de modèles animaux de maladie. Parallèlement, des développements en optique et en technologie d'imagerie par fibre optique ont conduit à la miniaturisation de la **microscopie par fluorescence**. Ces nouveaux outils permettent l'acquisition d'images directement dans le petit animal.

Une autre limitation importante concerne l'**automatisation** de l'acquisition des images en microscopie. En effet, les microscopes de recherche haut de gamme présentent des configurations complexes et peu flexibles, ce qui rend leur utilisation difficile pour le **criblage à haut-débit** (*High-Throughput Screening: HTS*) de nouvelles molécules thérapeutiques. Des innovations récentes dans ce domaine permettent maintenant de réaliser des **criblages en images** (*High-Content Screening: HCS*) et à haut-débit.

Une gamme de nouvelles technologies est apparue dans le domaine de la microscopie et de l'imagerie : imagerie à haute résolution, imagerie *in vivo* et criblage en image à haut débit. Elles sont déjà appliquées par les laboratoires de recherche en biologie.

1. IMAGERIE À HAUTE RÉOLUTION

1.1. LA MICROSCOPIE OPTIQUE À HAUTE RÉOLUTION

Les nouveaux microscopes à haute résolution améliorent significativement la résolution spatiale des microscopes optiques. Ces microscopes permettent l'acquisition d'images à

¹ Plate-forme d'Imagerie Dynamique - Imagopole, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15. Tél : 01 44 38 92 07 ; téléc. : 01 45 68 89 49 ; Courriel : olivier.renaud@pasteur.fr ; Site Web : www.pfid.org

des résolutions macromoléculaires ou sub-microscopiques. Ils sont couramment utilisés pour l'examen détaillé de structures subcellulaires.

Pendant longtemps, on a considéré que la qualité et la résolution des images capturées avec des microscopes optiques étaient fixées par des lois physiques (principe de diffraction). Cette limite, qui découle de la physique fondamentale, a été décrite par la **théorie de la formation des images d'Abbe**. Selon cette théorie, la résolution latérale maximum que l'on peut obtenir avec un **microscope photonique** dépend de la longueur d'onde des photons et de l'ouverture numérique du système optique. La limite de résolution d'un microscope représente la plus petite distance en dessous de laquelle deux points voisins très petits ne seront plus distingués. Dans des conditions optimales, un microscope optique (Fig. I) possède une résolution latérale d'environ 200 nanomètres mais ne permet pas la réalisation de tranches optiques. La **microscopie confocale**, inventée en 1953 par Marvin MINSKY, mais commercialisée seulement dans les années 80, a rendu possible la réalisation de "sections optiques", et ainsi d'obtenir une information tridimensionnelle de l'échantillon (Fig. II). Cette approche procure une légère augmentation (+ 20%) de la résolution latérale (environ 160 nm) et une augmentation importante de la résolution axiale qui peut descendre à environ 500 nanomètres. Cependant, l'analyse spatiale détaillée de structures subcellulaires est fortement limitée par ces résolutions. En effet, une membrane cellulaire a une épaisseur d'environ 10 nanomètres ; une vésicule possède une taille de quelques nanomètres, etc.

Récemment, différentes équipes de recherche ont montré qu'il était possible de contourner cette limite de diffraction, et ainsi d'augmenter la résolution des microscopes optiques en utilisant, par exemple, des **processus de fluorescence non-linéaire** [13]. Ces innovations permettent d'atteindre des résolutions de 30 nm en **microscopie photonique**. Les stratégies utilisées sont très variées. Elles peuvent être basées sur une nouvelle géomé-



Figure I. Microscope de recherche. Un microscope de recherche droit qui est équipé d'une caméra CCD. L'ensemble du système est contrôlé par ordinateur. Ce système de microscopie permet d'acquérir des images en lumière transmise ou en fluorescence (microscope de la plate-forme d'Imagerie Dynamique de l'Institut Pasteur, photo par S. SPRAY).

trie des microscopes comme :

- la combinaison de deux objectifs pour optimiser la collecte de la lumière (microscopie 4pi et i5M),
- l'optimisation de l'angle de vue ou l'excitation de l'échantillon par rotation (tomographie 3D par fluorescence [21] ; *Selective Plane Illumination Microscopy : SPIM*),
- l'utilisation de méthodes d'interférences de l'image pour augmenter le contraste (microscopie en lumière structurée),
- la limitation de la zone excitée (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscope : TIRFM* ; Microscopie multi-photonique : MPM ; *Stimulated Emission Depletion : STED*),
- etc.

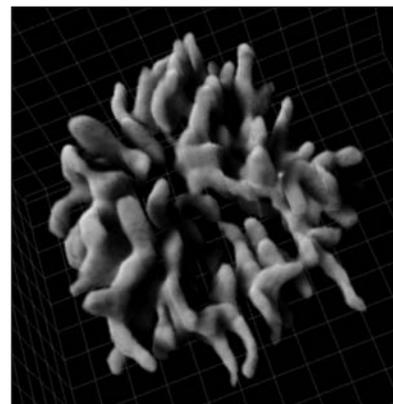


Figure II. Reconstruction tridimensionnelle de la chromatine d'une cellule humaine vivante en métaphase après acquisition par microscopie confocale (image de C. MACHU et O. RENAUD, Plate-forme d'Imagerie Dynamique, Institut Pasteur).

La **microscopie multi-photonique** (MPM) limite le volume excité grâce à l'utilisation d'une source laser pulsée. Le fluorochrome n'est excité que lorsque deux photons sont absorbés, événement qui n'est statistiquement possible que dans le plan focal. Grâce à cette technique, un volume très restreint de l'échantillon est excité, limitant du même coup la lumière parasite qui pourrait provenir des plans inférieurs ou supérieurs. En outre, la microscopie par **déplétion de l'émission de stimulation** [29] (STED) crée un petit volume d'excitation de la fluorescence grâce à l'utilisation de deux lasers pulsés qui vont agir, l'un pour réaliser l'excitation et, le second, de manière complémentaire, pour réduire le volume d'excitation au minimum (Fig. IIIa).

Les faisceaux laser utilisés présentent une géométrie complémentaire, afin que le laser qui éteindra la fluorescence puisse circonscrire l'excitation engendrée par le premier faisceau.

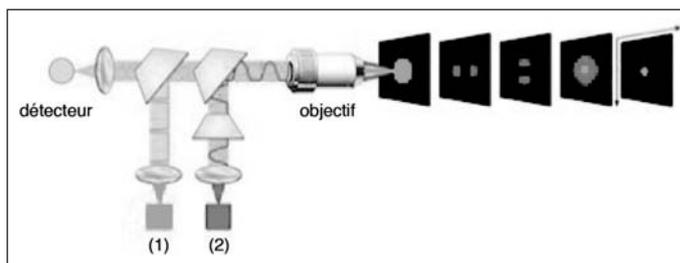


Figure IIIa. Principe d'acquisition en microscopie STED. Un premier laser (1) va permettre l'excitation des fluorochromes dans l'échantillon. Cependant, afin d'augmenter la résolution du microscope, un second laser (2) va éteindre la fluorescence autour du point d'excitation pour réduire la zone excitée. La zone effective d'excitation est représentée tout à fait à droite du schéma (image de <http://www.leica-microsystems.com/>).

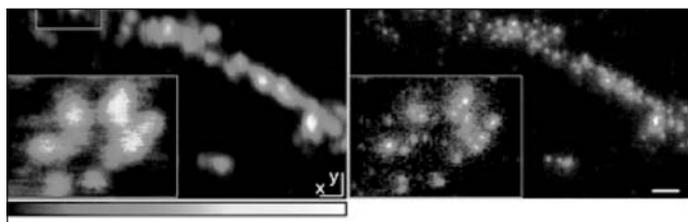


Figure IIIb. Exemple d'acquisition en microscopie STED. Les images représentent des vésicules synaptiques marquées acquises en microscopie confocale (à gauche) ou en microscopie STED (à droite). La microscopie STED permet de résoudre des vésicules synaptiques uniques dans la cellule nerveuse (voir encadré dans chaque image pour un grossissement). Image du Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen (<http://www.mpg.de/english/illustrationsDocumentation/documentation/pressReleases/2006/pressRelease20060412/index.html>).

Deux nouvelles méthodes ont encore repoussé les limites de résolution spatiale :

- BETZIG *et al.* [3] ont montré, qu'en utilisant la **“microscopie par localisation et photo-activation”** (*Photoactivated Localization Microscopy* : PALM), ils peuvent atteindre des résolutions de 2 à 25 nm. Cette méthode consiste à stimuler de manière répétée, et en utilisant une énergie d'excitation faible, une population de protéines fluorescentes photoactivables (PAFP). Les PAFP sont des molécules fluorescentes qui, pour atteindre leurs formes fluorescentes (dans le vert), doivent être préalablement activées par un flash de lumière violette. La série d'image obtenue par excitation successive est ensuite reconstruite pour créer une image unique hautement résolue.
- Dans un autre exemple, la **“microscopie par reconstruction optique stochastique”** (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*: STORM) [24], des fluorochromes (qui peuvent être **allumés** ou **éteints**) sont également utilisés et des cycles répétés d'acquisition d'images permettent de reconstruire une image composite de haute résolution (quelques nanomètres). Ces deux méthodes ont pour inconvénient la longueur d'acquisition des images qui peut prendre plusieurs heures.

En résumé, bon nombre de ces techniques d'imagerie à haute résolution n'a évolué que récemment, des laboratoires de physique aux applications biologiques. Des travaux supplémentaires sont encore nécessaires pour les rendre compatibles avec la biologie et donner, en particulier pour certaines d'entre elles, la possibilité de travailler avec des échantillons non fixés. Néanmoins, les améliorations obtenues concernant la résolution spatiale (Fig. IIIb) sont impressionnantes. D'ailleurs, il existe d'ores et déjà des systèmes commerciaux ayant intégré ces développements (par exemple, le microscope *Leica 4pi*). Ces améliorations ont un impact important sur les découvertes en biologie. A titre d'exemples, grâce à ces technologies, des chercheurs ont pu visualiser *in vivo* la plasticité des mitochondries dans des levures [7], celle de l'appareil de Golgi dans des cellules de mammifères [8] et étudier la fusion des vésicules avec la membrane plasmique [14, 15].

1.2. MICROSCOPIE CORRÉLATIVE

Malgré les développements importants de la résolution des microscopes optiques, la **microscopie électronique** reste le système d'imagerie le plus résolutif (environ 0,2 nanomètre). Cependant, cette technique ne permet pas de travailler sur des échantillons vivants. Dans ce but, une approche technologique, la **microscopie corrélative** (CLEM), a été développée. Elle combine l'utilisation de la microscopie optique et de la microscopie électronique, permettant de suivre, sur des échantillons vivants, des processus biologiques en microscopie photonique et de prendre, à un instant donné, sur le même échantillon, une image à très haute résolution par microscopie électronique. La méthode de fixation utilisée doit être très rapide et permettre une conservation optimale des structures biologiques. Pour cela, l'échantillon est cryo-fixé [19] par congélation rapide et peut être ensuite imagé par cryo-microscopie électronique. Des reconstructions à très haute-résolution par tomographie peuvent alors être réalisées [25]. Cette approche combinant les avantages de chaque technique de microscopie est en fort développement. Ces nouvelles méthodologies ont été utilisées avec succès, en particulier, dans différentes études sur les bactéries [16, 26] et sur les virus [5] et offrent donc de belles perspectives.

2. IMAGERIE IN VIVO

Contrairement à la microscopie à haute résolution, la **microscopie intra-vitale** (I-V) et l'imagerie de tissus en profondeur ont pour but d'examiner le comportement cellulaire *in vivo* ou *ex vivo* avec une bonne résolution. L'objectif principal de ces technologies est de recueillir l'information fonctionnelle concernant les processus dynamiques qui se produisent dans les tissus ou dans des organes qui sont maintenus dans leur état naturel (ou, tout au moins, dans un état physiologique satisfaisant). La microscopie I-V diffère de l'imagerie de l'animal entier qui est normalement menée avec des techniques non-invasives, mais dont la résolution spatiale est plutôt macroscopique.

2.1. LA MICROSCOPIE INTRA-VITALE ET L'IMAGERIE EN PROFONDEUR

La **microscopie I-V** et l'**imagerie de tissus en profondeur** présentent un ensemble différent de défis pour la microscopie à haute-résolution, à savoir, un accès physique difficile et une diffusion importante de la lumière dans les tissus. En particulier, l'accès *in vivo* aux tissus d'intérêt est souvent incompatible avec les optiques normalement utilisées en microscopie et, par ailleurs, nécessite le maintien, sur de longues périodes, de l'animal ou de tissus fragiles dans des configurations peu commodes (faible accessibilité des microscopes). Plus important encore : les tissus biologiques absorbent et dispersent la lumière. Cela réduit fortement la profondeur de pénétration et augmente le bruit de fond. Les ondes courtes (dans l'ultraviolet) sont, normalement, les plus dispersées et présentent des niveaux d'autofluorescence élevés. Pour ces raisons, des ondes d'excitation dans le rouge ou le proche infrarouge (NIR) sont utilisées pour la **microscopie I-V** et l'**imagerie de tissus en profondeur**.

De nouveaux objectifs et des instruments plus flexibles permettent actuellement de réduire les difficultés d'accès physique *in vivo*. Par exemple, des objectifs longs et fins (Fig. IV) ont été développés par la société *Olympus*, permettant un accès à pratiquement n'importe quel organe interne après réalisation d'une incision. En plus de leur nouvelle géométrie, ces objectifs possèdent une ouverture numérique relativement élevée et sont optimisés pour une utilisation avec des longueurs d'onde dans le proche infrarouge. Ils peuvent également être équipés de tubes de drainage pour l'aspiration de sang ou de conduits pour l'injection de colorants vitaux, de drogues ou de solutions salines. ALENCAR *et al.* [1] ont été les premiers à démontrer l'utilité de ces objectifs *in vivo* pour l'imagerie du cancer.



Figure IV. Objectifs pour la microscopie intra-vitale (d'après <http://www.olympusamerica.com>).

L'utilisation de technologies *confocales* permet également d'améliorer fortement la résolution des images, mais des problèmes subsistent, comme la faible pénétration de l'excitation et/ou la phototoxicité liée à l'utilisation d'une source laser puissante. Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de la **microscopie multi-photonique** peut aider à résoudre en partie ces problèmes. La profondeur de pénétration d'un microscope multi-photonique est six fois supérieure à un système confocal standard. De plus, la collection de la lumière est augmentée, la phototoxicité est réduite et il est possible de réaliser de l'imagerie tridimensionnelle. Bien que les avantages de la microscopie multi-photonique soient connus depuis quelque temps, le coût et la complexité de la mise en place et la maintenance de la source laser multi-photonique étaient, initialement, un obstacle important à son utilisation. Des progrès récents dans la technologie des lasers pulsés permettent maintenant une utilisation clé en main. De nombreux travaux scientifiques dans les domaines de l'immunologie [4], la parasitologie, la biologie des tumeurs ont bénéficié de cette technologie. Par exemple, FREVERT *et al.* [9] ont utilisé cette approche pour visualiser l'entrée des parasites du paludisme dans le foie d'une souris infectée.

D'autres technologies récentes permettent également de réaliser de l'imagerie intra-vitale non destructive sans utilisation de microscopes. Il est possible, par exemple, d'utiliser la technologie des **fibres optiques** pour imager *in vivo* des cellules ou organes. Ce système est particulièrement adapté pour étudier les vaisseaux sanguins [17] ou des organes difficilement accessibles par la microscopie traditionnelle, comme le cerveau [28]. À ce jour, cet accès a été obtenu au détriment de la qualité du signal, de la résolution spatiale et de la profondeur de champ. Toutefois, les développements technologiques dans ce domaine vont certainement permettre de résoudre un certain nombre de ces défauts, en particulier grâce à la miniaturisation des sondes, des optiques et de l'électronique. Ces systèmes sont vraiment des alternatives aux systèmes plus encombrants basés sur l'utilisation de microscopes et permettent d'ores et déjà d'acquérir des images par technique de fluorescence et confocales.

2.3. IMAGERIE DU PETIT ANIMAL PAR FLUORESCENCE ET BIOLUMINESCENCE

Une seconde approche consiste en l'utilisation de systèmes d'imagerie permettant le suivi spatio-temporel en temps réel de processus biologiques de façon non invasive, directement au sein d'un organisme vivant. Ces systèmes permettent la détection de protéines marquées en fluorescence ou en bioluminescence dans le petit animal (Fig. V). La lumière émise est collectée par une caméra très sensible. Par exemple, l'imagerie en bioluminescence [22] est basée sur la détection de la lumière émise lors de l'oxydation de la luciférine par la luciférase. Cette méthode offre la possibilité d'imager la lumière émise lors de l'expression du gène de la luciférase *in vivo* de façon non invasive et, par exemple, d'analyser l'infection bactérienne par *Bacillus anthracis* [12] ou de suivre les flux calciques chez la souris ou dans le cerveau de la drosophile [20, 23]. L'utilisation d'une sonde bioluminescente est très avantageuse car l'émission de lumière ne nécessite aucune source d'excitation (au contraire des sondes fluorescentes). De ce fait, les problèmes de phototoxicité, de photo-blanchiment (perte d'activité de la fluorescence) et d'auto-fluorescence sont absents, ce qui permet la réalisation de cinétiques longues et la quantification des réponses physiologiques ou pathologiques.



Figure V. Imagerie par bioluminescence de l'infection bactérienne dans une souris vivante. Des bactéries d'une lignée pathogène exprimant un gène rapporteur bioluminescent ont été inoculées à une souris vivante. L'expression de la bioluminescence a été suivie en fonction du temps grâce à l'utilisation d'un système équipé d'une caméra CCD très sensible (Caliper corp.). Image par K. ROGERS (Institut Pasteur).

3. SYSTÈMES DE CRIBLAGE EN IMAGE À HAUT DÉBIT

Les systèmes de criblage à haut-débit (*High-Throughput Screening : HTS*) sont, depuis plusieurs années, très utilisés par les industries pharmaceutiques pour cribler à grande échelle des drogues candidates. Cependant, l'utilisation de la microscopie pour le criblage à grande échelle est beaucoup plus récente, à cause de la complexité de l'automatisation et de l'analyse des images de microscopie. Les systèmes de criblage en images (*High Content Screening : HCS*) offrent la possibilité d'automatiser l'acquisition des images en microscopie optique dans des plaques multi-puits (Fig. VI) et de réaliser leur analyse en temps réel. Ceci résulte du développement d'instruments robotiques sophistiqués, de logiciels de traitement et d'analyse d'images et de nouvelles stratégies de stockage. Les systèmes HCS bénéficient également des développements récents de la microscopie, en particulier dans le domaine des sources **laser** qui sont maintenant beaucoup plus compactes, des améliorations de la résolution par l'utilisation de la technologie de la lumière structurée, etc. Ils présentent un avantage important par rapport aux systèmes HTS, car ils sont multi-paramétriques et permettent l'analyse de la réponse, aussi bien au niveau de la cellule individuelle [18] que d'une population. De plus, il est possible d'analyser des sous-populations cellulaires en fonction de leurs phénotypes et/ou d'autres marqueurs secondaires. Ces appareils permettent de réaliser des cribles à grande échelle, par exemple en utilisant des drogues [6].

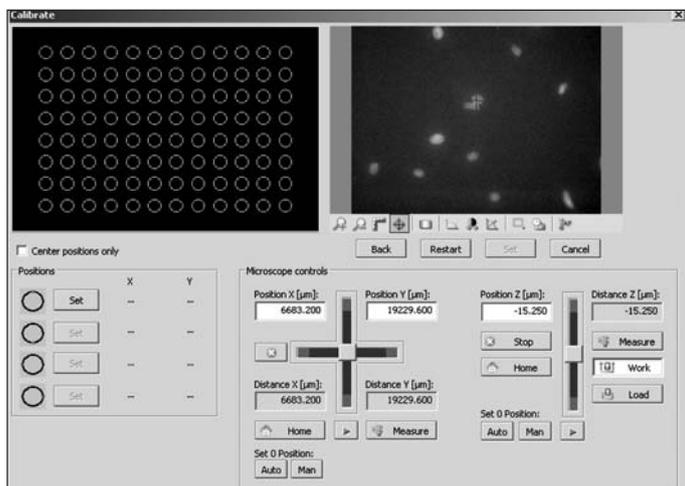


Figure VI. Interface logicielle d'un système de criblage en image. Un microscope de criblage (Zeiss) permet l'acquisition automatisée d'images (en haut à droite) de cellules placées dans une boîte multi-puits (schématisé en haut à gauche). Image par E. PERRET (Institut Pasteur).

Les développements du HTS et du HCS sont très étroitement liés aux instruments de **cytométrie en flux**. La cytométrie en flux est une technologie qui fait défiler, à grande vitesse dans un flux de liquide, des cellules devant un faisceau laser. L'analyse de la lumière (intensité de fluorescence, lumière diffusée) collectée permet de classer et trier la population selon différents critères. Cette technique permet d'analyser très rapidement un

grand nombre de données provenant de cellules individuelles et de caractériser des sous-populations par des analyses statistiques, mais ne permet pas l'acquisition d'images. Cette situation a évolué récemment, grâce à des procédés innovants, incorporant des caméras sur des systèmes de cytométrie en flux. Cette technologie, commercialisée par la société *Amnis Corporation* combine la puissance de la microscopie quantitative à la puissance statistique de la cytométrie. Les images obtenues par ce type de système ont une résolution faible mais permettent, cependant, d'entreprendre des analyses de localisation sub-cellulaire en fluorescence. Cette nouvelle génération de cytomètres en images est capable de traiter 10.000 événements par minute. Il est possible d'acquérir en simultané quatre fluorescences et la lumière transmise de chaque cellule. GEORGES *et al.* [11] ont publié une étude sur la translocation nucléaire du facteur nucléaire kB (NFkappaB), tirant pleinement parti des avantages du cytomètre en images.

CONCLUSION

Les nouvelles technologies en microscopie et en imagerie décrites ci-dessus offrent des améliorations importantes qui auront un impact sur la recherche biomédicale. Ces avancées spectaculaires sont multiples, puisqu'elles permettent une augmentation de la résolution aux niveaux cellulaire et sub-cellulaire, facilitent l'imagerie *in vivo* et rendent possible une automatisation de l'acquisition des images. On observe une tendance générale en imagerie, à regrouper des technologies jusqu'à présent distinctes. En effet, la microscopie et l'imagerie bénéficient du rapprochement des domaines de la microscopie optique, de la microscopie photonique et de la cytométrie. Cette complémentarité de méthodes a permis de développer des méthodologies offrant une résolution accrue, pouvant aller jusqu'à quelques nanomètres pour le CLEM, ou de cribler des dizaines de milliers de cellules par minute. Ainsi, l'Institut Pasteur a réalisé ce rapprochement de technologies et d'expertises en créant une structure unique appelée "Imagopole", regroupant la plateforme d'imagerie dynamique, la plateforme de microscopie ultrastructurale et la plateforme de cytométrie en flux.

Toutes ces nouvelles technologies en imagerie permettent la réalisation d'expériences *in vitro* et *in vivo*, qui n'ont plus rien à voir avec les analyses "simples", à un instant donné, réalisées dans le passé. Des modèles expérimentaux, plus complexes, sont maintenant disponibles, offrant une plus grande pertinence physiologique et des informations statistiques plus importantes grâce à l'acquisition à **haut-débit**. La possibilité d'acquérir sur le même modèle animal des images multiples au cours du temps offre de nombreux avantages, comme de répéter des mesures et de réaliser des observations chroniques et/ou cinétiques. Cela ouvre, par exemple, la perspective de tester différentes drogues et de suivre leurs activités *in vivo*. Pouvoir imager la réponse au traitement, directement dans l'animal entier, est un moyen utile pour quantifier simultanément l'efficacité, la durée et la spécificité des candidats thérapeutiques. Ces innovations technologiques représentent une avancée majeure, puisqu'elles ouvrent la voie à de nouvelles stratégies de recherche, en particulier pour la mise au point de nouveaux médicaments.

MOTS-CLÉS : Microscopie, imagerie, systèmes de criblages en images, microscopie intra-vitale, imagerie par fibre optique, haute résolution, microscopie électronique et photonique corrélative, bioluminescence.

