

Les apports des radioéléments dans l'exploration du monde vivant

Christian de ROUFFIGNAC

1. INTRODUCTION

Tous les organismes vivants sont le siège d'échanges permanents avec le milieu dans lequel ils évoluent. Les plantes, par exemple, assimilent, grâce à la photosynthèse, le dioxyde de carbone, utilisé pour la formation de substances aussi complexes que des sucres, des lipides ou des protéines. Les cellules elles-mêmes peuvent être considérées comme des entités où se produisent des phénomènes d'assimilation et de transformation, donnant lieu à de nouveaux substrats repris à leur tour par des "organes" intracellulaires (les organelles), l'ensemble de ces phénomènes aboutissant, in fine, à la production d'un nombre considérable de molécules organiques.

Ces molécules sont alors utilisées à des fins très diverses. En particulier, elles servent au renouvellement des éléments vieillissants de l'organisme dont toutes les molécules, y compris celles entrant dans la composition du squelette, ont une vie "programmée" dont la durée dépend de leur nature même. Au stade ultime de ces processus, les éléments arrivés au terme de leur durée de vie devront être remplacés. Les molécules qui les constituent subiront alors de nouvelles transformations aboutissant à des corps simples, essentiellement du dioxyde de carbone, de l'eau et de l'urée, que l'organisme éliminera au gré de leur production.

2. UN ÉQUILIBRE DYNAMIQUE

Tous ces processus sont des événements dynamiques : bien qu'elles soient toutes soumises à un renouvellement permanent, les molécules de même nature sont généralement présentes en quantité sensiblement constante au cours du temps dans la plupart des organismes. Si l'on suit la concentration de telle ou telle molécule, aucune variation sensible n'est observée. Et pourtant dans cette population, certaines viennent d'être synthétisées, d'autres sont dégradées. Pour décrire ce phénomène, on dit que ces molécules sont en "équilibre dynamique".

Avant l'arrivée des radioéléments, pour appréhender les relations entre des ensembles moléculaires, il fallait rompre ces relations par un artifice quelconque pour parvenir à modifier leur concentration. Une méthode a longtemps consisté à créer un déséquilibre dans l'organisme (on ôtait une glande, on interrompait le trajet d'un nerf), puis à en rechercher les conséquences sur les autres composantes accessibles à la mesure, dans le sang par exemple. C'est le principe de la méthode expérimentale introduite par Claude Bernard, qui a donné naissance, avec les succès que l'on connaît, à la physiologie.

Cette discipline vise à définir les processus biologiques en termes fonctionnels (comment ça marche ?), et tente de répondre à la question fondamentale : à quoi ça sert ? Par là, elle cherche à comprendre l'essence même de la vie, par l'analyse des différents processus qui caractérisent un organisme vivant. Comme le prévoyait avec une remarquable intuition Frédéric Joliot, dès sa découverte des radioéléments artificiels, cette discipline devait largement bénéficier et bénéficie toujours de la puissance du marquage isotopique.

Comment étudier un système sans en perturber l'équilibre ? C'est là que les marqueurs radioactifs, qui permettent de suivre, à la trace, le devenir dans l'espace et le temps de chaque espèce moléculaire, ont révolutionné la démarche des biologistes (*voir Annexe 1*).

Grâce aux marqueurs, non seulement les études complexes décrites précédemment ont pu être abordées, mais de nombreuses applications nouvelles ont vu le jour. Pourquoi ? Tout simplement parce que les isotopes radioactifs se comportent dans l'organisme de manière chimiquement identique aux atomes stables préexistants : le ^{14}C , un émetteur β^- , se comportera comme le ^{12}C , élément stable, et le ^{24}Na , un autre émetteur β^- , comme le ^{23}Na , stable.

De même que le baguage des oiseaux permet de déterminer leurs aires de répartition, leurs voies de migration et leur durée de vie dans les conditions naturelles, le marquage isotopique permet de détecter une molécule dans un mélange complexe, de la doser par les méthodes de comptage, et même de visualiser son devenir dans un organisme, un organe, une cellule, une organelle, grâce aux clichés radio auto-radiographiques (*voir Annexe 2*).

L'utilisation des marqueurs radioactifs a ainsi révolutionné la biologie. Les quelques exemples ci-dessous ne peuvent offrir qu'une vision très incomplète de l'apport des isotopes dans les sciences du vivant, tant la diversité des méthodes et des concepts générés est étendue.

