

Étude du renouvellement moléculaire et cellulaire au moyen des indicateurs nucléaires

par P. FALLOT et M. LAINÉ-BÖSZÖRMÉNYI,
Département de Biologie C.E.A. C.E.N. Saclay.
91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

INTRODUCTION.

Les récentes recherches inspirées par le concept de renouvellement ont profondément modifié notre compréhension des processus biologiques.

Cette notion, longtemps demeurée d'essence philosophique, apparaît déjà dans la cosmogonie hindoue avec Brâhma, le constructeur suprême, Vishnou, le conservateur de l'état stationnaire, et Çiva-Bhairava, le destructeur. Au 6^e siècle avant notre ère, le Bouddha exprima l'idée que le corps humain est constamment détruit et recréé par la dissociation et l'association d'agrégats (Panchaskandha). Contemporain du Bouddha, Héraclite d'Ephèse affirme que seule la « juste proportion » des échanges assure la pérennité de l'Ordre, contrairement à Parménide, partisan de l'immutabilité de l'Être.

Au début de notre ère, Tertullien soutient contre Hermégène l'idée que si la matière est éternelle, elle est immuable, inconvertible et incapable de tout changement. Au 13^e siècle, saint Thomas d'Aquin admet que le maintien de l'identité du corps ne dépend en aucune manière de la persistance de ces particules matérielles.

Lors du développement de la biologie expérimentale, Magendie défend contre l'école allemande la thèse du renouvellement. Il faut cependant attendre la fin du 19^e siècle pour que Bizzozero apporte la première démonstration du renouvellement cellulaire en distinguant les cellules labiles dont les durées de vie s'échelonnent de quelques heures à quelques mois (épithéliums), les cellules stables qui ne se renouvellent qu'en cas d'agression (hépatocytes) et les cellules permanentes qui subsistent aussi longtemps que l'organisme lui-même (neurones).

C'est la méthode des indicateurs nucléaires, imaginée en 1913 par G. DE HEVESY et P. PANETH qui permit d'asseoir définitivement

ce concept de renouvellement en le généralisant aux ions et aux molécules.

Dans son travail biologique princeps, sur la translocation du plomb dans les plantes (1923), HEVESY place des racines d'une variété de fève dans une solution contenant un sel de plomb marqué par l'un de ses radio-isotopes naturels, le thorium B, et suit la pénétration de la radioactivité dans la plante. Cette dernière, transférée ensuite dans une solution du même sel de plomb non radioactif, voit sa radioactivité diminuer au profit de la solution initialement inactive.

La deuxième contribution essentielle (1934) du même auteur est relative aux échanges d'eau dans l'organisme humain après administration d'eau légèrement enrichie en deutérium (^2_1H), isotope stable de l'hydrogène, découvert par H.-C. UREY en 1931. Cette expérience montre que l'indicateur HDO diffuse en une heure dans la totalité du volume d'eau et disparaît selon une loi exponentielle.

C'était la réponse à une question du physicien MOSELEY qui souhaitait, dès 1914, sans trop y croire, la découverte d'un marqueur de l'hydrogène (ou de l'oxygène) pour savoir quel était le devenir de l'eau de sa tasse de thé : simple passage ou distribution dans l'organisme.

Au cours d'une même série d'expériences, HEVESY confirme ainsi la notion de renouvellement, montre qu'elle s'applique aux échanges moléculaires, détermine leur vitesse et décrit le principe de la mesure des volumes et des masses par dilution isotopique.

R. SCHOENHEIMER et D. RITTENBERG, tout en découvrant les voies métaboliques capitales, montrent enfin que le renouvellement moléculaire avec maintien d'un état stationnaire provient non seulement d'échanges mais aussi de processus de dégradation suivis de resynthèse des macromolécules.

Les recherches biologiques fondées sur l'emploi des radio-isotopes artificiels (tritium, carbone-14, phosphore-32, iode-131) devenues possibles à la suite de la découverte de Frédéric JOLIOU et d'Irène CURIE, apportèrent la confirmation définitive du concept de renouvellement moléculaire et cellulaire.

Il s'agit là d'une des acquisitions les plus marquantes de la méthode des isotopes. L'apparente stabilité des constituants des organismes résulte en fait d'échanges, de synthèses et de dégradations exactement compensés. Ainsi, la classique distinction entre constituants structuraux et fonctionnels ne peut plus être soutenue. Toutes les espèces moléculaires identiques se

mélangent et subissent une évolution au hasard quelle que soit leur origine.

Le concept de renouvellement peut être envisagé sous différents aspects : répétition, remplacement, régénération, restauration. Tous ces processus appartiennent à ce que l'on est convenu de désigner sous le terme de cinétique moléculaire et de cinétique des populations de cellules.

Nous nous limitons, dans cet exposé, à quelques cas relativement simples où les organismes se trouvent dans un état stationnaire quand les flux d'entrée et de sortie de molécules ou de cellules sont égaux comme dans le cas des organismes adultes non pathologiques.

I. RENOUELEMENT MOLECULAIRE.

Nous envisagerons successivement le renouvellement moléculaire par échange à travers les membranes ou par transport à distance, et celui qui résulte du métabolisme des molécules. Les échanges intéressent surtout les ions et les petites molécules. Les transformations chimiques concernent les molécules de masse importante.

La vitesse de renouvellement d'un système en état stationnaire est définie soit par le nombre de molécules (mt^{-1}), soit par la fraction (t^{-1}) de l'ensemble moléculaire renouvelé par unité de temps. Elle est mesurée par la variation de la concentration isotopique au sein du système. Pour les molécules porteuses d'atomes enrichis en isotopes stables naturels (azote-15, carbone-13, deutérium) cette concentration s'exprime par le rapport de l'abondance isotopique (en excès par rapport à l'abondance naturelle) à l'ensemble des atomes homologues, marqués ou non marqués, de la molécule considérée. La définition précise de la radioactivité spécifique est le rapport des atomes radioactifs à l'ensemble des atomes homologues. Mais, en pratique, on établit le rapport de la radioactivité à la masse moléculaire, voire à la masse de substance ou au volume de liquide du milieu.

