

Instrument par excellence de la biochimie moderne et de la biologie moléculaire

LES MOLECULES MARQUEES

par Pierre FROMAGEOT,
C.E.N. de Saclay, Gif-sur-Yvette.

En bombardant de l'aluminium avec des particules émises par le polonium, Irène et Frédéric JOLIOT-CURIE observaient la formation d'un élément radioactif qui s'est avéré le ^{32}P , nouvel atome, isotope du ^{31}P naturel. La possibilité de détecter spécifiquement par son rayonnement une quantité de l'ordre de quelques fentogrammes (*) de ^{32}P dans un milieu complexe et d'en réaliser une mesure quantitative a immédiatement suggéré l'idée d'utiliser les isotopes radioactifs, pour l'exploration de leur cheminement et de celui des molécules qui les portent dans l'organisme. Une telle idée a connu un développement considérable, voire explosif, dès lors que FERMI montra que l'on pouvait plus commodément produire des isotopes radioactifs en utilisant des neutrons. Parmi les isotopes obtenus, ceux du carbone, ^{14}C , du soufre, ^{35}S , de l'hydrogène, ^3H et du phosphore, ^{32}P , ont connu un destin exceptionnel parce qu'ils correspondaient aux atomes dont sont constitués les organismes vivants.

UNE PRODIGIEUSE LOUPE GROSSISSANTE.

Dès lors qu'il devient possible de remplacer un atome d'une molécule par son isotope radioactif, et c'est une chimie nouvelle qui s'est développée à cet effet, s'ouvraient des perspectives prodigieuses fondées sur la capacité à détecter l'atome considéré et les molécules qui le portent, non seulement à des concentrations extrêmement petites, au-delà des méthodes analytiques existantes les plus élaborées, mais aussi au milieu de molécules de même nature et de même structure.

Une caractéristique importante d'une molécule marquée par remplacement par un isotope d'un de ses atomes constitutifs est son analogie presque totale de comportement, vis-à-vis de nombreux systèmes enzymatiques et de techniques analytiques, avec

(*) 1 fentogramme (fg) = 10^{-15} grammes .

celui de la même molécule non marquée. La molécule marquée trace ainsi le destin de toutes celles qui lui sont chimiquement semblables.

Ce nouvel outil a été utilisé à partir des années 1950 pour l'étude des produits de transformation des constituants cellulaires et de ceux provenant d'autres organismes et susceptibles d'être assimilés. Des équipes françaises, anglaises et américaines ont synthétisé des molécules marquées. Grâce à elles, les biochimistes ont pu détecter et identifier les transformations chimiques que produisaient des organismes entiers, des cellules isolées, des préparations acellulaires (systèmes extraits du contexte cellulaire) et, par un judicieux examen, tracer une à une les étapes des routes métaboliques conduisant des molécules complexes aux molécules les plus simples (voir encadré). Malgré l'extrême variété des structures offertes aux organismes, presque toutes sont réduites en

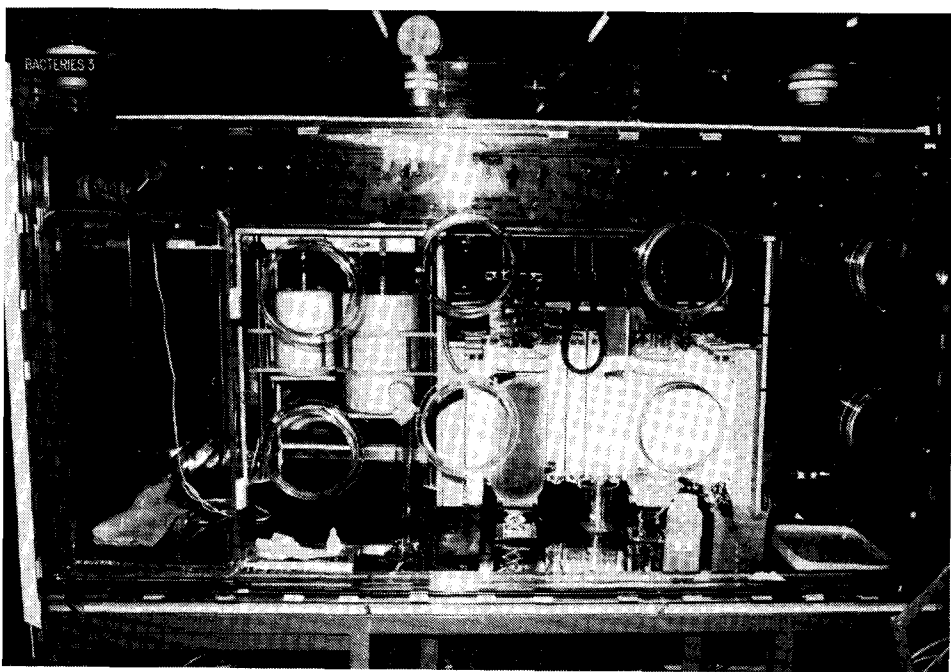


Fig. 1. — Préparation de molécules marquées par biosynthèse.

