

Un volet de l'histoire des Molécules marquées au CEA : La contribution de la Biologie

Pierre Fromageot

L'idée d'utiliser une marque pour suivre un événement n'est pas nouvelle. Daniel a pisté les Grands Prêtres dans le temps par les traces de cendres laissées par leurs sandales. Plus récemment, Claude Bernard écrivait à Taine "Si je pouvais suivre une molécule d'azote dans le corps d'un chien, je vous raconterais la physiologie". Aussi, dès la découverte de la radioactivité artificielle par Frédéric et Irène Joliot-Curie, le souhait exprimé par Claude Bernard a connu un début de réalisation au Collège de France, dont le cyclotron a permis de préparer de l'iode ^{128}I . Mais c'est avec la démonstration de Fermi que l'on produit une foule de radioéléments artificiels en mettant en oeuvre des neutrons, que les radioéléments artificiels prennent leur essor. Les réacteurs nucléaires que l'on commençait à construire se sont avérés les meilleurs auxiliaires des recherches biologiques, fournissant ^{32}P , ^{35}S et bientôt ^{14}C , à côté des métaux alcalins, du calcium, du chlore et de l'azote radioactifs.

La toute première molécule marquée

logie. Les deux volets de ce diptyque devaient se conforter, l'un contribuant à définir ce que sont les processus normaux dont l'autre examinait les perturbations. Cette nouvelle orientation, voulue par F. Perrin, Haut-Commissaire, allait conduire à la création du Service de Biologie, que J. Coursaget devait développer pendant 30 ans et apporter à la préparation de molécules marquées une vigoureuse stimulation.

L'utilisation d'enzymes purifiées

Les études du métabolisme du soufre dans l'embryon d'oiseau, que j'avais entreprises avec F. Chapeville puis avec A. Sentenac, montraient, non seulement que l'embryon disposait d'un système de réduction des ions sulfate en ions sulfite d'une extrême efficacité, mais aussi d'une cystéineylase, labilisant sans la couper la liaison C-S' de la cystéine. En présence d'un nucléophile, HS-, HSO₃, on observe un déplacement du soufre organique et

aujourd'hui le lecteur dira sans peine ce qu'il serait pour répondre, en 1956-1958 nous étions perplexes et avons voulu examiner comparativement et de façon globale, le métabolisme et ses variations dans le sac vitellin et dans l'embryon né. Une extrême sensibilité nous paraissant nécessaire, nous avons dû nous forger nos outils, car, les acides aminés et les sucres disponibles, marqués par ^{14}C sur un carbone, n'atteignaient pas les radioactivités spécifiques requises, sans compter les difficultés provenant de la présence des isomères optiques.

Les chlorelles à l'engrais

Aussi avons-nous entrepris en toute innocence de cultiver des chlorelles dans une atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$ avec l'espoir de les voir se multiplier et synthétiser des protéines uniformément marquées qu'il nous suffirait d'isoler, d'hydrolyser pour obtenir des acides aminés aussi radioactifs qu'il est possible. Les premiers résultats furent très décevants. Le nombre de cellules reste au mieux constant. Ce qui

peptidiques n'étaient pas coupées et restaient résistantes à toutes sortes d'enzymes protéolytiques. Ce n'est que bien plus tard que nous avons été voir en détail la nature des peptides résistants, et c'est l'oeuvre de A. Machard mais, dans l'immédiat, ce qu'il me fallait, c'étaient les acides aminés. Une hydrolyse acide complémentaire résolut la question.

Une seconde surprise de cette époque fut de réaliser combien l'eau distillée, les sels, phosphates, nitrates, etc., contiennent de $^{12}\text{CO}_2$ qui vient diluer le $^{14}\text{CO}_2$ mis en oeuvre. Nous avons mis des mois pour surmonter cette difficulté et la radioactivité spécifique des produits isolés fit un bond.

Là aussi, nous étions les premiers utilisateurs pour les raisons dites mais, très vite, les amateurs d'acides aminés uniformément marqués se firent insistants. Ils recherchaient aussi du glucose et du saccharose, comme nous.

La feuille de tabac

Il suffit de regarder une chlorelle pour voir qu'elle contient de l'amidon. Dans un premier temps, j'ai pourtant utilisé un autre organisme, plus facile peut-être, la feuille de tabac, réputée ne contenir que très peu de sucres libres. Aussi, après une nuit à l'obscurité, pouvait-on l'en débarrasser presque complètement, et il suffisait d'exposer la feuille 30 minutes à la lumière sous $^{14}\text{CO}_2$ pour récolter suffisamment dans l'extrait aqueux, du glucose...

cules marquées d'intérêt biologique : améliorer le matériel biologique initial, perfectionner des méthodes préparatives et analytiques, assurer des conditions de confinement rigoureuses, établir des accords avec le laboratoire dirigé par L. Pichat pour l'acheminement vers l'extérieur de notre production.