L'interprétation des variations de la concentration isotopique ou de la radioactivité spécifique est différente selon le modèle choisi.

La méthode stochastique suppose inconnue la configuration interne du système en équilibre qui est considéré comme une boîte noire à travers laquelle on détermine, à l'aide d'un indicateur nucléaire, le temps moyen de transit et le flux sortant. L'indicateur I est introduit instantanément dans le système et l'on mesure à la sortie sa concentration isotopique en fonction du temps. Lorsque la courbe ainsi établie (fig. 1) est voisine de zéro,

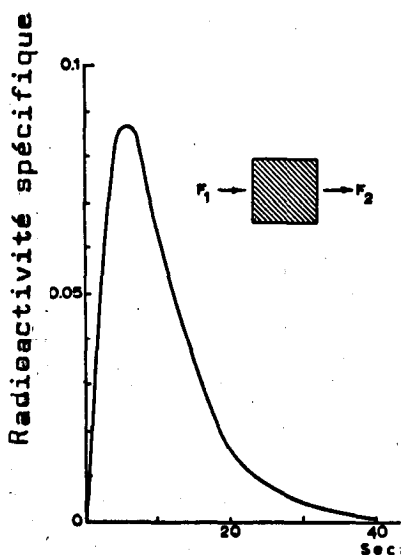


Fig. 1

on calcule le flux sortant F_2 supposé constant et égal au flux entrant F_1 pendant la durée de l'expérience, au moyen de l'équation de STEVART-HAMILTON :

$$F_2 = \frac{I}{\int C(t) dt}$$

I étant exprimé en unités numériques (microcurie), $C(t)$ en microcurie par unité de volume. Il suffit de mesurer l'aire sous la courbe pour obtenir F_2 .

Le très grand intérêt de cette méthode stochastique réside dans le fait qu'elle permet d'étudier des phénomènes très rapides et de déduire dans un système complexe le flux total d'entrée à partir de l'étude d'un seul des flux de sortie. Malgré ses avantages certains, elle est d'un emploi beaucoup moins fréquent que celle dite des compartiments. Cette dernière fait appel à des modèles concrets dont le choix dépend des hypothèses biologiques sur la configuration du système étudié.

Sous le nom de compartiment, on désigne une entité anatomique limitée par une membrane et dont la composition est supposée homogène dans le volume qui lui est attribué : le plasma, les globules rouges, la population cellulaire d'un organe, l'orga-

nisme entier représentant autant de compartiments. Le terme de réservoir (« pool ») définit la masse totale des molécules organiques ou inorganiques d'une espèce donnée, sans que soit précisée leur localisation anatomique. En fait, les deux notions peuvent s'imbriquer : il existe plusieurs « pools » dans un compartiment, un même « pool » peut être distribué entre plusieurs compartiments. On peut ainsi étudier le « pool » du cholestérol dans les seuls globules rouges. A partir de ces données, on construit des systèmes représentés par des compartiments disposés en série ou en parallèle ou selon toute autre organisation spatiale et l'on cherche à déterminer, par la mesure et le calcul, les flux d'échanges ou de transformations qui s'effectuent entre tous les compartiments du système imaginé. Une contrainte supplémentaire résultant de cette méthode est que l'on doit supposer instantanée la distribution de l'indicateur dans le compartiment, ce qui n'est pas toujours réalisé.

A titre d'exemple, considérons le cas le plus simple d'un organisme entier en état stationnaire, représentant un compartiment unique, ouvert sur l'extérieur donc sans recyclage possible de l'indicateur, dans lequel on souhaite étudier le renouvellement

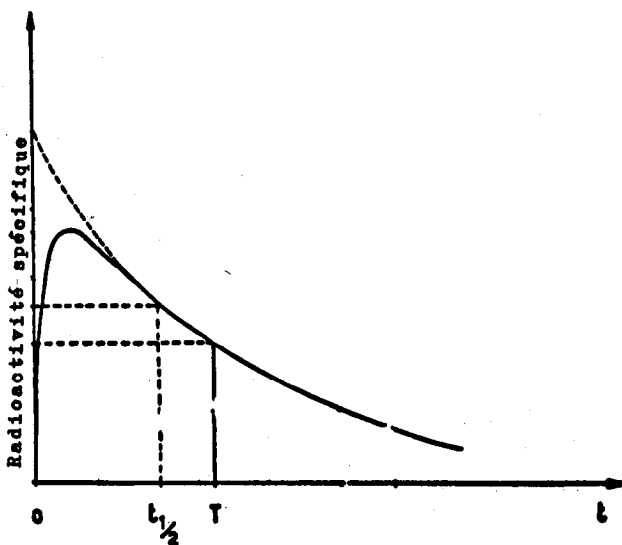


Fig. 2. — Courbe schématique en coordonnées cartésiennes de la variation de radioactivité spécifique (r) en fonction du temps de l'eau tritiée administrée à t_0 et mesurée chaque jour. La demi-vie $t_{1/2}$ est de 9 jours, la constante de renouvellement est de $0,077 \text{ j}^{-1}$ et le temps de renouvellement de 13 jours.

d'une seule espèce moléculaire. Après administration instantanée de la molécule marquée, on observe une décroissance exponentielle de la radioactivité spécifique en fonction du temps, ce qui traduit une élimination au hasard des molécules marquées et non marquées (fig. 2). On applique la relation suivante : $x = x_0 e^{-kt}$ où x_0 et x représentent respectivement la radioactivité spécifique aux temps 0 et t :

la vitesse de renouvellement :

$$k = \frac{\ln x_0/x}{t},$$

la demi-vie :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k},$$

et le temps de renouvellement :

$$T = \frac{t_{1/2}}{\ln 2}.$$

T correspond au temps nécessaire pour que la quantité de substances apparaissant et disparaissant dans un système en état stationnaire soit égale à la quantité de substances présente dans le système. La probabilité pour qu'une molécule soit renouvelée pendant ce temps est de 0,63.