Nous aborderons trois domaines pour lesquels le marquage isotopique fut déterminant : la notion de compartimentation et de répartition des molécules dans un organisme vivant, la durée de vie biologique d'une molécule ou d'une cellule, la détermination des interactions et des échanges chimiques conditionnant le fonctionnement du vivant.

3. ANONYME DANS LA FOULE MAIS TOUJOURS IDENTIFIABLE

Revenons à nos molécules en " équilibre dynamique ". Qu'est-ce qui intéresse le physiologiste ? Il voudra, par exemple, savoir si toutes les molécules de même nature ont la même destinée dans un organisme, c'est-à-dire si elles constituent un ou plusieurs groupes distincts, traquer l'existence d'échanges éventuels entre ces différents groupes et mesurer l'intensité de ces échanges.

Une " population " moléculaire se trouve rarement confinée dans un espace bien défini. On en retrouve généralement des représentants dans chaque partie de l'organisme. On peut les dénombrer et même les classer en plusieurs " sous-populations ". En effet, avec les marqueurs radioactifs, il est possible de reconnaître une " sous-population " formée par un ensemble de molécules qui ont une probabilité égale de subir un événement donné.

Chacun de ces ensembles occupe un espace (un " pool " ou " compartiment ") qui est le plus souvent de nature virtuelle mais dont la taille est néanmoins mesurable. On pourra ainsi détecter plusieurs de ces " sous-populations " si la molécule subit des événements de probabilité différente. Cette notion, de prime abord quelque peu ésotérique, recouvre une réalité aisée à comprendre.

En reprenant l'analogie des oiseaux, le baguage d'une population homogène sur le plan morphologique a souvent conduit à la découverte de sous-populations se distinguant par leur comportement ou leur durée de vie, propriétés souvent liées à des habitats différents au sein d'une même aire géographique.

Revenons à nos molécules. Si, par exemple, on injecte une petite quantité d'eau tritiée à un lapin, on observe que la concentration sanguine en ^3H évolue en fonction du temps selon une fonction exponentielle complexe qui semble tendre vers une valeur d'équilibre, à l'échelle de temps considérée (*voir Annexe 3*).

Cette évolution traduit le passage de l'eau tritiée du compartiment sanguin où il a été introduit, vers le milieu interstitiel, c'est-à-dire vers les espaces qui entourent les cellules de l'ensemble de l'organisme, puis son entrée dans les cellules. L'analyse de l'évolution de la radioactivité spécifique de l'eau plasmatique (c'est-à-dire la radioactivité en ^3H par l'unité de volume choisie) au cours du temps pourra nous renseigner sur l'intensité des échanges entre ces trois compartiments ainsi que sur leurs tailles respectives.

4. LA DURÉE DE VIE D'UNE MOLÉCULE

Que se passe-t-il quelques instants plus tard, lorsque la radioactivité spécifique de l'eau tritiée est devenue homogène dans tous les territoires de l'organisme ? La situation reste intéressante. En effet, l'évolution de la radioactivité spécifique ne dépendra plus que de l'élimination de l'eau tritiée dans le milieu extérieur et de son remplacement simultané en quantité égale par de l'eau non marquée.

Dans ce cas, l'organisme tout entier deviendra un unique compartiment. La radioactivité de l'eau tritiée décroîtra dans le sang selon une exponentielle simple qui tendra vers zéro.

Par analogie à la période radioactive, les biologistes ont défini une " période biologique ", mesurée par le temps nécessaire pour que la radioactivité spécifique des constituants de l'organisme ait diminué de moitié.

La résolution mathématique de la décroissance exponentielle, après correction éventuelle de la décroissance radioactive résultant de la période physique de l'isotope, montre que la période biologique correspond à la durée nécessaire pour que 69 % des constituants considérés aient été renouvelés¹.

Chez l'Homme, la période biologique de l'eau est de six à neuf jours, suivant les individus et les apports quotidiens.

Ce type d'investigation ne s'applique pas qu'aux atomes ou molécules. Imaginons que dans un organisme, on puisse marquer irréversiblement un type cellulaire donné à l'aide d'un radioélément. La disparition progressive des cellules fera décroître la radioactivité de cette population. A terme, toutes les cellules marquées auront disparu. L'évolution de la radioactivité spécifique de ce "compartiment" cellulaire (ici l'intensité de la radioactivité d'une quantité donnée de cellules) décrira donc une exponentielle simple qui tendra vers zéro.