Un nouveau collaborateur : La Spirulline

J'ai dit les limites de la chlorelle. Nous avons essayé bien d'autres végétaux unicellulaires, mais sans pouvoir observer de multiplication. Par pur hasard, j'apprends que l'on a trouvé des cyanophycées fossiles très voisines de celles qui vivent aujourd'hui et, à l'époque des fossiles, la terre devait être très radioactive, et ces bactéries particulièrement équipées pour résister. Comme notre Administrateur Général, Mr. A. Giraud était antérieurement Directeur de L'Institut Français du Pétrole, j'ai pu obtenir de cet Institut une souche de cyanophycées filamenteuses, la *Spirulina maxima*, qui pousse dans des lacs très salés du Tchad et, ce qui est mieux, avec un pH optimum de 10. Pour absorber du CO_2 , c'est un avantage, comme le sont aussi les conditions assez peu communes de salinité, lorsqu'on pense réaliser de grosses cultures. Mais sa propriété essentielle que nous avons présentée, est sa capacité à se multiplier en présence de $^{14}\text{CO}_2$ pur avec la même vitesse qu'en présence de CO_2 ordinaire.

en complexes métalliques avec le cuivre et le nickel, la séparation dans chacune des classes des constituants par des chromatographies dans des solvants volatils. C'est H. Maice-Hisser, puis F. Sala, puis R. Mermet-Bouvier et A. Machard qui ont pris à bras le corps toutes les difficultés, les ont résolues et sont parvenus à des solutions satisfaisantes, obtenant avec de bons rendements des produits d'une grande pureté, mesurée, parce que les impuretés d'origine, étant radioactives, se détectaient et se quantifiaient très facilement. Ce qui est moins commode à écarter, ce sont les produits de dégradation dus à la radiolyse. Ceux qui proviennent directement de la désintégration de ^{14}C ne peuvent être évités, mais ceux qui proviennent de l'effet de rayonnement sur les molécules voisines et le solvant peuvent être fortement réduits, par exemple, en conservant les acides aminés absorbés sur du papier filtre à la température de l'azote liquide et en éluant et procédant à une rechromatographie, juste avant l'utilisation. Les radioactivités spécifiques, homogènes, se trouvaient très proches de celle du $^{14}\text{CO}_2$ utilisé, soit 51 mc par milliatome de carbone.

Tout cela arrivait à maturité à un moment de grand besoin. Nierenberg montrait en 1961 que le polyU dirigeait la synthèse de polyphénylalanine, et l'intérêt pour la détermination du code génétique prenait son essor et mobilisait beaucoup des chercheurs. Nous étions prêts à faire face et le CEA a fourni dans le monde entier les acides aminés uniformément mar-

d'utiliser le $^{11}\text{CO}_2$ malgré sa période de 20 minutes, tant est rapide l'ensemble du procédé.

sion d'une espèce activée du tritium avec un atome d'hydrogène qui est supposée l'arracher, la place laissée libre réagissant avec un ion ou un radical tritium. Or, il se

molécule parentale et, effectivement, c'est une opération très facile, quelquefois trop facile, le peptide iodé devenant tellement hydrophobe qu'il tend à s'atta-

Les amonohuozes neivent-elles expri-

ner, quantifier, caractériser et isoler les récepteurs des familles d'hormones polypeptidiques. P. Meyer proposait immédiatement après de tritier l'angiotensine II, ce qui fut fait avec succès la même année, et nous atteignons pour ce second essai 56 curies par millimole, tout en conservant l'intégralité des propriétés biologiques. Si je parais insister, c'est qu'à l'époque, un tel résultat n'était pas si évident. Les critiques cessèrent d'ailleurs instantanément et, toute honte bue, les plus virulents détracteurs vinrent solliciter la tritiation de leur molécule préférée.

En 1971, c'est une protéine, une neurotoxine comportant quatre ponts disulfure qu'A. Menez allait tritier, en collaboration avec J.P. Changeux, lequel devait isoler peu après le récepteur de l'acétylcholine, en se fondant sur la très forte affinité de la toxine pour le récepteur.

La petite équipe qui s'est ainsi constituée avec J.L. Morgat, a été particulièrement active et a tritié la quasi totalité des peptides biologiquement actifs étudiés de

portait à la fois de la déhydroproline et de l'histidine. La tritiation a réduit le résidu déhydroprolyle et deshalogéné le résidu diiodohistidyle, conduisant à une radioactivité spécifique voisine de 120 curies par millimole. Madame Tixier-Vidal, avec ce matériel, a établi pour la première fois la pénétration d'une hormone polypeptidique à travers la membrane pour se retrouver dans une cellule cible, intacte, comme son résélement a permis de le prouver sans ambiguïté. Le second peptide, synthétisé par E. Briens et C. Blanot, avec introduction d'une déhydrolysine, est le facteur thymique isolé par J.F. Bach, facteur que nous avons réduit au laboratoire, en 1978. C'est un domaine qui ne peut que se développer.

