

# 50 ans de marquage isotopique en biochimie (de la recherche fondamentale aux analyses médicales de routine)

Autor(en): **Charollais, Etienne**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société**

Band (Jahr): **39 (1986)**

Heft 2: **Archives de Sciences**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-740355>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# 50 ANS DE MARQUAGE ISOTOPIQUE EN BIOCHIMIE (DE LA RECHERCHE FONDAMENTALE AUX ANALYSES MÉDICALES DE ROUTINE)

PAR

**Etienne CHAROLLAIS <sup>1</sup>**

---

## RÉSUMÉ

Si le concept de marquage isotopique revient certainement à G. Hevesy, les premières applications à l'étude des métabolismes (1935) sont avant tout l'œuvre de Schoenheimer et Rittenberg. Cet aperçu historique, limité à l'utilisation des traceurs en biochimie, souligne le développement d'une technique qui purement académique au départ a rapidement offert des possibilités exceptionnelles. Les découvertes simultanées de méthodes physiques d'identification et de mesure des isotopes radioactifs ou non ont permis de comprendre la plupart des mécanismes d'élaboration, de transformation, de régulation et d'élimination des constituants de la matière vivante. Certaines altérations des métabolismes, le mode d'action de médicaments ont pu être compris. L'application aux dosages de substances nombreuses et variées, tant dans la recherche que dans la routine des laboratoires biomédicaux, est sans doute l'aspect actuel le plus marquant.

## SUMMARY

If the concept of isotope labelling is certainly due to G. Hevesy, the first applications to the studies of metabolism (1935) are the work of Schoenheimer and Rittenberg. This historical survey, limited to the use of tracers in biochemistry, emphasizes the growth of a method which although initially of academic interest only, rapidly offered outstanding possibilities. The simultaneous discoveries of physical methods for identification and measurement of isotopes, radioactive or stable, have allowed us to understand most mechanisms of synthesis, transformation, regulation and excretion of the components of living matter. Abnormal metabolic paths and the method of drug action have been explained. The use for quantitative analysis of many and varied substances, as much in research as in the routine biomedical laboratories, is certainly at the present time the most outstanding aspect.

## 1. INTRODUCTION

L'identité chimique entre un élément et ses isotopes (radio-actifs ou non) permet d'utiliser ceux-ci comme traceurs et de suivre le devenir de l'élément ou de la molécule à laquelle il est lié. Le terme de *traceur* indique que la quantité pondérale de substance marquée est suffisamment faible (trace) par rapport à la masse de la substance à étudier afin que le métabolisme de cette dernière ne soit pas perturbé.

---

<sup>1</sup> Université de Genève, Pavillon des Isotopes, 20, boulevard d'Ivoy, CH-1211 Genève 4.

Dans le domaine biochimique, au cours de ces 50 dernières années l'emploi des traceurs a fourni des résultats spectaculaires. En effet les isotopes des éléments de base de la matière vivante (hydrogène, carbone, azote, oxygène, phosphore, soufre...) permettent la préparation de molécules marquées, dont la complexité augmente au cours des années.

Cette méthode irremplaçable a certainement révolutionné la biochimie moderne. D'innombrables informations n'auraient pu être obtenues à l'aide d'autres techniques expérimentales.

De date récente, la radioimmunologie, qui associe la haute sensibilité du traceur radioactif à l'extraordinaire spécificité des réactions immunologiques est certainement la méthode ayant permis le développement le plus spectaculaire de l'analyse biochimique et médicale moderne.

Enfin la résonance magnétique nucléaire pour détecter certains noyaux atomiques ainsi que leur localisation dans la molécule, est en passe de devenir un outil précieux de la recherche biochimique.

Lorsque en 1932, UREY, BRICKWEDDE et MURPHY [1] découvrent le deutérium, premier isotope lourd de l'hydrogène, l'idée de marquage isotopique de molécules était déjà pressentie. En effet Georg (György) von Hevesy et plusieurs collaborateurs avaient, en 1923 déjà [2], étudié la fixation du Plomb chez les végétaux à l'aide du «thorium B» (isotope radio-actif du plomb:  $^{212}\text{Pb}$ ) alors que les problèmes de pollution par cet élément n'étaient pas encore d'actualité!

A l'aide du concept de dilution isotopique, en 1934 [3] Hevesy et Hofer peuvent calculer le volume d'eau du corps humain en utilisant le deutérium (sous forme de  $\text{D}_2\text{O}$ ). La même année McDougall *et al.* [4] font les mêmes études chez le rat.

Il est rare qu'une découverte importante ne soit précédée de nombreux essais dans diverses directions. Aussi s'accorde-t-on généralement pour considérer, peut-être arbitrairement, l'année 1935 comme celle où débutèrent les premiers travaux systématiques de marquage isotopique. Cette technique a pris, durant ces 50 ans, un tel essor qu'il nous semble intéressant d'en retracer les grandes étapes qui ont permis le développement de la biochimie moderne.

Dès que le deutérium fut accessible en quantité importante la «Rockefeller Foundation» créa un fonds destiné à approfondir les connaissances dans le domaine de la biochimie en utilisant cet isotope lourd de l'hydrogène. C'est ainsi que dans le groupe de Urey au département de biochimie de la «Columbia University» (New York), David Rittenberg vint collaborer avec Rudolf Schoenheimer dont les recherches portaient alors sur le métabolisme des stéroïdes. C'est dans ce groupe que se développa l'idée d'utiliser le marquage isotopique pour l'étude du métabolisme intermédiaire. Jusqu'aux années 50 la biochimie prit un essor considérable avant tout grâce à cette technique.

Quatre manuscrits [5, 6, 7, 8] reçus le 26 juin 1935 sont publiés dans le Journal of Biological Chemistry de la même année (fig. 1). Schoenheimer et Rittenberg décrivent

# THE JOURNAL

OF

# BIOLOGICAL CHEMISTRY

EDITED BY CHESTER A. BERNE AND PUBLISHED IN PART BY THE CHEMICAL & BERNE  
MEMORIAL FUND

EDITED FOR THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS

## EDITORIAL BOARD

RUDOLPH J. ANDERSON  
STANLEY R. BENEDICT  
W. MANSFIELD CLARK  
ELMER V. MCCOLLUM  
LAFAYETTE B. MENDEL  
DONALD D. VAN SLYKE

VOLUME 111  
BALTIMORE  
1935

## DEUTERIUM AS AN INDICATOR IN THE STUDY OF INTERMEDIARY METABOLISM

### II. METHODS\*

By D. RITTENBERG and RUDOLF SCHOENHEIMER

(From the Department of Biological Chemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York)

(Received for publication, June 28, 1935)

## DEUTERIUM AS AN INDICATOR IN THE STUDY OF INTERMEDIARY METABOLISM. I\*

By RUDOLF SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG

(From the Department of Biological Chemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York)

(Received for publication, June 28, 1935)

The study of the metabolism of substances which occur in nature in large amounts and are continually synthesized and destroyed in the animal body presents almost insuperable difficulties. If substances such as natural fatty acids, amino acids, etc., are administered to an animal, we lose track of them the moment they enter the body, since they are mixed with the same substances already present. Furthermore, if a substance A is given to an animal and an excess of a substance B is afterwards discovered in the body or in the excretions, we can never be sure that the substance A has been converted into B, for a stimulation of the formation of B from some other source may equally well have occurred. The difficulty in following physiological substances in the course of their transportation in the body, and their conversion into other substances, accounts for our ignorance with respect to many of the most fundamental questions concerning intermediary metabolism. The solution of these problems will be possible only when direct methods for tracing such substances are available.