On pourra ainsi calculer la durée de vie moyenne de cette population cellulaire. C'est de la sorte que l'on a mesuré la durée de vie de nos globules rouges, qui est de 120 jours, ce qui signifie que nous fabriquons, pour remplacer les défectueux, 2.1011 globules rouges quotidiennement. Cette méthode est particulièrement utile lorsque l'on se trouve en présence de populations comptant une multitude d'individus, sur lesquelles une approche statistique prend tout son sens.

5. DEVENIR D'UNE MOLÉCULE DANS LA CELLULE

Initialement conçue pour décrire l'inventaire des constituants d'une cellule vivante, la biochimie s'est peu à peu étendue à l'étude de leurs transformations, et à la caractérisation des facteurs qui les catalysent et les régulent pour tendre à une stabilité du milieu intérieur. Les systèmes biologiques sont caractérisés par leur complexité et la nécessité de détecter et de doser des substances présentes à de très faibles concentrations au milieu de nombreux composés de nature chimique très voisine.

Le marquage isotopique a permis dès les années 40, avec la découverte de la radioactivité artificielle et la production d'isotopes radioactifs d'atomes abondants dans les molécules organiques (comme le ¹⁴C), d'explorer la chimie du vivant. Grâce aux marqueurs, on peut déterminer l'origine des atomes présents dans une molécule donnée et décrire leur devenir lorsque la molécule est transformée, jusqu'à son élimination par la cellule ou l'organisme. Notons en passant que deux éléments ont été déterminants, et continuent de l'être, pour étudier les réactions chimiques survenant dans une cellule vivante : la maîtrise du marquage, qui conditionne la possibilité d'introduire des atomes radioactifs en des positions définies dans des molécules biologiques, et la sensibilité des systèmes de détection. Les méthodes d'explorations sont nombreuses.

Une des plus utilisées, dite de *pulse chase*, consiste à fournir à des cellules un élément radioactif (période de *pulse*) puis à les cultiver en présence du même substrat non marqué (période de *chase*). C'est ce que firent, au début des années 1950, Andrew Benson et Melvin Calvin en cultivant des algues unicellulaires en présence de ¹⁴CO₂. Le ¹⁴C se retrouvait dans les différents constituants cellulaires formés au cours de la photosynthèse. En les analysant par chromatographie, et en utilisant différents temps de marquage, ils purent suivre le devenir du carbone dans la cellule végétale.

Ces travaux fondamentaux, réalisés à Berkeley de 1948 à 1957, ont permis, grâce à l'utilisation de carbone 14 et de phosphore 32, de déterminer l'ensemble des réactions biochimiques intervenant entre le moment où le carbone pénètre dans la cellule végétale sous forme de gaz carbonique et celui où on le retrouve stocké sous forme d'amidon (voir Annexe 4). A la même époque, Hans Krebs mettait en œuvre une autre méthode, dite de "compétition isotopique", classique aujourd'hui, pour analyser le métabolisme du carbone chez les bactéries et les animaux.

Le principe consiste cette fois-ci à marquer l'ensemble des constituants cellulaires, en cultivant par exemple les bactéries sur un milieu ne contenant que du glucose uniformément marqué au ¹⁴C comme seule source de carbone. Un seul type de précurseur, non marqué cette fois-ci, est ensuite ajouté au milieu de culture. Si ce précurseur est utilisé par la cellule, on verra alors décroître progressivement la radioactivité spécifique de la molécule dont elle est issue.

¹ Soit C la radioactivité mesurée dans le prélèvement au temps t : $C = C_0 e^{-kt}$

(a) Si le système est en état stationnaire pendant la période d'observation, au bout d'une période biologique T , la nouvelle concentration C' sera égale à $C/2$: $C' = C_0/2 = C_0 e^{-k(t+T)}$

(b) Le rapport (a) / (b) $\implies 2 = e^{-kt} / e^{-k(t+T)} = e^{-kt}$ soit : $kT = \text{Log}2 = 0,69$, ce qui signifie qu'au cours d'une période biologique, 69 % des molécules de l'organisme se sont renouvelées.

C'est essentiellement par ces deux méthodes complémentaires, la technique de *pulse chase* et la compétition isotopique, que la quasi-totalité des voies métaboliques du vivant ont pu être recensées au cours des cinquante dernières années.