KEYWORDS: Microscopy, imaging, high-content screening, intravital microscopy, fiber optic imaging technologies, high-resolution, correlative light electron microscopy, bioluminescence.

Remerciements : L'auteur remercie les membres de l'*Imagopole* et, plus particulièrement, l'équipe de la plateforme d'*Imagerie Dynamique* pour leurs conseils avisés.

ABSTRACT

NEW TECHNOLOGIES
IN MICROSCOPY AND IMAGING

Imaging biological processes by microscopy is an important technology for many applications in life sciences. The word microscopy comes from old Greek "micro" and "skopein" and means to examine the small; it regroups various complementary technologies. Optical microscopy is one of these; it allows researchers to study dynamic processes directly in living samples at tissue or cell level. Until about twenty years ago, confocal microscopy was state of the art for such studies despite evident technical limitations. However, recent technological developments have emerged and can solve many of these drawbacks and significantly improve their performance. In this article, we will strive to present high-resolution microscopes, *in vivo* imaging systems and high-content screening systems and their applications in biomedical research.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALENCAR H, MAHMOOD U, KAWANO Y, HIRATA T & WEISSELEDER R. (2005) Novel multiwavelength microscopic scanner for mouse imaging, *Neoplasia*, 7, 977-83.
2. BERCHE P (2007) *Une histoire des microbes (John Libbey Eurotext)*.
3. BETZIG E, PATTERSON GH, SOUGRAT R *et al.* (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, *Science*, 313, 1642-5.
4. BOUSSO P & ROBNEY EA. (2004) Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy, *Immunity*, 21, 349-55.
5. BRIGGS JA, GRUNEWALD K, GLASS B *et al.* (2006) The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions, *Structure*, 14, 15-20.
6. CARPENTER AE. (2007) Image-based chemical screening, *Nat Chem Biol*, 3, 461-5.
7. EGNER A, JAKOBS S & HELL SW. (2002) Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3370-5.
8. EGNER A, VERRIER S, GOROSHKOV A, SOLING HD & HELL SW. (2004) 4Pi-microscopy of the Golgi apparatus in live mammalian cells, *J Struct Biol*, 147, 70-6.
9. FREVERT U, ENGELMANN S, ZOUBEDE S *et al.* (2005) Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver, *PLoS Biol*, 3, e192.
10. FRISCHKNECHT F, RENAUD O & SHORTE SL. (2006) Imaging today's infectious animalcules, *Curr Opin Microbiol*, 9, 297-306.
11. GEORGE TC, BASJI DA, HALL BE *et al.* (2004) Distinguishing modes of cell death using the ImageStream multispectral imaging flow cytometer, *Cytometry A*, 59, 237-45.
12. GLOMSKI IJ, PIRIS-GIMENEZ A, HUERRE M, MOCK M. & GOOSSENS PL. (2007) Primary involvement of pharynx and Peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax, *PLoS Pathog*, 3, e76.
13. HELL SW. (2007) Far-field optical nanoscopy, *Science*, 316, 1153-8.
14. KEYEL PA, WATKINS SC & TRAUB LM. (2004) Endocytic adaptor molecules reveal an endosomal population of clathrin by total internal reflection fluorescence microscopy, *J Biol Chem*, 279, 13190-204.
15. KITTEL RJ, WICHMANN C, RASSE TM *et al.* (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release, *Science*, 312, 1051-4.
16. KOMEILI A, LI Z, NEWMAN DK & JENSEN GJ. (2006) Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK, *Science*, 311, 242-5.
17. LAEMMEL E, GENET M, LE GOUALHER G *et al.* (2004) Fibered confocal fluorescence microscopy (Cell-viZio) facilitates extended imaging in the field of microcirculation. A comparison with intravital microscopy, *J Vasc Res*, 41, 400-11.
18. LOO LH, WU LF & ALTSCHULER SJ. (2007) Image-based multivariate profiling of drug responses from single cells, *Nat Methods*, 4, 445-53.
19. LUCIC V, LEIS A & BAUMEISTER W. (2008) Cryo-electron tomography of cells: connecting structure and function, *Histochem Cell Biol*.
20. MARTIN JR, ROGERS L, CHAGNEAU C & BRULET P. (2007) In vivo bioluminescence imaging of Ca signalling in the brain of Drosophila, *PLoS ONE*, 2, e275.
21. RENAUD O, VINA J, YU Y *et al.* (2008) High-resolution 3-D imaging of living cells in suspension using confocal axial tomography, *Biotechnol J*, 3, 53-62.
22. ROGERS KL, MARTIN JR, RENAUD O *et al.* (2008) Electron-multiplying charge-coupled detector-based bioluminescence recording of single-cell Ca(2+), *J Biomed Opt*, 13, 031211.
23. ROGERS KL, PICAUD S, RONCALI E *et al.* (2007) Non-invasive in vivo imaging of calcium signaling in mice, *PLoS ONE*, 2, e974.
24. RUST MJ, BATES M & ZHUANG X. (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), *Nat Methods*, 3, 793-5.
25. SARTORI A, GATZ R, BECK F *et al.* (2007) Correlative microscopy: bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography, *J Struct Biol*, 160, 135-45.
26. SCHEFFEL A, GRUSKA M, FAIVRE D *et al.* (2006) An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria, *Nature*, 440, 110-4.
27. SHORTE SL & FRISCHKNECHT F. (2007) *Imaging Cellular and Molecular Biological Functions* (Springer).
28. VINCENT P, MASKOS U, CHARVET I *et al.* (2006) Live imaging of neural structure and function by fibered fluorescence microscopy, *EMBO Rep*, 7, 1154-61.
29. WILLIG KI, KELLNER RR, MEDDA R *et al.* (2006) Nanoscale resolution in GFP-based microscopy, *Nat Methods*, 3, 721-3.

LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DES BIOMOLÉCULES DE PETITE TAILLE DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES

Jean-François HEILIER^{1,2}, Erwan WERNER¹,
Céline DUCRUIX¹, Eric EZAN¹ et Christophe JUNOT^{1,3}

¹Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette, France.

²Université catholique de Louvain, Faculté de médecine, Bruxelles, Belgique.

RÉSUMÉ

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse instrumentale qui repose sur la détection, après leur séparation, d'ions en fonction de leur rapport masse/charge. Dans cet article, nous traitons des principales avancées qui ont été réalisées ces vingt dernières années et qui permettent de caractériser et de quantifier des biomolécules dans des fluides biologiques. Diverses applications concernant l'analyse des molécules organiques de petites tailles (métabolites) sont ensuite détaillées dans les domaines de la biologie clinique (diagnostic, suivi thérapeutique et toxicologique). Nous abordons enfin l'**analyse métabolomique**, une approche globale permettant de mettre en évidence des métabolites d'intérêt biologique à partir de l'analyse statistique d'empreintes métaboliques contenant plusieurs centaines à plusieurs milliers de signaux.

INTRODUCTION

L'utilisation de la **spectrométrie de masse** s'est considérablement répandue en biologie en raison d'avancées majeures réalisées depuis une vingtaine d'années : développement des sources à ionisation à pression atmosphérique, ou encore des analyseurs à haute résolution, permettant d'accéder aux mesures de masses précises. La spectrométrie de masse, autrefois réservée à des chimistes ou des physiciens spécialistes, est maintenant accessible aux biologistes et permet de répondre à diverses questions concernant la quantification et l'analyse structurale des biomolécules, ou encore les interactions protéines-ligands.

Le développement de la **chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse** a eu de grandes répercussions en biologie. Initialement, seule la chromatographie en phase gazeuse pouvait être couplée à la spectrométrie de masse, mais elle ne donnait accès qu'à une gamme réduite de biomolécules (celles qui étaient volatiles ou volatilissables par dérivation). Ainsi, l'analyse des biomolécules de masse élevée, telles que les protéines ou les acides nucléiques n'était pas possible et celle des molécules thermolabiles restait délicate. Le développement d'un couplage entre la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse à source d'ionisation à pression atmosphérique permet maintenant de les étudier avec succès.

Dans cet article, nous traiterons des principales avancées en matière de spectrométrie de masse (sources et d'analyseurs) qui permettent de caractériser et de quantifier des **biomolécules** dans des fluides biologiques. Diverses applications concernant l'analyse des molécules organiques de petite taille (**métabolites**) seront ensuite détaillées dans les domaines de la biologie clinique (diagnostic, suivi thérapeutique et toxicologique). Nous aborderons enfin l'analyse métabolomique dont nous verrons qu'il s'agit d'une approche globale permettant de mettre

en évidence des métabolites d'intérêt biologique à partir de l'analyse statistique d'empreintes métaboliques.

1. LES DIFFÉRENTS TYPES DE SPECTROMÈTRES DE MASSE

Un **spectromètre de masse** est un instrument composé de plusieurs éléments (Fig. I) parmi lesquels une source et un analyseur.

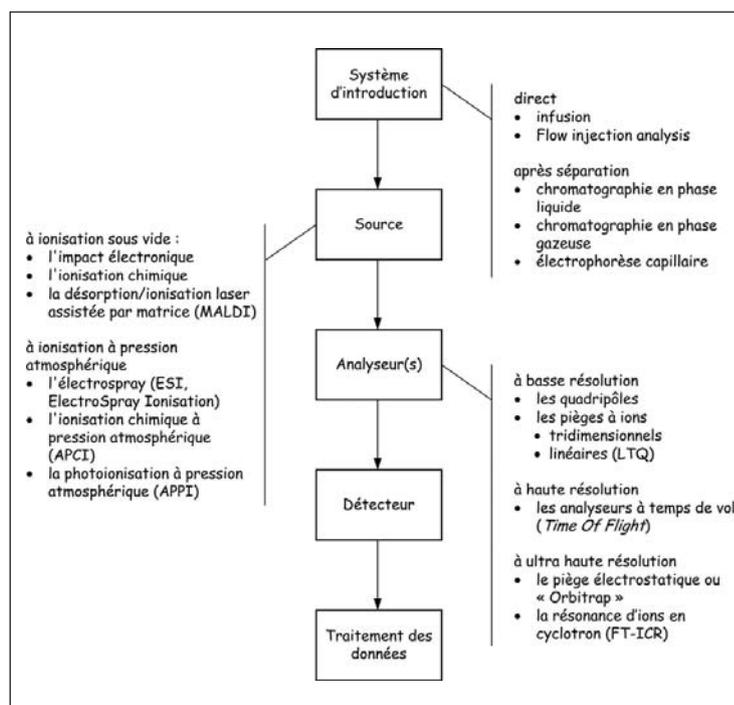


Figure I : Schéma global d'un spectromètre de masse présentant les divers sources et analyseurs disponibles pour l'analyse de biomolécules.

¹ Commissariat à l'Energie Atomique, DSV/iBiTec-S/SPI, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

² Université Catholique de Louvain, Faculté de médecine, Unité de Toxicologie Industrielle et de Médecine du Travail, 1200 Bruxelles, Belgique.

³ Correspondance : Dr Christophe JUNOT. Commissariat à l'Energie Atomique, DSV/IBiTec-S/SPI/LEMM 91191 Gif sur Yvette (christophe.junot@cea.fr).

Après avoir été introduites dans le système, les biomolécules sont ionisées dans la source ; les ions résultants sont attirés par des jeux de lentilles électrostatiques vers l'analyseur où ils vont être séparés en fonction de leur rapport "masse sur charge" (m/z). Afin que les ions se déplacent sans rencontrer d'obstacles, l'analyseur est maintenu sous vide poussé (pression $< 10^{-6}$ mbar). Après comptabilisation au niveau du détecteur des ions présents pour chaque rapport m/z , l'instrument fournit un spectre de masse. Le **spectre de masse** est un graphe en deux dimensions, dont le domaine spectral étudié est représenté en abscisse et l'intensité des signaux fournis par les ions, en ordonnée (Fig. II). Les instruments se distinguent essentiellement par leur source et leur(s) analyseur(s) qui sont adaptés à diverses applications, telles que la caractérisation structurale ou la quantification. Bien qu'il existe des dispositifs d'introduction directe, bon nombre de systèmes de spectrométrie de masse sont précédés d'appareillages chromatographiques permettant de fractionner les constituants d'un mélange (Fig. I).

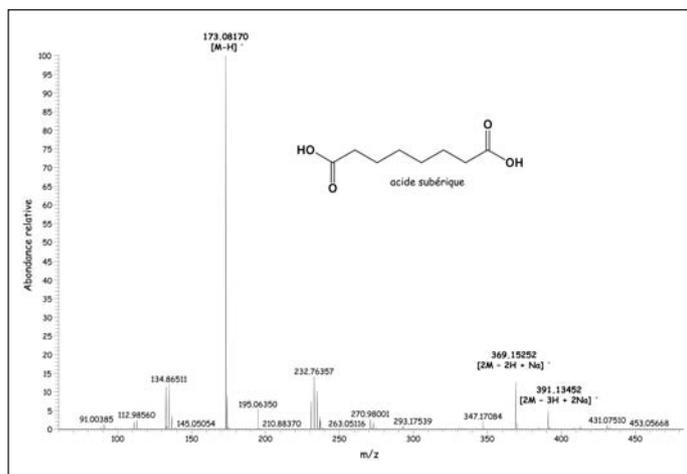


Figure II : Spectre de masse de l'acide subérique obtenu sur un LTQ-Orbitrap avec une source electrospray (ionisation négative, résolution : 30000). L'ion (pseudo-)moléculaire [M-H]⁻ est l'ion majoritaire du spectre (abondance 100). Les sources electrospray conduisent souvent à la formation d'adduits dont les ions [2M - 2H + Na]⁻ et [2M - 3H + 2Na]⁻ sont des exemples.

1.1. LES SOURCES

Les sources utilisées en spectrométrie de masse sont basées sur l'ionisation en phase gazeuse ou sur la désorption-ionisation d'analytes.

1.1.1. La désorption-ionisation peut être réalisée sous vide ou à pression atmosphérique. Les sources MALDI [10] (de l'anglais *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, désorption-ionisation laser assistée par matrice) et DIOS [28] (*Desorption-Ionization on Porous Silicon*, désorption-ionisation laser sur silicium poreux) opèrent à partir de supports solides. Le DIOS permet d'accéder aux petites molécules, alors que le MALDI est réservé à l'étude des biomolécules de masse supérieure à 1000 Da. Les sources *electrospray* (ESI) [8] et DESI (*Desorption-ElectroSpray Ionization*) opèrent sur des nébulisateurs

[26]. Développée par J.B. FENN au milieu des années 1980, l'*electrospray* (Fig. IIIA) résulte de l'application à pression atmosphérique d'un champ électrique de plusieurs milliers de volts sur un nébulisateur. C'est l'une des sources les plus utilisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). Elle est, par ailleurs, adaptée au couplage avec l'électrophorèse capillaire (CE) [12]. Elle permet d'analyser sous forme intacte des biomolécules polaires à moyennement polaires qui peuvent être thermolabiles.

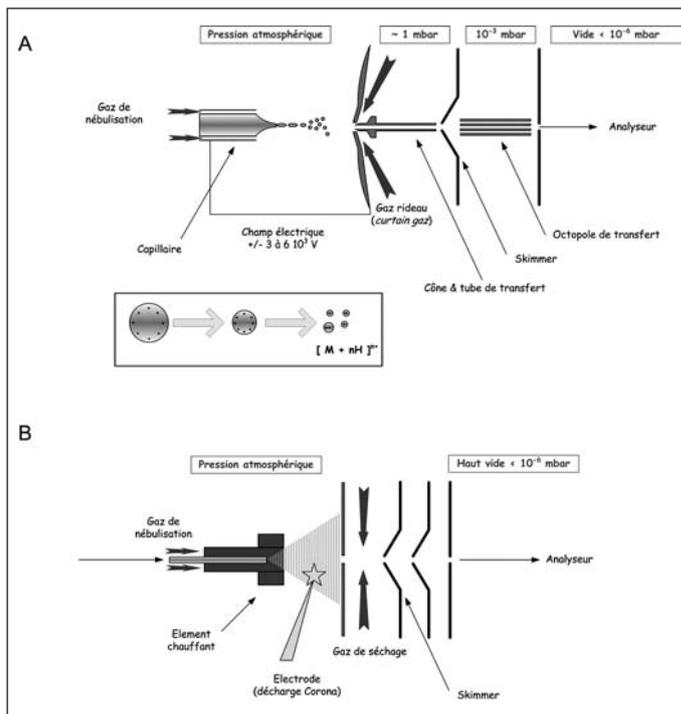


Figure III : Sources à pression atmosphérique (Electrospray)

A. La source electrospray : L'*electrospray* est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 kV entre ce capillaire et la contre-électrode. Il provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées (encadré). L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer la réduction de leur taille jusqu'au moment où les forces coulombiennes vont approcher le niveau des forces de cohésion de celles-ci et provoquer leur explosion. Une véritable cascade de fissions conduit à des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leurs surfaces devient suffisant pour provoquer la désorption des ions. Les ions ainsi produits sont accélérés vers l'analyseur alors que les molécules non chargées sont éliminées.

B. La source APCI : En APCI, l'analyte en solution est introduit dans un nébulisateur pneumatique où il est converti en un fin aérosol à l'aide d'un jet d'air ou d'azote à haute vitesse. Les gouttelettes sont alors déplacées par le flux gazeux au travers de la chambre de désolvatation/vaporisation puis les substances arrivent dans la région de la source se trouvant à pression atmosphérique où l'ionisation se produit en formant des agrégats chargés. D'une façon générale, la phase mobile joue le rôle de gaz ionisant. Les ions réactifs sont produits à partir de l'effet d'une décharge Corona après nébulisation du solvant. En ionisation en mode positif, le transfert de proton avec les ions du solvant peut se produire pour donner les ions protonés de l'espèce moléculaire, suivant les affinités protoniques du solvant et des molécules gazeuses de l'analyte. En ionisation en mode négatif, les ions de l'espèce moléculaire sont obtenus par transfert d'électron ou par abstraction de proton.

1.1.2. L'ionisation en phase gazeuse peut, quant à elle, être réalisée sous vide (sources à impact électronique et à ionisation chimique, utilisées en GC/MS), ou à pression atmosphérique, comme, par exemple, l'APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, ionisation chimique à pression atmosphérique) [21] ou l'APPI (*Atmospheric Pressure Photo-Ionization*, Photo-ionisation à pression atmosphérique).

En APCI (Fig IIIB), l'échantillon est ionisé à pression atmosphérique par application d'une décharge *corona*. Les ions produits sont ensuite transférés vers l'analyseur. L'avantage de cette source est la simplicité avec laquelle elle permet de coupler directement le spectromètre de masse avec différentes techniques de séparation telles que la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire. L'APCI est particulièrement bien adaptée aux composés peu polaires ayant une masse moléculaire inférieure à 1500 Da environ. En APPI, l'ionisation est due à l'interaction entre l'analyte et des photons émis par une lampe à décharge. Cette technique est adaptée à l'analyse de composés apolaires comme les stéroïdes [13], les pesticides [27, 35], ou les hydrocarbures polyaromatiques [25]. Elle est, en ce sens, complémentaire à l'*electrospray*.

1.2. LES ANALYSEURS

Il existe de nombreux types d'analyseurs répondant à des usages divers. Leurs performances sont évaluées au travers de leur résolution, de leur exactitude en masse et de la gamme dynamique de masse dans laquelle ils peuvent répondre.

1.2.1. La résolution d'un analyseur est sa capacité à séparer des ions de rapports m/z proches mais différents. La résolution est initialement définie comme le rapport $m/\delta m$, où δm est la plus petite différence entre deux pics résolus. On lui préfère aujourd'hui la définition FWHM (*Full Width at Half-Maximum peak height*) où δm correspond à la largeur du pic à mi-hauteur.

1.2.2. L'exactitude en masse est la différence entre la masse exacte et la masse mesurée ; elle s'exprime en parties par million (ppm) [6].

1.2.3. La gamme dynamique en masse correspond au domaine spectral (en m/z) dans lequel l'instrument répond. Les performances des principaux analyseurs commercialement disponibles sont résumées dans le tableau 1.

Table 1 : Valeurs typiques de résolution et d'exactitude pour les principaux analyseurs

| Analyseurs | Résolution ^a | Exactitude |
|---------------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Triple quadrupoles et pièges ioniques | ~ 500 | ~ 0.3 à 1 u |
| TOF | 8000 à 20000 | 1 à 5 ppm ^b |
| LTQ-Orbitrap | jusqu'à 100000 | < 3 ppm |
| FT-ICR | jusqu'à 1000000 ^c | < 1 ppm |

^a $m/\delta m$, FWHM, ^b avec calibration interne ou *lock mass*,

^c la résolution est fonction de l'intensité du champs magnétique

1.2.4. Le principal critère de classement des analyseurs est la résolution. On distingue couramment les analyseurs de basse, haute et ultra-haute résolution (Fig. I). Pour les instruments à basse résolution, comme les pièges ioniques et les quadripôles, la résolution ne dépasse pas les 500 à m/z 250. Ces instruments ne permettent donc la séparation que de composés différents au minimum d'une unité de masse. Les instruments à haute résolution autorisent des mesures de masses précises, avec une erreur inférieure à 5 ppm lorsqu'un "calibrateur" interne est utilisé. Ils atteignent des résolutions de l'ordre de 8.000 à 20.000 ($m/\delta m$ FWHM). Il est possible d'obtenir des résolutions de l'ordre de 100.000, voire de plus de 1.000.000 avec les analyseurs à ultra-haute résolution (analyseurs à transformée de Fourier) de type Orbitrap et FT-ICR, respectivement. Les erreurs sur les mesures de masses précises peuvent alors être inférieures à 1 ppm.

L'obtention d'une masse précise est cruciale dans la détermination de la composition élémentaire d'une molécule inconnue (c'est-à-dire le nombre de chacun des atomes la constituant) car le nombre de formules potentielles est inversement proportionnel au niveau de précision.

Les **analyseurs quadrupolaires** (car constitués de quatre barres) (Fig. IVA) [9] sont des analyseurs à basse résolution très répandus. Certains appareils possèdent plusieurs analyseurs en série, séparés par une cellule de collision. Une construction fréquente est celle du triple quadripôle (TQ) où trois quadripôles sont montés en série. Dans le quadripôle central, on introduit un gaz de collision à une pression telle qu'un ion entrant dans le quadripôle subira, en moyenne, une collision avant de se dissocier. Les triples quadripôles permettent différents mode d'acquisition parmi lesquels le mode SRM/MRM (*Selected Reaction Monitoring*)/"Multiple Reaction Monitoring" est particulièrement bien adapté aux dosages spécifiques de biomolécules (*vide infra*).

Les **pièges à ions** [7, 15] sont, comme leur nom l'indique, des pièges à l'intérieur desquels les ions sont stockés. Les analyseurs à piégeage d'ions peuvent être utilisés pour produire des fragmentations successives et séquentielles (MS^n) : au cours du temps, les ions sélectionnés se fragmentent dans le piège qui contient alors tous les ions fils qui peuvent, par la suite, être eux-mêmes fragmentés. Les expériences de MS/MS sont ainsi réalisées de manière "temporelle" dans les pièges ioniques alors qu'elles le sont "dans l'espace" avec les autres types de spectromètres de masse hybrides (qui contiennent plusieurs analyseurs en série). La possibilité de réaliser des expériences de MS^n avec les pièges ioniques fait de ces analyseurs des outils particulièrement adaptés aux études structurales car ils permettent d'établir des filiations entre les différents ions produits lors des expériences de CID (*vide infra*).