Si l'on change l'échelle des temps (fig. 3), on constate, que pendant la première heure, la courbe ne représente plus une fonction exponentielle, elle peut être décomposée en plusieurs termes dont chacun représente un compartiment de distribution. Leurs pentes en coordonnées semi-logarithmiques permettent de calculer les vitesses de renouvellement, l'extrapolation à t_0 d'apprécier le volume du compartiment correspondant par le principe de dilution isotopique. La relation qui définit cette courbe correspond à une somme de fonctions exponentielles :

Radioactivité spécifique (RS) = $x = C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t} + C_0$; on atteint un pseudo-équilibre à l'échelle de temps considérée (60 minutes). En fait, la décroissance exponentielle se poursuit avec une période de 9 jours (fig. 2).

Si l'on a affaire à plusieurs compartiments et à plusieurs populations moléculaires, on doit établir des systèmes d'équations différentielles linéaires à coefficients constants. Ni les constantes exponentielles, ni les coefficients des termes de ces équations ne sont immédiatement interprétables comme dans les cas simples exposés précédemment.

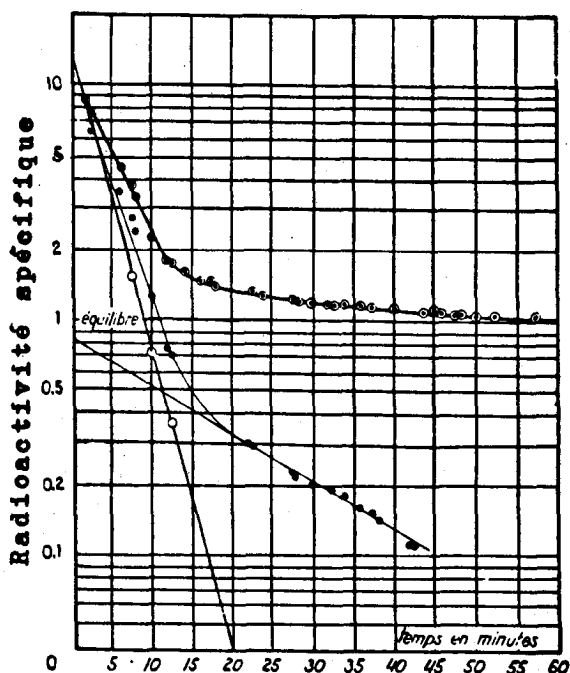


Fig. 3. — Décomposition graphique de la courbe d'évolution en fonction du temps de la radioactivité spécifique de l'eau tritiée.

Nous avons vu que les êtres vivants se trouvent dans un état stationnaire qui résulte de la synthèse et de la dégradation de presque tous les constituants structuraux ou fonctionnels de l'organisme, et pas seulement des échanges de molécules que nous venons de décrire. Les molécules synthétisées à partir de précurseurs simples sont constamment dégradées. Les relations mathématiques qui décrivent ces processus sont souvent compliquées, nous prendrons l'exemple simple d'une relation qui unit un précurseur métabolique A à son descendant B. Soit k la fraction de B renouvelée par unité de temps, x la radioactivité spécifique (RS) de B et $f(t)$ la RS de A.

$$\frac{dx}{dt} = kf(t) - kx, \text{ puisque l'on est en état stationnaire,}$$

$k = \frac{dx/dt}{f(t) - x}$ le numérateur mesure la pente de la RS en fonction du temps, le dénominateur est la différence à un temps

quelconque entre la RS du précurseur A et celle de B. On montre que le temps de renouvellement $1/k$ peut être obtenu en mesurant l'aire définie entre les courbes de la RS de t_1 à t_2 et en divisant par m qui représente l'incrément de la RS de B. Cette relation est très générale puisque $f(t)$ peut être quelconque. Il est également très important de constater sur la fig. 4 que la dérivée s'annule quand la différence entre les radioactivités spécifiques est elle-même nulle; c'est le meilleur critère pour démontrer que A est bien le précurseur immédiat de B.

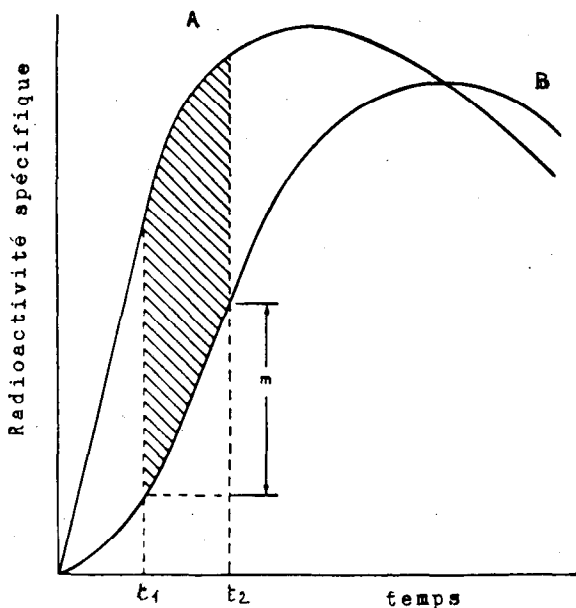


Fig. 4. — Courbe de la radioactivité spécifique en fonction du temps d'un précurseur (A) et d'un descendant (B).