Les peptides deshydrogénases

Il existe dans la nature des peptides et des protéines qui possèdent des doubles liaisons, sous forme de déhydroalanine, de déhydroproline et bien d'autres dou-

niques qui paraissent essentielles, la RMN à haut champ ouvrait des possibilités inconnues jusqu'alors. Pour persuader ma Direction de nous confier un appareil de RMN, il nous fallait montrer ce que nous savions faire avec les appareils existant ailleurs. Les études entreprises avec S. Fermandjian de l'angiotensine II, comparant les séquences primaires, les structures et l'affinité d'une série d'analogues pour le même récepteur, études réalisées en coopération avec P. Meyer, S. Régoli et C. Bumpus, ont paru convaincantes. Celles que développait A. Menez, à propos des neurotoxines, ne l'étaient pas moins. C'est ainsi que J. Horowitz, notre Directeur, fit pour nous en 1970, l'acquisition d'un CAMECA 250 MHz qui venait, pour un temps combler nos vœux. Très vite, nous nous sommes heurtés aux limites inhérentes à la RMN du proton et il m'est apparu qu'il fallait absolument disposer de l'aide que pouvaient apporter certains isotopes stables, soit pour simplifier un spectre, soit pour accéder à des mesures nouvelles. C'était dire qu'un nou-

des protéines qui, hier, étaient encore inaccessibles à de telles études.

Faire face à ces nouveaux objectifs et trouver des solutions pour chaque cas particulier, supposent une intégration de moyens de natures très différentes : non seulement obtenir des acides aminés enrichis en un ou plusieurs isotopes stables, en des quantités inégales jusqu'alors, mais être capable de les placer en des endroits stratégiques dans les protéines étudiées, sont les conditions de réussite. C'est devoir associer à une familiarité avec les méthodes analytiques et préparatives les plus raffinées, une expérience de première main en génétique moléculaire. Est-ce possible ? Oui, si cet effort fait partie d'un ensemble de recherches actives. Ce sont P.N. Lirsac et A. Menez qui réalisent aujourd'hui cette combinaison si précieuse.

Conclusion

La description que je viens de faire ne recouvre que les préoccupations, les travaux, les choix auxquels j'ai été mêlé et n'évoque que succinctement les résultats obtenus. D'autres domaines, par exemple, celui des isotopes à vie brève, émetteurs de positons, si prodigieux par le regard qu'ils permettent de porter à l'intérieur d'un organisme supérieur, ont été décrits ailleurs par ceux qui le connaissent.

Ce qui me paraît important à souligner, c'est l'intrication constante entre les pro-

jets de recherche et les préoccupations préparatives, les secondes rendant possibles les premières, celles-là suggérant de nouveaux développements et la création de nouveaux outils. C'est bien parce que le laboratoire participait, à part entière, aux recherches fondamentales de son temps, que nous avons pu être prêts au bon moment pour apporter à la communauté scientifique internationale, les molécules marquées nécessaires.

L'accroissement explosif des recherches biologiques donne aux marquages de molécules un rôle toujours grandissant, en même temps qu'il se diversifie et s'adapte aux problèmes à résoudre. L'étiquette utilisée n'est soumise qu'à une exigence, celle de ne pas modifier de façon perceptible le comportement de la molécule marquée dans le système étudié. Ce qui est donc acceptable dans un cas peut ne pas l'être dans un autre.

On voit s'ouvrir là bien des possibilités nouvelles pour l'étude demain des cinétiques au sein des cellules et des facteurs qui en contrôlent les vitesses respectives. Les routes métaboliques de nos manuels de biochimie doivent être complétées par les flux des substances qui les empruntent. Ce sont là des mondes presque vierges qu'il reste à explorer, comme on l'a fait pour certains "compartiments". De nouvelles étiquettes sont nécessaires et de nouveaux outils aussi, mais on voit bien qu'une nouvelle physiologie et, par conséquence, qu'une nouvelle pathologie,

prennent peu à peu forme.

Outre ces perspectives, on voit se développer, depuis les travaux de Benson et Yallow, un vaste domaine d'identification et de dosage de substances importantes, qui met en jeu des substances marquées et des macromolécules possédant des propriétés de liaisons spécifiques. Ce n'est pas le lieu d'en discuter ici, sauf pour dire que les progrès à faire sont énormes et l'urgence grande, tant dans les marquages proprement dits, que dans l'automatisation des mesures. Pourquoi ne pas voir aussi que le marquage d'une molécule peut servir, non seulement à repérer cette molécule, mais aussi à l'apporter vers une cible. Le marquage devient un étiquetage au sens de la poste, une adresse, servant à diriger la molécule vers sa cible. Ce marquage-là peut être vu de bien des façons et conduira à de nouvelles formes de thérapeutique si la molécule a des propriétés correctives que l'étiquette rend spécifiques.

Les laboratoires de CEA ont acquis dans ces domaines en évolution rapide une expérience et un savoir faire qui permettent de dire que demain, comme hier, ils contribueront au développement de la biologie, comme l'avaient souhaité les créateurs et animateurs les plus prestigieux du CEA, F. et I. Joliot-Curie, R. Perrin, J. Teillac.