

ISOTOPES et BIOLOGIE, un grand dessein

Pierre FROMAGEOT *

Le concept d'isotope se réfère à la classification de Mendeleïef et concerne les atomes qui occupent une même case mais présentent une masse atomique différente. Leur noyau peut être stable ou instable, et dans ce dernier cas, l'émission d'une particule ou d'une radiation électromagnétique conduit à une transformation de l'ensemble. C'est la détection de cette émission ou les propriétés spécifiques de leur noyau qui confèrent aux isotopes tout leur intérêt.

Les organismes vivants étant constitués majoritairement d'atomes légers, C, N, O, H, S, P, ce sont certains isotopes de ces atomes qui vont jouer un rôle prédominant dans l'exploration des processus propres aux être vivants. A ces atomes constitutifs des molécules organiques s'ajoutent les ions Cl^- , PO_4^{--} , Na^+ , K^+ , Ca^{++} et quelques autres si importants dans l'équilibre et l'économie cellulaire.

C'est la découverte de la radioactivité artificielle par F. et I. JOLIOT-CURIE qui est l'évènement majeur de la récente histoire de la biologie, parce qu'était établie la possibilité de préparer des isotopes radioactifs. D'ailleurs F. JOLIOT obtenait dès 1942 au Collège de France, avec P. SUE, J. HOREAU et R. COURRIER de la diiodotyrosine marquée par l'iode ^{128}I . Mais les accélérateurs de particules ne sont pas aussi commodes d'utilisation que les flux de neutrons, comme le démontrait FERMI à la même époque, pour la préparation des radioéléments artificiels. La construction des réacteurs nucléaires allait transformer la situation en permettant d'obtenir les quantités d'isotopes nécessaires au développement prodigieux de leur utilisation.

En 1952, F. PERRIN, Haut-Commissaire, confie la création du Service de Biologie à J. COURSAGET qui s'installe au fort de Chatillon, à côté de la "pile" ZOE. L'objectif est d'explorer le fonctionnement cellulaire à l'aide d'isotopes, d'en définir à cette occasion les diverses manières de s'en servir, d'aider à la construction d'appareils de mesure et de contrôle, de contribuer enfin à préciser les techniques de confinement. Les très rapides progrès réalisés ont donné au Service de Biologie devenu Département en s'installant à Saclay, un rôle de pilote où venaient se former ceux qui en France voulaient, à leur tour, utiliser pour leurs recherches des isotopes radioactifs. D'ailleurs, ce thème faisait aussi l'objet d'un enseignement organisé par E. GRINBERG et très suivi.

Quelques étapes marquent cette route qui allait conduire aux connaissances actuelles dont l'acquisition, grâce aux isotopes, a connu une accélération in-imaginable il y a 50 ans.

METABOLISME INTERMEDIAIRE :

Au CEA, les premiers pas vers l'utilisation d'isotopes, ont servi à explorer, chez les oiseaux, le métabolisme du soufre, et ce en raison de sa probable fragilité dans un organisme irradié.

Si l'on introduit des traces de $^{35}\text{SO}_4$ dans un embryon de poule, on peut mettre en évidence après quelques minutes, des acides aminés soufrés marqués. Ces composés, séparés par électrophorèse ou par chromatographie sur papier, étaient repérés, et l'ont été pendant longtemps encore, par le noircissement d'un film photographique. Cette visualisation par autoradiographie couplée avec les séparations sur couches minces s'est avérée d'une puissance analytique et d'une versatilité extrême. L'identification des étapes du métabolisme, la mise en évidence de la taurine, acide aminoéthanesulfonique, dans tous les tissus importants, et sa fuite de cette substance hors des cellules animales dès qu'elles souffrent, sont parmi les résultats acquis. Mais plus important fut la démonstration qu'avec des molécules marquées on peut analyser les processus cellulaires sans perturber leurs équilibres naturels, en raison des très petites quantités introduites. Des conclusions semblables étaient tirées dans quelques laboratoires aux Etats Unis et en Angleterre. La conséquence fut un vif intérêt pour le destin des molécules présentes dans l'organisme.