Les **analyseurs à temps de vol** reposent sur un principe décrit en 1946 par STEPHENS [24] ; ils sont désignés sous leur acronyme anglais de **TOF** (*Time of flight*). WILEY et McLAREN ont élaboré le premier TOF dans un but commercial en 1955

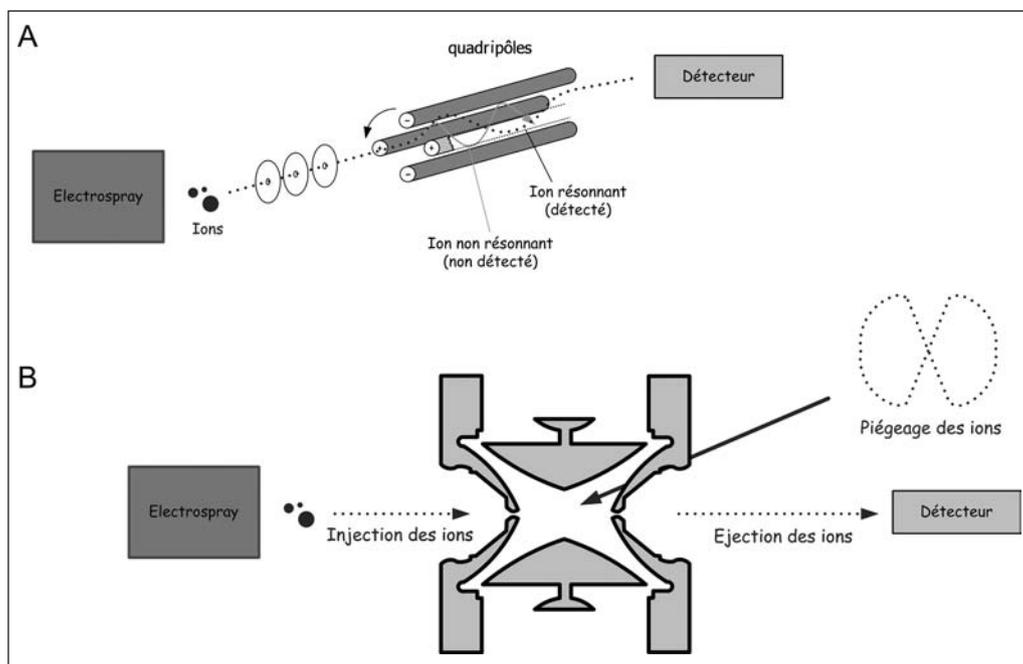


Figure IV : Les analyseurs quadrupolaires.

A. Les analyseurs quadrupolaires sont constitués de quatre barres ayant idéalement une section hyperbolique ou cylindrique. On applique sur ces barres deux potentiels générant deux champs : le premier, constant, auquel se superpose, un second, alternatif. L'application de ces potentiels crée un champ quadrupolaire entre les électrodes au travers duquel pénètrent les ions extraits de la source par un jeu de lentilles électrostatiques. A un instant donné, seuls les ions dont le rapport m/z permet de décrire une trajectoire stable dans le filtre atteignent le détecteur. Les autres, dont la trajectoire n'est pas stable, sont éjectés avant d'atteindre l'extrémité de l'analyseur et ne sont pas détectés.

B. Les pièges à ions tridimensionnels ou cylindriques sont constitués d'une électrode circulaire en forme de diabolos, couverte de deux calottes sphériques. L'application de tensions alternatives sur l'électrode circulaire permet d'obtenir un «piège» à l'intérieur duquel les ions sont stockés. L'éjection des ions et, en général, leur manipulation dans le piège est effectuée par déstabilisation de leur trajectoire. De même, on peut obtenir une expulsion des ions selon leur rapport m/z .

[33]. Dans un TOF, les ions sont séparés en fonction de leur vitesse dans le tube de vol. Les vitesses étant inversement proportionnelles à la racine carrée de leurs rapports m/z , les ions les plus légers de grande vitesse arrivant au détecteur plus rapidement que les ions plus lourds de plus faible vitesse.

Les appareils hybrides Q-TOF (Quadripôle - Temps de vol) sont apparus en 1995. Ces spectromètres peuvent être considérés comme un triple quadripôle dans lequel le troisième quadripôle est remplacé par un analyseur à temps de vol (TOF) [17]. Ces analyseurs présentent un important pouvoir de résolution en masse ($m/\delta m > 10\ 000$ pour une masse de 1000 Da), facilitant ainsi les identifications de composés inconnus.

Deux analyseurs à ultra-haute résolution sont actuellement commercialisés : le FT-ICR (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance) et l'Orbitrap. Le FT-ICR est un cyclotron⁴ qui piège les ions sur une trajectoire circulaire dans un champ magnétique fixe. La fréquence résultante du mouvement de l'ion dépend du rapport m/z de l'ion et de la valeur du champ magnétique [16]. L'Orbitrap est, quant à lui, basé sur un piège électrostatique décrit dans les années 1920 par KINGDON [11].

Le premier spectromètre de masse utilisant cette technologie, que l'on doit à Alexander MAKAROV [14], ne fut disponible qu'au début de ce siècle. L'Orbitrap permet d'accéder à l'ultra haute résolution sans utilisation de champ magnétique.

2. LES MODES D'ACQUISITION DES IONS PRODUITS DANS LA SOURCE D'IONS

On distingue deux principaux modes d'acquisition : le mode de spectrométrie de masse simple (MS) et le mode de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ou à fragmentation successive (MSⁿ).

2.1. SPECTROMÉTRIE DE MASSE SIMPLE

Pour le mode MS, les spectres peuvent être acquis en mode de balayage (SCAN) ou en mode de détection d'ions sélectionnés (Selected Ion Monitoring : SIM). Ainsi, en balayage, des spectres de masse sont acquis entre deux rapports m/z extrêmes et sont accumulés par répétition. Tous les ions formés dans la source seront détectés. Le mode SIM a, quant à lui, pour but de détecter des substances cibles avec un maximum

de sensibilité en ne détectant que les ions sélectionnés correspondant aux substances à analyser.

2.2. LES MODES D'ACQUISITION MS/MS ET MS^N

Ils impliquent une activation des ions par accroissement de leur énergie interne. L'excès d'énergie conduit à la fragmentation de la molécule. Différents moyens d'activation existent, parmi lesquels la collision par gaz (Collision Induced Dissociation : CID) est l'approche la plus courante.

2.2.1. Différents modes de balayage sont utilisés en spectrométrie de masse de type MS/MS :

- Le mode "SRM" (Selected Reaction Monitoring) : Un premier ion (ion précurseur) est sélectionné avant d'être fragmenté. L'abondance d'un des fragments (ion produit) est spécifiquement mesurée. Ce mode permet d'obtenir un gain de sensibilité et de sélectivité par rapport au mode SIM ; il est accessible aux triples quadripôles, aux pièges à ions ainsi qu'aux appareils hybrides.
- Le balayage d'ions fragments est basé sur la sélection d'un ion précurseur avant fragmentation. Les produits de sa

⁴ Accélérateur circulaire de particules utilisant un champ magnétique fixe et un champ électrique alternatif de fréquence constante.

fragmentation sont ensuite analysés. Ce mode est accessible avec tous les types d'analyseurs.

- Le **balayage des ions précurseurs** est accessible uniquement avec les triples quadripôles. Un ion est sélectionné dans le troisième analyseur pendant que le premier analyseur balaye en rapports m/z de façon à détecter tous les ions parents capables, en se fragmentant, de produire l'ion sélectionné dans le troisième analyseur.
- Le **balayage de perte neutre constante** consiste à identifier des couples ion précurseur/ion fragment qui possèdent une différence de masse définie. Ce mode est accessible aux triples quadripôles et aux Q-TOF.

Ces différentes configurations permettent, à la fois, d'obtenir des informations structurales et également de détecter sélectivement des familles métaboliques dont les membres possèdent des groupements chimiques communs (Fig. 5).

Pour obtenir une information structurale, on choisira de préférence un appareil permettant à la fois de réaliser des expériences de fragmentation (de la molécule parent) et des mesures de masse précise (analyseurs à haute résolution). Dans le domaine de l'analyse protéomique, ce sont les instruments de type LC - ESI - (Q-) TOF et MALDI - TOF qui sont les plus utilisés. Toutefois, les pièges ioniques couplés à des analyseurs à ultra-haute résolution (FT-ICR et Orbitrap) pourraient supplanter ces appareils dans les prochaines années.

3. LES APPLICATIONS DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN BIOLOGIE ET EN MÉDECINE

À l'aide de quelques exemples, nous tenterons de mettre en évidence l'apport de la spectrométrie de masse dans les domaines de la biologie clinique. Nous aborderons également l'**analyse métabolomique**, qui est une approche globale combinant chimie analytique et

analyses statistiques multivariées pour la mise en évidence de métabolites d'intérêt biologique.

3.1. SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET BIOLOGIE CLINIQUE

On entend par biologie clinique l'analyse qualitative et quantitative de biofluides pour orienter le diagnostic, le traitement et la prise en charge des patients. L'intérêt de la spectrométrie de masse par rapport aux techniques traditionnelles, telles que l'immuno-analyse, la colorimétrie ou la chromatographie liquide couplée à un détecteur UV (LC/UV) est un gain de spécificité, et souvent de sensibilité, mais également la possibilité de réaliser des analyses multiparamétriques (détection simultanée de plusieurs analytes). Initialement, l'utilisation de la spectrométrie de masse

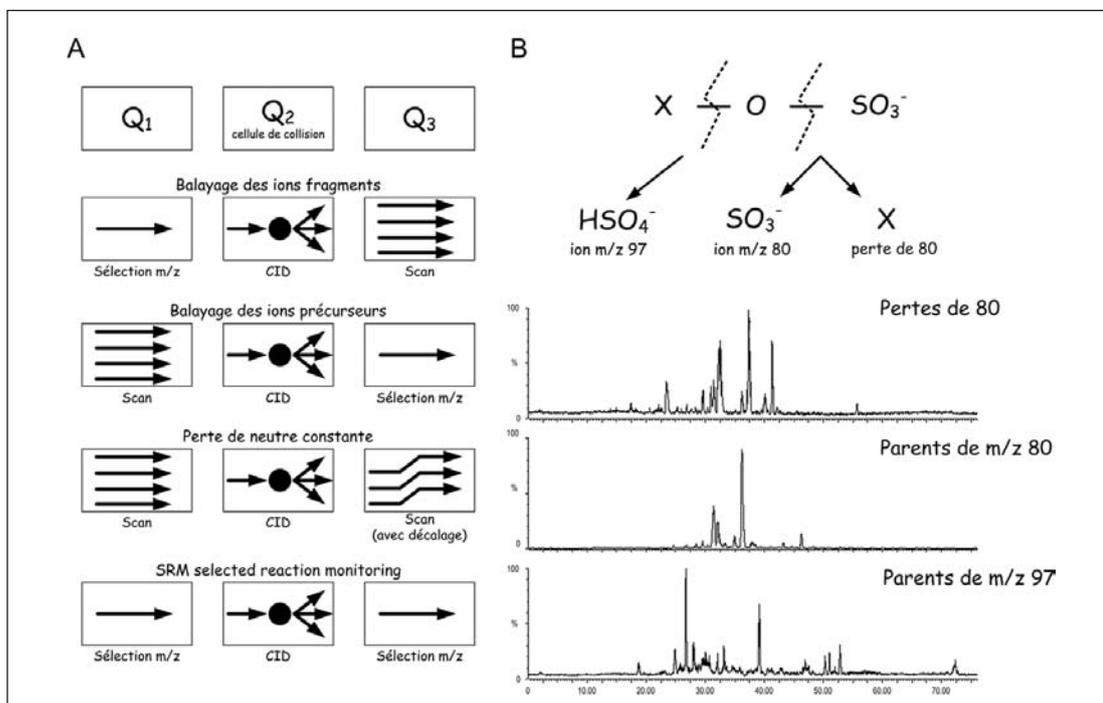


Figure 5 : Les différents modes d'acquisition du signal en spectrométrie en tandem.

A. Le balayage des ions fragments et des ions précurseurs, la perte de neutres et le suivi d'une transition spécifique.

B. Il est possible d'obtenir des empreintes LC/MS/MS caractéristiques de différents types de sulfoconjugués urinaires, selon leurs profils de fragmentation. On peut par exemple détecter sélectivement les molécules qui en se fragmentant dans le spectromètre de masse, perdent 80 unités de masse (groupement sulfate, SO_3) ou engendrent un anion de masse 80 (SO_3^-) : elles correspondent à des sulfoconjugués comportant un noyau aromatique. Les molécules qui génèrent un anion de masse 97 (HSO_4^-) durant le processus de fragmentation correspondent, elles, à des sulfoconjugués de type alicyclique, c'est-à-dire cycliques non aromatiques, comme les stéroïdes androgènes, par exemple.

2.2.2. Dans la pratique, l'appareillage standard pour l'analyse quantitative est l'*electrospray* couplé aux triples quadripôles. Cet appareillage permet d'atteindre en mode SRM des seuils de détection extrêmement faibles. Grâce à son couplage aisé avec la chromatographie liquide, l'ESI-MS/MS est particulièrement bien adapté à l'analyse de molécules polaires présentes dans les fluides biologiques. C'est un appareillage de choix pour l'analyse toxicologique ou la pharmacocinétique.

était limitée aux universités et aux laboratoires privés spécialisés. Elle s'est maintenant popularisée car les instruments sont plus simples et accessibles aux non spécialistes. La **spectrométrie de masse appliquée à la biologie clinique** offre une gamme étendue d'applications, allant de l'analyse des petites molécules jusqu'aux polymères biologiques. Elle est par exemple utilisée pour le diagnostic prénatal des maladies héréditaires.

ditaires métaboliques, aux Etats-Unis et en France. Nous n'aborderons ici que des applications en lien avec les métabolites.

3.1.1. Les suivis thérapeutique et toxicologique. Le suivi thérapeutique pharmacologique ou TDM (*Therapeutic Drug Monitoring*) consiste en la mesure des concentrations des médicaments ou de leurs métabolites actifs dans la circulation. L'objectif est de maintenir les concentrations dans l'index thérapeutique, c'est-à-dire entre les concentrations minimales nécessaires pour observer un effet thérapeutique et les concentrations toxiques. Le TDM est particulièrement important pour les médicaments possédant un index thérapeutique étroit comme la *digoxine*⁵ [2], les médicaments immunosuppresseurs utilisés lors des greffes d'organes (Tacrolimus p. ex.) [30] ou les cocktails d'inhibiteurs de la transcriptase inverse ou des protéases virales utilisés dans le traitement du virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Dans le cadre particulier du **traitement du VIH**, des méthodes d'analyse permettant la détection et la quantification simultanée du plus grand nombre de composés ont été développées à l'aide de couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem ou LC/MS/MS [1]. Ainsi, il est possible de détecter et de quantifier simultanément les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), précurseurs de l'ADN viral et les didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP), médicaments compétiteurs des premiers sur l'activité de la transcriptase inverse du VIH. La détermination du ratio ddNTP/dNTP peut permettre ensuite d'évaluer l'efficacité et la toxicité de ces médicaments. Ce type de méthodologie est également applicable à d'autres nucléotides, comme par exemple l'ATP.

La LC/MS/MS peut également être utilisée à des fins de **suivi toxicologique** pour détecter des médicaments et des toxiques dans des fluides biologiques tels que le plasma, les urines ou le liquide de lavage gastrique. L'équipe de PIERRE MARQUET a publié une étude comparative des performances de la LC/MS/MS par rapport à la GC/MS et à la chromatographie liquide couplée à un détecteur UV à barrette de diode pour la détection de médicaments et de toxiques dans 36 prélèvements cliniques. La LC/MS/MS a été la technique la plus performante puisqu'elle a permis d'identifier 94% des toxiques alors que la GC/MS et la LC/UV n'en ont respectivement identifié que 64 et 55% [22].

Le spectromètre de masse utilisé dans cette étude était un appareil hybride de type Q-TRAP [7]. Cet instrument présente des analogies avec les triples quadripôles, le troisième analyseur étant un piège linéaire. Il est ainsi possible d'acquérir des spectres en mode de balayage analytique et de réaliser des expériences de MS³, tout en conservant les modes d'acquisition des triples quadripôles.

3.1.2. Le diagnostic. Avant 1980, le diagnostic des maladies génétiques liées à des anomalies au niveau du métabolisme des acides organiques, des acides aminés et des acides gras était réalisé par GC/MS. Les acides gras sont métabolisés

par β oxydation mitochondriale. Pour cela, ils sont transportés à travers la membrane cellulaire vers le cytosol. Ils traversent ensuite la membrane externe mitochondriale pour former des conjugués avec le *coenzyme A* (dérivés acylCoA). Les acyl-CoAs réagissent ensuite avec la *carnitine* (acylcarnitines), ce qui leur permet de passer à travers la membrane interne mitochondriale grâce à un système de transport actif. Enfin, à l'intérieur de la mitochondrie, les acylcarnitines sont reconverties en acylCoAs qui subissent une dégradation par β oxydation.

Des anomalies au niveau de certains enzymes impliqués dans le processus de β oxydation provoquent une accumulation sanguine d'acylcarnitines. Ces esters de carnitine sont difficilement détectés par GC/MS, tandis que la spectrométrie de masse en tandem avec des sources à ionisation à pression atmosphérique s'avère être une méthode de choix. La détection est réalisée par introduction directe de l'échantillon biologique dans un spectromètre de masse de type triple quadripôle avec une détection en mode balayage de parent d'un ion fragment caractéristique des acylcarnitines à m/z 85 (Fig. VI). La procédure ne prend que quelques minutes [3].

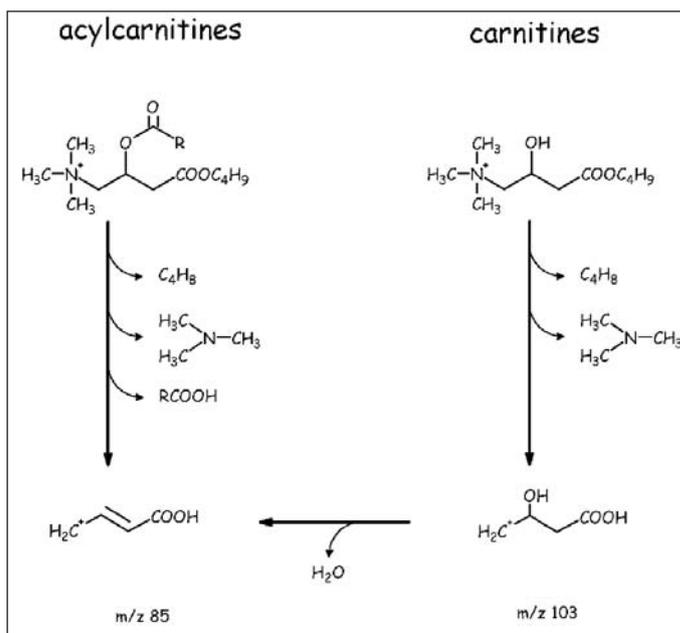


Figure VI : Schéma de fragmentation des butyl-esters protonés de la carnitine et des acylcarnitines obtenus dans le cadre d'expériences de CID (collision induced dissociation). (R : acide gras de 2 à 20 carbones)

3.2. L'ANALYSE MÉTABOLOMIQUE

3.2.1. Objectif : Apparu à la fin des années 1990, le concept de "métabolome" désigne l'ensemble des métabolites présents dans un milieu biologique. L'objectif des analyses métabolomiques est de caractériser des biomarqueurs en comparant des empreintes métaboliques qui contiennent plusieurs milliers de signaux et qui sont caractéristiques d'états biolo-

⁵ un glycoside cardiotonique utilisé dans l'insuffisance cardiaque grave.

giques donnés. Ce type d'approche ouvre des perspectives prometteuses dans des domaines variés tels que la nutrition [20], le marquage de pathologie ou de toxicité [18] et, à un niveau plus fondamental, la compréhension globale des systèmes vivants [29].

L'analyse métabolomique est une approche multidisciplinaire mettant en jeu la chimie analytique, pour acquérir des empreintes métaboliques les plus informatives et les plus robustes possibles, le traitement du signal, pour extraire l'information analytiquement la plus pertinente à partir de ces empreintes et les analyses statistiques multivariées, qui permettent de résumer et de visualiser l'information biologiquement pertinente qui est contenue dans le jeu de données. Enfin, il est possible de caractériser les signaux d'intérêt biologique révélés par les analyses statistiques grâce à des expériences complémentaires impliquant la spectrométrie de masse et/ou la

résonance magnétique nucléaire (RMN) (Fig. VII). L'analyse métabolomique a pour objectif d'aboutir à une meilleure compréhension des systèmes biologiques en mettant en évidence des interrelations métaboliques qui n'auraient pas pu être détectées avec des approches biochimiques traditionnelles. D'autre part, contrairement aux approches analytiques traditionnelles où les analytes à détecter sont préalablement sélectionnés avant la mise au point de la méthode de dosage, l'analyse métabolomique repose, elle, sur l'extraction de l'information pertinente à partir des empreintes métaboliques. Ceci permet de réaliser plusieurs fouilles de données successives avec des objectifs différents.

3.2.2. Les approches métabolomiques trouvent des applications dans différents domaines tels que la recherche de biomarqueurs de toxicité [5] et de pathologie [32, 34] ou encore

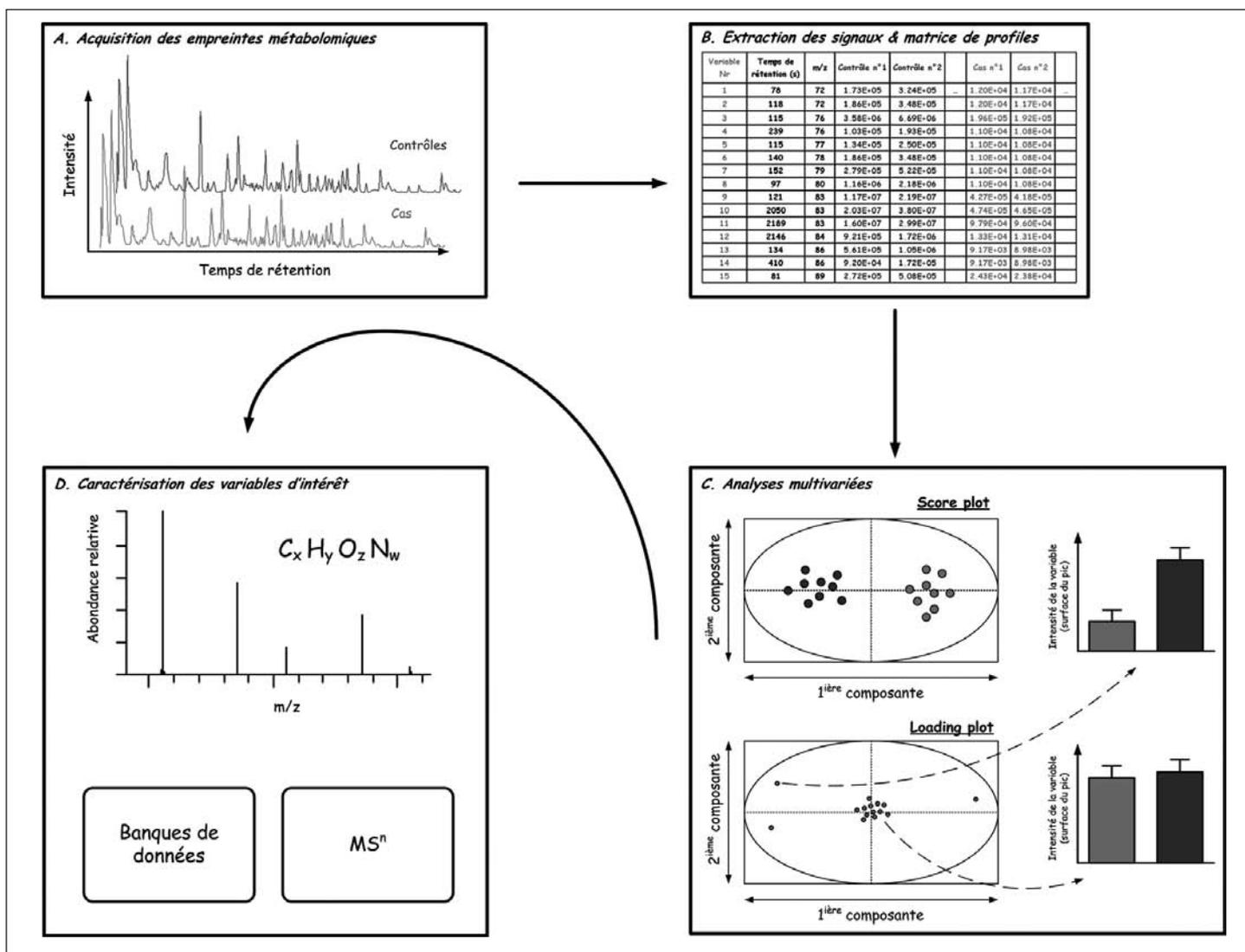


Figure VII : Processus d'analyse métabolomique : (A) Acquisition des empreintes métabolomiques des cas et des contrôles, (B) extraction des pics et constitution d'une matrice renseignant pour chaque variable (c'est-à-dire chaque couple [m/z - temps de rétention]), l'intensité (hauteur, surface,...) du signal dans chaque échantillon, (C) analyses statistiques multivariées (la carte factorielle du poids des individus, encore appelée "score plot", représente la dispersion optimale des échantillons en fonction de leur groupe (cas ou contrôle). La carte factorielle du poids des variables, encore appelée "loading plot" représente les variables (m/z + temps de rétention). Les variables les plus discriminantes pour la séparation des groupes sont présentes en périphérie. (D) Les variables discriminantes sont ensuite identifiées (obtention de la composition élémentaire, interrogation de banques de données et expériences de MS/MS).

l'étude du métabolisme des xénobiotiques⁷. Le thème de la médecine personnalisée a également été abordé, avec des perspectives prometteuses [4]. La mesure simultanée d'un grand nombre de métabolites a permis de découvrir de nouvelles voies métaboliques et d'écrire de nouveaux diagrammes métaboliques, comme l'illustre une étude menée par SOGA et collaborateurs [23] sur un modèle de stress oxydant induit par le paracétamol chez la souris⁸.