In order to follow directly the metabolism of physiological substances many attempts have been made to introduce easily detectable chemical groups into the molecule. Interesting results have been obtained by the use of synthetic derivatives containing halogens or phenyl groups, but all such substances differ so greatly from the corresponding natural substances in chemical and physical character that they are treated differently by the body.

\* This work was carried out with the aid of a grant from the Josiah Macy, Jr., Foundation.

143

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 111, NO. 1

## DEUTERIUM AS AN INDICATOR IN THE STUDY OF INTERMEDIARY METABOLISM

### III. THE RÔLE OF THE FAT TISSUES\*

By RUDOLF SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG

(From the Department of Biological Chemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York)

(Received for publication, June 28, 1935)

## DEUTERIUM AS AN INDICATOR IN THE STUDY OF INTERMEDIARY METABOLISM

### IV. THE MECHANISM OF COPROSTEROL FORMATION\*

By RUDOLF SCHOENHEIMER, D. RITTENBERG, and M. GRAFF

(From the Department of Biological Chemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York)

(Received for publication, June 28, 1935)

FIG. 1.

Reproduction des quatre premiers articles sur le marquage isotopique.

effects of the mono-azo dye, Congo Red, produces quite similar to those of liver extract in cases of primary anemia. Our observations make imperative a further exploration of the old theory that pernicious anemia is due to excessive absorption or deficient detoxification of noxious substances derived from the gastro-intestinal tract. While it is not improbable that the effective factors in liver are utilized in the detoxification of a toxin, it seems highly unlikely that Congo Red can supply material needed for production or maturation of red cells or for maintenance of neurons and lingual papillae.

CAMILLE MAMMO  
WILLIAM DOCK

#### DEUTERIUM AS AN INDICATOR IN THE STUDY OF INTERMEDIARY METABOLISM

MANY attempts have been made to label physiological substances by the introduction of easily detectable groups such as halogens and benzene nuclei. However, the physical and chemical properties of the resulting compounds differ so markedly from those of their natural analogues that they are treated differently by the organism. The interpretation of metabolic experiments involving such substances is therefore strictly limited.

We have found the hydrogen isotope deuterium to be a valuable indicator for this purpose. The fact that it occurs in the same proportions (1 atom of deuterium to 5,000 atoms of protium) in the hydrogen of ordinary water and of organic matter is in itself evidence that the living body is unable to distinguish the few organic molecules which contain deuterium from those which do not. Were the reverse the case, organic matter of biological origin would display differences in isotopic ratio.

We have prepared several physiological compounds (fatty acids and steroid derivatives) containing one or more deuterium atoms linked to carbon, as in methyl or methylene groups. Their physical properties are indistinguishable from those of their naturally occurring analogues by the methods commonly employed. As, however, the deuterium content of these substances or of their physiological derivatives can readily be determined from the properties of the water formed on combustion, their fate in the body can be followed even after considerable dilution.

In preliminary feeding experiments with different amounts of fat (labeled oil, partially hydrogenated with deuterium), the product had similar properties to olive oil) to mice, it was found that most of the fat, before being utilized, is stored in the fat depots; the fat burned in the body was not taken directly from that absorbed but from the fatty tissue.

\* B. M. Jacobson, *Science*, 80: 211, 1934.

\* Y. Subbarow, B. M. Jacobson and C. H. Flaks, *New Eng. Med. and Surg. Jour.*, 213: 663, 1935.

\* M. Mamm and G. Zolzen, *Gov. Clin. Med.*, 14: 1207, 1933.

The breakdown of the fat in the organism could be followed by deuterium analysis of the body fluids. Earlier experiments with dogs have shown that administration of cholesterol gives rise to an excess excretion of either cholesterol or coprosterol, according to the nature of the basal diet. We have now found that ingested coprostanone is converted into coprosterol; after feeding coprostanone 4, 5- $\beta$ , to a dog and to a human the coprosterol isolated from the stools contained large amounts of deuterium. The number of possible applications of this method appears to be almost unlimited.

RODOLPH SCHROEDER  
DAVID RITTEBERG

SCHOOL OF PHYSICIANS AND  
SURGEONS  
CALIFORNIA UNIVERSITY

#### SCIENTIFIC APPARATUS AND LABORATORY METHODS

exposure to highly ionized air was started within ten minutes after each culture was prepared. In the polonium experiments exposure was continuous, but in the second series exposure was stopped by turning off the current during about half of each day.

In both series of experiments a definite effect has been observed, consisting in the coloration and subsequent death of larvae. The coloration, reddish brown or rusty, appeared first at the posterior spiracles, and spread from this point through the larval body. The amount of coloration when death occurred was not uniform; the majority of affected larvae died when about half of the body was colored, although a few lived until coloration was practically complete, and many died with only a spot of color at the spiracles. Coloration did not advance after death.

Coloration never appeared in all larvae in a culture; it was not observed in larvae that remained in or upon the food medium at the bottom of the bottle, but only in those that crawled up the walls. Some larvae were colored in every bottle treated, and in several cases the majority of those on the walls. One coloration set in, death of the affected larva followed within twelve to twenty-four hours. Within another day or two all larvae that could be seen in the bottle died. The adult flies remained alive, although in the second series, with the discharge, the adults showed an extreme debility, being scarcely able to crawl around after an exposure of two days or more.

That death of the larvae was not caused by a poisoning or other change in the food was proved in the following manner: A culture in which after exposure to ionized air all larvae that could be seen had died was allowed to stand filled with normal atmospheric air. Within two days larvae appeared, and seemed active and normal. None of these larvae were colored.

The use of deuterium has made possible, for the first time, the recognition of cholesterol and copro-

A BIOLOGICAL EFFECT OF IONIZED AIR  
In view of the contradictory results of certain experiments designed to test the therapeutic and other biological values of ionized air, it has been thought desirable to try some simple experiment under well-controlled conditions which would give a definite answer to the question whether or not ionized air has any effect on living material. Accordingly, inbred cultures of wild-type *Drosophila melanogaster* have been grown in ionized air under various conditions.