Heureusement, sous l'impulsion de J. GUERON, L. PICHAT développait dès 1948 des procédés de synthèse applicables à la mise en oeuvre du $^{14}\text{CO}_2$. Il put, l'un des tout premier, offrir à la communauté scientifique, des molécules marquées par ^{14}C , dans un état de pureté exceptionnel. Dès lors, les expériences se multiplient pour connaître le devenir des constituants essentiels de la cellule, les sucres, les acides aminés, les acides gras, mis en présence de tissus d'une grande variété d'organismes :

Les expérimentateurs ont ainsi pu suivre le chemin de chaque atome de carbone d'une molécule complexe vers des molécules plus simples, comparer les tissus les uns aux autres, et observer aussi comment une molécule complexe se construit, atome par atome.

C'est tout le métabolisme cellulaire qui s'est trouvé ainsi élucidé, dans ses grandes lignes, en quelques années, avec pour conclusions majeures, l'extrême similitude de comportement de tissus d'origines différentes, d'une part, la simplicité des molécules de bases utilisées pour l'édification de structures complexes, de l'autre.

Une molécule singulière est le CO_2 . Comment les végétaux verts transforment-ils à la lumière, le CO_2 en amidon par exemple ? Le laboratoire de photosynthèse de Département de Biologie a apporté une contribution notable à la fois en pistant le ^{14}C dans les constituants de la plante et en réduisant le temps d'exposition à la lumière. Développant ensuite des méthodes spectroscopiques fines, liées à la fluorescence de la chlorophylle, le laboratoire a acquis dans la connaissance des

molécules impliquées dans la réduction du CO_2 , une position flatteuse.

BIOSYNTHESES DES MACROMOLECULES.

F. CRICK et J. WATSON avaient décrit, en 1953 la structure de l'ADN comme une double hélice, stabilisée, entre autres, par la complémentarité des bases constitutives, en pensant à deux propriétés importantes de la molécule : Diriger sa propre reproduction, et servir à l'expression des caractères spécifiques de l'organisme. Immédiatement s'est posée la question "Comment" et l'une des premières réponses concerne la répliation de l'ADN.

MESELSON et STAHL cultivent *E. coli* dans un milieu contenant un sel d'ammonium marqué par ^{15}N pendant plusieurs générations, puis remplacent ^{15}N par ^{14}N . Ils examinent la densité de l'ADN au temps 0 puis après une puis deux générations, par centrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium. La densité des molécules d'ADN de première génération correspondant à un hybride, association d'un brin "lourd" et d'un brin "léger". Parmi les molécules de la deuxième génération, la moitié possédait la densité d'un hybride, l'autre moitié était "légère". Un tel résultat d'une extrême élégance, montrait que chaque brin de l'ADN était répliqué, que chaque cellule fille disposait d'un brin maternel et d'un brin néosynthétisé.

Est-il possible de reproduire cette répliation in vitro, d'isoler les catalyseurs qui en sont responsables, comme aussi les facteurs de régulation ? Dans le même contexte, comment s'exprime l'information génétique présente dans l'ADN et comment le cellule s'en sert elle ?

Pour aborder expérimentalement l'étude de ces questions, il fallait des outils nouveaux permettant de détecter et de mesurer la concentration d'extrêmement petites quantités de polynucléotides et de polypeptides. En un mot, c'est de l'ensemble des monomères marqués dont il fallait disposer, et ce, avec la plus haute radioactivité possible.

Le Département de Biologie, au CEA, pour pouvoir poursuivre ses travaux, entreprit de cultiver en 1958, une algue unicellulaire verte, la chlorelle, et ensuite une algue bleue, la spirulline, à la lumière et dans une atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$ pur. Tout le carbone de la matière organique produite est alors constitué de ^{14}C . Ensuite, on hydrolyse protéines et acides nucléiques et en sépare les monomères. Tous les carbones se trouvaient ainsi marqués par ^{14}C , et les acides aminés par surcroît conservaient leur activité optique naturelle. Le CEA n'était pas seul dans cet effort.