On cultive des microorganismes photosynthétiques (*Anacystis nidulans*) en présence de $^{14}\text{CO}_2$ comme seule source de carbone. Ensuite, on extrait des cellules des constituants auxquels on s'intéresse. Ceux-ci sont uniformément marqués par ^{14}C . Radioactivité spécifique : 50 curies par atome de carbone.

un nombre limité de composés très simples, les métabolites centraux, moellons des édifices propres à l'organisme.

LA CONSTRUCTION DES STRUCTURES ELABOREES : LES BIOSYNTHESES.

Se posait en termes nouveaux l'origine des constituants cellulaires, souvent de structures très complexes, et en premier lieu de leurs atomes constitutifs. Le recours au marquage des métabolites centraux fit découvrir, avec étonnement, que la construction des édifices moléculaires compliqués résultait de la succession d'étapes, chacune apportant des éléments de structure simple. En marquant un atome particulier de ces éléments, on identifia l'origine de chacun des atomes des molécules complexes.

La généralité du processus, la généralité des molécules de base utilisées par la cellule comme éléments de leurs propres édifices, la distinction sur tous les plans (mécanismes, topologie) entre réactions de synthèses et réactions de dégradations sont quelques-unes des grandes leçons apportées par la mise en œuvre de molécules marquées par des isotopes radioactifs.

DES CONSTITUANTS CELLULAIRES SIMULTANEMENT DETRUIITS ET CONSTRUITS.

Un examen des phénomènes de dégradation ou de biosynthèse, non plus sous l'angle seul de la nature des transformations chimiques mais avec la préoccupation des quantités et des cinétiques, fait apparaître l'existence d'un ensemble de molécules qui présentent à l'égard d'un événement donné, défini par l'expérimentateur, une probabilité identique de subir cet événement. Un tel ensemble de molécules constitue un réservoir métabolique. La taille de ce réservoir, la cinétique de renouvellement de ses constituants, alors même que leur masse totale est constante, sont des grandeurs accessibles seulement avec l'aide de molécules marquées. La concentration en isotope dans les molécules de même nature chimique, et ce en fonction du temps, fournit les éléments de mesure nécessaires aux paramètres cinétiques. Tout un ensemble de connaissances nouvelles sont ainsi apparues, montrant que certains constituants cellulaires sont simultanément détruits et construits, toujours par des voies différentes dont les débits ont souvent été précisés, pour une situation physiologique donnée. Ainsi se trouvait établie par l'expérience une notion traditionnelle de la philosophie antique, savoir que l'identité d'un corps ne dépendait nullement de la persistance de chacune de ses parties matérielles.

Que des molécules simples et universelles constituent les éléments de la construction des structures les plus différents et

les plus complexes implique bien des notions supplémentaires et tout d'abord que ces molécules réagissent entre elles de façon spécifique et avec des vitesses suffisantes. L'étude du métabolisme a conduit ainsi à celle des enzymes, catalyseurs biologiques, à la délinéation de leur spécificité et de leur mode d'action. En second lieu, associer des éléments entre eux, c'est créer un ordre et réduire localement l'entropie. Il fallait donc trouver d'où provenait l'énergie nécessaire et les formes chimiques qui la rendaient utilisable.

Enfin, une construction suppose un schéma dans l'espace et dans le temps comme une régulation de l'activité des catalyseurs, tant pour équilibrer les diverses voies métaboliques entre elles que pour les adapter à rétablir l'équilibre lorsque change le milieu extérieur aux cellules.

La régulation de l'intensité des flux métaboliques est assurée par des enzymes situées en général près de l'origine des voies considérées, enzymes dont l'activité est modulée par des produits finals de structure distincte de leurs substrats immédiats. Le recours aux molécules marquées a permis une très fine analyse des processus en jeu et l'identification, au niveau des structures des enzymes de régulation, de sites spécifiques dont l'occupation par des composés simples modifie l'efficacité des sites catalytiques.

L'ensemble des connaissances acquises a permis d'expliquer le mode d'action de nombreuses substances d'intérêt thérapeutique, par exemple des antibiotiques, et par-là, d'en préparer de nouvelles, mieux adaptées aux buts poursuivis.

L'INFORMATION BIOLOGIQUE DECRYPTÉE.