L'utilisation du phosphore 32 et du soufre 35 a également été, dans les années 1940-50, à l'origine de la caractérisation de l'ADN, le matériel génétique des chromosomes, et a permis, dans les années 1960, de comprendre la façon dont ce matériel régit le fonctionnement cellulaire : détermination du code génétique, synthèse des protéines, régulation de l'activité des gènes. En 1977, Frederick Sanger² inventait une technique permettant le séquençage de l'ADN, c'est-à-dire l'analyse séquentielle de ses constituants élémentaires, qui allait ouvrir la voie à la lecture des génomes. Là aussi, le marquage joua un rôle tout à fait essentiel (*voir Annexe 5*).

C'est aussi la chimie des communications entre cellules et entre tissus qui a pu être abordée par le marquage. Le marquage radioactif des hormones, par exemple, a permis d'isoler leurs récepteurs, molécules situées à la surface de la cellule sur lesquels l'hormone, en venant se fixer, déclenche une réponse physiologique. Les laboratoires de chimie et de biologie du CEA ont d'ailleurs joué dans les domaines de l'endocrinologie, des neurorécepteurs, de la génétique, des échanges cellulaires un rôle déterminant au cours des dernières décennies et continuent de tenir leur rang.

Enfin, rappelons qu'au CEA, un laboratoire d'imagerie médicale, le Service Hospitalier Frédéric Joliot, a vu le jour en 1958 à l'hôpital d'Orsay. Aujourd'hui, ce laboratoire est devenu un centre leader dans son domaine. Les radioéléments et les techniques de détections associées ont permis de développer des techniques d'imagerie d'organes sains ou pathologiques de plus en plus raffinées.

Avec la mise en œuvre de gamma caméras, de tomographe à positons ou d'imagerie par résonance magnétique, on obtient aujourd'hui des images d'organes en trois dimensions en temps réel. Obtenues en l'absence de tout traumatisme, ces images sont des informations primordiales pour l'élaboration d'un diagnostic, qui délimitent avec précision le champ d'intervention du chirurgien et qui permettent de suivre l'efficacité du traitement thérapeutique. Cette imagerie donne lieu à une foule d'applications dans des pathologies comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie, l'épilepsie, la dépression nerveuse, pour ne citer que les plus marquantes se rapportant aux fonctions cérébrales.

Tout aussi fondamentales sont les toutes nouvelles applications de cette imagerie dans le domaine des fonctions cognitives car elles révèlent aussi l'activité du cerveau (*voir Annexe 6*). On sait dire maintenant quelles zones du cerveau sont actives, ou inactives, lors d'une opération mettant en jeu l'un de nos cinq sens ou lors d'une opération mentale. On peut ainsi mettre en évidence les zones qui participent au langage, (langue maternelle, langues étrangères, langage des signes), au calcul mathématique, aux dons, celles qui rendent compte de la mémoire, des images mentales (gustatives, olfactives, visuelles, auditives, tactiles), à la pensée...

6. CONCLUSION

Au-delà des quelques exemples que l'on vient de citer, on constate que les techniques d'exploration basées sur l'emploi de traceurs rendent et continueront de rendre pendant encore de longues années des services irremplaçables. Leur immense mérite vient du fait qu'ils permettent d'explorer l'intérieur de ces obscures " boîtes noires " que sont les organismes, les organes, et les molécules complexes du vivant.

Les mêmes méthodes sont également mises en œuvre pour l'étude des flux de matière et des interactions au sein d'une population bactérienne, végétale, animale ou au sein d'écosystèmes complets. Cette exploration permet d'établir des relations fonctionnelles au cours des divers processus physico-chimiques, des divers échanges que connaît l'entité considérée.

Elle permet aussi d'explorer, sans aucun a priori, le comportement de molécules nouvelles dans les organismes lorsque l'on souhaite connaître leur distribution, leur durée de vie et leurs transformations chimiques. Ces études sont particulièrement indispensables dans le cas des médicaments dont il est nécessaire de décrire chacune des étapes de leur métabolisme afin, entre autres objectifs, d'en prévoir les éventuels effets secondaires.

² Frederick Sanger, déjà prix Nobel en 1958 pour la mise au point d'une méthode d'analyse biochimique des protéines, reçut un second prix Nobel en 1980 pour sa méthode de séquençage de l'ADN. Il faut noter que Hans Krebs et Melvin Calvin furent également lauréats du prix Nobel pour leurs découvertes, respectivement en 1953 et 1961.