Les études métabolomiques ont également contribué à une meilleure compréhension des pathologies dont l'étiologie est inconnue ou mal caractérisée. Pour cela, la complémentarité des différentes méthodes d'études post-génomiques commence à être exploitée. Une telle démarche a récemment été employée pour l'étude de la schizophrénie [19] à partir de tissus cérébraux humains, en combinant les approches transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques. Les auteurs de cette étude ont ainsi mis en évidence des modifications du métabolisme énergétique cérébral et du fonctionnement mitochondrial, ainsi que l'existence de mécanismes de réponse à la présence d'un stress oxydant.

Le **phénotypage** des organismes transgéniques, ou des patients, est également une des applications de la métabolomique. Dans le cas des animaux transgéniques, l'objectif est de caractériser biochimiquement des modèles animaux qui miment des pathologies humaines afin d'améliorer leur compréhension, d'identifier des biomarqueurs à visée diagnostique et de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques.

WU et coll. [34] ont utilisé le profilage métabolique par spectrométrie de masse pour développer un **modèle murin d'étude d'une maladie métabolique humaine d'origine génétique**. Ils ont administré à des souris un agent mutagène (*N-éthyl-N-nitroso-urée*) qui provoque des mutations aléatoires dans leur génome. Grâce à la métabolomique, ils ont comparé le profil urinaire des souris à celui de patients et sélectionné des animaux présentant un phénotype similaire à celui des patients atteints par cette maladie génétique.

Récemment, WERNER et coll. [31] ont démontré l'intérêt d'une approche métabolomique dans le contexte de **l'identification des métabolites et des effets endogènes d'un xénobiotique**. Des rats ont été traités avec du phénobarbital et leurs urines, avant et après traitement, ont été analysées. L'approche différentielle développée en métabolomique a permis d'isoler, dans un premier temps, les signaux spécifiques aux métabolites du phénobarbital et dans un second temps, les molécules dont l'expression avait été modifiée par le phénobarbital. Les analyses réalisées à l'aide d'un piège ionique couplé à un Orbitrap (ultra-haute résolution) ont abouti à la caractérisation de 14 métabolites du phénobarbital dans des urines de rats, dont certains n'avaient jamais été décrits auparavant.

CONCLUSION

Deux prix Nobel, respectivement en Physique et en Chimie, ont récompensé les avancées significatives réalisées dans le domaine de la spectrométrie de masse. Le premier a été attribué à Wolfgang PAUL, pour le développement du piège ionique, et le second à John FENN pour la méthode d'ionisation par *electrospray*.

Ces deux découvertes, et particulièrement l'*electrospray*, au travers de sa capacité de couplage à la chromatographie liquide ont grandement contribué au développement de nouvelles applications de la spectrométrie de masse dans l'analyse et la caractérisation des biomolécules. La commercialisation d'analyseurs à ultra-haute résolution d'usage aisé (LTQ-Orbitrap) est une nouvelle étape franchie dans la mise en oeuvre de la spectrométrie de masse dans des laboratoires pour lesquels elle n'est pas le domaine d'étude principal. En effet, l'accès à l'ultra-haute résolution ouvre, pour un plus grand nombre de biologistes, une voie vers la caractérisation structurale des molécules inconnues. La richesse du panel d'instruments disponibles reflète la diversité d'usage des spectromètres de masse et rappelle qu'un seul instrument ne peut répondre à toutes les demandes des utilisateurs.

ABSTRACT

MASS SPECTROMETRY FOR THE ANALYSIS OF SMALL MOLECULAR WEIGHT MOLECULES IN BIOLOGICAL FLUIDS

Mass Spectrometry is an analytical tool that allows the separation of ions according to their mass to charge ratios. This paper covers the main technological improvements in mass spectrometry regarding sources and analyzers, which have made mass spectrometry a reference tool for the quantification and characterization of low molecular weight compounds (i.e. metabolites) in biofluids. Several of its applications, in the field of clinical biology (therapeutic drug monitoring, toxicology, diagnosis) are then reported and discussed. Finally, we focus on **metabolome analysis**. This is a global approach which highlights metabolites of biological relevance by using statistical discriminant analysis of metabolic fingerprints.

MOTS-CLÉS : Spectrométrie de masse, métabolites, métabolomique, biologie clinique, suivi thérapeutique, diagnostic, toxicologie.

KEYWORDS: Mass spectrometry, metabolites, metabolomics, metabonomics, clinical biology, drug monitoring, toxicology, diagnosis.

Remerciements : Jean-François HEILIER est titulaire d'une bourse de recherche post-doctorale délivrée par les Fonds Spéciaux de Recherche de l'Université catholique de Louvain.

⁷ Substance étrangère à l'organisme vivant.

⁸ SOGA et collaborateurs ont détecté 1859 signaux par électrophorèse capillaire couplée à un spectromètre de masse équipé d'un analyseur à temps de vol dans des extraits hépatiques de souris. En analysant les modifications métaboliques induites par le paracétamol, ils ont mis en évidence une corrélation entre les concentrations plasmatiques d'acide ophtalmique et la déplétion en glutathion hépatique. En conclusion, ils proposent l'utilisation de cet acide en tant que biomarqueur de stress oxydant.

BIBLIOGRAPHIE

1. BECHER F, PRUVOST A, GOUJARD C *et al.*, Improved method for the simultaneous determination of d4T, 3TC and ddI intracellular phosphorylated anabolites in human peripheral-blood mononuclear cells using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 2002, **16** 555-565
2. CAMPBELL TJ and WILLIAMS KM Therapeutic drug monitoring: antiarrhythmic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2001, **52** 21S-34S
3. CHACE DH Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem.Rev.* 2001, **101** 445-477
4. CLAYTON TA, LINDON JC, CLOAREC O *et al.*, Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 2006, **440** 1073-1077
5. COEN M, HOLMES E, LINDON JC *et al.*, NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem.Res.Toxicol.* 2008, **21** 9-27
6. DE HOFFMANN E and STROOBANT V. Spectrométrie de masse Dunod Ed, Paris 2005
7. DOUGLAS DJ, FRANK AJ, and MAO DM Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom.Rev.* 2005, **24** 1-29
8. FENN JB, MANN M, MENG CK *et al.*, Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 1989, **246** 64-71
9. FERGUSON RE, FERGUSON RE, MCCULLOH KE *et al.*, Observation of the Products of Ionic Collision Processes and Ion Decomposition in a Linear, Pulsed Time-of-Flight Mass Spectrometer. *J.Chem.Phys.* 1965, **42** 100-106
10. KARAS M and HILLENKAMP F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Anal.Chem.* 1988, **60** 2299-2301
11. KINGDON KH. A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Physical Review* 1923, **21** 408-418
12. KRALY J, FAZAL MA, SCHOENHERR RM *et al.* Bioanalytical applications of capillary electrophoresis. *Anal.Chem.* 2006, **78** 4097-4110
13. LEMBCKE J, CEGLAREK U, FIEDLER GM *et al.* Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. *J.Lipid Res.* 2005, **46** 21-26
14. MAKAROV A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal.Chem.* 2000, **72** 1156-1162
15. MARCH RE & TODD JF. Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry Wiley Ed, New York 2005
16. MARSHALL AG, HENDRICKSON CL, & JACKSON GS Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom.Rev.* 1998, **17** 1-35
17. MORRIS HR, PAXTON T, DELL A *et al.* High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun.Mass Spectrom* 1996, **10** 889-896
18. NICHOLSON JK, CONNELLY J, LINDON JC *et al.* Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2002, **1** 153-161
19. PRABAKARAN S, SWATTON JE, RYAN MM *et al.* Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol.Psychiatry* 2004, **9** 684-97, 643
20. REZZI S, RAMADAN Z, FAY LB *et al.* Nutritional metabonomics: applications and perspectives. *J.Proteome.Res.* 2007, **6** 513-525
21. ROBB DB, COVEY TR, & BRUINS AP Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal.Chem.* 2000, **72** 3653-3659
22. SAUVAGE FL, SAINT-MARCOUX F, DURETZ B *et al.*, Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Clin.Chem.* 2006, **52** 1735-1742
23. SOGA T, BARAN R, SUEMATSU M *et al.* Differential metabonomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol.Chem.* 2006, **281** 16768-16776
24. STEPHENS WE A pulsed mass spectrometry with time dispersion. *Physical Review* 1946, **69** 691-691
25. STRAUBE EA, DEKANT W, & VOLKEL W Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization for the analysis of dinitropyrene and aminonitropyrene LC-MS/MS. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* 2004, **15** 1853-1862
26. TAKATS Z, WISEMAN JM, & COOKS RG Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J.Mass Spectrom.* 2005, **40** 1261-1275
27. TAKINO M, DAISHIMA S, & NAKAHARA T Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J.Chromatogr.A* 2003, **1011** 67-75
28. THOMAS JJ, SHEN Z, CROWELL JE *et al.* Desorption/ionization on silicon (DIOS): a diverse mass spectrometry platform for protein characterization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001, **98** 4932-4937
29. VAN DER GREEF J, MARTIN S, JUHASZ P *et al.*, The art and practice of systems biology in medicine: mapping patterns of relationships. *J.Proteome.Res.* 2007, **6** 1540-1559
30. WALLEMACQ PE Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we? *Clin.Chem.Lab Med.* 2004, **42** 1204-1211
31. WERNER E, CROIXMARIE V, UMBDENSTOCK T *et al.* Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Accelerating the Characterization of Discriminating Signals by Combining Statistical Correlations and Ultrahigh Resolution. *Anal.Chem.* 2008, *In press*
32. WIKOFF WR, PENDYALA G, SIUZDAK G *et al.* Metabolomic analysis of the cerebrospinal fluid reveals changes in phospholipase expression in the CNS of SIV-infected macaques. *J Clin.Invest* 2008, **118** 2661-2669
33. WILEY WC, WILEY WC, MCLAREN IH *et al.* Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev.Sci.Instrum.* 1955, **26** 1150-1157
34. WU JY, KAO HJ, LI SC *et al.* ENU mutagenesis identifies mice with mitochondrial branched-chain aminotransferase deficiency resembling human maple syrup urine disease. *J Clin Invest* 2004, **113** 434-440
35. YOSHIOKA N, AKIYAMA Y, & TERANISHI K. Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J.Chromatogr.A* 2004, **1022** 145-150

TOURNÉE D'INSPECTION EN AFRIQUE ÉQUATORIALE FRANÇAISE - Première partie -

Docteur Gaëtan SALEUN ¹

AVANT-PROPOS

par le Docteur Jean-Paul SALEUN ³

Parmi les documents retrouvés après le décès de mes parents, se trouvait un "carnet de route" tenu par mon père, le médecin lieutenant-colonel Gaëtan SALEUN, lors de la tournée d'inspection qu'il effectua en Afrique Equatoriale Française (AEF) en 1945. Ces notes de voyage, rédigées il y a plus de 60 ans, et uniquement à l'intention de ma mère, n'étaient pas destinées à être publiées. Cependant, elles constituent un témoignage historique de la vie dans cette région, car elles décrivent les différentes formations médicales visitées, les personnes rencontrées et les contrées traversées. Nombreux sont ceux qui croient que ces pays, devenus des destinations touristiques, étaient de petits paradis pour ceux qui y travaillaient. En fait, les jeunes médecins lâchés en brousse rencontraient de grandes difficultés et les remarques de mon père sur le niveau culturel des infirmiers, des matrones et de la population rencontrés sont quelquefois si peu amènes (illettrisme, prostitution, alcoolisme...) que certaines ont dû être supprimées.

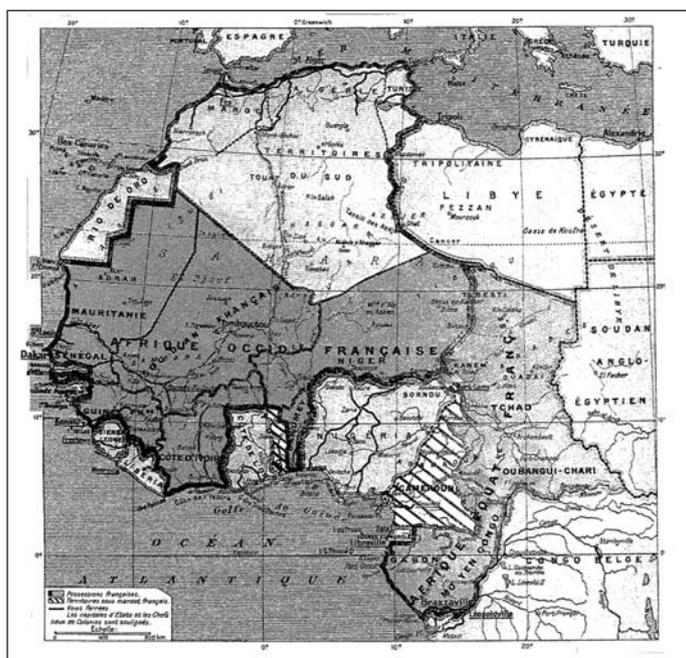


Figure 1 : Possessions françaises et territoires sous mandat français en Afrique du Nord, Afrique Occidentale et Afrique Equatoriale. Atlas de l'Empire Colonial Français, Création de L'office de Propagande Philatélique, 12 rue de l'Arcade, Paris VIIIe. (Date approximative : entre 1942 et 1947).

comportant le Nord du Moyen-Congo et l'Oubangui-Chari, la seconde, l'Ouest du Moyen-Congo et le Gabon. Dans le texte présenté ci-après, Gaëtan SALEUN décrit son périple dans le Nord du Moyen-Congo, en partant de Brazzaville jusqu'à Ouesso, ainsi que le trajet fluvial sur la Sangha. La description de la fin de la tournée d'inspection sera publiée dans un numéro ultérieur.

CONTEXTE HISTORIQUE : Après la fermeture par les Allemands de l'Ecole d'Application du Service de Santé des Troupes Coloniales du Pharo à Marseille, où mon père enseignait la bactériologie et la parasitologie aux futurs médecins coloniaux, il continua à dispenser cet enseignement dans les locaux de l'Institut Pasteur à Paris (sans l'autorisation des autorités). Après la libération de cette ville et sa prise de fonction au Ministère des Colonies, le Médecin général inspecteur VAUCEL le désigna en octobre 1944 pour créer et organiser un nouveau service d'Hygiène Mobile et de Prophylaxie en AEF. Cette colonie comprenait quatre territoires : le Gabon, le Moyen-Congo (devenu le Congo-Brazzaville), l'Oubangui-Chari (devenu la République Centrafricaine) et le Tchad². Mon père y avait déjà effectué trois séjours consécutifs : le premier comme adjoint du même docteur VAUCEL, à l'Institut Pasteur de Brazzaville, les deux suivants pour lui succéder et diriger cet Institut.

Le 2 février 1945, il quitte la France par avion militaire à destination de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso, ex Haute-Volta), où il fait escale afin de voir sur place des réalisations déjà existantes dans ce territoire. Il rejoint ensuite Brazzaville, où il décide d'organiser une tournée d'inspection dans tous les départements de cette colonie pour faire un bilan, se rendre compte de l'état sanitaire et des possibilités locales. Compte tenu des moyens de transport de l'époque et des pistes existantes (la route goudronnée s'arrêtait à moins de 10 km après Brazzaville) et de l'étendue du territoire à visiter (cinq fois la France), la tournée fut scindée en deux et exclut le Tchad : la première partie de la tournée en AEF

¹ Cours IP 1930-1931, puis moniteur (1934-1935) du même cours, Chef de laboratoire (1931 à 1933), puis Directeur (1935 à 1937) et de 1938 à 1940 de l'Institut Pasteur de Brazzaville.

² Le Cameroun avait un statut à part ; ancienne colonie allemande, elle avait été confiée sous mandat par la Société des Nations en partie à la France, l'autre étant attribuée à la Grande-Bretagne.

³ Cours IP 1962, membre du Conseil d'Administration de l'AAEIP

PREMIÈRE PARTIE : LE NORD DU MOYEN-CONGO (2 avril - 12 juin 1945)

● **DE BRAZZAVILLE À OUESSO**

1° - De Brazzaville à Pangala

Départ de **Brazzaville** le 2 avril à 7h35. Le ciel est gris, la température fraîche. Mayama est à 95 kilomètres, le trajet est assez pénible, de nombreux passages sont difficiles, la paille des herbes sèches recouvre la route et masque les trous. Arrivée au bac à 9h40, puis poursuite sur Pangala distant de 98 km pour une arrivée à midi 20. L'état des routes est assez médiocre avec quelques passages très difficiles, comme à la sortie de Mayama où existe un tronçon assez long avec nombreux nids de poule non apparents. Les ponceaux sont normaux, l'un d'eux est en réfection juste avant l'arrivée à Pangala.



Le Médecin Lieutenant-Colonel Gaëtan SALEUN (Archives familiales)

Les villages sont rares de Brazzaville à **Mayama**. Ils sont plus nombreux entre ce village et Pangala, mais leur propreté très négligée. Certains ont des cases très basses, très pauvres, mal faites, avec des toits ronds sans ouvertures. Les indigènes sont petits, ils ont peur au passage de la voiture et s'esquivent dans la brousse leur charge sur la tête. La région est toute en collines, aux ondulations larges et plates recouvertes de hautes herbes et de quelques rares boqueteaux, entrecoupées de nombreux vallonnements.

A **Pangala**, l'infirmier signale que de nombreux indigènes fuient dans la brousse, depuis le procès des Balalis, par crainte d'être compromis. Il est secondé par un infirmier sta-

giaire, une matrone et une élève. Les cases constituant la formation sanitaire sont délabrées et sales. Les malades sont rassemblés dans un seul bâtiment obscur et enfumé, une douzaine d'entre eux sont trypanosomés⁴. Un nouveau bâtiment, peut-être commencé en 1939, en vue d'installer un dispensaire, était une bonne idée. Malheureusement, sa construction est stoppée depuis la guerre. Il n'y a pas de crédits pour poursuivre. La case du médecin est en assez bon état, à entretenir. Les médicaments sont rares. Le matériel est insuffisant et en mauvais état, (un microscope dont la vis micrométrique ne fonctionne pas). Aucune tournée⁵ n'a eu lieu dans la région depuis 1943. A l'école, il y a 70 enfants.

Déjeuner à Pangala et départ à 13h50, arrivée au bac à 15h40. Nombreuses mouches tsé-tsés⁶.

2° - Etape à Djambala

Après 306 km, arrivée à **Djambala** (22.316 habitants), vers 17h. C'est un joli poste sur un piton situé à 700 mètres d'altitude environ et en dominant d'autres aux alentours. La case du chef de département est neuve, bien faite, surplombant un à pic. Le panorama est vaste, bien dégagé, la vue est magnifique. La case de passage est confortable, même coquette, de même que les bâtiments de l'école. L'altitude et la position du poste, très «ventilé», font que la température est souvent fraîche et nécessite de faire du feu, d'où la construction de cheminées de type européen dans chaque case.

L'infirmierie comporte un bâtiment très correct, bien tenu. Cependant les aménagements intérieurs seraient à poursuivre : les matériaux sont faciles à trouver sur place. Le personnel est convenablement logé dans des petites cases en briques, mais il n'y a pas de maison de médecin. Un infirmier, visage ouvert, semble avoir une bonne activité, il est assisté d'un stagiaire, d'un agent d'hygiène et d'une infirmière. Les médicaments sont en faible quantité mais

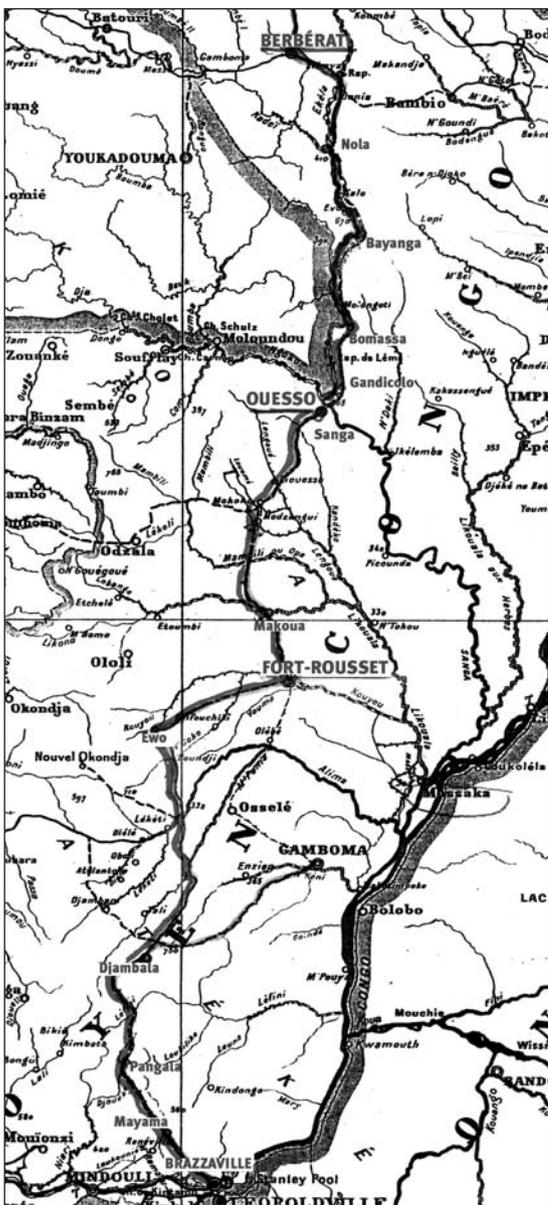


Figure II : Itinéraire du Docteur Gaëtan Saleun au Moyen-Congo. Les étapes de la tournée sont soulignées (Brazzaville, Mayama, Pangala, Djambala, Ewo, Fort Rousset, Makoua, Ouesso, Bomassa, Bayanga).

⁴ Atteints de trypanosomiase ou maladie du sommeil

⁵ tournée = visite du médecin dans les différents villages avoisinants

⁶ mouches vecteurs du trypanosome, agent de la maladie du sommeil

l'essentiel est présent. Les consultations assez nombreuses sont faites aussi consciencieusement que possible. La subdivision de Djambala n'a pas été vue au plan de la trypanosomiase depuis 1941, l'administrateur déclarant qu'il n'y avait pas de trypanosome dans la région, d'où l'inutilité des tournées !...

Tout le département est du ressort du médecin qui se trouve à **Gamboma**. Celui-ci se présente correctement et me fait bonne impression. Il aurait sur place 8 infirmiers capables de reconnaître des trypanosomes. Il a 4 microscopes dont 3 en bon état, une camionnette *De Soto* mais une vedette ou une pinasse serait nécessaire. Gamboma paraît le point le plus central de la région, d'autre part, renseignements pris, il semble que depuis l'affectation de ce médecin indigène, la population viendrait très volontiers se faire traiter, étant donné ses bons résultats.