In the first set of experiments ionized air was drawn through the culture bottle, which was closed by a rubber stopper. The air was ionized by a polonium source suspended in a glass tube, one end of which was closed with a wad of cotton, the other end leading without obstruction to the culture bottle. Since the source was never closer than 30 cm to the bottle, the weak gamma-radiation characteristic of polonium need not be considered. These experiments were performed in a damp, cool basement.

In a second series of experiments, performed in various rooms in another building, air was ionized in the culture bottles by means of a brush discharge between point and plane connected to a 5,000 volt transformer, each bottle being closed with a wad of cotton. In this case, as indicated in the previous one, the degree of ionization would vary at different points within the bottle, because of recombination of ions.

Each culture was started with flies from the inbred stock; neither these nor any of their ancestors had in any case been exposed in the experimental bottles, but

\* *Agrochim. An. Boiany*, 44: 176, 1930; Chouchak, *Rev. Gen. Bot.*, 41: 489, 1935; Heila, Hiltz and St. Kolomoj, *Zentralbl. Bpt. u. Infektionskrankh.*, 111: 5, 703, 1930; see also: Koller, *Jour. Parasit.*, 21: 5, 543, 1932; Rossano, *Science*, 81: 556, 1933.

la méthodologie du marquage isotopique au deutérium en vue de l'étude du métabolisme de lipides: acides gras et stérols. Il est à noter que «Science» publie le 16 août 1935 [9] une note préliminaire de ces mêmes auteurs, probablement reçue avant les quatre premiers articles fondamentaux (fig. 2).

L'analyse historique des premiers développements de cette technique des traceurs jusque vers 1947 a été effectuée par un des pionniers déjà cité: G. Hevesy [10].

## 2. 1935-1950: PRÉPARATIONS D'ISOTOPES LOURDS OU RADIOACTIFS. DÉCOUVERTE DE L'ÉQUILIBRE DYNAMIQUE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES. ETUDE DES MÉTABOLISMES

### 2.1 ISOTOPES LOURDS ET ÉQUILIBRE DYNAMIQUE

Les études par marquage isotopique vont de pair avec d'une part, les possibilités de préparation des isotopes à l'état pur (ou du moins enrichis), sous une forme facilement utilisable pour la synthèse de précurseurs, d'autre part, avec le développement instrumental permettant une mesure précise (sensible et spécifique) du traceur.

C'est ainsi qu'après l'utilisation du deutérium, celle du carbone-13 puis celle de l'azote-15 devinrent possibles.

R. Schoenheimer, D. Rittenberg, V. du Vigneaud, K. Bloch entre 1939 et 1941 posèrent les bases du métabolisme des acides aminés et de protéines ainsi que de certains produits azotés d'excrétion. Des résultats précis, grâce au double marquage ( $^{15}\text{N}$  et  $^2\text{H}$  p. ex.) mettent en évidence un phénomène jusqu'alors inconnu, l'équilibre dynamique des constituants cellulaires. En d'autres termes, tous les composants de la cellule se dégradent et se resynthétisent en permanence, chaque constituant a sa propre durée de vie biologique; ceci protège l'organisme contre les agressions extérieures. A cette époque, ceci est bien démontré pour les acides gras, les protéines, les anticorps, les nucléotides et même pour des éléments figurés tels que les hématies. Cela se généralisera par la suite.

A l'aide de techniques identiques (double marquage  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ), le métabolisme d'unités monocarbonées est éclairci. Il en va de même pour les divers modes de fixation de l'azote par les plantes et micro-organismes.

L'oxygène-18 est surtout utilisé pour déterminer les mécanismes réactionnels (p. ex. hydrolyse d'esters).

Au point de vue expérimental on utilise surtout la spectrométrie de masse (encore peu développée) mais également de délicates mesures de densité de l'eau de combustion lorsque le deutérium est utilisé comme traceur [6].

A cette époque, il est remarqué à plusieurs reprises qu'un effet isotopique dû à une masse plus élevée du traceur peut se manifester, tout spécialement dans le cas du deutérium dont la masse est le double de celle du proton.

## 2.2 ISOTOPES RADIOACTIFS

C'est également en 1935 qu'un des premiers isotopes radioactifs artificiels (le phosphore-32 fut découvert) [11]. Il s'agit d'un important traceur au point de vue biochimique puisqu'il intervient dans presque tous les métabolismes, qu'il est facile de le détecter avec un compteur Geiger-Muller ordinaire et que sa demi-durée de vie physique ( $T_{1/2} = 14,3$  j.) est suffisamment longue. Ici encore on doit à G. Hevesy les premiers essais qui confirment l'équilibre dynamique de cet élément.

A l'aide du  $^{32}\text{P}$  les études furent ensuite menées sur les tissus durs (squelette, dents) puis plus tard avec d'autres radio-éléments: Calcium-45, Strontium-89, Sodium-24, Carbone-11... Il fut possible de localiser ces éléments grâce aux techniques autoradiographiques. On peut noter qu'en 1924 déjà, Lacassagne et Lattes utilisèrent des émulsions photographiques pour étudier la distribution du Polonium chez l'animal.

Au niveau biochimique, l'utilisation du  $^{32}\text{P}$  permit de démontrer le rôle important des esters phosphoriques organiques dans le métabolisme des acides nucléiques et des phospholipides. Des noms prestigieux tels que G. Hevesy, O. Meyerhof, J. K. Parnas, H. Kalckar, F. Lipmann, E. Chargaff sont liés à ces études. On remarque déjà que le renouvellement de l'ARN est plus rapide que celui de l'ADN et que ces processus sont perturbés dans les tissus cancéreux.

Bien que découvert en 1936, le Soufre-35 n'est utilisé en biochimie qu'en 1939 pour l'étude d'acides aminés soufrés.

Des isotopes de l'iode, oligo-élément en apparence peu important, dont l'utilisation, nous le verrons plus loin, va prendre un essor considérable dans l'analyse biochimique moderne, sont préparés en vue de l'étude de la fonction thyroïdienne. Le premier isotope radioactif accessible en 1938,  $^{128}\text{I}$  [14, 15] ( $T_{1/2} = 26$  min.) est peu pratique, il est vite remplacé par l'iode-131 (1939-40) encore utilisé aujourd'hui [16, 17, 18].

Enfin citons divers radio-éléments artificiels qui ont surtout, à cette époque (dès 1943), permis des études préliminaires de quelques métabolismes:  $^{56}\text{Mn}$ ,  $^{56}$  et  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{55}$  et  $^{59}\text{Fe}$ .

En 1939-1940 une étape fondamentale dans l'histoire du marquage isotopique va être franchie grâce à la préparation de deux radio-éléments de base de la structure de la matière vivante: le tritium (hydrogène-3) et le Carbone-14.