Après l'intégration de l'équation précédente, on peut montrer en variant les conditions aux limites que, si la radioactivité spécifique de A est maintenue constante :

$$f(t) = x_{\infty} \quad \text{et que} \quad x = 0 \text{ à } t_0$$

on obtient une courbe de croissance de la forme :

$$x = x_{\infty} (1 - e^{-kt}).$$

Si l'administration de l'indicateur est interrompue brusquement (blocage métabolique entre A et B) on observe la décroissance classique de la radioactivité spécifique :

$$x = x_0 e^{-kt} \text{ (fig. 5).}$$

Quelques exemples classiques illustrent ces considérations théoriques : R. SCHOENHEIMER et D. RITTENBERG ont montré que les

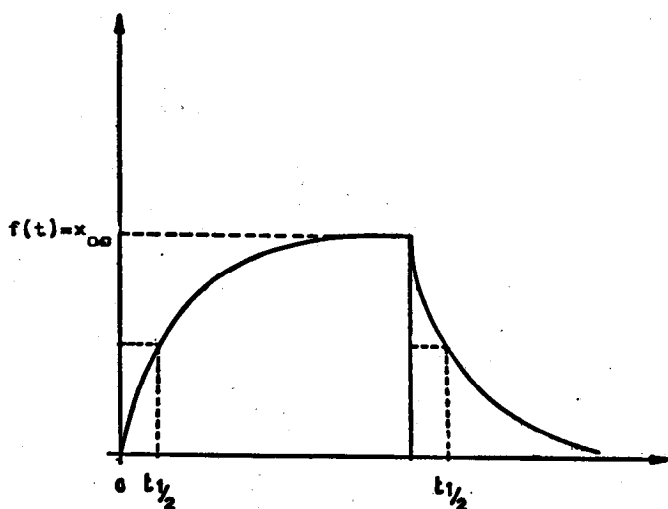


Fig. 5. — On administre dans un premier temps un précurseur marqué à radioactivité spécifique constante $f(t) = x_{\infty}$ jusqu'à ce que l'équilibre de la radioactivité spécifique du descendant soit atteint. On arrête brusquement l'administration de l'indicateur et on observe la décroissance exponentielle de la radioactivité spécifique du descendant.

protéines étaient synthétisées à partir de précurseurs simples : les acides aminés et qu'elles étaient ensuite dégradées par rupture des liaisons peptidiques. Ces produits de dégradation se retrouvent avec des substances identiques d'origine alimentaire dans un « pool » métabolique. Ces ensembles ont la même probabilité de transformation, de conversion et de transport ; certains donnent lieu à de nouvelles synthèses de macromolécules analogues à celles dont elles étaient issues, d'autres donnent nais-

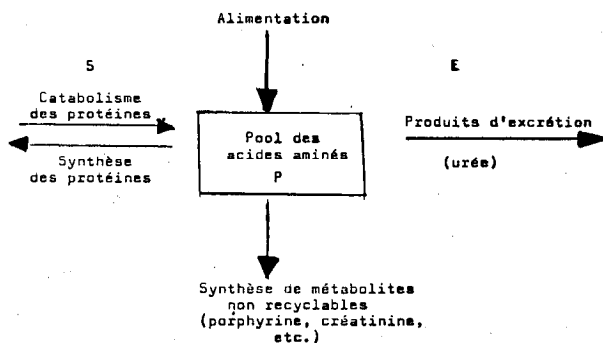


Fig. 6

sance à des molécules de grande importance : porphyrine, créatinine qui sortent du « pool » sans être recyclées. Enfin, les dernières sont excrétées directement ou après transformation (cycle de l'urée) (fig. 6).

Lorsque le système n'est pas en état stationnaire (croissance ou involution), le renouvellement persiste mais pour en mesurer la vitesse, on doit introduire des données expérimentales plus nombreuses et des calculs plus complexes.

Un bilan complet du renouvellement du cholestérol a été établi par F. CHEVALLIER qui a mesuré les contributions respectives des ingestions, synthèses, transports, échanges, conversions, sécrétions et excrétions du cholestérol au moyen de précurseurs simples et de double marquage par le carbone-14 et le tritium du cholestérol. L'intérêt de telles recherches réside dans la possibilité offerte aux pharmacologistes d'étudier des molécules capables d'abaisser le taux sanguin du cholestérol dont on connaît le rôle dans la pathogénie des maladies cardio-vasculaires.

II. RENOUELEMENT CELLULAIRE.

L'emploi des indicateurs nucléaires a maintenant complété celui des méthodes cytologiques, physiologiques ou immunologiques classiques qui servaient à la mesure du renouvellement.

Nous venons de voir que la plupart des molécules subissent un constant renouvellement dans les organismes vivants. Il existe au moins deux molécules dont la destinée est intimement liée à celle des cellules : l'acide désoxy-ribonucléique (ADN) des cellules en prolifération et l'hémoglobine des globules rouges incapables de se diviser. Le marquage de ces molécules est à la base des mesures isotopiques du renouvellement cellulaire.

La prolifération cellulaire est souvent assimilée à la mitose : processus de division de cellules vivantes avec maintien du même nombre de chromosomes donc de la même quantité d'ADN dans les cellules filles que dans les cellules mères. En fait, la mitose ne représente qu'un événement discret dans le cycle cellulaire complet, la durée de ce dernier (DC) est définie par le temps qui sépare deux mitoses ; il comporte plusieurs phases : G_1 , S, G_2 et M.

G_1 se situe entre la fin de la mitose et le début de S, cette période correspond à l'accumulation des matériaux nécessaires à la synthèse de l'ADN. Ce processus se déclenche dès que la cellule a reçu l'ordre de se diviser par l'un des nombreux stimuli qui assurent la régulation cellulaire dans les tissus.

S est la période de synthèse et de réplication de l'ADN nécessaire à la transmission de l'information génétique.