Départ de Djambala le 3 avril à 13h20 pour rejoindre Ewo, distante de 250 km. La route est excellente sur environ 60 km, très mauvaise par la suite. Il existe de nombreux passages sablonneux agrémentés de profondes ornières. A 15 heures, passage du bac de la **Pama** ; nous essayons une tornade créant des flaques d'eau et des gerbes latérales au passage de la camionnette. La route est très ensablée, nous obligeant à quitter son tracé pour nous créer un chemin dans la brousse environnante. La pluie a fait baisser sérieusement la température, il fait très froid.

A 16h30, arrivée au bac de la **rivière Alima**, bordée d'une petite forêt d'aspect agréable, succédant aux collines dénudées ou simplement herbeuses, pratiquement désertes, que nous venions de parcourir. Après le passage du bac, la route est devenue meilleure. De l'autre côté du fleuve Okoyo se trouvent une palmeraie, des villages et les hangars de la maison Tréchet.

3° - Ewo

Nous arrivons à 18h25 à **Ewo**, chef-lieu d'une subdivision de 30.000 habitants du département de la **Likouala-Mossaka**. La route est devenue meilleure. Les villages sont nombreux et l'on y aperçoit quelques enfants. Les cases sont petites en feuilles de palmiers, beaucoup penchent et vont s'effondrer ; l'hygiène et la propreté sont inexistantes. Il règne un aspect de très grande pauvreté, sauf dans les villages où existe une palmeraie ; cependant, l'indigène extrayant l'huile pour le compte de la seule société existant dans la région, effectue un travail peu rémunérateur.

Les populations sont chétives, certainement très sous-alimentées. De plus, elles s'étiolent peut-être par consanguinité, ou plutôt à cause des fléaux sociaux : syphilis, trypanosomiase, paludisme... Les enfants sont plus ou moins rachitiques (gros ventres, membres grêles). Les cultures paraissent rares, elles sont inapparentes aux alentours des villages.

Il existe une infirmerie tenue par un sergent infirmier européen, un infirmier indigène et une matrone. Pas d'hypnosserie⁷ : les sommeilleux sont traités avec les autres malades. Il n'existe pratiquement pas de matériel : un seul microscope, pas de véhicule et l'approvisionnement en médicaments est lamentable. En 1944, l'infirmier principal aurait effectué à pied, accompagné de 2 porteurs, la prospection de trois terres seulement, soit 3.000 habitants sur 30.000 à visiter. La durée de son absence a été de 15-20 jours. Il aurait seulement dépisté 30 sommeilleux. Une tornade éclate dans la nuit.

Le 4 avril : départ à 6h55 pour Fort Rousset, distant de 148 km. Nous passons le N'Goko sur un grand pont de bois. La région est plus peuplée, de nombreux petits villages bordent la route et leur prospérité paraît meilleure au fur et à mesure que nous approchons du but de notre étape.

La population est en meilleure condition physique. La taille est très moyenne mais les adultes sont musclés. Les enfants sont plus nombreux et, dans l'ensemble, leur état paraît satisfaisant. L'alimentation serait plus variée : manioc, arachides, maïs, surtout ; viande en petite quantité mais suffisante (petit bétail et gibier).

Le temps est gris et humide, la zone traversée est alternativement une savane et des bosquets de plus en plus touffus.

4° - Arrivée à Fort Rousset (aujourd'hui Owando) à 10h

Le poste, chef-lieu du département de la Likouala-Mossaka, (95.000 habitants), situé au bord d'une large rivière, paraît agréable. La formation sanitaire est importante, les bâtiments sont en dur, bien tenus. Ils comprennent un bâtiment principal destiné aux consultations et aux traitements : un petit bloc chirurgical, deux bâtiments secondaires d'hospitalisation. Mais consultations et hospitalisations ne reflètent nullement l'action médicale d'un centre aussi important. Le matériel est suffisant mais pourrait être amélioré..., il y a 3 micros et une camionnette, en panne depuis plusieurs mois.

Le réseau routier est suffisant pour permettre des tournées rapides, sauf dans la subdivision de Mossaka où tout doit se faire par pirogue, mais il serait indispensable d'affecter une pinasse à moteur pour gagner du temps. Comme le médecin ne possède pas de voiture, il ne se déplace qu'exceptionnellement.

Le personnel se compose d'un médecin autrichien contractuel, de 6 à 7 infirmiers indigènes, d'un agent d'hygiène et de 4 matrones ou élèves. La case du médecin est en assez bon état ; après amélioration, elle pourrait servir à un agent sanitaire, car une nouvelle case est en construction. Les infirmiers sont très bien logés dans des cases en dur.

Il existe aussi une hypnosserie aux cases médiocres, qui semble n'exister que pour la forme, car il y a peu de sommeilleux en traitement, le recensement de ceux-ci n'étant pas fait, car les tournées sont insuffisantes.

Dans le département de la Likouala, dont Fort Rousset est le chef-lieu, existent aussi en plus de la formation d'Ewo déjà citée, une infirmerie à **Makoua** tenue par un infirmier européen, assisté d'un indigène et d'une matrone. Il surveille aussi une hypnosserie très bien située, tenue correctement mais qui serait à refaire entièrement (il y a peu de sommeilleux en traitement) et une léproserie en construction avec des matériaux du pays ; il y a aussi à **Mossaka** une infirmerie tenue par un sergent infirmier et 3 infirmiers, dont un reste à demeure et deux partent en tournées. A Mossaka, l'infirmier effectue environ 10 à 15 jours de tournées par mois, ce qui fait que la subdivision est vue une fois par an. Mais, en 1944, seulement un tiers de la population a été visité. Par contre, en 1945, 80% et même davantage, de la population est vu, selon les terres, grâce à l'appui du nouveau chef de la subdivision.

⁷ hypnosserie = établissement destiné à hospitaliser les sujets atteints de la maladie du sommeil dans un état trop grave pour pouvoir subvenir à leurs besoins

Dans ce département, d'après les «on dit», il y aurait beaucoup de trypanosomiase. En tout cas, plus que les statistiques ne le montrent, car les tournées sont insuffisantes pour refléter avec exactitude l'incidence de cette endémie. D'après les renseignements fournis par l'infirmier, qui connaît à peu près tout le département, la subdivision de Mossaka serait la plus frappée, puis Abolo, Makoua, Fort Rousset et enfin Ewo.

Mon inspection montre qu'aucune action suivie n'est réalisée. Nulle part, les lépreux n'ont été recensés, on signale, par-ci par-là, des zones où leur nombre paraîtrait plus important, mais rien de précis. D'ailleurs il n'y a pas de traitement suivi de ces malades qui, dégoûtés, retournent à leur village. J'envisagerai dans ce mémoire le recensement de la syphilis, de la tuberculose, du pian, de la bilharziose, de l'amibiase, et du paludisme.

On ne sait pas grand chose quant aux variations quantitatives de la population, certains déclarent qu'elle décroît très sensiblement. Les avortements sont fréquents et la mortalité infantile élevée au cours du premier âge ; certaines terres sont nettement dépourvues d'enfants.

5° - Makoua

Le 5 avril à 9h30, départ de Fort Rousset pour Makoua, distant de 85 km. Passage de la rivière au bac, la route est convenable, avec seulement quelques ravinements. Pont sur le Kouyou. Les villages sont assez nombreux mais alternativement propres et sales selon la convenance de leur chef. La population paraît en assez bon état physique ; les enfants sont nombreux et ont bon aspect.

Cette région est nettement différente des précédentes, la forêt prenant le dessus. Ce qui frappe surtout, c'est que plus on se rapproche de Makoua et plus les cultures paraissent importantes, comme les plantations à proximité des villages. Monsieur X. déclare que la population est suffisamment alimentée : manioc, arachides, palmistes, un peu de maïs et, en plus, poissons et un peu de viande de chasse.

La prostitution est la règle, elle est même constatée par un rapport médical. Un proverbe dit : «la femme est comme l'eau de la rivière - quel est l'homme qui pourrait se vanter d'épuiser la totalité de l'eau qui coule dans la rivière ?». Dans certaines terres, il y aurait très peu d'enfants.

Arrivée à Makoua à 11h et visite de la mission catholique dont les constructions en dur sont intéressantes ; un barrage suivi d'une chute fournissant l'électricité pour actionner les machines d'un petit atelier de bois.

Départ à 6h15 le 6 avril, pour Ouesso, situé à 215 km.

Le passage de la rivière en bac prend 30 minutes. Peu après le départ, on entre dans la grande forêt équatoriale. Le temps est beau, frais. L'atmosphère dégage des senteurs d'humidité terrestre mélangée à celles de certaines plantes. Le spectacle est magnifique et grandiose. Arbres gigantesques et majestueux, certains ont des troncs droits qui s'élèvent vers le ciel à 40-50 mètres de hauteur ; d'autres aux troncs noueux, avec de grandes lianes qui les enveloppent ou descendent vers le sol, quelques-unes traversent la route, comme pour relier les deux côtés.

Plus bas poussent des fougères arborescentes, des arbustes de toutes sortes, des herbes et des feuillages très denses. Parfois, la route est recouverte d'un véritable gazon uniforme d'un très beau vert. De nombreux papillons de toutes couleurs volent de toutes parts. On se sent littéralement écrasé par la nature omniprésente.

Les villages sont moins rares que l'on pourrait le supposer dans une région de forêts aussi denses. On peut observer, de-ci de-là, des plantations de manioc et surtout des bananeraies. Parfois on aperçoit des parties dénudées, mutilées, ne respectant pas les beaux arbres dont l'aspect semi-calciné donne une note triste.

Ces zones sont destinées à l'établissement de nouveaux villages ou de plantations. Nous rencontrons des petits singes qui semblent nous abreuver de sarcasmes, furieux que l'on vienne violer leur habitat. Par ailleurs, nous rencontrons peu d'animaux ; c'est une région à gorilles.

Les indigènes se déplacent isolément ou par deux et traversent ces étendues boisées, lourdement chargés, car leurs déménagements se font à dos d'homme. Ils semblent affolés par un passage de véhicule, se figent à bonne distance du bord de la route, les yeux largement ouverts, exprimant à la fois la stupéfaction et la curiosité. On aperçoit de temps à autres des tombes sur le bord de la route, simples piquets sur lesquels sont accrochés les biens du décédé (le plus souvent une cuvette, une bouteille, un verre, parfois la carcasse d'une chaise longue).

À la traversée des villages, les indigènes poussent des cris de joie ou d'extase.

Arrêt à 90 km d'Ouesso pour déjeuner dans un petit village de grande forêt ayant une case de passage en poto-poto (torchis) à peine convenable. Deux factoreries indigènes y sont installées. La chaleur est lourde. Arrivée à Ouesso à 16 heures.

● SANGHA⁸ : OUESSO - BAYANGA

1° - Ouesso,

Ce poste, chef-lieu du département de la Haute Sangha, est construit sur le bord de la Sangha. Il y fait chaud et humide. La case de passage est très convenable. Le village indigène est important, mais d'aspect sale. Le clou du village est le marché nouvellement construit : c'est l'orgueil du chef de département, qui ne manque pas de demander aux passagers de visiter son œuvre. Cette construction est originale, octogonale, en dur avec toits superposés, deux rangées concentriques de piliers de soutien, girouette au sommet de la toiture. La ville n'a qu'une artère le long du fleuve, bordée de palmiers. Les cases administratives se succèdent, la case d'un colon termine la rangée avec l'habitation de la mission évangélique.

Le 10 avril, après 3 jours à Ouesso, embarquement sur la Sangha avec le médecin capitaine C., pour remonter jusqu'à Bayanga. Aux dires de tous, le trajet ne manquera pas d'imprévu, car les eaux ont rarement été aussi basses.

Le *pick-up* est placé, non sans difficultés, sur un des chalands accrochés latéralement le long du bateau "S/S Kosa Kosa".

⁸ La Sangha (notée Sanga sur la Fig. II) est un affluent du fleuve Congi (actuellement Zaïre).

Départ d'Ouessou à 11h. Le "Kosa Kosa" doit être un des plus vieux bateaux existant sur le fleuve. Petit, sans aucun confort, une toute petite cabine étroite pour le capitaine du bord, qui a installé son lit picot⁸ et un matelas pour sa jeune ménagère indigène. J'occupe une soit-disant cabine, c'est-à-dire quatre planches, un toit absolument vide. Mon picot est monté dans ce réduit.

Au centre, un petit emplacement libre contre le tuyau de la cheminée du bateau laisse juste l'espace pour une table sur laquelle on prend les repas, bien réchauffés par la chaleur extérieure et celle de la dite cheminée.

À l'arrière, sur la toiture en tôle ondulée très usagée, on a confectionné spécialement pour moi un petit abri, c'est-à-dire un bâti en planches sur lequel sont fixées des nattes. Ce petit espace devait servir à l'origine pour permettre d'y prendre une douche et aussi comme lieu d'aisance ? Mais étant donné que nous devons nous alimenter par nos propres ressources, les deux cuisiniers ont tout de suite occupé cet abri pour organiser le foyer de bois qui servira à la préparation des repas durant toute la remontée du fleuve : les cantines popotes y sont placées. C'est tout à fait rustique, rudimentaire, c'est bien ainsi que je m'imagine le déplacement du "blanc" il y a 50 années. Malheureusement, on se rend compte que, même à notre époque de soi-disant progrès, les compagnies de navigation privées n'ont rien fait pour améliorer l'équipement. Il est vrai que ces sociétés s'intéressent au rapport financier ; les passagers, qui à vrai dire sont assez rares, ne sont pas intéressants.

Ce bateau doit avoir un âge certain. Les tuyauteries fuient de partout et l'on observe sur toute leur longueur, au niveau de chaque joint, un jet de vapeur. Il s'ensuit que la pression nécessaire pour la propulsion est assez difficilement obtenue.

Le capitaine est un indigène sympathique. Il a plusieurs barreaux pilotes qui connaissent parfaitement le lit du fleuve et les "passes". Malheureusement, les bancs de sable se déplacent constamment, surtout en cette période de basses eaux dont l'étiage a rarement été aussi bas. Le personnel du bord est très convenable, il est vrai que le capitaine a une réelle autorité.

Le départ d'Ouessou a été intéressant de par la nouveauté des moyens de locomotion. Lentement, puisque le bateau a une certaine difficulté à gagner sur le courant, on voit Ouessou s'éloigner. Pendant deux heures au moins, on continue à apercevoir tous les européens du poste venus assister à ce départ et qui poursuivent leurs conversations.

Le panorama est surprenant, pour qui accomplit ce voyage pour la première fois. Il a au moins l'avantage de la nouveauté et l'on a tout loisir pour bien observer les rives du fleuve, parfois large, parfois un peu plus étroit. Le bateau remonte péniblement en zigzags pour éviter les bancs de sable

et souvent nous longeons une des rives, si près que l'on peut toucher les branches des arbres. Le spectacle de ces rives à la végétation dense, coiffées par les hautes branches vertes d'arbres gigantesques est magnifique. A chaque coude du fleuve, on peut apercevoir un paysage nouveau, mais il ne change pas et l'on admire les divers tons dans la gamme du jaune aux verts plus ou moins foncés, l'eau est glauque, jaune ocre. Le soir à la tombée du jour, les couchers de soleil donnent des couleurs magnifiques, très changeantes qui se reflètent sur les nappes d'eau calme.

À l'avant de chaque chaland, placés à califourchon, deux indigènes sondent à la perche la profondeur du lit ; et l'on entend de façon constante, ces hommes annonçant rythmiquement les résultats de leurs sondages : "M'balé" : l'eau est profonde ; "M'balé tombai" : l'eau est juste suffisante ; "N'déré" : sable ou terre, indique qu'il faut se méfier.

La navigation est délicate, une attention constante est nécessaire aux hommes et au capitaine qui doivent examiner les rives et rechercher leurs points de repères particuliers pour trouver et suivre la passe, car il n'y a pas de balise.

Dans l'après-midi du 10 avril, nous touchons le premier poste à bois, **Gandicolo**. C'est un petit village qui a comme particularité de fabriquer de grandes quantités de vin de bambou, boisson alcoolisée, toxique. Le bateau ne manque jamais d'y faire escale. Le personnel achète des dames-jeannes de cette boisson.

Le soir, à Kounda où nous nous arrêtons pour passer la nuit, ce sont de véritables libations ; presque tous sont ivres. Mon chauffeur en particulier qui, le lendemain matin, a de petits yeux rouges qu'il a peine à ouvrir. L'effet de ce vin de bambou est certainement violent, car il est atteint d'un tremblement des mains très accusé.

Ce matin, départ à 6 heures. La journée a été sans histoire. Je continue à admirer le paysage, bien que peu varié. Le temps est beau, un peu chaud. J'ai scruté en vain les rives afin de découvrir un "niama⁹" : hélas j'ai seulement vu une famille de petits singes, jeunes cercocèbes¹⁰, qui s'amusaient à sauter de branche en branche.

Nous nous sommes arrêtés pour faire du bois : à Bakengué à 7h45, à Lemé à 9h15, à Kabo à 16h35, enfin à Babalé à 18h45 où nous passons la nuit. Celle-ci a été chaude ; nous avons été envahis par des termites ailés, des moucheron et des moustiques.

On se réveille tôt à bord. En effet, le soir on laisse éteindre les feux, ceux-ci sont rallumés vers 4 heures du matin ; c'est assez dire qu'avant le lever du jour les bruits divers, de la préparation du foyer, du bois fendu à la hache sur le pont du chaland, du chant des indigènes pour s'encourager à la besogne, enfin de la chaudière qui laisse fuir la vapeur, tout s'acharne à vous ôter le sommeil. Puis, c'est la machine qui se met en branle et donne

⁸ Lit picot : lit de camp.

⁹ Niama : bête, bestiole. "Petit niamas" : insectes et bêtes de petite taille ; "gros niamas" : toutes les bêtes qui peuvent être chassées.

¹⁰ Primate à queue prenante, de la famille des cécobidés (cercos = queue).

de sérieuses vibrations à tout le bateau, aussi se décide-t-on rapidement à quitter le picot pour faire ses ablutions dans l'air matinal, sur le toit de tôles à l'arrière du bateau, en pleine nature, avec une cuvette d'eau que l'on se déverse largement sur tout le corps.

On ne risque guère de faire beaucoup de culture physique et l'on a vite fait le tour du bâtiment. Un coup d'œil à l'avant, près du barreur où la petite brise de la lente vitesse vous rafraîchit un peu ; une visite à la chaufferie pour voir le travail des chauffeurs qui se relaient pour alimenter le gouffre à bois que représente le foyer. C'est ahurissant la chaleur qui se dégage devant la gueule grande ouverte du foyer : l'eau ruisselle littéralement en permanence sur la totalité du corps des indigènes. C'est un métier extrêmement pénible.

On s'aperçoit de leur relève car, lorsque l'un des deux reprend le travail, il ne cesse de lancer à voix haute le même refrain, à la même cadence, avec une tonalité élevée pour descendre vers la basse.

Inutile de s'aventurer sur les chalands, le soleil et la réverbération vous en chassent très rapidement. Que faire sinon écrire ? Aussi je m'emploie à mettre à jour ma correspondance, tant pour la France que pour les personnes qui m'ont réservé un excellent accueil au cours de mon voyage.

Aujourd'hui, nous nous sommes arrêtés toujours pour le bois : à Mopembé, puis à Lembé, village situé sur la rive dépendant du Cameroun ; à 9h30, à Banda puis à Bomassa à 13h30.

2° - Bomassa

Est un village avenant ; les cases sont neuves, vastes, bien construites. Il est dommage que les indigènes n'y laissent aucune fenêtre. Bomassa aurait été, il y a quelques années, très important, or ce village se dépeuple rapidement, les causes en seraient multiples d'après les habitants. D'abord les crocodiles qui peuplent la Sangha auraient mangé bon nombre de femmes et d'enfants ! A dire vrai il y a très peu d'enfants, mais je pense que la trypanosomiose en a été la raison principale. Le village se trouve à l'orée de la grande forêt et chaque soir, les indigènes reçoivent la visite des singes et des panthères. C'est un ancien poste militaire abandonné.

L'après-midi sur le bateau, nous sommes piqués par diverses bestioles, particulièrement des tsé-tsé, des mouches à éléphants, des taons. Il faudrait réviser cette notion qui veut que les tsé-tsé ne piquent que le soir tombant. J'avoue qu'aux passages de bacs en plein jour et sur la Sangha, elles ne s'en sont pas privées. Il y a aussi de grosses mouches piqueuses aux yeux verts, très jolies, au corps vert et rougeâtre.

Nous avons fait à plusieurs reprises, machine arrière, zigzags, en avant très lentement, pour éviter le banc de sable que nous avons raclé, sans toutefois nous échouer. A 17h45, le capitaine indigène, maître à bord, vient m'annoncer que nous sommes en panne. Il paraît que le toit du foyer s'est effondré sur la grille, mettant à nu la chaudière déjà usée. Sur le champ, je pense que cette avarie doit être grave et je le questionne. Non me dit-il, cela arrive, nous allons accoster la rive, attendre que les feux s'éteignent et faire la réparation sur place.

Nous amarrons au bord, sous de grands arbres en pleine forêt. Les indigènes jettent des seaux d'eau pour éteindre les grosses bûches restées sur la grille, le tout est retiré, un tri est fait pour récupérer les briques, plutôt les fragments de briques, qui s'étaient détachés.

Le matin du 13 avril à 3 h, réveillé par le bruit, je me lève et à la lueur d'une lampe tempête, assiste à la réparation. C'est moins compliqué que je ne le supposais. De la terre a été prélevée à la rive. Malaxée à l'eau elle forme un bon mortier. Les briques récupérées, soudées entre elles avec ce mastic d'un nouveau genre, permettent de colmater toit et côtés du foyer. Bientôt, le feu est rallumé. La pression monte lentement et nous quittons ce lieu pas plus inhospitalier qu'un autre, à l'heure normale, c'est-à-dire 6 heures.

Nous naviguons jusqu'à 12 heures sans arrêt pour atteindre Molongo où l'on se ravitaille en bois, puis Bomangokou à 17 heures ; on ne s'arrête pas. Cependant, tout de suite après avoir dépassé ce village, j'aperçois sur le bord de la rive, au soleil, un caïman ouvrant sa grande gueule. Vite je saisis mon fusil et tire ; j'ai la bonne fortune de le clouer sur place. Aussitôt tous les indigènes du bord poussent des cris de joie ; on fait stopper le bateau, une pirogue se détache, va chercher l'animal et le ramène à bord. Il est dépecé sur le champ. C'est une grosse bête de 1,70 m. de long. Le partage se fait et nous gardons un beau morceau de queue qui fait le plat de résistance lors de trois repas successifs. Dire que c'est un mets extraordinaire serait abusif, pourtant je dois avouer que cette chair est mangeable, blanche, ferme, elle rappellerait assez la saveur d'un poisson genre "chien de mer" de chez nous. Ce petit incident a eu le don de rompre la monotonie du voyage.

Le soir, nous faisons mettre nos chaises longues à l'avant d'un des chalands et profitons d'un peu de fraîcheur. Arrivée à Sapamba à 18 heures, arrêt pour faire du bois. Le capitaine décide de poursuivre à la faveur d'un beau clair de lune. Nous continuons jusqu'à 21h30 pour atteindre Lidjombo. Nous avons encore été envahis par tout un nuage d'insectes d'espèces les plus variées. Le court trajet de nuit s'est avéré assez difficile, nous avons touché des bancs de sable, avons fait plusieurs fois marche arrière, pour nous échouer définitivement. Cette nuit-là, nous l'avons passée au milieu de la rivière et le lendemain il a fallu que les indigènes du bord descendent dans l'eau à mi-mollets seulement, pour soulever avec des madriers l'un des chalands et après maints efforts désensabler le bateau qui avait creusé son lit.

De bon matin, nous touchons la rive et visitons les tirailleurs de la concession L. L'équipe du docteur C. était en place depuis la veille et avait procédé au dépistage des malades que nous examinons. Ce portugais a une plantation de café, il emploie une centaine de manœuvres, mais se plaint évidemment que cette quantité est insuffisante. Leur état de santé en général laisse fort à désirer. C'est lamentable de voir cela ! Palabres au sujet de l'alimentation. M. L. se plaint d'avoir d'énormes difficultés à se procurer les vivres nécessaires. Il voudrait que ce soit l'administration qui lui procure les denrées nécessaires à la nourriture. Bien entendu, il ne fera aucun effort pour que les indigènes de sa concession fassent des cultures vivrières. Cela

prendrait probablement trop de temps, ce qui serait autant de moins pour l'entretien de ses plantations. Il apparaît qu'il y a un peu de mauvaise volonté de la part de l'employeur.