A Amersham, les laboratoires de l'AEC, et à Boston, la New England Nuclear Corp. se lancaient dans la même aventure, préparer acides aminés et nucléosides triphosphates marqués par le ^{14}C . Ils ont aussi entrepris la préparation de nucléosides triphosphates marqués par ^{32}P , voie dans laquelle le CEA n'a pas persévéré.

Les biochimistes ont commencé leurs travaux, d'abord aux Etats Unis où M. GRUNBERG-MANAGO et S. OCHOA découvraient en 1955, la polynucléotide phosphorylase, un enzyme capable de synthétiser un segment d'ARN dont la séquence reflète la composition en nucléotides du milieu. On pouvait ainsi rechercher les conditions permettant d'obtenir, puis d'orienter la synthèse d'un polymère d'acides aminés. C'était le début d'une grande aventure, qui allait conduire à définir le code génétique, à isoler les ARN de transfert, et à découvrir les modalités de la biosynthèse des protéines. Rentrée à Paris, M. GRUNBERG-MANAGO développait un vigoureux laboratoire à L'Institut de Biologie Physico-Chimique, et stimulait bien des groupes à l'Institut Pasteur, et ailleurs.

La transcription de l'ADN en ARN, la première étape de l'expression du message génétique sous forme d'un ARN "Messenger" connaissait un essor parallèle, et bientôt on mettait en évidence les enzymes responsables et en étudiait les propriétés dans les bactéries et certains virus.

Le CEA apportait sa contribution à ces études à la fois par les molécules marquées préparées et par ses propres recherches. On a dit plus haut que l'embryon de poule possède des capacités métaboliques différentes de celles de l'adulte, comme si le fait de quitter l'autarcie de la vie dans une coquille provoquait l'abandon de propriétés devenues inutiles. C'était un exemple bien net de l'expression contrôlée de certains gènes, chez l'animal, et une incitation à une étude approfondie. Malgré l'affirmation d'un célèbre collègue que "ce qui est vrai pour E. coli est vrai pour l'éléphant", nous nous sommes attachés à l'examen de la transcription chez les levures, cellules modèles des cellules animales, et auxquelles s'applique la génétique expérimentale. A. SENTENAC isole ainsi, l'un des tout premiers, la machinerie qui assure la transcription de l'ADN, sous une forme hautement purifiée. Cette machinerie, énorme, constituée de 10 à 12 protéines distinctes fonctionne in vitro. Quel est le rôle des sous-unités, où se trouvent les éléments de contrôle, comment s'établit la spécificité de la transcription et son intensité, sont des questions qui trouvent peu à peu une solution, à Saclay, à Strasbourg chez P. CHAMBON, et dans quelques autres laboratoires, qui tous se connaissent et coopèrent.

Les nucléotides marqués servent désormais, non seulement à mesurer la biosynthèse d'ARN mais aussi à en étudier la spécificité en faisant appel à l'hybridation du segment synthétisé avec un segment informatif de l'ADN. En un mot, ce sont des outils quantitatifs et qualitatifs.

Les données récoltées sont immenses et conduisent aujourd'hui à construire des ADN particuliers, à insérer dans un ADN naturel des données nouvelles et même à prévoir la régulation de l'expression de certains gènes. Une thérapeutique du noyau de la cellule malade est en train de naître.

Dans l'immédiat, on se rend compte que l'on vient de réunir les connaissances nécessaires à une modification raisonnée de protéines importantes, voire à la création de protéines nou-

velles, adaptées à un but particulier. Le CEA se fondant sur l'expérience acquise, et conscient des enjeux en cause, crée en 1989 une unité d'ingénierie des protéines.