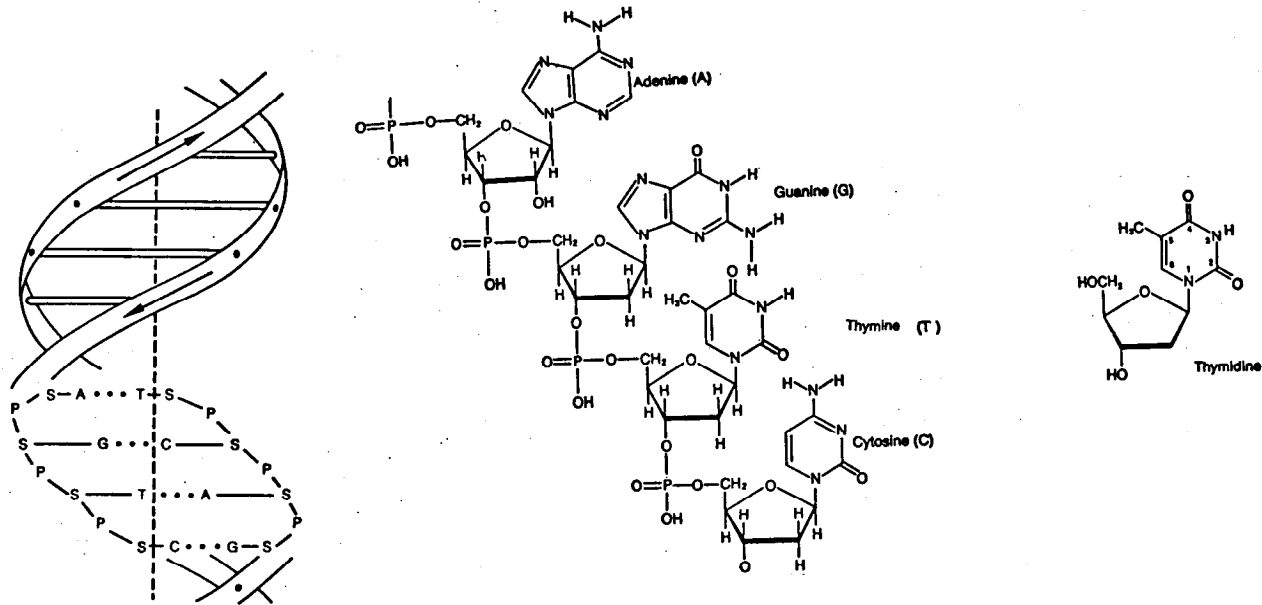


Fig. 7. — Représentation de la double hélice de l'acide désoxyribonucléique (ADN), porteur de l'information génétique.

On voit sur le schéma de gauche la disposition dans l'espace des bases A, G, T et C, respectivement appariées aux bases T, C, A et G; S est le sucre désoxyribose; P le phosphore. Le schéma du milieu montre la structure chimique de l'ensemble (A, G, T et C). C'est la thymidine, association de la thymine et du désoxyribose qui est utilisée, après marquage par le tritium, comme précurseur radioactif de l'ADN, ce qui permet la mesure du renouvellement cellulaire.

G_2 est un stade qui suit la synthèse et précède la mitose, durant cette période la teneur en ADN des cellules est doublée par rapport à celle de G_1 .

M représente les mitoses et comporte 4 stades cytologiquement définis.

Les méthodes de mesure du cycle cellulaire sont fondées sur l'observation microscopique et sur l'autoradiographie(*) des cellules en cultures ou des cellules obtenues par prélèvements de tissus ou d'organes des animaux d'expérience. Les techniques, telles que la microcinématographie et la microcytospectrophotométrie des acides nucléiques ne concernent que des cellules individuelles ; pour la mesure statistique de la prolifération, on détermine l'index mitotique, IM défini comme le rapport des cellules se trouvant à un stade quelconque de la mitose, au nombre total des cellules présentes. Il s'agit d'un paramètre essentiel de l'activité proliférante. Si la durée de la phase mitotique : DM, est connue, le nombre des mitoses par unité de temps peut en effet être calculé en divisant IM par DM. La durée de la mitose est par ailleurs égale au produit de IM par la durée du cycle DC.

On est donc amené à déterminer, outre IM, soit DM, soit DC. DM peut être obtenue au moyen du blocage du cycle que l'on stoppe au stade G_2 par les rayonnements ionisants. On mesure alors la vitesse de disparition des mitoses. Il est également possible, grâce à la colchicine, de bloquer le processus à un stade déterminé en aval de la métaphase, deuxième phase de la mitose. On mesure alors la cinétique d'accumulation des images de métaphase.

Cependant, étant donné la courte durée de la phase mitotique par rapport à celle du cycle, la précision de ces mesures est très discutable. La méthode des indicateurs nucléaires permet de déterminer directement DC et secondairement DM. Dans ce dessein, on utilise la thymidine marquée au tritium administrée *in vivo* ou dans les cultures de cellules. Ce nucléoside (fig. 7) qui résulte de l'association covalente d'une base pyrimidique : la thymine avec un sucre, le désoxyribose, est incorporé pendant la phase de synthèse S dans les chaînes d'ADN et non dans celles des autres acides nucléiques. Il s'agit donc d'un précurseur rigoureusement spécifique de l'ADN. D'autre part, le rayonnement bêta du tritium dont l'énergie moyenne est 5,7 keV possède dans les tissus un parcours moyen de l'ordre du micron. Ainsi, les autoradiographies destinées à mesurer les mitoses marquées sont très significatives. On peut en effet, sans ambiguïté, attribuer sa radioactivité à une mitose donnée.