Il a installé, comme les arrêtés l'obligent, un soit-disant dispensaire. C'est-à-dire une case sordide, sans lumière, sale à souhait. Dans une des pièces, il y a une réserve de pharmacie dans une petite armoire. Elle ne doit pas servir souvent. Dans l'autre case, une salle contenant trois lits qui ne seront jamais utilisés. Mais il est en règle, donc pas grand chose à dire. Il a reçu la visite d'un inspecteur du travail, qui a posé un questionnaire assez enfantin et a noté quelques accrocs ou négligences. Monsieur L. n'a pas eu grand mal à réfuter ses arguments. Il donne satisfaction quant à des observations simplistes telles celle de l'attribution de cuvettes pour faire cuire les aliments. Et tout le monde est satisfait. Personne ne perd la face. Pourtant si l'on approfondit les choses, il est indéniable que les travailleurs sont nettement sous-alimentés et que rien n'est fait pour que les cases sur la concession offrent d'avantage d'hygiène. Enfin, il est incontestable que les dits travailleurs ne profitent aucunement du produit de leur travail. Ils n'en fichent pas lourd. Soit ! Mais à l'employeur de veiller à ce qu'ils fournissent l'effort nécessaire. Ne parlons pas du salaire qui est ridicule car les amendes viennent l'amenuiser et le compte de fin d'année montre qu'une fois l'impôt payé, il ne leur reste pas grand chose. Quelles améliorations l'indigène peut-il apporter à son standard de vie avec ces salaires de misère ?

Nous touchons un poste à bois à 14h30, et nous arrêtons le soir, sur le fleuve sans village, pour y passer la nuit. Cette fois à la fin de l'après-midi, c'est une attaque d'abeilles que nous subissons, elles sont extrêmement nombreuses ; je ne devrais pas les chasser mais d'en sentir des dizaines vous courir sur la peau ne peut se supporter longtemps, aussi je tente de les éloigner. Peine perdue : au contraire, elles s'énervent devenant furieuses et certaines me dardent de leur dard. J'ai perdu, je dois battre en retraite et me réfugier dans ma splendide cabine, souffrant de piqûres douloureuses.

Hier au soir, le foyer s'est à nouveau effondré. La même opération que précédemment est faite dans la nuit et nous pouvons partir à l'heure habituelle. La question est de savoir si nous atteindrons le terminus ce soir, d'autant que la navigation est de plus en plus délicate. Les bancs de sable que nous touchons à une cadence accélérée entravent constamment notre marche. Les jours précédents, nous pouvions calculer à peu près que le bateau faisait du 6 km à l'heure ! Cette allure ne fait que diminuer et nous finirons bien par être stoppés définitivement.

Nous l'avons craint ce soir. En effet, à 16 heures, les barreaux n'ont pas trouvé une passe favorable : nous nous sommes ensablés. La nuit est venue sans que nous ayons pu nous tirer de cette fâcheuse position. Les insectes, à nouveau des nuées d'abeilles, en ont profité pour venir nous tenir compagnie, mais averti par l'incident d'hier, je les ai flattées en les laissant en paix, préférant encore la solution désagréable de leurs pattes sur mon épiderme. L'ennui, c'est lorsqu'elles venaient se nicher entre la semelle de mes babouches et la plante des pieds. Comment procéder pour ne pas les énerver et subir leurs accès de fureur ? Il fallait stoïquement supporter ce chatouillement jusqu'au moment où elles se décidaient à quitter cette demeure.

Nous commençons à trouver le temps long, pénible, monotone. Le paysage, toujours à peu près le même, ne m'intéresse plus.

Le 16 avril, notre position à 5 heures du matin est désastreuse. Le bateau s'est placé en travers du courant, ce qui fait que le sable s'est accumulé sur le côté d'aval. Tous les indigènes sont à pied sec, poussant, soulevant avec des madriers, s'encourageant avec des cris, des chants... pour nous désensabler.

Progressivement on gagne, centimètre par centimètre, et l'effort est récompensé puisque, après trois heures de travail, nous flottons à nouveau. Pendant ce temps, les barreaux ont parcouru en tous sens la largeur du fleuve pour rechercher l'endroit où la profondeur est suffisante. Ils plantent des piquets au fur et à mesure et remontent sur plusieurs centaines de mètres pour réaliser le tracé. C'est très curieux de voir un fleuve aussi large, à cet endroit il a bien 300 mètres, et parcourir cette étendue avec seulement de l'eau jusqu'aux genoux.

Or il nous faut au minimum de l'eau jusqu'à mi-cuisses pour passer. Enfin ils ont trouvé l'endroit propice et nous partons, nous raclons bien le fond pendant un moment, mais nous passons et j'en suis satisfait.

D'ailleurs je n'ai pas chômé, comme il fallait que tout le monde soit mis à contribution, j'ai moi-même donné quelques conseils et pris la barre par moments, donnant des ordres : «avant doucement», «stop», «arrière toute», pour enfin dire : «en avant toute». Nous poussons un véritable soupir de soulagement en apercevant **Bayanga**, terme de notre trajet fluvial, que nous atteignons exactement à 12h20.

À suivre.

IMPORTANT !

Des restrictions budgétaires nous ont contraints à résilier l'abonnement téléphonique de la ligne directe (01 43 27 72 37).

Désormais, il convient de composer le numéro 01 45 68 81 65 (téléphone et télécopie).

VIE DE L'ASSOCIATION

I. NAISSANCE

Notre dévouée conseillère, **Valérie GUEZ-ZIMMER** (cours IP 1989-1990) et Marc, son époux, nous annoncent la naissance du petit frère de Maud, **Thibault**. Nous adressons nos

félicitations aux heureux parents et nos meilleurs voeux de bonheur et de prospérité à Thibault.

2. VIE DES COMMISSIONS

2.1. RÉGIONALISATION

Journée scientifique à Dijon : vendredi 28 Novembre 2008
Amphithéâtre Courtois, Faculté de Pharmacie, 7, boulevard
Jeanne d'Arc - 21000 DIJON

Programme

- 9h - 9h45 : Accueil des participants
- 9h45 - 10h15 : Introduction par **Mme le Pr E. KOHLI**, Doyen de la faculté de Pharmacie de Dijon et allocution du **Dr Michel DUBOS**, Président de l'AAEIP
- 10h15 - 10h45 : **Lymphocytes T régulateurs et Virus**
Pr. E. KOHLI, (Laboratoire des Interactions muqueuses Agents transmissibles -LIMA- et UFRs Médecine et Pharmacie, Dijon
- 10h45 - 11h15 : **Lymphocytes T régulateurs et Cancers - La réponse immunitaire antitumorale : un modèle d'inefficacité ?**
Pr. B. BONNOTTE (Centre de Recherche Inserm U866 Département Mort cellulaire et Cancer) Dijon
- 11h15 - 11h45 : **Le concept de Vaccinologie**
Pr P. SALIOU (Coordinateur du cours international de Vaccinologie Université de Bordeaux II/Ecole du Val de Grâce)
- 12h PAUSE REPAS
- 14h15 - 15h : **Les infections à rotavirus. Prise en charge et vaccination**
Pr F. HUET (Service de pédiatrie, Centre hospitalier universitaire), Dijon
- 15h - 15h45 : **Du cancer du col de l'utérus et maladies associées à la mise en œuvre de la vaccination**
Dr Dr J. MONSONEGO (Institut Alfred Fournier), Paris
- 15h45 - 16h30 : **Approches vaccinales dans l'infection à HIV**
Pr. M. GIRARD (Ancien Professeur à l'Institut Pasteur) Paris

16h30 : Conclusions du séminaire

16h45 : Pot de départ

Cette journée scientifique régionale est organisée avec le soutien logistique et financier de l'UFR de Pharmacie de Dijon et de la société SANOFI PASTEUR MSD

Voir Bulletin d'inscription à la page 150

2.2. ENTRAIDE

2.2.1. Message d'un de nos boursiers. Nous avons plaisir à publier la lettre suivante, adressée à l'AAEIP par un scientifique en poste à Dakar (Sénégal).

"... Je remercie l'ensemble des membres de l'Association de m'avoir permis de bénéficier d'une aide financière pendant le cours "Arthropodes vecteurs et santé humaine" dispensé en 2008 par l'Institut Pasteur. Cette aide a concerné mes frais d'inscription au cours de l'Institut Pasteur mais également la validation de cette formation en Diplôme universitaire à l'université Denis Diderot. Elle m'a permis de faire ma formation dans la sérénité et sans aucun souci financier qui est souvent source de déstabilisation...".

Ces remerciements doivent être adressés à tous nos généreux donateurs sans qui nos actions d'entraide ne seraient pas possibles.

2.2.2. Demande de matériel numérique informatique par les étudiants. La commission propose aux membres de l'AAEIP de faire don de matériel informatique en bon état et non obsolète dont ils n'auraient plus l'emploi. Dans ce but, dès qu'un adhérent souhaite faire don d'un ordinateur portable ou d'un appareil photo numérique (matériels les plus demandés), il peut envoyer les caractéristiques du matériel en question (Marque, modèle, année, spécificité) au secrétariat de l'AAEIP. Lorsqu'un élève sollicitera le besoin en matériel, le donateur sera contacté pour organiser le transfert du matériel.

2.2.3. Bourse au logement. Vous disposez d'une chambre ou d'un studio à Paris ou en région parisienne susceptibles d'être loués à un étudiant ? Vous accepteriez d'accueillir chez vous un étudiant ? Contactez notre secrétariat qui transmettra vos propositions aux élèves ou stagiaires (Master, doctorants, post-doctorants) de l'Institut Pasteur. Offres et demandes de logement sont aussi valables pour les autres régions ! Toutes les offres et demandes sont disponibles soit par téléphone soit sur le site Internet de l'AAEIP.

2.3. ADMISSIONS

Selon l'approbation du Conseil d'Administration en date du 12 juin 2008, nous avons le plaisir d'accueillir comme nouveaux membres de l'Association (dont un boursier de l'Association) :

- M. Mamadou NDIATH, scientifique de nationalité sénégalaise, cours "Arthropodes vecteurs et santé humaine" (2006),
- Mlle Alexia SICARD, diplômée en sciences politiques, cours "Circulation des agents infectieux et maîtrise du risque" (2008),
- Mme Emilie TESSIER, scientifique, cours "Informatique en biologie" (2008).

2.4. COMMUNICATION - APPEL À BONNES VOLONTÉS

Pour la troisième année, notre Association tiendra un stand aux prochaines **Journées internationales de Biologie (JIB)**, qui auront lieu du mercredi 5 au vendredi 7 novembre 2008 au CNIT de Paris - La Défense. Les organisateurs font appel aux bonnes volontés pour les aider à assurer la permanence sur le stand au cours de ces journées.

2.5. ACTIVITÉS CULTURELLES

2.5.1. Visite de l'exposition Georges ROUAULT (1871-1958), avec les oeuvres de la collection Idemitsu (Tokyo) le **mardi 14 octobre à 16h30** à la Pinacothèque de Paris, 28 place de la Madeleine, 75008 Paris, métro Madeleine.

- 2.5.2. Visite des "deux Arches", le lundi 20 octobre 2008 :**
- visite guidée de l'Arc de Triomphe qui bénéficie, depuis quelques mois, d'une restauration intérieure et d'une nouvelle scénographie,
 - déjeuner sur le toit de la grande Arche,
 - accès au toit par les ascenseurs panoramiques, vue sur l'axe historique de Paris (110 m de haut),
 - visite guidée culturelle de la grande Arche : parcours artistique (parmi les oeuvres du parvis : MIRO, CÉSAR...).

3. ILS NOUS ONT QUITTÉS

• Hommage au Docteur **Elie WOLLMAN**

Membre éminent de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur, le Docteur Elie WOLLMAN l'était à plus d'un titre : par son engagement personnel en qualité d'ancien élève du grand cours 1946-1947, et comme représentant de la Direction de l'Institut Pasteur au sein du Conseil d'Administration de notre Association. À la cessation de ses activités professionnelles, l'honorariat ayant été décerné à Monsieur WOLLMAN par la Direction de l'Institut Pasteur, l'AAEIP l'avait également nommé conseiller honoraire du Conseil d'Administration, puis membre d'honneur pour continuer à pouvoir bénéficier de ses avis et de ses conseils.

D'autres¹ ont relaté les qualités de chercheur et l'importante contribution de Monsieur WOLLMAN à la compréhension des processus fondamentaux en biologie. Nombreux sont les anciens élèves qui se souviennent de son cours sur la conjugaison bactérienne qui leur ouvrait des horizons insoupçonnés. Ils ont aussi gardé en mémoire la gentillesse et la rigueur avec laquelle il répondait aux questions qui lui étaient posées.

Persuadé de l'intérêt qu'il y avait à créer et maintenir les liens entre les anciens élèves entre eux et avec la maison-mère à laquelle ils devaient tant, M. WOLLMAN a toujours eu à cœur de participer réellement à la vie de l'association. Malgré la lourde tâche de sa fonction de Sous-directeur de l'Institut Pasteur et de Directeur de l'enseignement, il a ainsi marqué nombre de séances du conseil d'administration de l'AAEIP de sa présence discrète et de ses interventions judicieuses, attestant de sa grande perspicacité. Lorsque les circonstances l'ont exigé, il s'est associé aux membres du bureau afin de trouver des solutions aux problèmes du moment. Nul doute que sa médiation

fut très importante quant à l'aide financière que l'Institut a apportée et continue à maintenir à l'association. On ne peut oublier qu'on doit à son intervention auprès de J. MONOD l'attribution du local qui héberge l'Association depuis 1973.

Très attaché à ce que le titre d'ancien élève de l'Institut Pasteur ne soit pas dévoyé et soit attribué uniquement à des personnes ayant réellement eu le temps et la volonté de s'imprégner de l'esprit pasteurien², il considérait que le titre d'ancien élève, qu'il avait lui-même suggéré d'élargir aux stagiaires de longue durée, ne pouvait être attribué qu'après examen des dossiers, avis du chef d'unité et analyse des motivations des impétrants. Avec l'accord de la direction, il s'en était suivi une modification des statuts de l'Association.

La participation de M. WOLLMAN aux assemblées générales, même lorsqu'elles avaient lieu en province, témoignait de son réel attachement au dynamisme et au rayonnement de l'association. Il était vraiment un des nôtres, ses avis, ses conseils, son aide nous ont été précieux, il nous manquera.

Que Madame WOLLMAN, qui l'a souvent accompagné lors des assemblées générales ou des réunions amicales de notre Association, soit assurée que nous n'oublierons pas M. WOLLMAN.

Yvonne LE GARREC

- Docteur **Christian CASPER**, décédé le 17 avril 2007,
- Madame **Jacqueline SAOUT**, née **LESARTRE**, veuve du Docteur Jean SAOUT (cours IP 1955-1956), décédée le 18 juin 2008,

Que les familles éprouvées veuillent bien trouver ici l'expression de notre sympathie et nos sincères condoléances.

¹ Voir notice nécrologique dans les "Nouvelles de l'Institut Pasteur", page 147.

² L'esprit pastorien est défini par Émile Roux comme "la foi scientifique qui donne l'ardeur au travail, l'imagination qui inspire les idées, la persévérance qui les poursuit, la critique qui les contrôle, la rigueur expérimentale qui les prouve et aussi l'indépendance et le désintéressement qui sont une conséquence de l'amour passionné de la vérité".

NOUVELLES DE L'INSTITUT PASTEUR

I - ENSEIGNEMENT

1.1. RÉSULTAT DES COURS

■ LES ÉLÈVES DU COURS "IMMUNOLOGIE APPROFONDIE" ET LEURS ENSEIGNANTS

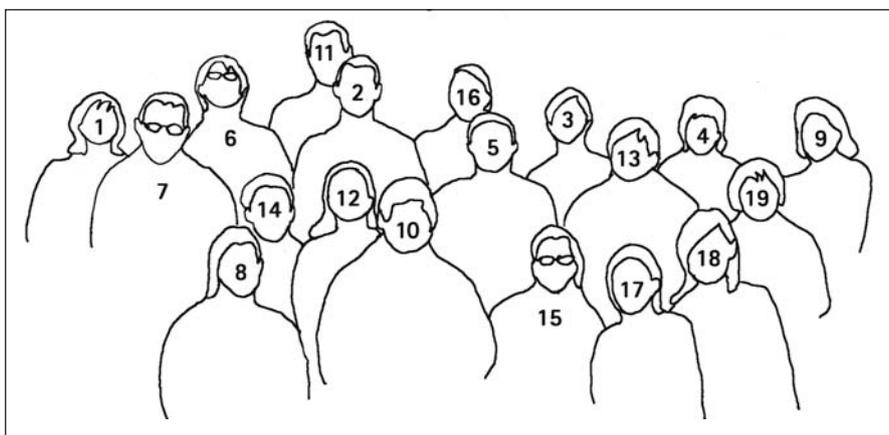
- 5 NOVEMBRE 2007 - 11 JANVIER 2008 -



- | | | |
|---------------------------------------|--|--|
| 1. Mlle AILAL Fatima (Maroc) | 11. Mlle DOSSET Magalie | 21. Mlle NAOUAR Ikbel (Tunisie) |
| 2. Mme ALMOUSSA Murielle (IP) | 12. M. ELISEE Ruben | 22. M. RAMOND Cyrille |
| 3. Mlle AYMERIC Laëticia | 13. Mlle FRANCOIS Véronique | 23. Mme RUEFF-JUY Dominique (IP) |
| 4. M. BAUDHUIN Jérémy | - M. FREITAS Antonio (IP) (Absent) | 24. M. SANDOVAL Frédéric |
| 5. Mlle BLANC Caroline | 14. Mlle GARDES Pauline | 25. Mlle SARDI Fatima |
| 6. Mlle BOUVIER Isabelle | 15. Mlle GUIARD Elsa | - Mlle SCHILTE Géraldine (IP) (Absent) |
| 7. Mme BRODIN ép. SARTORIUS Albane | 16. M. HUETZ François (IP) | 26. Mme SERVAIS Christine (IP) |
| 8. Mlle CASARAVILLA Cécilia (Uruguay) | 17. Mlle LECLERC Marion | 27. Mlle SMATI Rim (France-Tunisie) |
| 9. M. CRABOL Yoann | 18. M. LE GARS Mathieu | 28. Mlle SYNAEVE Cindy |
| 10. M. DEGUINE Jacques | 19. M. MEDEIROS DE ANDRADE Joao (Brésil) | 29. Mlle THIRIOT Aude (IP) |
| - Mlle DELAGREVERIE Héloïse (Absent) | 20. Mme MERIAUX Véronique (IP) | |

■ **LES ÉLÈVES DU COURS "GÉNÉTIQUE DE LA SOURIS"
ET LEURS ENSEIGNANTS**

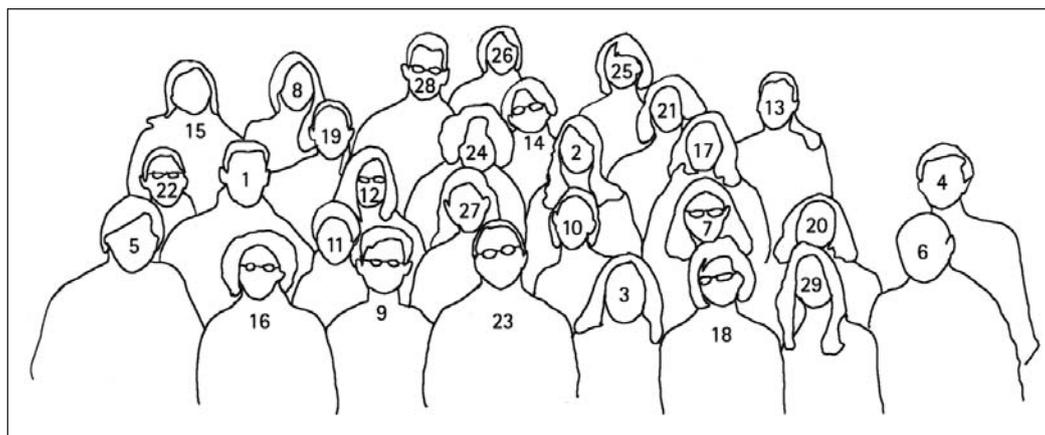
- 7 JANVIER - 12 FÉVRIER 2008 -



- | | | | |
|---------|--|----------|---|
| 1. Mme | ALMOUSSA Murielle [IP] | 11. M. | PASSET Bruno |
| 2. M. | ANDRE William | 12. Mlle | RAMMAH Cyrine |
| 3. Mlle | BEHLOULI Asma (Algérie) | 13. M. | ROUSSET Jean-Pierre* (CNRS - UMR C8621, Orsay) |
| 4. Mme | HATIN Isabelle* (CNRS - UMR C8621, Orsay) | 14. Mlle | SANGAR Fatiha (France-Maroc) |
| 5. M. | MAVOUNGOU Lionel | 15. Mlle | SDASSI Nezha (Maroc) |
| 6. M. | MESNARD Laurent | 16. Mlle | TORDO Julie |
| 7. M. | MONTAGUTELLI Xavier [IP] | 17. Mlle | VERSTRAETE Nina |
| 8. Mlle | MORAIS Jessica | 18. Mlle | XU Jie (Chine) |
| 9. Mme | NUGUES Viviane [IP] | 19. Mme | ZHOURAVLEVA Galina* (St. Petersburg State University - Russie) |
| 10. M. | PANTHIER Jean-Jacques [IP] | | |

* Enseignants

■ LES ÉLÈVES DU COURS "MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL"
ET LEURS ENSEIGNANTS
- 7 JANVIER - 19 FÉVRIER 2008 -

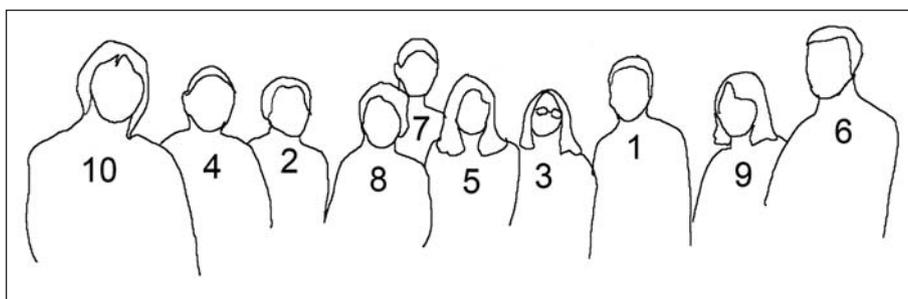


1. ABLAIN Julien
2. ARIAS Cristina (Argentine)
3. BALDEYRON Céline (Curie)
4. BRUZZONE Roberto (IP)
5. CARRANZA Pedro (Argentine)
6. CHAVRIER Philippe (Curie)
7. DA COSTA Mariã (Portugal)
8. DAYRAUD Cyrielle
9. DIEP Tai The (Vietnam)
10. ECKERSLEY MASLIN Mélanie (Australie)

11. FEDRIGO Griselda (Argentine)
12. GRUOSSO Tina
13. JIMENEZ Ana Joaquina (Colombie)
14. KARACA Yasemin (Turquie)
15. LE BOUTEILLER Marie
16. LÉGER Hélène
17. LEROY Carine
18. LOMMA Mariella (Italie)
19. LOUBLIER ép. CONSTANTINO Sandrine
20. MURARO Lucia (Italie)

21. PALMA Elena (Italie)
22. PLESTANT Charlotte
23. QUIVY Jean-Pierre (Curie)
24. RICHARD Magali
25. ROCANCOURT Murielle (IP)
26. SERVAIS Christine (IP)
27. TOLEDO Andrea (Uruguay)
28. TRAVERT Christophe
29. ZURZOLO Chiara (IP)

**■ LES ÉLÈVES DU COURS
"MOLECULAR TOOLS AND EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS"
ET LEURS ENSEIGNANTS
- 14 - 25 AVRIL 2008 -**



- **ABD EL HAKEEM ABASS** Naglaa (*Sudan*) (**absent**)
- 1. **ALP** Alpasian (*Turkey*)
- 2. **COITINHO AZEVEDO** Cecilia Esther (*Uruguay*)
- 3. **FILLIOL-TOUTAIN** Ingrid [Pasteur Institute]
- 4. **GUTIERREZ PEREZ** Maria Cristina [Pasteur Institute]
- 5. **MENDEZ LOPEZ** Maria Victoria (*Venezuela*)
- 6. **MEZRED** Farid (*Algeria*)
- 7. **NIEMANN** Stefan* (*Research Center of Borstel, Germany*)
- 8. **NUGUES** Viviane [Pasteur Institute]
- 9. **ROCANCOURT** Murielle [Pasteur Institute]
- 10. **TAFAJ** Silva (*Albania*)

(*)Lecturer

1.2. THÈSES PRÉPARÉES ET SOUTENUES À L'INSTITUT PASTEUR

- du 21 mai au 9 septembre 2008 -

| Orateur | Titre de la thèse et date de la soutenance | Unité, laboratoire ou groupe dans lequel la thèse a été soutenue | Département |
|-------------------------|---|--|---------------------------|
| BREHIN Anne-Claire | La protéine OAS3 de la voie interféron inhibe la réplication du virus Chikungunya dans les cellules humaines (06/06/2008) | Interactions moléculaires Flavivirus-Hôtes | Virologie |
| GAGET Virginie | De l'identité cyanobactérienne : différents niveaux d'approche (29/05/2008) | Cyanobactéries | Microbiologie |
| JORY Aurélie | Molecular and cellular characterisation of mouse skeletal muscle progenitors : Patterning of the somite and its derivatives by Numb (03/09/2008) | Cellules souches et développement | Biologie du développement |
| MARQUENET Emélie | Identification du rôle de l'activité ATPase de Malt, modèle d'étude des ATPases STAND, protéines impliquées dans la transduction du signal (12/09/2008) | Génétique moléculaire | Microbiologie |
| MICHALSKI Nicolas | Cochlear mechano-electrical transduction: identification and functional characterization of its components (04/07/2008) | Génétique et physiologie de l'audition | Neuroscience |
| RAMEIX-WELTI Marie-Anne | Neuraminidase des virus Influenza A : sensibilité aux inhibiteurs et interactions avec <i>Neisseria meningitidis</i> (21/05/2008) | Génétique moléculaire des virus respiratoires | Virologie |
| ROSEAU LIN Laura | Etude de la recombinaison au cours de la réplication du locus mat1 de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (09/09/2008) | Dynamique du génome | Génomes et génétique |
| SOUILHOL Céline | Analyse de la fonction du gène Notchless murin et de son implication dans la régulation de la voie Notch (27/06/2008) | Génétique fonctionnelle de la souris | Biologie du développement |

II. RECHERCHE
2.1. CONGRÈS 2008 DE L'OMS SUR LA RECHERCHE VACCINALE ET SES SATELLITES

Dans le cadre du congrès 2008 de l'OMS "Initiative for vaccine research", qui s'est tenu du 29 juin au 2 juillet 2008, à l'Institut Pasteur, un symposium satellite sur l'immunité innée et la vaccination, «*Workshop on innate immunity and vaccination*», a eu lieu le 29 juin, organisé par Claude LECLERC, responsable de l'unité Régulation immunitaire et vaccinologie à l'Institut Pasteur. De nombreux spécialistes du domaine s'y sont succédés.