Le tritium est découvert en 1939 par P. W. Alvarez et R. Cornog [19]. Une première méthode de préparation du  $^{14}\text{C}$  est décrite par S. Ruben et M. D. Kamen en 1940 [20, 21]. C'est essentiellement grâce au tritium,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$  et  $^{35}\text{S}$  que les mécanismes des transformations biochimiques les plus simples comme les plus complexes pourront être élucidés.

Au point de vue instrumental, les méthodes de mesure vont se développer considérablement car il est vite évident qu'un simple compteur Geiger-Muller ou proportionnel, qu'une simple chambre d'ionisation, s'avèrent d'un emploi assez limité, même en les couplant avec diverses méthodes chromatographiques développées dans les années 50.

Les isotopes alors utilisés en biochimie étant essentiellement des émetteurs  $\beta^-$  d'assez faible énergie, les radioactivités mises en jeu dans la phase terminale de l'analyse étant faibles, il fallait disposer d'une méthode appropriée. Ici encore la collaboration avec la physique des particules élémentaires et l'électronique s'est révélée fondamentale.

La production de lumière visible liée à la radioactivité, dans certaines conditions, était connue dès le début du siècle; il fallut cependant attendre 1945 pour qu'une électronique convenable permette d'amplifier l'émission de photons (photomultiplicateur) et rendre cet effet utilisable. Quelques années plus tard (1949-1950), la scintillation liquide [22, 23, 24] pour les émetteurs  $\beta^-$  de faible énergie devenait accessible à tous les types de recherches avec ces radio-éléments ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ...). Les premiers appareils commerciaux sont disponibles dès 1954.

Parallèlement, les scintillateurs solides permirent la détermination des émetteurs  $\gamma$ . La préparation par Hofstadter des cristaux de Na I «dopés» au thallium (1948) [25] a permis l'utilisation comme traceurs de nombreux émetteurs  $\gamma$  d'intérêt biologique (Iode, Calcium, Fer, Cobalt...). L'effet Cerenkov redécouvert en 1934, mais déjà observé en 1926 [26, 27], ne fut guère exploité avant 1965 et sur une plus faible échelle que la scintillation liquide. Il est vrai que les mesures «en Cerenkov» ne sont applicables qu'aux radio-éléments émetteurs de particules chargées de haute énergie dont la vitesse est supérieure à celle de la lumière (p. ex.  $^{32}\text{P}$ ,  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ ).

### 3. QUELQUES GRANDES ÉTAPES DE LA BIOCHIMIE (1942-1958)

Le choix de trois champs de recherches: biosynthèse du cholestérol, photosynthèse et naissance de la biologie moléculaire, bien qu'arbitraire, tente de montrer la variété des applications de la technique des traceurs. Cette méthode peut être mise en œuvre pour élucider une biosynthèse classique, débrouiller un ensemble complexe de réactions ou même permettre le développement d'une nouvelle discipline devenant autonome.

#### 3.1 BIOSYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL (ou élaboration d'une molécule complexe)

Il s'agit de la première molécule complexe dont la biosynthèse a pu être précisée grâce à l'utilisation de traceurs. Cette étude débute par les travaux de Bloch, Rittenberg et divers collaborateurs (1942) [28], mais aujourd'hui encore il subsiste quelques points de détails qui ne sont pas totalement éclaircis. Ces auteurs utilisant le double marquage isotopique montrèrent que le cholestérol était synthétisé dans l'organisme à partir de l'acétate:





Il est bien évident que pour retrouver l'emplacement des atomes de carbone dans la molécule de cholestérol (fig. 3) une dégradation chimique longue et complexe de la molécule est nécessaire. Nous verrons plus loin que des techniques modernes permettent aujourd'hui d'éviter ce travail fastidieux.

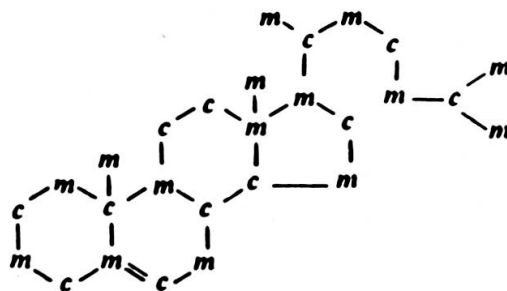


FIG. 3.

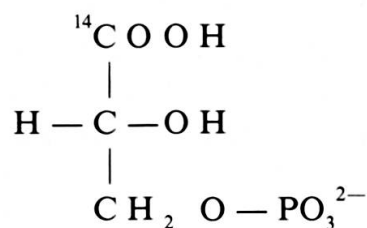
Origine des atomes de carbone du cholestérol.  
m = méthyle de l'acétate  
c = carboxyle de l'acétate

### 3.2 PHOSPHOSYNTHÈSE (ou étude d'un processus complexe)

La photosynthèse classique, c'est-à-dire la fixation du  $\text{CO}_2$  par les plantes qui utilisent l'énergie solaire est un processus complexe dont l'étude a pu être entreprise simultanément par Calvin et Benson en Californie [29] et Gaffron et Fager à Chicago [30] dès 1948 grâce au marquage isotopique. Quelques tentatives avaient été faites en 1939-40 par le groupe de S. Ruben [31] à l'aide de  ${}^{14}\text{C}$  ( $T_{1/2} = 20,5$  min.) sans beaucoup de succès, car l'analyse instrumentale d'alors était insuffisante.

Aujourd'hui à l'échelle des ultrastructures cellulaires et au niveau moléculaire plusieurs mécanismes de réaction ne sont pas encore clairs. L'emploi des traceurs reste indispensable.

En étudiant la fixation de  $\text{CO}_2$  radioactif ( ${}^{14}\text{C}$ ) par des algues photosynthétiques du genre *Chlorella* ou *Scenedesmus*, ces auteurs montrèrent que le premier produit formé (en quelques secondes!) était le 1- ${}^{14}\text{C}$ -phosphoglycérate:



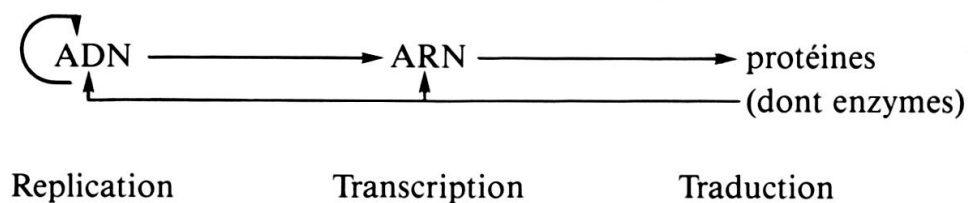
On sait aujourd'hui que le CO<sub>2</sub> est fixé au niveau d'un système enzymatique complexe sur un pentose important: le ribulose 1,5 diphosphate.