L'INGENIERIE DES PROTEINES

Pour tirer le meilleur d'une modification de la séquence d'une protéine, il faut pouvoir établir un parallèle entre les propriétés acquises, ou perdues, et les altérations structurales associées. C'est dire tout le rôle accordé aux études de RMN et à la diffraction des rayons X, si l'on a pu cristalliser l'objet des recherches. La mise en oeuvre d'isotopes dont le noyau possède un spin tel que ^{13}C ou ^{15}N ouvre des perspectives nouvelles dans les études des structures par RMN, mais suppose la capacité de marquer par biosynthèse, tel ou tel carbone, tel ou tel azote, sinon tous, des protéines étudiées. On voit ainsi se préciser une notion récente et essentielle, l'interdépendance des techniques biologiques et physiques. C'est A. MENEZ qui pilote ce secteur de recherches dont le développement remarquable s'appuie sur la maîtrise de la biologie moléculaire, sur celle de la préparation d'acides aminés enrichis en ^{13}C , et sur la RMN.

LES REGULATIONS HORMONALES

Alors que l'on caractérisait, au CEA et ailleurs, à l'échelle moléculaire, des enzymes nouveaux catalysant des processus fondamentaux, apparaissait aussi le souci d'une intégration à l'organisme entier des connaissances nouvellement acquises. Comment mettre en évidence les cibles cellulaires et moléculaires des facteurs de régulation que sont les hormones. Là aussi l'impératif catégorique est la détection à un niveau de concentration extrêmement petit, des substances organiques que sont les hormones. C'est le tritium, isotope radioactif de l'hydrogène, qui allait apporter la solution. Le laboratoire de L. PICHAT et le Département de Biologie développaient des méthodes efficaces pour marquer par le tritium les hormones stéroïdes et les hormones polypeptidiques, respectivement. On pouvait désormais espérer voir le site d'action d'un agent de régulation et même en entreprendre la caractérisation et l'isolement. En effet profitant de l'affinité de l'hormone pour sa cible, on pouvait isoler le complexe hormone-cible, se fondant sur le marquage de l'hormone. C'est ainsi qu'est née l'endocrinologie moléculaire.

La plupart des hormones étudiées dans le monde entre 1970 et 1990 l'ont été avec l'aide des biochimistes de Saclay, les toutes premières étant l'ocytocine en liaison avec F. MOREL, de Collège de France, l'angiotensine avec PH. MEYER à l'hôpital Necker. La première démonstration que certaines hormones polypeptidiques franchissent la barrière cellulaire et pénètrent dans le noyau de la cellule cible a été apportée aussi au Collège de France, par Madame R. TIXIER-VIDAL avec le TRH, hormone de libération de l'hormone thyroïdienne, particulièrement enrichie en tritium, soit 4 atomes par molécule.

Le succès des méthodes développées par le Département de Biologie tenait à son expérience dans le domaine de la biochimie des peptides et des protéines associée à des conditions exceptionnellement bonnes de travail dans les laboratoires "chauds".

Bien d'autres aspects de la physiologie et de la pathologie cellulaires n'ont pu être élucidés que parce que les molécules ou les ions impliqués ont été obtenus sous une forme radioactive. On en trouvera ailleurs une description comme aussi une évocation des méthodes analytiques si puissantes et automatisables utilisées dans les hôpitaux.

CONCLUSION

Si ce qui a été acquis au cours de ces 50 dernières années en Biologie, est d'une ampleur et d'une importance qui soulève l'admiration de tous les observateurs, il est clair que c'est aux isotopes, radioactifs le plus souvent, que nous le devons. C'est bien ce qu'avaient prévu et souhaité F. JOLIOT-CURIE et F. PERRIN. Les défis, demain, ne sont pas moins importants, bien au contraire, les domaines à explorer plus larges et plus fascinants encore. Les recherches de demain devront utiliser des isotopes dans des conditions plus spécifiques, plus exactement adaptées aux systèmes étudiés. Il est intéressant d'observer que les préparations de molécules marquées mettent de plus en plus souvent en oeuvre des concepts voisins de ceux pour lesquels elles sont des outils d'étude, conduisant à une intégration des efforts, intégration qui modèle le nouveau visage de la recherche biologique, toujours davantage empreint de physico-chimie et de logique.

* Chef du Service de Biochimie du Département de Biologie.