→ Claude LECLERC, cleclerc@pasteur.fr, poste 8618 ; programme global du congrès : http://www.who.int/vaccine_research/about/gvrf/2008/en/index.html (BIP 13/06/2008)

2.2. INAUGURATION DU COLLOQUE "25 ANS DE VIH" PAR LA MINISTRE DE LA SANTÉ

Mme Roselyne BACHELOT-NARQUIN, Ministre de la Santé, de la Jeunesse et des Sports, est venue le 19 mai 2008 ouvrir le colloque "25 ans de VIH" dédié, notamment, aux dernières avancées en matière d'essais cliniques, mais aussi à de nombreux axes majeurs de recherche pour continuer à lutter contre le virus. Ce colloque a réuni plus de 500 personnes et donné lieu à de nombreuses reprises en presse, en radio et en télévision (BIP 23/05/2008).

III. INTERNATIONAL

3.1. INAUGURATION DU LABORATOIRE DE BIOSÉCURITÉ

P3 À L'INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE

Mme Rama YADE, Secrétaire d'État chargée des Affaires étrangères et des droits de l'Homme et le Dr MAM BUN HENG, Secrétaire d'État du Ministère de la Santé du Cambodge, ont inauguré le 25 avril 2008 un laboratoire de biosécurité de niveau 3 (P3 ou BSL3) à l'Institut Pasteur du Cambodge en présence de Jean-Claude DESMAZIÈRES, Ambassadeur de France, de Jean-Louis SARTHOU, Directeur de l'Institut Pasteur du Cambodge, d'Yves CHARPAK, Directeur des Affaires Internationales à l'Institut Pasteur et de Roberto BRUZZONE, Directeur de l'Institut Pasteur de Hong Kong. Ce laboratoire de haute sécurité biologique P3, composé de quatre modules séparés pour l'étude des virus respiratoires, des arbovirus et virus émergents, du VIH et des rétrovirus, des mycobactéries et des bacilles tuberculeux ainsi que d'une animalerie A3, constitue une plate-forme de niveau international à vocation régionale. Avec ses 140 m², c'est le plus grand complexe de ce niveau de biosécurité en Asie du Sud-est. Dans le contexte de menace de pandémies de grippe aviaire ou d'autre type, ce laboratoire constitue un élément essentiel pour la recherche et la compréhension des virus émergents en particulier dans le cadre du projet de "Surveillance et Investigation en Situation Epidémique en Asie du Sud-est : SISEA" supporté par l'Agence Française de Développement (AFD), pour les 4 pays suivants : Cambodge, Laos, Vietnam, Chine. Ce laboratoire de biosécurité de niveau 3, sera un élément essentiel du "National Influenza Center" de l'Institut Pasteur du Cambodge, nommé officiellement par le Ministère de la santé du Cambodge et le Bureau Régional de l'OMS à Manille, en tant que membre du "WHO Global Influenza Surveillance Network". Ce laboratoire P3, va renforcer le soutien du dispositif français au niveau de la santé au Cambodge, avec l'Université des Sciences de la Santé, l'Hôpital Calmette et l'Institut Pasteur. Le laboratoire de Biosécurité P3 a été construit grâce à un financement de la France d'un montant d'un million d'euros : subvention du Ministère de la Santé et prêt souscrit par l'Institut Pasteur du Cambodge auprès de l'AFD avec la caution de l'Institut Pasteur. Ce plateau technique conçu et réalisé par des entreprises françaises (Exeliance ; LaSalle-Blanche), avec l'expertise de Thierry LEGALOIS (IP), puis monté et assemblé en partenariat avec des sociétés cambodgiennes, a permis un transfert de haute technologie dans cette région déjà frappée par le SRAS et la grippe aviaire (BIP 09/05/2008).

3.2. CONFÉRENCE SCIENTIFIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR

ET DU RÉSEAU INTERNATIONAL DES INSTITUTS PASTEUR LES 26 ET 27 JUIN 2008

À l'occasion des 120 ans, l'Institut Pasteur et le Réseau International des Instituts Pasteur ont organisé la conférence scientifique internationale intitulée "La recherche sur les maladies infectieuses : un défi planétaire / *Research on infectious diseases: a global challenge*". Elle s'est tenue les 26 et 27 juin 2008 au Centre d'Information Scientifique (CIS) à Paris. Ce colloque a présenté des recherches effectuées à l'Institut Pasteur et dans le Réseau International des Instituts Pasteur ou en parte-

nariat avec d'autres institutions, sur tous les continents. Il a abordé à la fois la recherche sur le terrain et les mécanismes moléculaires des maladies, mais aussi les avancées dans le contrôle des maladies (BIP 30/05/2008).

3.3. LE VICE MINISTRE DE LA SANTÉ AMÉRICAIN

A RENDU VISITE À L'INSTITUT PASTEUR

L'amiral VANDERWAGEN, Vice Ministre de la Santé américain, en charge de la préparation des réponses aux pandémies, est venu le 15 mai 2008 à l'Institut Pasteur, accompagné d'une délégation du ministère américain, de l'ambassade des États-Unis et du Directeur Général de la Santé, Didier HOUSSIN ainsi que de représentants du Ministère de la Santé français. Ils ont été reçus par Alice DAUTRY, Directrice Générale de l'Institut Pasteur, avec des scientifiques (Hervé BOURHY, Jean-Claude MANUGUERRA et Arnaud FONTANET) et des représentants de la Direction des Affaires Internationales. Les sujets abordés ont été, outre le programme de renforcement des moyens de lutte contre la grippe aviaire en Afrique financé en partie par le ministère de la santé américain, l'ulcère de Buruli au Cameroun, l'hépatite C en Égypte, la rage en Afrique, ainsi que la situation des CNR en France et en Afrique et les moyens de renforcer les liens entre les instituts du réseau et les autres acteurs comme l'OMS, le CDC,... (BIP 23/05/2008).

3.4. LE MINISTRE MEXICAIN DE LA SANTÉ

À L'INSTITUT PASTEUR

Monsieur José Ángel CORDOVA VILLALOBOS, Ministre mexicain de la Santé, est venu le 23 mai 2008 à l'Institut Pasteur, accompagné de Mauricio HERNANDEZ, Secrétaire d'État chargé de la Prévention et de la Promotion de la Santé du Ministère mexicain de la Santé, de membres du ministère mexicain et du représentant de l'ambassade du Mexique en France. Ils ont été reçus par Alice DAUTRY, Directrice Générale de l'Institut Pasteur et Yves CHARPAK, Directeur des Affaires Internationales, avec des scientifiques : Nancy GUILLENAGHION, post-doctorante mexicaine, Martha Erika NAVARRO SANCHEZ et une doctorante mexicaine Monica BURGOS ZEPEDA, ainsi que Daniel SCOTT-ALGARA, Coordinateur région Amériques et Patrick ENGLAND. Les sujets abordés ont été le renforcement des partenariats pour la recherche scientifique entre l'Institut Pasteur et le Mexique dans le domaine des maladies infectieuses et en particulier sur la dengue et le paludisme ainsi que la surveillance épidémiologique des maladies émergentes dans la région Caraïbes. Le ministre a également exprimé le souhait de partenariats pour la formation dans le cadre de l'École de Santé Publique et du transfert de compétence pour les interventions en cas d'épidémies (BIP 30/05/2008).

3.5. L'INSTITUT PASTEUR RENFORCE SON PARTENARIAT AVEC LE NIH

Alice DAUTRY, Directrice Générale de l'Institut Pasteur et Elias A. ZERHOUNI, Directeur du *National Institute of Health (NIH)* ont signé le 19 mai 2008 une lettre d'intention traduisant leur volonté d'établir une collaboration scientifique entre les deux organismes sur de multiples volets.

L'accord envisage d'intensifier les collaborations dans les domaines de la recherche biomédicale notamment et les programmes de formations qui lui sont attachés. Dans ce cadre, l'accord prévoit de développer des programmes de recherche qui seront définis d'un commun accord entre les deux

organismes, sur des sujets d'intérêt mutuel. Cette collaboration scientifique reposera notamment sur des échanges de personnels statutaires, d'étudiants et de jeunes chercheurs post-doctorants (*BIP 23/05/2008*).

IV. DÉCISIONS

4.1. CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES ARBOVIRUS

Depuis le 2 mai 2008, le Centre National de Référence des Arbovirus est rattaché à l'unité Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes dirigée par Monsieur Philippe DESPRÈS, dans le département de Virologie (*BIP 16/05/2008*).

4.2. NOMINATIONS

Claude LECLERC, chef de l'Unité de recherche Régulation Immunitaire et Vaccinologie succède à Agnès LABIGNE comme secrétaire du bureau du Conseil d'administration de l'IP (*BIP 4/07/2008*).

Anthony PUGSLEY a été nommé au poste de Directeur général adjoint scientifique de l'Institut Pasteur, au cours de la séance du Conseil d'Administration du 5 juin 2008. Anthony PUGSLEY, Professeur à l'Institut Pasteur, remplace Bernard DUJON qui devient Conseiller scientifique auprès de la Directrice Générale (*BIP 13/06/2008*).

4.3. CRÉATIONS D'UNITÉS

Le Conseil d'Administration du 5 juin 2008, sur proposition de la Directrice générale et après avis du Conseil scientifique, a prononcé la création des unités suivantes à compter du 1^{er} juillet 2008 :

- **Génétique humaine et fonctions cognitives**, dirigée par Thomas BOURGERON, professeur à l'université Paris VII, et rattachée au département de Neurosciences.
- **Hépacivirus et immunité innée**, dirigée par Eliane MEURS, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, et rattachée au département de Virologie.
- **Immunobiologie des cellules dendritiques**, dirigée par Matthew ALBERT, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur et directeur de recherche à l'INSERM, rattachée au département d'Immunologie.
- **Neuro-immunologie virale**, dirigée par Monique LAFON, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, et rattachée au département de Virologie.

- **Pathogénie virale**, dirigée par Fernando ARENZANA-SEISDEDOS, directeur de recherche à l'INSERM, et rattachée au département de Virologie.

Le premier mandat de ces unités s'achèvera le 30 juin 2012 (*BIP 13/06/2008*).

4.4. RECRÉATIONS D'UNITÉS

Le Conseil d'Administration du 5 juin 2008, sur proposition de la Directrice générale et après avis du Conseil scientifique, a prononcé la création des unités suivantes à compter du 1^{er} juillet 2008, et dont le mandat s'achèvera le 30 juin 2012 :

- **Génétique moléculaire des virus respiratoires**, sous le nouveau nom de **Génétique moléculaire des virus à ARN**, dirigée par Sylvie VAN DER WERF, chef de laboratoire et professeur à Paris VII, rattachée au département de Virologie.
- **Régulation enzymatique des activités cellulaires**, sous le nouveau nom de **Biochimie structurale et cellulaire**, dirigée par Michel VÉRON, professeur à l'Institut Pasteur et directeur de recherche au CNRS, rattachée au département de Biologie structurale et chimie.
- **Rétrovirologie moléculaire**, dirigée par Simon WAIN HOBSON, professeur à l'Institut Pasteur, et rattachée au département de Virologie (*BIP 13/06/2008*).

Les responsables des cours pour l'année universitaire 2008-2009 ont été désignés (*BIP 20/06/2008*).

4.5. L'ASSEMBLÉE DES 100 : TRAVAUX, ÉLECTIONS

Lors de sa séance du 25 juin 2008, l'Assemblée des 100 a approuvé le procès-verbal de l'assemblée générale du 27 juin 2007, ainsi que le rapport du Conseil d'Administration à l'Assemblée. Par ailleurs, 8 membres du Conseil d'administration et 5 membres extérieurs de l'Assemblée ont été nouvellement élus dès le premier tour.

V. DISTINCTIONS

5.1. FRANÇOISE BARRÉ-SINOUSI, DOCTEUR HONORIS CAUSA DE TULANE UNIVERSITY

Le 17 mai 2008, Françoise BARRÉ-SINOUSI, responsable de l'unité "Régulation des Infections Rétrovirales", a été honorée du titre Docteur *Honoris causa* de l'université de Tulane, Nouvelle-Orléans, Louisiane, États-Unis (*BIP 09/05/2008*).

5.2. PATRICE COURVALIN, DOCTEUR HONORIS CAUSA DE LA TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMARK

Patrice COURVALIN, responsable de l'unité des Agents antibactériens et Directeur du Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques a été honoré le 25 avril 2008 des insignes de "honorary doctorate" (Docteur *Honoris causa*) par la *Technical University of Denmark* (*BIP 16/05/2008*).

5.3. **KEN MAC ELREAVEY REÇOIT LA MÉDAILLE COMMÉMORATIVE ANNANDALE**

La Société Asiatique, la plus ancienne société savante en Asie (1784) décerne tous les trois ans la médaille commémorative Annandale pour récompenser des contributions importantes dans le domaine de l'anthropologie en Asie.

Cette année, la médaille a été décernée à Ken McELREAVEY, responsable de l'unité de Génétique du développement humain. Remise le 5 mai 2008 par Gopalkrishna GANDHI, petit-fils de Mahatma GANDHI, elle récompense ses travaux sur la génétique des populations humaines dans le sous-continent indien (BIP 23/05/2008).

5.4. **LE PRIX "R" DÉCERNÉ AUX CRÉATEURS DE L'ÉCOLE PASTEUR-CNAM DE SANTÉ PUBLIQUE**

Arnaud FONTANET, Directeur de l'École Pasteurienne d'Infectiologie et Jean DE KERVASDOUÉ, Professeur titulaire de la chaire d'économie et de gestion des services de santé au Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM) sont les lauréats du prix "R". Représentant respectivement l'Institut Pasteur et le CNAM, ce prix leur est décerné pour la création de l'École Pasteur-Cnam de Santé Publique, jugée idée "remarquable" de l'année 2008. Il leur a été remis le 28 mai 2008 par *CMP Medica / Décision Santé* à l'occasion du salon Hôpital Expo qui s'est tenu Porte de Versailles en mai 2008 (BIP 30/05/2008).

5.5. **BENOÎT GAMAIN ET LLUIS QUINTANA-MURCI LAURÉATS DE LA MÉDAILLE DE BRONZE DU CNRS 2008**

La médaille de bronze récompense le premier travail d'un chercheur, qui fait de lui un spécialiste de talent dans son domaine. Cette récompense représente un encouragement du CNRS à poursuivre des recherches bien engagées et déjà fécondes. Cette année, deux chercheurs de l'Institut Pasteur sont lauréats :

- Benoît GAMAIN (unité de Biologie des Interactions Hôte-Parasite -URA 2581) pour ses travaux sur le décryptage des interactions hôte-parasite au cours du paludisme gestationnel. Ces travaux ouvrent la voie au développement de stratégies vaccinales visant à protéger les femmes et leur fœtus des lourdes conséquences du paludisme gestationnel ;
- Lluis QUINTANA-MURCI (chef de l'unité postulante de Génétique évolutive humaine, URA 3012), pour ses travaux sur la diversité génétique des populations, sur les effets de la

sélection naturelle dans le génome humain et sur l'identification de gènes, dont certains sont impliqués dans les relations hôte-pathogènes, soumis à de fortes pressions de sélection. La cérémonie de remise des médailles aura lieu en fin d'année (BIP 20/06/2008).

5.6. **THOMAS BOURGERON ET OLIVIER SCHWARTZ ONT REÇU LE PRIX PASTEUR VALLERY-RADOT 2008**

Selon les vœux de Jacqueline PASTEUR VALLERY-RADOT, épouse du petit-fils de Louis PASTEUR, le Prix Pasteur Vallery-Radot récompense chaque année deux personnalités françaises de moins de 50 ans, appartenant à l'Institut Pasteur et ayant conçu au cours des cinq dernières années une œuvre scientifique d'envergure dans le domaine de la biologie ou de la physique-chimie. En accord avec l'Institut Pasteur, deux prix sont attribués par la Bibliothèque nationale de France, légataire universel de Madame Jacqueline PASTEUR VALLERY-RADOT. En présence de Bruno RACINE, directeur de la BNF, de Jean-François BACH, Secrétaire perpétuel de l'Académie des sciences et d'Alice DAUTRY, Directrice générale de l'Institut Pasteur, ils ont été remis le 16 juin 2008 à Thomas BOURGERON, responsable de l'unité de Génétique humaine et fonctions cognitives et à Olivier SCHWARTZ, responsable de l'unité Virus et Immunité. À cette occasion, une conférence a été donnée par Maxime SCHWARTZ, directeur général honoraire de l'Institut Pasteur, et les deux lauréats ont brièvement présenté leurs travaux (BIP 20/06/2008).

5.7. **GILLES MARCHAL, LAURÉAT DU 10^{ÈME} CONCOURS NATIONAL D'AIDE À LA CRÉATION D'ENTREPRISES DE TECHNOLOGIES INNOVANTES**

Dans le cadre du 10^{ème} Concours national d'aide à la création d'entreprises de technologies innovantes, le ministère de la recherche a distingué 170 lauréats sur 1.174 dossiers reçus (75 projets en création développement et 95 en émergence). Parmi les 18 lauréats en création-développement pharmacie, sciences du vivant et biotechnologies, Gilles MARCHAL, responsable du laboratoire Immunothérapie, a été primé pour son projet EFD, préparation anti-inflammatoire provenant du BCG, active dans divers modèles expérimentaux, tels que l'asthme établi ou encore la maladie de Crohn dans deux espèces animales. La subvention de 300.000 € reçue à cette occasion permettra la création d'une entreprise, Immunotherapix, en vue de valoriser les résultats expérimentaux et d'apporter la preuve du concept et d'activité lors d'essais chez l'homme.

VI. EXPOSITIONS

6.1. **EXPOSITION METCHNIKOFF**

Cent ans après l'attribution du prix Nobel de Physiologie et Médecine à Elie METCHNIKOFF qui a donné lieu à un important colloque en avril dernier, l'héritage de ce scientifique s'impose : la phagocytose est comprise aujourd'hui comme un des mécanismes de l'immunité innée. De même, il est désormais établi que les phagocytes jouent un rôle déterminant dans l'établissement de l'immunité acquise chez les organismes supérieurs et que les anticorps utilisent les cellules de l'immunité innée pour agir. Dans le cadre des 120 ans de l'Institut

Pasteur et pour commémorer le centenaire du prix Nobel d'Elie METCHNIKOFF, le Musée Pasteur présente une exposition qui évoque l'homme - de l'Ukraine à l'Institut Pasteur - et le scientifique - du naturaliste à l'immunologiste -.

L'exposition se tient depuis le 19 mai 2008 dans la Grande Galerie. L'entrée est libre. Nous vous invitons à venir nombreux découvrir l'œuvre de ce pionnier.

Pour toute information, contacter : Annick Perrot (poste 8282) ou Patricia Cardin (poste 8283) (BIP 16/05/2008).

6.2. UNE EXPOSITION EN L'HONNEUR D'ALEXANDRE YERSIN

Pour rendre hommage à Alexandre YERSIN, pasteurien découvreur du bacille de la peste, et à l'occasion du 120^e anniversaire de l'Institut Pasteur, l'Association *Friends of the Institut Pasteur Hong Kong Limited* a présenté, du 28 mai au 14 juillet, au Musée de l'Université de Hong Kong, puis jusqu'à la fin septembre au Hong Kong Museum of medical sciences, une exposition intitulée «*From the plague to new*

emerging diseases» avec le concours du Musée Pasteur et du *Hong Kong University Pasteur Research Centre* (HKU-PRC). Cette exposition, inaugurée le 27 mai, avait pour objet, non seulement de faire davantage connaître YERSIN et l'Institut Pasteur, mais aussi de collecter des fonds pour les *Friends of the Institut Pasteur Hong Kong Limited*, afin d'aider le laboratoire de Hong Kong et les recherches sur la santé publique (BIP 06/06/2008).

VII. PUBLICATIONS - CONFÉRENCE DE PRESSE

7.1. PASTEUR LE MAG' N°5

Au sommaire de ce numéro, un dossier d'une trentaine de pages consacré à "Des menaces bactériennes", mais aussi une évocation des manifestations organisées dans le cadre des 120 ans, des articles sur l'addiction, sur l'apport de l'Institut Pasteur à l'OMS, de nouvelles avancées dans la prévention de l'ulcère de Buruli et l'opération "Mains sales, mains propres".

→ Nathalie FEUILLET (8109, feuillet@pasteur.fr). Site web externe, tout comme les numéros précédents (BIP 23/05/2008).

7.2. LA LETTRE DE L'INSTITUT PASTEUR (LIP) N°61 VIENT DE PARAÎTRE

Ce trimestre, le magazine des donateurs de l'Institut Pasteur consacre son dossier aux 25 ans de mobilisation de l'Institut Pasteur face au virus du sida.

→ Évelyne AUBIN (eaubin@pasteur.fr) (BIP 30/05/2008).

7.3. OBSERVATOIRE DES RISQUES SANITAIRES

L'Institut Pasteur s'est associé cette année au 3^{ème} observatoire des risques sanitaires. Leurs résultats ont été présentés lors d'une conférence de presse, le 6 juin 2008 (BIP 06/06/2008).