L'injection de la thymidine tritiée, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, au temps t_0 , doit être unique et rapide. La tota-

(*) Sur l'autoradiographie, voir l'article de M. DELLAGI page 1249.

lité des cellules qui se trouvent dans la phase S — à l'exclusion de toutes les autres — vont être marquées ; le produit radioactif non utilisé pour la synthèse est immédiatement et totalement métabolisé et éliminé sans recyclage possible.

L'ensemble des cellules marquées en S va se déplacer en traversant la phase G₂ pour apparaître en M au temps t₁. On établit le rapport :

$$r = \frac{^*m}{^*m + m} \quad \text{où}$$

^{*}m est le nombre de mitoses marquées et m le nombre de mitoses non marquées.

Le temps qui s'écoule entre r = 0 (de t₀ à t₁) et r = 1 (à partir du temps t₂) correspond à DM ; r = 1 persiste aussi longtemps que dure la phase S.

Lors de la division, une des cellules filles emporte la moitié de l'ADN donc de la radioactivité et les cellules mères restent marquées avec 50 % de perte tout en gardant la même radioactivité spécifique. Elles poursuivent le cycle en traversant G₁ puis S où une nouvelle quantité de ADN est synthétisée en vue d'une deuxième réplication. La thymidine tritiée non incorporée ayant été éliminée en début d'expérience, cette synthèse de l'ADN se fera sans marquage, ainsi la radioactivité spécifique des cellules diminue de moitié à chaque nouvelle phase S. Les cellules traversent de nouveau la phase G₂ et paraissent une deuxième fois en M. Le rapport r va subir la même évolution que lors du premier passage. Le temps entre deux points homologues des deux plateaux mesure la durée du cycle cellulaire DC (fig. 8).

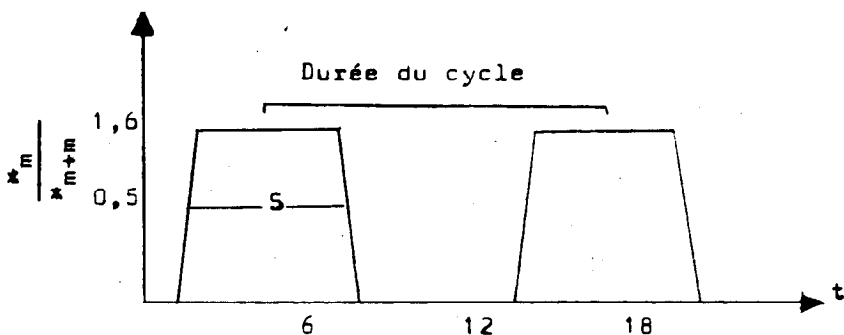


Fig. 8

L'expérience ne peut être prolongée au-delà du deuxième ou troisième plateau en raison de la diminution du rapport signal sur bruit de fond à chaque tour. (On ne doit pas augmenter la quantité de thymidine radioactive injectée afin d'éviter les effets radiobiologiques).

Nous avons vu précédemment que $DM = IM \times DC$; sachant d'autre part que le temps entre t_0 et le point où $r = 0,5$ correspond à $0,5 DM + DG_2$; DG_2 la durée de G_2 peut être calculé :

$$DG_2 = \frac{t_2 - t_1}{2} - t_0.$$

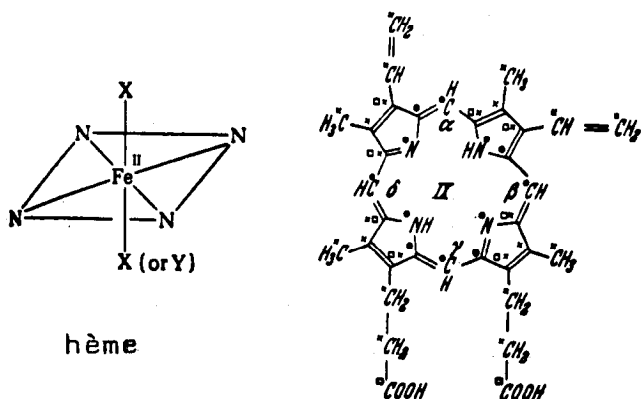
La durée du cycle DC étant connue, on obtient celle de G_1 .

Donnons, à titre d'exemple, les valeurs numériques correspondant à l'épithélium duodénal : $DG_1 = 5$ heures, $DS = 5$ heures, $DG_2 = 2$ heures, $DM = 0,7$ heure, la durée totale du cycle DC = 13 heures.

Le temps de renouvellement des cellules se confond avec la durée du cycle si toutes les cellules de la population sont impliquées dans le processus et lorsque l'on se trouve en état stationnaire, c'est-à-dire quand la prolifération compense la mort et les migrations hors cycle des cellules filles.

Ces cellules qui sortent du cycle peuvent conserver leur propriété de reproduction, d'autres se différencient tout en conservant ou en perdant cette propriété. Enfin, dans le cas particulier des globules rouges ceux-ci perdent leur noyau lorsqu'ils passent de la moelle osseuse dans la circulation, ils ne peuvent plus se reproduire et leur survie est limitée par les contraintes subies dans les vaisseaux capillaires; on parle alors de la durée de vie de ces cellules.

Le principe de la mesure de cette durée de vie repose sur le fait que la synthèse complète de l'hémoglobine s'effectue dans les érythroblastes et cesse dès que ceux-ci ont perdu leurs noyaux. Du fait de la perte associée des équipements enzymatiques nécessaires, l'hémoglobine ne subira plus aucun renouvellement moléculaire et son sort demeurera lié à celui des globules rouges. L'hémoglobine est le pigment des hématies, composée de l'hème qui résulte de l'association de la protoporphyrine avec le fer (fig. 9) dont les valences libres X ou Y sont destinées à la liaison avec la globine (copule protéique) et l'oxygène. Dans leur expérience princeps, D. SHEMIN et D. RITTENBERG ont identifié l'origine de tous les atomes carbones de la protoporphyrine synthétisée dans les érythroblastes à partir de l'acide acétique et de la glycine marqués respectivement aux carbone-13 et à l'azote-15.