Annexe 1 : Principe d'utilisation des radioéléments

Les composants des systèmes biologiques font l'objet de transformations chimiques ou d'échanges permanents sans transformation chimique. Les radioéléments permettent de mesurer les paramètres qui décrivent ces processus cinétiques, notamment leur intensité et le nombre de molécules impliquées. Leur emploi repose sur les principes suivants :

- 1) La molécule marquée doit être chimiquement pure. Cela est particulièrement crucial pour les molécules organiques et plus particulièrement celles marquées au tritium, qui peuvent subir une radiolyse plus ou moins importante selon leur radioactivité spécifique, c'est-à-dire selon l'intensité de la radioactivité par gramme (ou molécule) de l'élément stable. En fin d'expérience, lors de l'exploration d'un processus cinétique, il faut s'assurer que la molécule n'a pas subi de transformation chimique au cours du processus.
- 2) Le système doit être à l'état stationnaire : la valeur de chacune des variables qui définit le système ne doit pas varier de façon significative pendant la durée de l'expérience. La quantité de l'élément marqué doit donc être négligeable devant la masse de l'élément non marqué contenue dans le compartiment où il est introduit. De même, l'échantillon doit avoir une taille négligeable par rapport à celle du compartiment où il est prélevé.
- 3) Le compartiment dans lequel s'effectuent les prélèvements doit être homogène ; autrement dit, l'échantillon doit être représentatif de ce compartiment.
- 4) L'introduction de la molécule marquée et le prélèvement des échantillons doivent être rapides par rapport au processus cinétique exploré.

Au cours de l'évaluation d'un processus cinétique séparant deux compartiments, les radioéléments intègrent un certain nombre d'événements cinétiques intermédiaires, ce nombre dépendant de la vitesse de variation de la radioactivité spécifique du radioélément par rapport à la durée de la période d'observation. On voit donc par là que la méthode ne préjuge en rien des mécanismes biologiques mis en jeu au cours du processus cinétique, elle n'en fait qu'une description fonctionnelle.

(d'après le cours sur « l'utilisation des radioéléments en biologie », de F. Morel, à l'INSTN).

Annexe 2 : Incorporation de thymidine tritiée marquant l'ADN dans le noyau d'une cellule nouvelle

Autoradiographie en microscopie électronique d'une cellule épithéliale provenant d'un animal auquel de la thymidine tritiée a été administrée quatre jours auparavant.

L'incorporation de thymidine tritiée dans le noyau, résulte d'une synthèse d'ADN utilisant cette base nucléotidique. Elle signe l'apparition d'une cellule nouvellement formée.

(M. Chrétien et M. Pisam, *Biol. of the Cell*, 56, 137-150, 1986.)



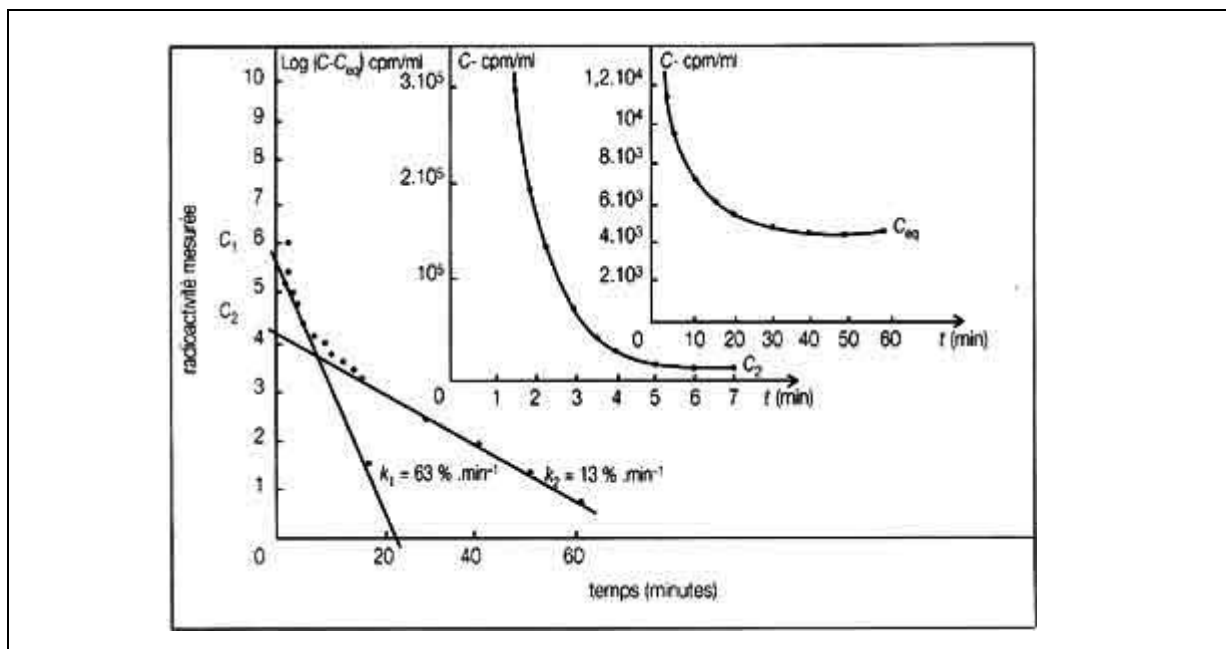
Annexe 3 : Mesure de la taille des compartiments cellulaire et extra cellulaire ; vitesse de renouvellement de l'eau dans ces derniers