Ici encore les résultats obtenus étaient limités par les possibilités instrumentales de l'époque: chromatographie sur papier, cinétique rapides... ainsi que par le niveau des connaissances en biochimie générale. Le cycle des pentoses phosphates (vers 1953), le transfert de l'énergie des photons dans des liaisons chimiques telles que celles de l'ATP indispensables à la photosynthèse étaient encore inconnus. Cette photophosphorylation n'est découverte par Arnon qu'en 1954.

### 3.3 NAISSANCE DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE \*

Ce qu'on désigne aujourd'hui sous le nom de «Biologie moléculaire», est un champ de recherche de la biochimie qui, assez tôt, s'en est détachée pour faire le pont entre diverses disciplines de la biologie, la microbiologie ou même la médecine fondamentale. Elle évolue actuellement vers le «génie génétique» grand consommateur de radio-isotopes.

Au départ, dans les années 50, l'utilisation des traceurs a permis d'aborder l'étude des mécanismes de biosynthèse et de dégradation des acides nucléiques et des protéines, c'est-à-dire les bases moléculaires de la génétique telles qu'elles furent énoncées dans le livre célèbre de J. D. Watson: «Molecular biology of the gene» [33]. L'énoncé du «dogme central» de la biologie moléculaire (Crick 1958) [34]:



a été précédé de toute une série de découvertes difficilement imaginables sans l'emploi de traceurs:

- Découverte des polymérases
- Découverte de l'ARN qui transfère les acides aminés
- Etude structurale et moléculaire des ribosomes
- Ribosomes comme lieu de biosynthèse des protéines...

On peut noter qu'en 1958, à la suite des hypothèses émises par Crick et Watson sur le mode de replication de l'ADN, une brillante démonstration de la replication dite semi-conservative, de l'ADN par Meselson et Stahl [35] constitue un exemple désormais classique de marquage isotopique sortant des voies habituelles.

\* Les biologistes moléculaires s'accordent en général pour faire coïncider les débuts de cette nouvelle discipline avec la parution d'un article de O. T. Avery *et al.* [32] qui a d'abord passé relativement inaperçu!

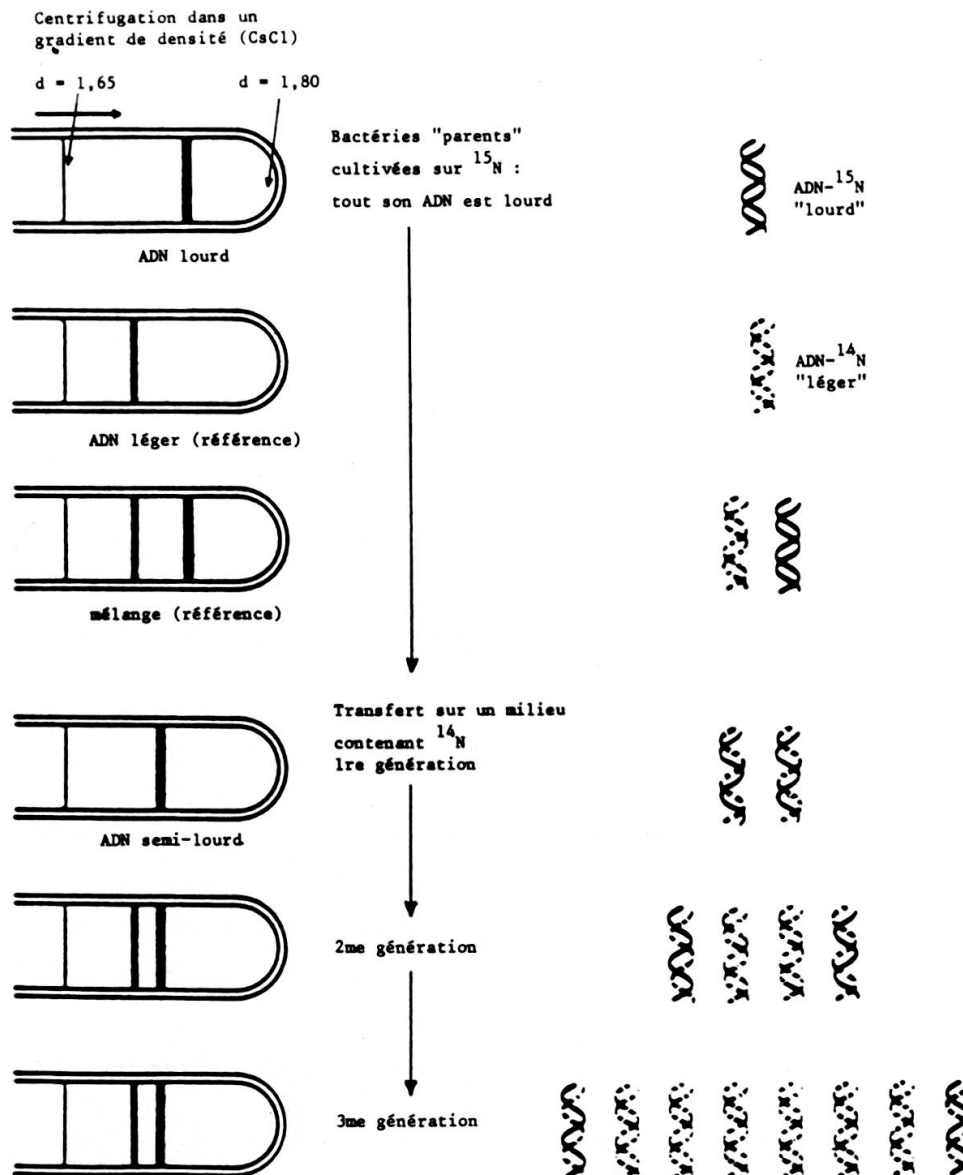


FIG. 4.

Expérience de Meselson-Stahl.

D'après le schéma (fig. 4) actuellement prouvé, de la replication de l'ADN (la première fois chez un micro-organisme: *Escherichia coli* ou colibacille) on voit que si l'on fournit à la bactérie une source d'azote léger ( $^{14}\text{N}$ ) ou d'azote lourd ( $^{15}\text{N}$ ) pour élaborer son ADN, on pourra observer au cours des générations soit la formation d'ADN lourd (contenant surtout du  $^{15}\text{N}$ ), d'ADN léger (contenant surtout du  $^{14}\text{N}$ ) ou d'ADN semi-lourd (contenant  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$  à parts égales). Des techniques raffinées d'ultracentrifugation décrites la première fois par Claude en 1946 [36] puis Hogeboom, Schneider et Palade en 1947 [37] permettant de séparer ces molécules d'après leur densité, dans un gradient de densité obtenu par centrifugation à haute vitesse.