- N représente ^{15}N de $^{15}\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
- C » ^{14}C de $\text{NH}_2 - ^{14}\text{CH}_2 - \text{COOH}$ glycine
- C » ^{14}C de $^{14}\text{CH}_3 - \text{COONa}$
- C » ^{14}C de $\text{CH}_3 - ^{14}\text{COONa}$ acétate de sodium

Fig. 9. — Incorporation dans la protoporphyrine de l'hémoglobine des atomes provenant de ses deux précurseurs : la glycine et l'acétate.

Après administration de cette glycine on constate, lors de prélèvements échelonnés pendant des mois, que la concentration de l'indicateur dans la protoporphyrine isolée croît, atteint un maximum puis demeure constant jusqu'à la destruction de la cellule (fig. 10). Cette lyse entraîne une brusque diminution du marquage car l'hémoglobine libérée est décomposée : la protoporphyrine est rapidement transformée en bilirubine qui est excrétée par le foie après conjugaison, la globine est détruite, de ce fait l'indicateur n'est pas recyclé. Le temps qui sépare les demi-valeurs des concentrations isotopiques obtenues quelques jours après le début et à la fin de l'expérience donne une valeur approximative de la demi-vie des hématies. Celle-ci a été précisée par les auteurs au moyen d'une équation intégrale et en apportant deux corrections : l'une tient compte du fait que l'ingestion de la glycine n'est pas instantanée (3 jours), l'autre qu'il existe une dispersion de la durée de vie des globules rouges. Celle-ci a été fixée, après ces corrections, à 127 jours en moyenne à partir de t_0 . Ainsi le marquage d'une molécule qui échappe au renouvellement permet de mesurer la durée de vie de ces cellules.

On ne peut utiliser en pratique courante la méthode que nous venons de décrire. En effet, les précurseurs, acétate ou glycine, marqués au moyen d'isotopes stables : azote-15, carbone-13, sont d'un prix élevé. D'autre part l'isolement, la purification de la

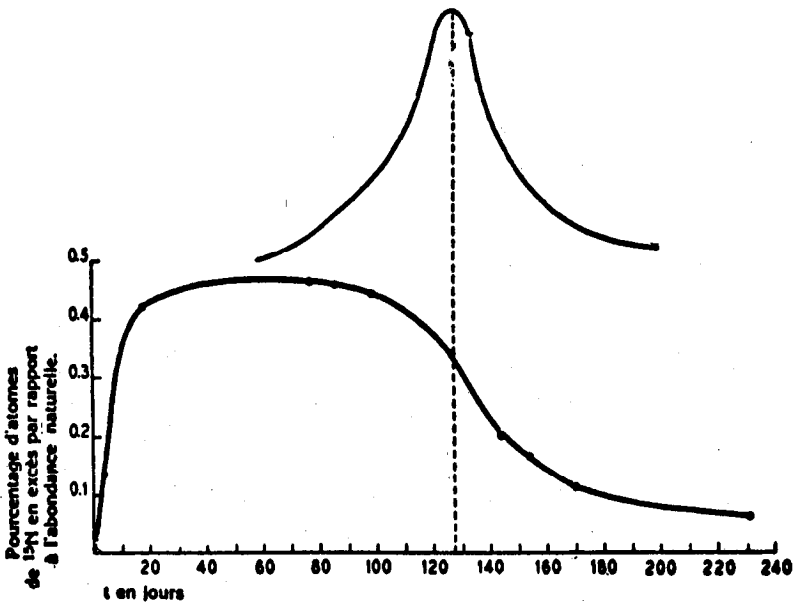


Fig. 10. — Concentration de ^{15}N incorporé dans la protoporphyrine de l'hème des hématies humaines, après ingestion de ^{15}N -glycine.

protoporphyrine, ainsi que la mesure de la concentration isotopique font appel à des techniques difficiles. Quant aux précurseurs marqués au carbone-14 radioactif, ils ne peuvent être utilisés chez l'homme en raison de la longue période de cet élément (5 730 ans).

Pour mesurer facilement la durée de vie des hématies, on procède à un prélèvement de sang suivi d'un marquage au moyen d'un métal radioactif tel que le chrome-51 (période 27,8 jours). Les hématies de tous âges présentes dans le sang sont uniformément marquées et réinjectées dans la circulation. Les plus âgées vont disparaître les premières en libérant le métal qui est éliminé. Au cours de prélèvements successifs, on voit décroître la radioactivité car les hématies jeunes non marquées entrent dans la circulation en remplacement de celles qui disparaissent en fonction de leur âge. Une relation simple permet de déterminer leur durée de vie moyenne, qui est très proche des 127 jours.

III. RENOUVELLEMENT PARTIEL.

Le renouvellement macromoléculaire, aussi bien que le renouvellement cellulaire, peuvent n'être que partiels.

Nous avons vu que l'analyse exacte du renouvellement cellulaire est fondée sur les deux postulats de la constance et de la stabilité de l'ADN porteur de l'information génétique. Il existe néanmoins des exceptions en rapport notamment avec l'activité des gènes lors de la différenciation. D'autre part, l'ADN peut subir des agressions provoquées par les rayonnements (rayons X ou U.V.) ou par certains agents chimiques mutagènes. Ces altérations portent sur la thymine qui, par dimérisation avec une molécule voisine, entraîne des modifications ponctuelles de la chaîne. Pour pallier ce dernier inconvénient, l'organisme possède des systèmes enzymatiques qui assurent l'excision de la zone altérée et son remplacement par un fragment intact. Si la thymidine-tritiée est introduite dans le milieu, au moment de ce dernier processus, elle est incorporée en dehors de la phase normale S de la synthèse de l'ADN, ce qui traduit un renouvellement partiel. Cette notion de réparation est d'autant plus importante qu'il existe des maladies caractérisées par l'absence des systèmes de réparation. Il en résulte de sérieux problèmes chez les malades cancéreux lorsque se pose la question de la radio ou de la chimiothérapie.