Le schéma directeur du métabolisme, dans sa totalité, réside dans le patrimoine génétique, l'Acide Désoxyribo-Nucléique (ADN) des chromosomes cellulaires. Une telle notion, aujourd'hui une certitude, est fondée sur une série d'expériences élégantes rendues possibles par un judicieux emploi de molécules marquées. Par exemple, Alfred HERSHEY et Martha CHASE établirent en 1952 que les informations nécessaires à la multiplication et à la construction de tous les constituants des bactériophages sont localisés exclusivement dans leur acide nucléique, et non dans leurs protéines. A cet effet, ils préparèrent un bactériophage T₂ marqué par le ³⁵S au niveau de ses protéines et par ³²P au niveau de son acide désoxyribo-nucléique, et en infectèrent des bactéries sensibles. Seul le ³²P pénétrait les bactéries, le ³⁵S, et par conséquent les protéines restant à l'extérieur. Un tel résultat évoquait la possibilité de définir ce qu'est l'information biologique en termes de molécules et allait susciter une floraison de travaux dans tous les pays.

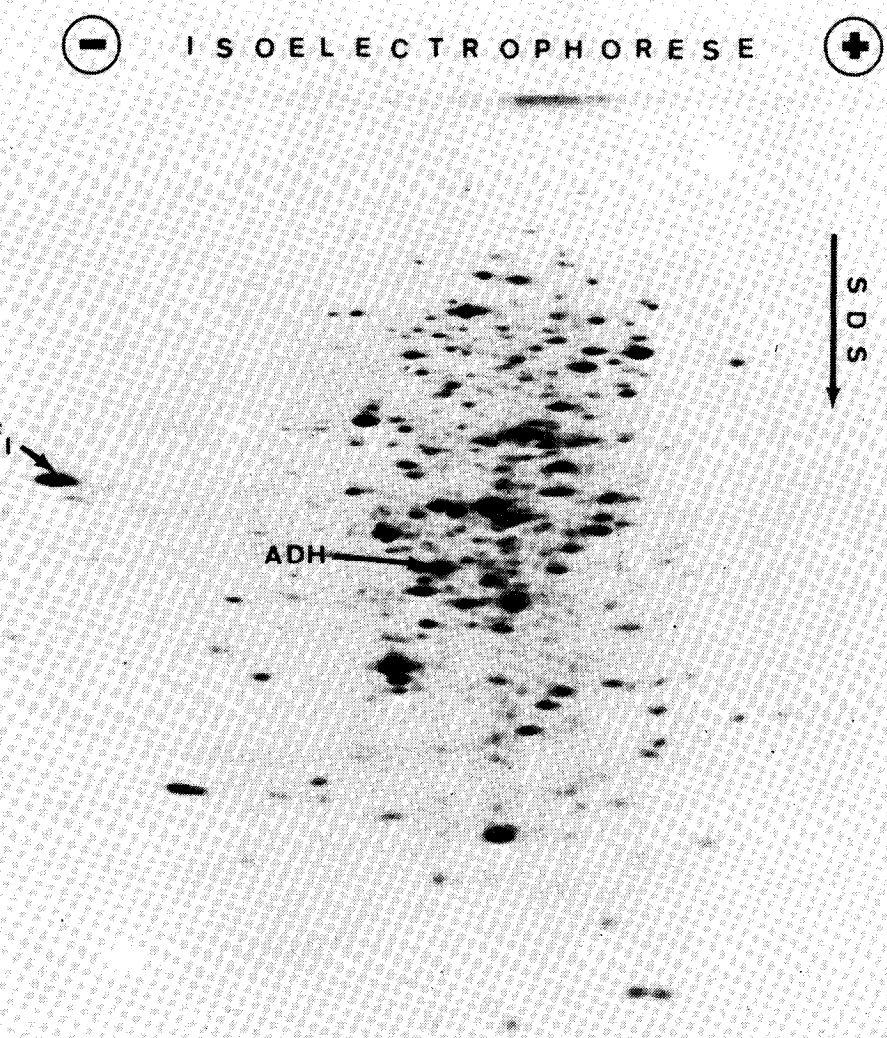


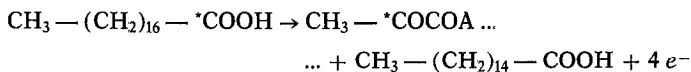
Fig. 2. — Séparation par électrophorèse bidimensionnelle des protéines totales de la levure. Les protéines ont été marquées par ^{14}C à l'aide d'acides aminés radioactifs offerts à la levure en croissance. Détection des protéines par autoradiographie. On cherchait à identifier les protéines les plus abondantes de la cellule. Les flèches indiquent l'alcool-déshydrogénase (ADH) et le facteur d'élongation de la synthèse protéique (EF_1).