VIII. DONS - PROMOTION DE L'INSTITUT PASTEUR

8.1. PASTEURDON

8.1.1. Mise en ligne du site dédié

Le site web pasteurdon.fr est en ligne. Ce site présente l'ensemble de l'opération Pasteurdon. Il a aussi été conçu pour accompagner les partenaires de cette opération dans leur mobilisation. Les internautes pourront y trouver des informations sur l'édition 2008, les partenaires radios, les partenaires entreprises et les parrains. Également consultables : l'ensemble des événements prévus en régions ainsi que tous les outils pour communiquer et se mobiliser. Le site offre aussi la possibilité de faire un don en ligne.

8.2. UNE CARTE BLEUE AUX COULEURS DE L'INSTITUT PASTEUR

8.2.1. Le 26 mai, Société Générale lance un catalogue de cartes bancaires "cobrandées, affinitaires", ou présentant un design original dont une aux couleurs de l'Institut Pasteur. Cette carte aura les mêmes fonctions que les cartes bancaires classiques. Cette nouvelle génération de cartes permettra aux clients qui le souhaitent de montrer leur engagement pour une cause qui leur est chère. Pour chaque achat réalisé par le porteur avec une de ces cartes, quel que soit le montant, une partie fixe reviendra à la structure mentionnée sur la carte dont l'Institut Pasteur par exemple (BIP 16/05/2008).

8.3. LE MILLÉSIME 2007 DU VIN DU CHÂTEAU DES RAVATYS DEUX FOIS DISTINGUÉ

8.3.1. Le vin du château des Ravatys, propriété de l'Institut Pasteur à côté de Mâcon, a obtenu deux distinctions cette année pour le millésime 2007 :

- Brouilly 2007 : Médaille d'argent au Concours Général Agricole de Paris,
- Côte de Brouilly 2007 : Médaille de bronze au Concours des Grands Vins de France de Mâcon

Le château des Ravatys a été légué en 1937 à l'Institut Pasteur par Madame Mathilde COURBE, généreuse donatrice. Site web : <http://www.chateaudesravatys.com/index.php> (BIP 06/06/2008).

8.3.2. Plusieurs cuvées du Château des Ravatys, légué en 1937 à l'Institut Pasteur par Mathilde COURBE, généreuse donatrice, sont disponibles sur le campus. Le vin du Château des Ravatys a reçu tout dernièrement plusieurs récompenses (voir BIP du 6 juin 2008) :

→ Jean-Michel MONCEAU ou Bruno PHILIPPE, 01.45.68.80.29.

L'abus d'alcool est dangereux pour la santé. À consommer avec modération (BIP 27/06/2008).

IX. NÉCROLOGIE

La Direction de l'Institut Pasteur a la grande tristesse de faire part du décès de Henri-Hubert MOLLARET, Elie WOLLMAN et Mario ZAKIN.

● **Monsieur Elie WOLLMAN**, Sous-directeur honoraire de l'Institut Pasteur, Professeur honoraire à l'Institut Pasteur. Né le 4 juillet 1917 à Paris, il est décédé le 1^{er} juin 2008. Elie WOLLMAN était docteur en médecine et docteur ès sciences. Il est engagé à l'Institut Pasteur comme boursier Roux, en 1942, dans le service d'André LWOFF mais replié en zone sud où il fut médecin dans les maquis du Tarn, il ne rejoignit l'Institut Pasteur qu'à la libération. Boursier de la fondation Rockefeller, il se familiarisa avec la génétique des bactéries et de leurs virus, au "*California Institute of Technology*" dans le laboratoire de Max DELBRÜCK.

Assistant (1946) puis chef de laboratoire à l'Institut Pasteur en 1954, il est nommé directeur de recherche au CNRS (1960), professeur à l'Institut Pasteur (1964) et professeur de classe exceptionnelle II en 1978. Il a été sous directeur de l'Institut Pasteur de 1966 à 1985 et s'est en particulier consacré à la direction de l'enseignement.

Les premières recherches d'Elie WOLLMAN ont porté sur la génétique de la lysogénie. Cependant, l'essentiel de son travail, effectué en collaboration avec François JACOB, a concerné la sexualité et la génétique des bactéries. La conception de la technique de la "conjugaison interrompue", en grande partie son oeuvre, s'est révélée un outil d'une grande utilité dans la localisation des marqueurs génétiques. En outre, elle a apporté les premières indications que le chromosome bactérien était circulaire. La démonstration que le prophage lambda était induit lors de son transfert par conjugaison dans une bactérie non lysogène (induction zygotique) a fortement contribué à faire comprendre que l'immunité conférée par le prophage était due à un répresseur. Cet ensemble de travaux a fait d'Elie WOLLMAN l'un des principaux fondateurs de la génétique bactérienne, laquelle a joué un grand rôle dans l'émergence de la biologie moléculaire.

Bénéficiaire de nombreux prix : Rapkine en 1953, Fondation Lecomte du Nouy en 1956, ESSEC décerné par la Ligue nationale contre le cancer en 1958, Roy Vaucouloux (1959) et Prix Charles Léopold Meyer de l'Académie des Sciences (1976), il avait reçu des distinctions honorifiques telles que celles de Commandeur des Palmes académiques (1966), Officier de la Légion d'honneur (1980) et Commandeur de l'Ordre National du Mérite (2001) ; il était membre fondateur de l'EMBO et membre étranger de l'Académie des Sciences des Etats-Unis.

E. WOLLMAN bénéficiait d'une grande notoriété en France et à l'étranger et son livre sur la génétique des micro-organismes, co-écrit avec F. JACOB, a eu un retentissement et un rayonnement considérable. Il a joué un rôle important en tant que pasteurien dans le monde scientifique. Esprit fin et très distingué, doué d'un sens critique aigu, E. WOLLMAN montrait un total dévouement à l'Institut Pasteur ; il représentait sa mémoire et en connaissait toute l'histoire.

La Direction et le Personnel de l'Institut Pasteur associent à sa mémoire, le souvenir de ses parents, Eugène et Elisabeth WOLLMAN, Chercheurs à l'Institut Pasteur, morts en déportation.

● **Monsieur Henri-Hubert MOLLARET**, Professeur honoraire à la Faculté et Professeur honoraire à l'Institut Pasteur. Henri-

Hubert MOLLARET a eu une longue carrière à l'Institut Pasteur (de 1952 à 1990). Il est une grande figure de la bactériologie des agents pathogènes majeurs, tels que le bacille de la peste, des yersinioses entériques, de la tularémie, des pasteurella, etc.

Après des études médicales, incluant des fonctions d'interne à l'hôpital de l'Institut Pasteur en 1943 et 1944, il a intégré l'Institut Pasteur en tant que boursier dans le service de Microbiologie générale auprès de J. DUMAS (de 1952 à 1957). Il a fréquenté le laboratoire des leptospires de Mme KOLOCHINE-ERBER et celui des Anaérobies que dirigeait le Professeur A.R. PREVOT avant de rejoindre le service de la Peste de G. GIRARD puis celui de M. BALTAZARD, service qu'il allait à son tour diriger à partir de 1971.

Ce parcours inaugural auprès de grands maîtres pasteurien allait faire d'Henri MOLLARET un des plus grands bactériologistes de sa génération. Nommé Professeur des Universités en Bactériologie à la Faculté de Médecine de Paris-Ouest puis Professeur à l'Institut Pasteur et responsable du Cours de Bactériologie systématique à la mort de M. PIECHAUD, il allait transmettre, à son tour, ses vastes connaissances à des générations de médecins, de vétérinaires, de scientifiques, etc. Chef de l'unité d'Ecologie bactérienne comprenant le centre collaborateur OMS pour les Yersinia et le centre de référence pour les Yersinia, les Pasteurella et la tularémie, il a été chef de département d'écologie en 1978, puis chef de département de Bactériologie et Mycologie en 1982. Il a pris sa retraite en 1990.

Homme de vaste culture, son approche scientifique est celle d'un naturaliste, associant l'analyse la plus approfondie du micro-organisme infectieux et de ses caractéristiques pathogéniques à celles des éléments de son contexte naturel et ses relations avec les autres composants de l'écosystème. Ses travaux sur la peste sont remarquables à cet égard. Elève direct de M. BALTAZARD, il développera avec lui et Y. KARIMI, à l'Institut Pasteur de Téhéran, l'hypothèse sur la conservation endogène du bacille de la peste entre les poussées épizootiques ; c'est-à-dire les capacités de survie de ces bactéries dans les terriers et la contamination des rongeurs fouisseurs repeuplant ces lieux dévastés, expliquant ainsi la pérennisation des foyers invétérés. De même, ses études sur la tularémie, également appelée pseudo-peste, ses modes de transmission et ses vecteurs, les hôtes réservoirs sauvages, etc., sont de notoriété internationale, surtout après que les menaces bioterroristes aient réactivé l'importance de ces thématiques. Grand spécialiste de la pseudotuberculose et découvreur de l'espèce nouvelle *Yersinia enterocolitica*, une de ses contributions les plus importantes à la santé publique est sans doute la description des adénites mésentériques pseudo-tumorales ; description qui allait permettre, grâce à ce diagnostic différentiel, d'écarter celui de tumeur cancéreuse et épargner au patient l'amputation chirurgicale et les chimio- et radiothérapies aux conséquences très lourdes.

Henri MOLLARET, médecin scientifique et homme de vaste culture, était passionné d'histoire des sciences et de la médecine. Avec Jacqueline BROSSOLLET, son assistante, ils ont publié de nombreux ouvrages de référence sur la peste et sur Alexandre YERSIN, découvreur du bacille responsable de la peste.

Ses nombreux élèves gardent de lui le souvenir du patron passionnant et joyeux, capable de stimuler de nombreuses vocations de jeunes chercheurs, et du grand humaniste qu'il était.

Henri MOLLARET s'est éteint à 85 ans, le 11 juillet 2008. Les obsèques ont été célébrées dans l'intimité le 16 juillet en Maine-et-Loire.

● **Monsieur Mario ZAKIN**, né le 12 août 1938 à Buenos Aires (Argentine), est décédé le 30 juillet 2008. Mario ZAKIN est Docteur ès Sciences (1964) de l'université de Buenos Aires. Chargé de recherche à l'Institut Pasteur en 1978 et chef de laboratoire en 1983, il est responsable d'une équipe indépendante dans l'unité de Biochimie cellulaire dirigée par Georges COHEN. A la tête du laboratoire d'expression des gènes eucaryotes en 1992 puis chef de l'unité du même nom dans le département de biochimie et génétique moléculaire, il est nommé professeur en 1995. Il a pris sa retraite le 30 septembre 2003.

M. ZAKIN a abordé durant sa carrière scientifique plusieurs domaines : biochimie des protéines, immunochimie et biologie moléculaire. Au début des années 1980, M. ZAKIN a apporté une importante contribution à l'élucidation de la structure et régulation des gènes méthionine chez la bactérie modèle, *Escherichia coli*. En 1983, il a focalisé sa recherche sur la structure et la régulation de l'expression de gènes de mammifères comme l'antithrombine III et la transferrine humaine (protéine qui règle le transfert du fer dans l'organisme humain).

Vers la fin de sa carrière, il s'est également intéressé au rôle de la transferrine dans le système nerveux central. Dans son

travail sur la régulation transcriptionnelle, il a utilisé des méthodologies de pointe pour caractériser les éléments de régulation du gène de la transferrine et purifier les facteurs de transcription qui participent à la régulation transcriptionnelle de ce gène. L'étude des mécanismes spécifiques qui gouvernent la transcription des gènes eucaryotes, et plus précisément celles des protéines qui contrôlent l'expression génétique spécifique du foie représentent des champs très importants de la recherche biomédicale. En même temps, M. ZAKIN a continué à s'intéresser à d'autres thématiques, dont la structure et la fonction des gènes S et L du virus Tacaribe, arenavirus responsable de la fièvre hémorragique en Argentine, en vue d'une étude vaccinale.

Son travail a été publié dans des journaux de réputation internationale. Mario ZAKIN a dirigé 9 DEA et 12 thèses. Il a participé à l'enseignement du cours de Microbiologie générale (1980 et 1986), Immunologie générale (1983) et a dirigé un cours à l'université de Buenos Aires dans les années 1980-1990.

Il laisse le souvenir d'un scientifique solide, déterminé, poursuivant ses objectifs avec une énergie considérable. Il a été un responsable de laboratoire très apprécié pour ses qualités humaines, toujours à l'écoute et bienveillant.

La Direction et le Personnel de l'Institut Pasteur présentent aux familles éprouvées l'expression de leurs condoléances attristées.



CNRS Formation Entreprises

du 9 au 11 mars 2009 **Initiation aux différentes techniques synchrotron pour la biologie**
à GIF SUR YVETTE (91)

du 16 au 20 mars 2009 **RMN et modélisation de biopolymères**
à PARIS (75)

du 16 au 20 mars 2009 **Résonance magnétique nucléaire et interactions biologiques**
à GIF-SUR-YVETTE (91)

du 16 au 20 mars 2009 **Protéomique : introduction aux méthodes de séparation des peptides et des protéines.**
à PARIS (75)

du 17 au 19 mars 2009 **Application de la microcalorimétrie à l'étude des molécules biologiques**
à ORSAY (91)

du 23 au 24 mars 2009 **Application du dichroïsme circulaire à l'étude des molécules biologiques**
à GIF SUR YVETTE (91)

Le 23 mars 2009 **Microfluidique et microfabrication pour la biologie**
à PARIS (75)

Centre de ressources en formation

Un problème de formation particulier ? N'hésitez pas à nous consulter :
- par mail à ressources@cf.cnrs-gif.fr
- par téléphone au 01.69.82.44.96

Catalogue, programmes et inscriptions :

CNRS Formation Entreprises Avenue de la Terrasse Bât. 31 91198 Gif-sur-Yvette Cedex
Tél. : 01 69 82 44 55 - Fax : 01 69 82 44 89

Internet : <http://cnrsformation.cnrs-gif.fr>

INFORMATIONS

I. CONGRÈS ET COLLOQUES¹

----- Octobre 2008 -----

☐ 14 - 15 et 16 octobre à Biarritz

21^{ème} Congrès A3P

→ Site web : www.a3p.org

☐ 27 - 29 octobre à Lyon

TransalpNano, 1^{ère} conférence Transalpine en Nanosciences et Nanotechnologies

→ Université Claude Bernard Lyon 1, Formation continue - Cellule congrès 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex. Tél. +33 (0) 4 72 43 10 11, Téléc. 33 1 4 72 43 12 61, courriel : transalpnano2008@univ-lyon1.fr (*La Gazette du Laboratoire 05/06/2008, n° 133*)

----- Novembre 2008 -----

☐ 11 - 13 novembre à l'Institut Pasteur

7^{ème} Conférence Louis Pasteur : Comprendre et contrôler les maladies infectieuses : un programme pour le XXI^{ème} siècle
- 7th Louis Pasteur conference: Understanding and controlling Infectious Diseases: an agenda for the XXIst Century

→ Gestion des colloques (clp7@pasteur.fr)
<http://www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/clp7/vf/index.html> et
<http://www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/clp7>

----- Mai 2009 -----

☐ 8 - 12 mai à Seattle, WA, Etats-Unis

Annual Meeting of the American Association of Immunologists

→ Site web : <http://www.sfi-immunologie.com.fr/cgi-bin/even.cgi?langue=1&do=view&rubrique=agendainter>

----- Septembre 2009 -----

☐ 13 - 16 septembre à Berlin (Allemagne)

2nd European Congress of Immunology

→ Site web : <http://www.sfi-immunologie.com.fr/cgi-bin/even.cgi?langue=1&do=view&rubrique=agendainter>

----- Octobre 2009 -----

☐ 13 - 17 octobre à l'Institut Pasteur

LEGIONELLA 2009

→ Gestion des colloques (legionella2009@pasteur.fr) Site web : www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/legionella2009/vf (en français)

II. PRIX

Le Prix Gilbert Lagrue, décerné avec le soutien des Laboratoires Pierre Fabre Santé

Ce prix récompense, chaque année, des études en recherche fondamentale et clinique sur la dépendance tabagique.

→ Caroline PERDRIX, courriel : caroline.perdrix@pierre-fabre.com (*La Gazette du Laboratoire 05/06/2008, n° 133*)

¹ Les congrès et colloques ne sont mentionnés qu'une fois.

LIVRES

NOS LECTURES

DES MARCHES DE LA MORT AUX SCIENCES DE LA VIE

Charles CHANY. Ed. François-Xavier de Guibert, 2004, 26 €

Dès la couverture de cet ouvrage autobiographique, on perçoit par son titre deux périodes opposées : l'une noire, l'autre rouge.

La période noire commence de façon favorable. Dans une famille hongroise aisée et cultivée, l'auteur mène à Budapest une enfance heureuse. Mais, adolescent, il fait en Allemagne, en 1933, un séjour qui l'amène à découvrir la montée du nazisme, annonciatrice des horreurs qui vont suivre. L'antisémitisme, figurant dans le programme de HITLER, fait partie des moyens de la prise du pouvoir facilitée par la misère et les souffrances du peuple allemand liées aux applications du traité de Versailles. Les persécutions commencent et montent progressivement. C'est la "mobilisation" qui prend vite la forme d'une déportation dans les mines de cuivre de Bor en Serbie, où les mauvais traitements, la sous-alimentation conduisent à une mortalité élevée. En 1943, devant l'avancée des troupes soviétiques, le camp de Bor est évacué et c'est le début d'une marche de plus de 900 kilomètres jusqu'à la frontière autrichienne. L'épuisement et les massacres continuels réduisent à quelques centaines l'effectif de 3.600 partants. Puis, c'est le camp de Buchenwald d'où l'auteur est libéré par les troupes américaines en avril 1945 : sa survie parmi la vingtaine de rescapés tient du miracle, mais aussi d'un courage et d'une volonté inébranlables.

La période rouge, c'est la réalisation d'une vocation, par les études de médecine à Paris, puis l'accès à la recherche en biologie. Interne à l'hôpital Saint Vincent de Paul, il porte un grand intérêt aux infections virales sévissant chez les enfants, intérêt qui devait l'amener à orienter sa carrière de chercheur. Il suit le "Grand Cours" de l'Institut Pasteur puis entre dans le Service des Virus de Pierre LÉPINE où il se livre à des travaux novateurs sur les adénovirus isolés en cultures cellulaires. Puis il s'intéressera au virus de la rougeole et ses propriétés hémagglutinantes, au para-influenza avec la formation de syncytiums. Ce dernier virus devait l'amener à aborder des travaux intensifs sur l'interféron et ses propriétés antivirales et antitumorales. Après avoir quitté l'Institut Pasteur, il crée à l'hôpital Saint Vincent de Paul le premier laboratoire de diagnostic virologique en milieu hospitalier, devient Professeur agrégé de virologie, puis directeur d'une unité INSERM. Il s'ensuit une longue série de travaux de recherche fondamentale, basés sur l'interféron et son antagoniste, la sarcolectine, et parmi lesquels on peut citer la réversion phénotypique de cellules tumorales. Il s'y ajoute une étude des mécanismes du développement de l'encéphalite spongiforme et l'insertion du gène de l'antigène HBs dans les cellules CHO, prélude à la production d'un vaccin contre l'hépatite B. Le contraste entre ces deux périodes est saisissant. Il permet de mesurer la force d'une vocation et la détermination dont fait preuve l'auteur de cet ouvrage.



JOURNÉE SCIENTIFIQUE RÉGIONALE DE L'AAEIP : DIJON 28 NOVEMBRE 2008

BULLETIN D'INSCRIPTION

A retourner *avant* le 21 novembre 2008

Soit au : Secrétariat de l'AAEIP 25, rue du docteur Roux, 75724 PARIS cedex 15 -
Téléphone/télécopie : 01 45 68 81 65 - Courriel : vchoisy@pasteur.fr

Ou bien au Professeur Yves MICHIELS, UFR de Pharmacie, 7, avenue Jeanne d'Arc, 21000 DIJON
Courriel : Yves.Michiels@u-bourgogne.fr

Nom et prénom :

Fonction :

Nom, prénom d'accompagnant éventuel :

Adresse :

Téléphone : Courriel :

Je m'inscris aux Conférences scientifiques du vendredi 28 novembre 2008

Participation aux frais : 10 € par personne

Ci-joint chèque de..... €, libellé à l'ordre de l'AAEIP

Date et Signature :

PRÉSIDENT FONDATEUR : **Pierre BRYGOO**, Docteur en Médecine †

PRÉSIDENTE D'HONNEUR : Professeur **Alice DAUTRY**, Directrice générale de l'Institut Pasteur

CONSEIL D'ADMINISTRATION

----- CONSEILLERS ÉLUS ET CONSEILLERS À VIE* -----

A) MEMBRES DU BUREAU

- Président : **Michel DUBOS**, Docteur en médecine
- Vice-présidents : **Jean-Luc GUESDON**, Docteur ès sciences
Pr. **Pierre SALIOU**, Docteur en médecine
- Trésoriers : **Jean-Paul PENON**, Docteur en pharmacie
Catherine DE SAINT-SARGET, Scientifique
- Secrétaires généraux :
Alain CHIPPAUX, Docteur en médecine
Pr. **Philippe LAGRANGE**, Docteur en médecine
assistés de **Jean-Claude KRZYWKOWSKI**, Pharmacien
- Archivistes : **Alain CHIPPAUX**
Jean-Claude KRZYWKOWSKI

- Bulletin : **Paulette DUC-GOIRAN**, Docteur en médecine
Pr. **Edith BAR-GUILLOUX**, Docteur ès sciences
- Stagiaires et Relations internationales :
François POTY, Docteur en médecine
- Annuaire : **Alain CHIPPAUX**

B) RESPONSABLES DE COMMISSIONS

- Entraide : **Catherine DE SAINT-SARGET**
- Regain : Pr. **Marie-José SANSON-LE PORS**, Docteur en médecine
- Admissions : **Michel BERNADAC**, Docteur vétérinaire
- Finances : **Jean-Paul PENON**
- Communication : **Michel BERNADAC**
- Activités culturelles : **Andrée DEVILLECHABROLLE**,
Docteur en médecine
Claude MARQUETTY, Docteur en pharmacie
- Régionalisation : Pr. **Pierre SALIOU**

C) AUTRES CONSEILLERS

- Pr. **Henri Michel ANTOINE**, Docteur en médecine*
- Pr. **Michel BARME**, Docteur en médecine
- Paul T. BREY**, Docteur ès sciences
- Philippe DESPRES**, Docteur ès sciences
- Valérie GUEZ-ZIMMER**, Docteur ès sciences
- Mireille HONTEBEYRIE**, Docteur en pharmacie
- Paul-Emile LAGNEAU**, Scientifique
- Yvonne LE GARREC**, Docteur en pharmacie*
- Olivier PATEY**, Docteur en médecine
- Pr. **Alain PHILIPPON**, Docteur vétérinaire
- Jean-Yves RIOU**, Docteur en médecine
- Françoise TAILLARD**, Docteur en médecine
- Jacques THÉBAULT**, Docteur en pharmacie*
- Daniel VIDEAU**, Docteur vétérinaire*
- Georges YAZIGI**, Docteur en médecine

----- CONSEILLERS DÉSIGNÉS PAR LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR-----

Marie-Hélène MARCHAND, Secrétaire général honoraire
de l'Institut Pasteur

Isabelle SAINT GIRONS, Directeur de l'Enseignement

----- CONSEILLERS HONORAIRES -----

Marie-Claire CARRÉ, Docteur en médecine
Pr. **Bernard DAVID**, Docteur en médecine
Pr. **Jean-Claude TORLOTIN**, Docteur en pharmacie

Pr. **Pierre VERGEZ**, Docteur en médecine
Pierre VILLEMIN, Docteur vétérinaire

BIENFAITEURS

Nous remercions la Direction générale de l'Institut Pasteur,
ainsi que les nombreux amis qui contribuent généreusement au succès des activités de l'Association.

ADRESSE ET SECRÉTARIAT

AAEIP, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15

Tél. et télécopie : 01.45.68.81.65. Site Web : www.pasteur.fr >, rubrique " Enseignement " >

rubrique Association des Anciens Elèves

La Banque Postale : 13.387.59 D Paris

SECRÉTARIAT : **Véronique CHOISY** - courriel : vchoisy@pasteur.fr