Le renouvellement des organismes subcellulaires — réticulum endoplasmique, mitochondrie — a été également démontré en dehors du renouvellement cellulaire global. Il s'agit d'une étude difficile car nous ne connaissons que partiellement la composition et la physiologie de ces organites. Seule, la méthode du double marquage voire celle du marquage multiple permet d'aboutir à une conclusion. L'administration simultanée et instantanée de précurseurs tels que la méthionine marquée au soufre-35 ou l'acétate marqué au carbone-14 est suivie de la mesure de la radioactivité spécifique de plusieurs constituants de l'organite : protéines solubles et insolubles, lipides et cytochromes par exemple. Si la vitesse de décroissance de tous ces constituants est identique, on peut raisonnablement admettre que l'organite est renouvelé dans son ensemble ; il est en effet peu probable que toutes ces molécules aient la même vitesse de renouvellement. Cette expérience n'est concluante que si les temps de renouvellement de l'organite et de la cellule sont très différents. Dans les cellules hépatiques du rat normal, le temps de renouvellement des mitochondries est de l'ordre de 10 jours, alors que les cellules dans lesquelles elles sont incluses ne se renouvellent qu'en cas d'agression.

CONCLUSION.

Ainsi l'apparente stabilité des êtres vivants adultes n'est que le résultat d'échanges équilibrés de matière qui aboutissent, selon des rythmes différents et des modalités diverses, au renouvellement des organismes considérés. Celui-ci peut être étudié au

niveau des structures intégrées, cellules, organes, prises globalement ou restreint à celui des molécules. Dans le premier cas, il s'effectue en fonction de l'âge de la structure, dans le deuxième, il s'agit d'un processus au hasard.

Si le renouvellement d'une population cellulaire âgée se conçoit aisément, celui d'une population moléculaire qui ne vieillit pas doit être expliqué. Le maintien de l'état stationnaire s'accompagne en effet d'une consommation d'énergie libre : les synthèses généralement endergoniques consomment plus d'énergie que les dégradations exergoniques n'en fournissent. L'intérêt biologique de cette surconsommation d'énergie peut être évalué en termes de régulation : un système en équilibre thermodynamique classique verrait cet équilibre constamment déplacé sous l'influence de perturbations minimales ; une perturbation plus importante pourrait même déclencher un déséquilibre désastreux pour la structure biologique. Au contraire, la modulation de flux continus destinés à maintenir un état stationnaire assure une stabilité beaucoup plus grande et permet une régulation plus fine. Cette hypothèse semble confirmée par les travaux de PRIGOGINE sur les systèmes thermodynamiques ouverts et les organismes à bas niveau entropique. Ce principe est maintenant utilisé par les économistes qui préfèrent raisonner en termes de flux plutôt qu'en termes de stocks, la modulation des flux permettant une rapide adaptation au marché.

Par ailleurs, la dégradation continue de macromolécules met à la disposition de l'organisme des métabolites dont l'emploi peut permettre la synthèse urgente de molécules d'intérêt vital. Le stock alimentaire de molécules organiques rapidement épuisé n'est pas toujours suffisant pour faire face à de tels besoins. On sait d'autre part que les organismes supérieurs sont incapables d'utiliser directement des matériaux inorganiques ubiquitaires tels que CO_2 , H_2O ou NH_3 . Il leur est donc nécessaire de disposer à tout moment de métabolites qui ne peuvent être trouvés que dans l'alimentation d'origine photosynthétique ou bactérienne ou qui proviennent de la dégradation de leurs propres macromolécules.

Quant aux flux incessants d'eau et d'électrolytes de part et d'autres des membranes, ils pourraient faciliter l'apport rapide vers les cellules de leurs métabolites et l'élimination accélérée de leurs déchets.

Ainsi le concept de renouvellement, maintenant étayé sur des bases expérimentales indiscutables, représente l'une des acquisitions définitives de la méthode des isotopes. Celle-ci a profondément modifié nos conceptions physiologiques et biochimiques en résolvant les nombreux problèmes que les techniques classiques avaient laissés sans solution.

BIBLIOGRAPHIE

-
- *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Biological applications of tracer elements. Vol. 13, 1948.
 - BIZZOZERO. — *An adress on the growth and regeneration of the organisms*. Brit. Med. Journal 728, 1894.
 - F. CHEVALIER. — *Biodynamique des indicateurs*. Gordon and Breach, Sciences Publishers London, N. Y., Paris, 1972.
 - G. DE HEVESY. — *Adventures in radioisotops research*. Collected papers 2. vol. Pergamon London, 1962.
 - D. RITTENBERG. — *Dynamic aspects of the metabolism of amino-acids*. Harvey Lectures, 44 : 200, 1948-49.
 - R. SCHOENHEIMER. — *The dynamic state of body constituents*. Harvard Univ. Press., 1949.
 - D. SHEMIN and D. RITTENBERG. — *The life span of the human cell*. J. Biol. Chem., 166 : 627, 1946.
 - R.-A. SHIPLEY and R.-E. CLARK. — *Tracer method for in vivo kinetics*. Ac. Press N. Y., 1972.
 - M. TUBIANA. — *La cinétique de prolifération cellulaire*. Cours I.N. S.E.R.M., Villejuif, 1971.
 - D.-B. ZILVERSMIT, C. ENTENMAN et M.-C. FISCHKE. — *Calculations of « turnover time » and « turnover rate » from experiments involving the use of labelling agents*. J. gen. physiol., 26 : 325, 1943.
-