Dans l'exemple ci-dessous, la radioactivité du sang d'un lapin a été suivie après l'injection intraveineuse de $3\mu\text{Ci}$ d'eau tritiée. On voit que l'expression de C en fonction du temps décrit deux termes exponentiels successifs.

En exprimant le $\text{Log}(C-C_{\text{eq}})$ en fonction du temps, les points expérimentaux du second terme exponentiel s'inscrivent sur une droite du type $y = -k_2.t.\text{Loge} + \text{Log}C_2$ qui permet d'obtenir k_2 et C_2 , C_{eq} étant estimée à partir des données expérimentales. Puis on porte ensuite le $\log_1(C-C_2)$ en fonction du temps pour calculer C_1 et k_1 .

En divisant C_2 par la radioactivité injectée, on obtient la taille du compartiment intracellulaire (soit 65 % de la masse corporelle) et à partir de k_2 une vitesse de renouvellement de 13 % de l'eau de ce compartiment par minute, puis par un calcul similaire, on obtient la taille du compartiment extracellulaire (de l'ordre de 24 %) et la vitesse de renouvellement de l'eau de ce même compartiment (de 63% par minute).

La fréquence des prélèvements, imposée par les conditions de l'expérience, ne permet pas d'apprécier les caractéristiques cinétiques de la distribution de l'eau tritiée dans le compartiment vasculaire en raison de la rapidité des échanges entre l'eau de ce compartiment et celle du compartiment extracellulaire.



Annexe 4 : Autoradiographie d'un gel de séquence d'ADN

La technique dite de *pulse chase* consiste à mettre des cellules ou des extraits cellulaires en présence d'un substrat marqué pendant quelques minutes (phase de *pulse*) puis, après lavage, en présence de la même molécule non marquée (phase de *chase*). La détermination des molécules ayant incorporé les atomes radioactifs et du degré d'incorporation, autrement dit leur radioactivité spécifique, permet de reconstituer les voies métaboliques, c'est-à-dire la cascade d'évènements biochimiques dans laquelle s'intègre le substrat.

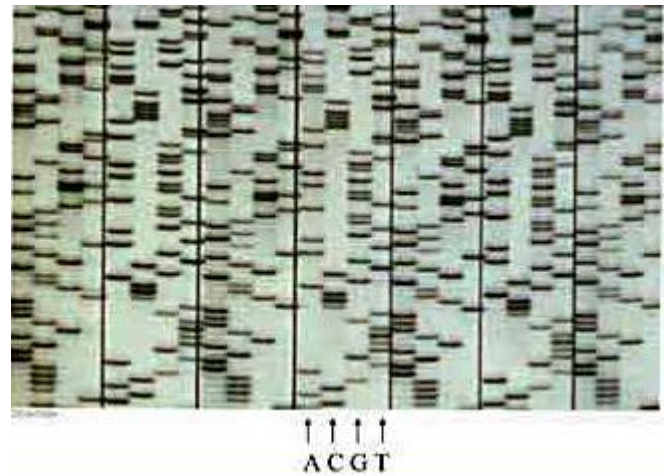
L'application de cette technique aux végétaux (utilisation successive de $^{14}\text{CO}_2$ puis de $^{12}\text{CO}_2$) a par exemple permis à l'équipe de biochimistes animée par Benson et Calvin, à Berkeley, de déterminer que l'acide 3-phosphoglycérique est la première molécule organique formée à partir du CO_2 chez un grand nombre de végétaux, allant des algues vertes aux végétaux supérieurs. Cette molécule à trois atomes de carbone (on parle de métabolisme en C3) sert ensuite à la synthèse de molécules plus complexes.