Définir la structure chimique des gènes et leur organisation, reconnaître et établir le code génétique et son caractère quasi-universel, examiner les modalités d'expression des gènes et la biosynthèse des protéines, comprendre les processus de réplication des gènes représentent une œuvre immense qui s'est développée au cours de toutes les dernières années et qui n'est pas terminée. La disposition d'acides aminés radioactifs a rendu possible l'étude de la biosynthèse des protéines (fig. 2). La possibilité de marquer les nucléosides triphosphates, soit au niveau de leurs bases puriques ou pyrimidiques par le ^{14}C , le tritium ^3H ou un halogène lourd, brome ou iode, soit au niveau de l'un des groupes phosphate par le ^{32}P , a permis de détecter et de mesurer non seulement la biosynthèse des acides nucléiques mais aussi la qualité de ces biosynthèses en mettant en jeu des phénomènes d'hybridation. La caractéristique commune de ces recherches est l'extrêmement petite masse de constituants mise en œuvre, au point que la radioactivité disponible est fréquemment un facteur limitant de l'expérimentation. Le développement des études de biologie moléculaire s'est ainsi accompagné d'un développement parallèle de la préparation de molécules marquées dont les radioactivités spécifiques se sont élevées et tendent vers les limites théoriques.

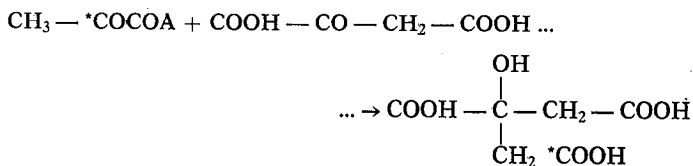
Les récents progrès dans les synthèses et les jonctions de segments d'acides nucléiques, dans leurs transferts dans les cellules hôtes capables de les multiplier sont à la base du génie génétique dont les promesses comme outil d'investigation et de production sont prodigieusement exaltantes. Le socle de cet avenir a été et demeure la préparation de molécules marquées par des isotopes radioactifs dont la découverte est la plus belle contribution de la physique nucléaire à la biologie.

SIMPLIFICATION STRUCTURALE : LA PREPARATON DES MOELLONS

Examinons le métabolisme des acides gras chez l'animal. On marque par ^{14}C le carboxyle du stéréate. On constate que ce stéréate pénètre dans les mitochondries du foie et qu'en sont détachés les deux derniers carbones sous forme de l'acétylthioester du coenzyme A, avec formation de palmitate.



En marquant le carboxyle du palmitate, on constate que la même scission se reproduit et ce jusqu'à ce que, deux par deux, tous les atomes de l'acide gras soient transformés en acétyl COA. Cette molécule est l'un des métabolites centraux, moellon de la construction de nombreux édifices moléculaires, biosynthèses d'acides gras, de stéroïdes... par des systèmes situés en dehors des mitochondries. Or l'acétyl COA ne sort pas de la mitochondrie directement. Il réagit avec l'oxaloacétate en formant du citrate, qui sort de la mitochondrie.



et va régénérer de l'acétyl COA à l'extérieur.

L'utilisation des molécules marquées permet non seulement de repérer l'origine et le destin des atomes enrichis en isotope, mais aussi de préciser des mécanismes. Ainsi, dans l'exemple évoqué, le citrate représente une forme de transport de l'acétyl COA de l'intérieur vers l'extérieur de la mitochondrie. On peut s'en assurer en ajoutant dans le milieu du citrate ordinaire, qui va, dès le début de la réaction, diluer le citrate radioactif formé, et en accroître artificiellement la masse présente. On pourra ainsi isoler plus facilement un échantillon de citrate, le purifier et vérifier sa radioactivité. Par surcroît, si la préparation mitochondriale utilisée est associée aux systèmes qui forment

à partir de citrate de l'acétyl COA, on en mesurera la radioactivité spécifique en l'absence et en présence de citrate ajouté.

La réduction de la radioactivité spécifique de l'acétyl COA résultant de l'addition de citrate, et sa comparaison avec celle du citrate vont établir la position d'intermédiaire de cette molécule dans le processus global de dégradation des acides gras.

Cette méthode de dilution isotopique par addition au milieu d'un métabolite non marqué pour identifier la formation transitoire et en petites quantités du même composé au cours d'une chaîne réactionnelle a été systématiquement utilisée : c'est l'un des moyens d'établir une filiation moléculaire.

On notera que ces réactions de réduction de complexité progressent par étapes, associées pour une part à des oxydations qui fournissent l'énergie chimique dont l'organisme aura besoin.