#### 4. LES MÉTHODES DE DOSAGE PAR LIAISON: RADIO-IMMUNO-ASSAYS (RIA) ET MÉTHODES APPARENTÉES 1959-1985...

Dès les débuts d'utilisation des marqueurs isotopiques l'attention des chercheurs s'est portée sur le phénomène de l'effet isotopique. En d'autres termes, le remplacement d'un atome par un de ses isotopes dont la masse diffère notablement peut entraîner des modifications dans le devenir de la molécule qui renferme cet isotope.

Ceci n'est sensible pratiquement, que lors de l'emploi du deutérium ou du tritium dont les masses sont respectivement le double ou le triple de celle de l'hydrogène.

C'est sans doute pour cela qu'on a longtemps hésité à marquer des molécules avec des atomes étrangers. Un premier essai avait cependant été tenté par Franz Knoop en 1904 [38] qui ayant eu l'idée de marquer des acides gras par un groupe phényle à l'extrémité hydrocarbonée avait eu la chance de pouvoir tirer des conclusions correctes en proposant un schéma de dégradation par  $\beta$ -oxydation. Il y a ici un *effet de marquage* qui n'est plus un simple effet isotopique.

Vers les années 60, deux groupes de chercheurs imaginent une méthode de dosage des substances d'intérêt biologique entièrement nouvelle. Yalow et Berson [39] marquent l'insuline à l'iode radioactif (radio-élément étranger à la molécule) et assurent la spécificité du dosage par un anticorps anti-insuline. Ekins [40] marque l'hormone thyroïdienne à l'iode (élément naturel) et assure la spécificité selon un principe voisin, soit l'utilisation d'une protéine liante servant au transport physiologique de l'hormone thyroïdienne.

Ces deux méthodes combinées et celles qui en dérivent constituent à l'heure actuelle l'immense majorité des dosages cliniques de routine. Elle s'est étendue également au dosage des médicaments circulant dans l'organisme.

Chaque laboratoire d'analyse médicale doit donc s'équiper d'un appareillage de mesure aussi simple et polyvalent que possible et ce n'est sans doute pas par hasard que le radio-isotope le plus utilisé, même dans la recherche, est l'iode-125.

La technique de ce qu'on peut appeler le « dosage par liaison » avec marquage isotopique, a pris à l'heure actuelle une telle importance, dans les domaines des sciences biologiques, biochimiques, pharmaceutiques, médicales... qu'il est nécessaire d'en retracer ici les principes de base.

Toute molécule organique dont on veut envisager le dosage par liaison:

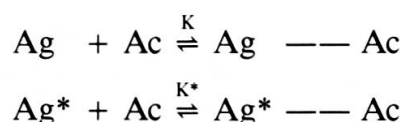
- doit pouvoir être marquée par un radio-isotope (souvent l'iode 125).
- doit correspondre à une structure protéique spécifique avec laquelle elle forme un complexe peu dissociable. Cette protéine peut être un anticorps, une protéine de transport, un récepteur membranaire, un système enzymatique plus ou moins modifié... (ces diverses méthodes portent d'ailleurs chacune un nom particulier. Cf. tableau I).

Réactif spécifique	Appellation	Composés dosés	Exemples
Anticorps	Radioimmuno-assay (RIA)	Hormones polypeptidiques " protéiques " stéroïdes " thyroïdiennes Nucléotides cycliques Antigènes Enzymes Protéines diverses Petites molécules	Insuline, ACTH, peptides cérébraux... Gonadotropes... Aldostérone, hormones sexuelles... T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> ... c-AMP, c-GMP ... de tumeurs, viraux  TBG, albumine, Ig, facteurs de coagulation ... Prostaglandines, vitamines, dérivés d'acides aminés, médicaments ...
Protéines liantes	Protein-binding-assay (PBA)	Hormones thyroïdiennes " stéroïdes Vitamines Nucléotides cycliques Eléments traces	T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> ... Cortisol, hormones sexuelles ... B <sub>12</sub> , D, folate ... c-AMP, c-GMP Fer
Récepteurs membranaires	Radioreceptor-assay (RRA)	Hormones polypeptidiques	ACTH, LH, TSH ...
Enzymes	Radioenzymatic-assay (REA)	Vitamines Nucléotides cycliques	Folates ... c-AMP, c-GMP
Microorganismes	Radiomicrobiology-assay (RMA)	Vitamines	Folate ...
Réactifs inorganiques		Métaux traces	Hg, Pb, Cd, Fe ...
Techniques diverses	Radioallergosorbent-test (RAST)  Enzyme-linked-Immuno- sorbent-assay (ELISA)	Allergènes  Anticorps	Tests d'allergie  Anticorps de la rubéole ...

TABLEAU I.

Quelques substances d'intérêt biochimique, pharmaceutique ou médical dosées par la méthode de liaison.

Le principe de la réaction repose à la fois sur la formation réversible d'un complexe type antigène (Ag) — anticorps (Ac) et sur la dilution isotopique:



Ag\* représente la molécule marquée. K et K\* sont les constantes d'affinité du complexe qui doivent être identiques et élevées.

La figure 5 précise cette réaction. Comme en général le marquage à l'iode-125 modifie quelque peu la molécule à doser, il est nécessaire de s'assurer qu'il n'y a pas d'effet de marquage, ce qui n'est pas toujours le cas.

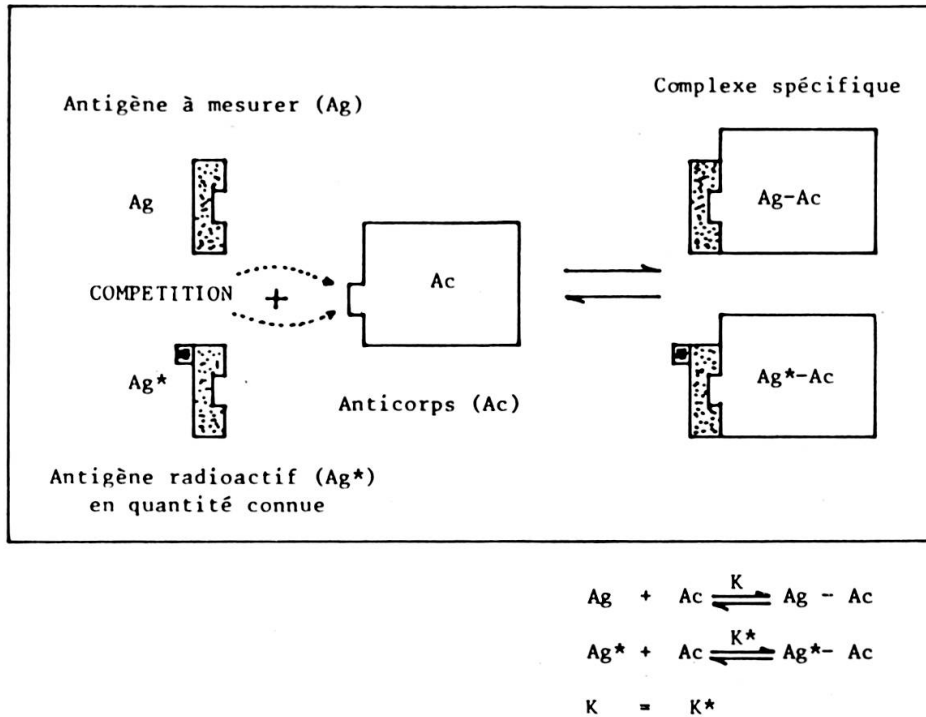


FIG. 5.