Cette réaction, essentielle à la vie, est catalysée par la ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygénase, l'enzyme la plus abondante sur la planète. En 1966, quelques années après Benson et Calvin, Hatch et Slack découvraient chez la canne à sucre une seconde voie d'incorporation du dioxyde de carbone dans une molécule organique

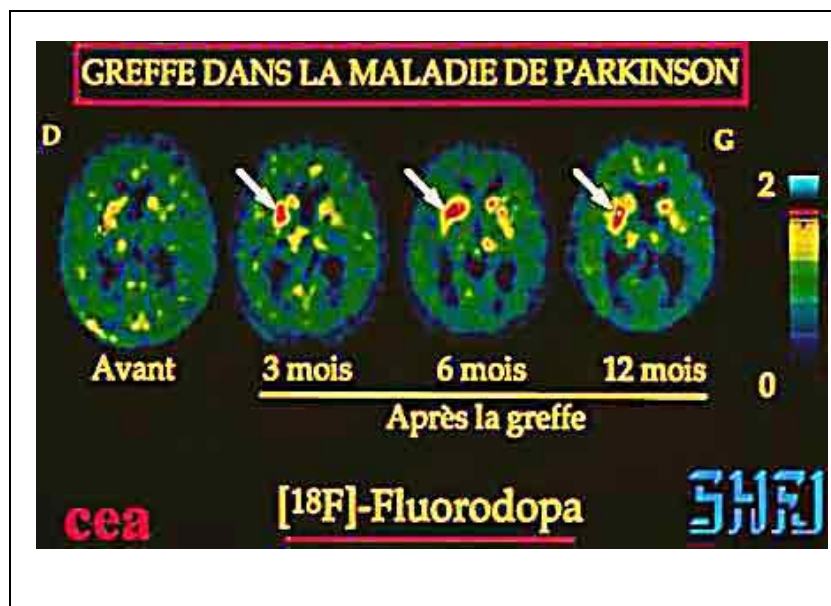
lors de la photosynthèse. Les premières molécules formées sont ici des molécules à quatre atomes de carbone, comme l'oxalo-acétate (métabolisme en C4).

La figure ci-contre présente la séquence des produits en C4 formés au cours de la photosynthèse. Cette séquence est obtenue par reconstitution, en attribuant des durées variables aux périodes de pulse et de chase.

Ces deux voies biochimiques, métabolisme en C3 et en C4, constituent les deux grandes formes connues d'assimilation du dioxyde de carbone lors de la photosynthèse chez les végétaux, ce sont deux réactions essentielles pour l'ensemble de la vie sur Terre.



Annexe 5 : Greffe de tissu foetal chez un patient atteint de la maladie de Parkinson



Annexe 6 : Les différentes aires du langage

Les aires colorées de la figure ci-contre montrent les zones du cerveau activées lorsque le sujet est soumis à une série de tests auditifs.

De haut en bas : le sujet écoute une histoire dans un langage qui lui est incompréhensible. Il n'entend que des sons sans signification : seules les aires auditives, situées dans les lobes temporaux droit et gauche, sont activées.

On le soumet à une liste de mots sans liens, mais en français, dans sa langue maternelle. Il reconnaît ces mots : une zone spécifique s'active, située à gauche. Cette aire (aire de Broca) met en jeu des processus lexicaux qui permettent de donner une signification à ces sons particuliers que sont les mots.

C'est en quelque sorte notre dictionnaire. Si on raconte une histoire en français au sujet, on voit que d'autres aires du cerveau, en plus des précédentes, sont activées. La plupart de ces aires sont situées à gauche, celles situées au niveau temporal sont des zones qui donnent leur sens aux associations de mots que sont les phrases.

(Document CEA/SHFJ, Orsay LPSC, INSERM, CNRS & EHSS, Paris)