Le dosage final exige une séparation quantitative des molécules liées (B) (Ag-Ac ou Ag\*Ac). Il peut s'agir d'une précipitation, d'une centrifugation, d'une adsorption, d'une électrophorèse...

Enfin la mesure de radioactivité de la fraction B ou F, ou des deux permet de calculer la concentration de la molécule originale Ag (voir fig. 6).

La sensibilité de cette méthode peut atteindre  $10^{-12}$  à  $10^{-15}$  mole, c'est-à-dire que l'on est en mesure de doser pratiquement tous les constituants de la matière vivante. Le tableau I, loin d'être exhaustif, montre quelques domaines d'application de la méthode de liaison.

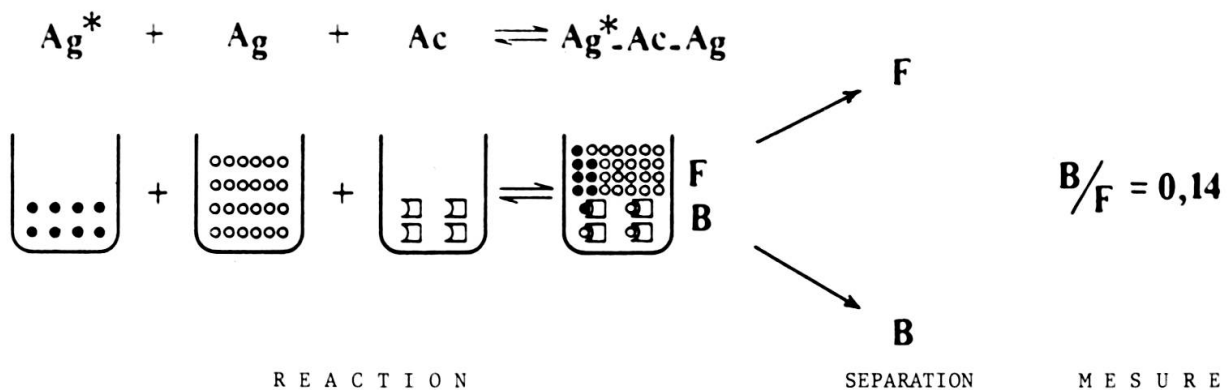


FIG. 6.

F = antigène (Ag ou Ag\*) libre. B = antigène lié.

## 5. ISOTOPES ET RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (SPÉCIALEMENT $^{13}\text{C}$ -RMN)-1966-1985...

Si l'on se reporte à l'étude de Bloch (1942) sur la biosynthèse du cholestérol [28], exemple parmi beaucoup d'autres, on constate que cette méthode est très ardue. Car s'il est facile de procéder à l'incorporation du carbone 13 ou 14 chez un organisme vivant à l'aide de précurseurs appropriés, il est extrêmement compliqué de dégrader une molécule aussi complexe pour déterminer l'origine de chaque carbone.

En 1966, M. Tanabe et G. Detre [41] eurent l'idée d'utiliser un des aspects de la RMN du proton ( $^1\text{H}$ ) et du carbone-13 pour l'étude de la biosynthèse d'une substance naturelle complexe, la griséofulvine (antifongique) (fig. 7).

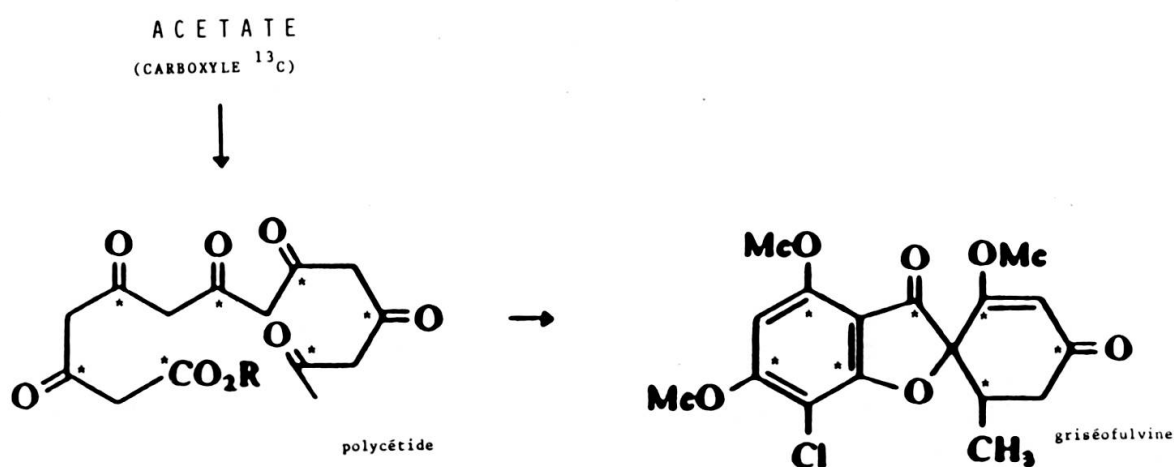


FIG. 7.

Schéma de la biosynthèse de la griséofulvine.

Sans entrer dans le détail, disons que le noyau de  $^{13}\text{C}$  (spin nucléaire =  $\frac{1}{2}$ ) est physiquement différent du  $^{12}\text{C}$  (spin nucléaire = 0). Seul le  $^{13}\text{C}$  est détectable en RMN, son déplacement chimique et le nombre de raies (couplages) dépendent de la nature et de la position des autres noyaux qui l'entourent, si bien que même dans une molécule complexe il est théoriquement possible de localiser chacun des atomes de carbone pour autant qu'il s'agisse de  $^{13}\text{C}$ , car dans la nature cet isotope est toujours présent, à raison de 1,11%.

Le principe d'étude d'une biosynthèse est simple. Il suffit d'administrer des précurseurs supposés, enrichis en  $^{13}\text{C}$  (concentration supérieure à 1,11%), d'isoler le produit formé et d'identifier l'emplacement du  $^{13}\text{C}$  dans la molécule. La biosynthèse d'innombrables substances naturelles a ainsi pu être débrouillée avec certitude et rapidité. Cette méthode (utilisable pour d'autres noyaux atomiques) a en outre de nombreuses applications dans le domaine de l'étude des mécanismes de réaction en chimie organique et en biochimie. Elle serait, en principe, idéale si ce n'était le coût des appareils souvent hors de portée de bien des laboratoires!

## 6. CONCLUSION

On utilise facilement le terme de « Révolution » dans une Science lorsqu'une découverte fondamentale permet une explosion des connaissances. La découverte et l'utilisation des Isotopes (radioactifs ou non), l'étude de leur comportement physique constitue certainement une révolution dans la biochimie de ces 50 dernières années (1935-1985). Intentionnellement, nous nous sommes limités à quelques applications biochimiques, dans le sens large du terme, mais il est bien clair que la contribution des isotopes en médecine, par exemple, est tout aussi considérable. Des milliers de « Curies » ou plutôt des milliards de « Béquerels » utilisés chaque année dans les laboratoires de recherche biochimique ou médicale perpétuent la mémoire de pionniers qui au départ ne recherchaient qu'une connaissance intime de la matière.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- [1] UREY, H. C., F. G. BRICKWEDDE, G. M. MURPHY. *Phys. Rev.* 39, 164 (1932).
- [2] HEVESY, G. *Biochem. J.* 17, 439 (1923).
- [3] HEVESY, G., E. HOFER. *Klin. Wschr.* 13, 1524 (1934).
- [4] MCDUGALL, E. J., F. VERZAR, H. ERLLENMEYER, H. GAERTNER. *Nature (London)* 134, 1006 (1934).
- [5] SCHOENHEIMER, R., D. RITTENBERG. *J. Biol. Chem.* 111, 163 (1935).
- [6] RITTENBERG, D., R. SCHOENHEIMER. *J. Biol. Chem.* 111, 169 (1935).
- [7] SCHOENHEIMER, R., D. RITTENBERG. *J. Biol. Chem.* 111, 175 (1935).
- [8] SCHOENHEIMER, R., D. RITTENBERG, M. GRAFF. *J. Biol. Chem.* 111, 183 (1935).
- [9] SCHOENHEIMER, R., D. RITTENBERG. *Science* 82, 156 (1935).
- [10] HEVESY, G. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 13, 129 (1948).
- [11] AMALDI, E., O. D'AGOSTINO, E. FERMI, B. PONTECORVO, F. RASETTI, E. SEGRÈ. *Proc. Roy Soc. Series A*, 149, 522 (1935).
- [12] LACASSAGNE, A., J. LATTES. *C. R. Soc. Biol. Paris* 90, 352 (1924).
- [13] ANDERSON, E. B. *Z. Physik Chem.* 32B, 237 (1936).
- [14] HERZ, S., A. ROBERTS, R. D. EVANS. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 38, 510 (1938).
- [15] HAMILTON, J. G. *Am. J. Physiol.* 124, 667 (1938).
- [16] HAMILTON, J. G., M. H. SOLEY. *Am. J. Physiol.* 127, 557 (1939).
- [17] ——. *Am. J. Physiol.* 131, 135 (1940).
- [18] ——. *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.* 26, 483 (1940).
- [19] ALVAREZ, L. W., R. CORNOG. *Phys. Rev.* 56, 613 (1939).
- [20] RUBEN, S., M. D. KAMEN. *Phys. Rev.* 57, 549 (1940).
- [21] KAMEN, M. D., S. RUBEN. *Phys. Rev.* 58, 194 (1940).
- [22] AGENO, M., M. CHIOZZOTTO, R. QUERZOLI. *Atti Acad. Naz. Lincei Rend.* 6, 626 (1949).
- [23] REYNOLDS, G. T., F. B. HARRISON, G. SALVINI. *Phys. Rev.* 78, 488 (1950).
- [24] KALLMAN, H., M. FURST. *Phys. Rev.* 79, 857 (1950).
- [25] HOFSTADTER, R. *Phys. Rev.* 74, 100 (1948).
- [26] MALLETT, L. C. *R. Acad. Sc. Paris* 183, 274 (1926).
- [27] CERENKOV, P. A. *Dokl. Akad. Nauk, SSSR* 2, 451 (1934).
- [28] BLOCH, K., D. RITTENBERG. *J. Biol. Chem.* 143, 297 (1942) (note préliminaire suivie de toute une série d'articles).
- [29] «Photosynthesis in plants» (FRANKS, J. and W. B. LOOMIS eds), 1949, Chapt. 19 — BENSON, A. A., M. CALVIN, V. A. HAAS, S. ARONOFF, A. G. HALL, J. A. BASSHAM, J. W. WEIGL.



- [30] *ibid.* Chapt. 20. BROWN, A. K., E. W. FAGER, H. GAFFRON.
- [31] RUBEN, S., W. Z. HASSID, M. D. KAMEN. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 661 (1939) (premier d'une série d'articles).
- [32] AVERY, O. T., C. M. MACLEOD, M. MCCARTY. *J. Exp. Med.* 79, 137 (1944).
- [33] WATSON, J. D. *Molecular biology of the gene*. Benjamin New York, 1<sup>er</sup> éd. 1965 (3<sup>e</sup> éd. 1975).
- [34] CRICK, F. H. C. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 12, 138 (1958).
- [35] MESELSON, M., F. W. STAHL. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 44, 671 (1958).
- [36] CLAUDE, A. *J. Exp. Med.* 84, 51, 61 (1946).
- [37] HOGEBOM, G. H., W. C. SCHNEIDER, G. E. PALADE. *Proc. Expl. Biol. Med.* 65, 320 (1947).
- [38] KNOOP, F. *Der Abbau Aromatischer Fettsäure in Tierkörper*. Freiburg (Baden), 1904. KNOOP, F. *Beitr. Chem. Physiol. Pathol.* 6, 150 (1905).
- [39] YALOW, R. S., S. A. BERSON. *J. Clin. Invest.* 39, 1157 (1960).
- [40] EKINS, R. P. *Clin. Chem. A.* 5, 453 (1960).
- [41] TANABE, M., G. DETRE. *J. Am. Chem. Soc.* 88. 4515 (1966).

*Revues sur l'application des Isotopes en biochimie:*

- HEVESY, G. Historical sketch of the biological application of tracer elements. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 13, 129-150 (1948).
- EKINS, R. P. in *Radiochemical methods in analysis* Ed. COOMBER, D. I., Plenum Press, 1975, chapter 9: Tracer methods in organic and biochemical analysis.
- KUNESCH, G., C. POUPAT in *Isotopes in Organic Chemistry*, BUNCEL, E. and C. C. LEE ed. Elsevier, vol. 3, 1977, chapter 3: Biosynthetic studies using carbon-13 enriched precursors.

*Revues sur les méthodes de dosage des radio-isotopes:*

- *Radiochemical methods in analysis* Ed. COOMBER, D. I. Plenum Press 1975.
- *Les radio-éléments et leurs utilisations*. Collection CEA, Eyrolles 1980.

Université de Genève  
Pavillon des Isotopes  
20, bd d'Ivoy  
CH-1211 Genève 4