

# Préparation de molécules marquées par biosynthèse

PROFESSEUR WALTER G. VERLY,

Laboratoire des isotopes, Département de biochimie de l'Université de Liège

Puisque ce chapitre est consacré à la biosynthèse des molécules marquées<sup>1</sup>, ce sont les substances carbonées, également appelées organiques, qui retiendront notre attention; un grand nombre d'entre elles existent dans les tissus des êtres vivants où elles subissent des transformations chimiques connues sous le nom de métabolisme.

Les molécules organiques marquées sont demandées surtout par les biologistes, pour des études physiologiques, et par des médecins, qui les utilisent pour des diagnostics basés sur les déviations pathologiques de l'utilisation de ces produits par l'organisme humain. Cette clientèle espère donc principalement des molécules marquées correspondant à des produits qui existent naturellement dans la matière vivante et qui y sont élaborés.

La fabrication des molécules marquées peut se faire par *synthèse chimique* en utilisant toutes les ressources de l'expert chimiste. On peut aussi donner à un organisme vivant, sous une forme chimique convenable, le nucléide marqueur, qui sera incorporé dans le produit demandé, normalement fabriqué par cet organisme: c'est à cette technique que l'on donne le nom de *marquage par biosynthèse*. Le procédé paraît très facile puisque l'organisme vivant réalise spontanément une synthèse qui aurait exigé un long travail du chimiste organicien. Toutefois, la biosynthèse est rarement dirigée vers un but unique et le résultat en est habituellement un mélange extrêmement complexe de substances marquées: l'intervention du chimiste reste nécessaire pour les séparer. La biosynthèse et la synthèse chimique ont

donc chacune leurs avantages et leurs inconvénients, qui doivent être pesés dans chaque cas particulier de manière à toujours choisir la méthode la plus facile, qui est nécessairement la moins onéreuse.

Les isotopes rares, radio-actifs ou lourds, de tous les éléments qui constituent le protoplasme vivant, peuvent servir pour des marquages par biosynthèse. Les plus importants sont probablement: <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H et <sup>2</sup>H, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>131</sup>I, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O, etc.

Ces nucléides marqueurs doivent être présentés sous une forme chimique convenable. Le précurseur marqué, que l'on introduit dans le milieu biologique, peut être une molécule très simple, éventuellement inorganique, comme l'anhydride carbonique, l'eau ou l'ion sulfate. Il peut aussi être beaucoup plus complexe: nous verrons plus loin que l'on a utilisé de la progestérone tritiée (=marquée avec <sup>3</sup>H), c'est-à-dire une hormone dont la molécule contient 53 atomes (C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>)!

Le système biologique, qui réalise la biosynthèse, peut être un organisme entier, pluricellulaire comme un plant de tabac, ou monocellulaire comme l'algue *Chlorella*. Il peut être un organe isolé, comme un foie, maintenu en survie par une circulation artificielle, dans laquelle on introduit le précurseur marqué. Des tranches d'organe de quelques dixièmes de millimètre d'épaisseur (par exemple des tranches de glande surrénale) peuvent être mises en suspension dans un milieu nutritif. On peut enfin se servir d'une solution homogène d'enzymes plus ou moins bien purifiés.

De très nombreuses variables influencent le marquage par biosynthèse et déterminent sa valeur pratique: la nature du nucléide marqueur et son prix, la nature chimique du précurseur marqué, les qualités que l'on exige de la molécule marquée que l'on veut préparer, la composition du système biologique utilisé; enfin l'effet toxique des radiations ionisantes ne peut pas être ignoré et place une limite à la méthode quand on utilise des radionuclides.

Ces variables peuvent se combiner de multiples manières, mais elles ne sont pas indépendantes, ce qui rend difficile un exposé systématique du problème. Il faut également tenir compte du rendement isotopique, c'est-à-dire du rapport entre la quantité de l'isotope marqueur (ou la radio-activité - qui lui est proportionnelle - dans le cas d'un radio-isotope) qui se trouve dans le produit final et la quantité mise en œuvre sous la forme de précurseur marqué.

1. Le terme « molécule marquée » n'est pas strictement correct. Une molécule qui contient, par exemple, un radionuclide, ne peut pas être suivie à la piste: elle ne manifeste son existence qu'au moment précis où l'atome radio-actif se désintègre. Avant cette désintégration, elle est aussi silencieuse qu'une molécule qui ne contient que des atomes stables et, après la désintégration, elle perd tout intérêt: son nucléide marqueur a disparu et sa nature chimique a été complètement changée par la transmutation. Le problème ne doit donc pas être considéré à l'échelle d'une molécule, mais bien d'une manière statistique, et il est plus correct de parler d'un produit marqué: une quantité, même petite, de ce produit contient des billions de molécules et le suicide de quelques unes ne change pas les propriétés de l'ensemble; ces suicides forment un feu d'artifice presque continu qui permet de localiser facilement le produit. Malgré cette remarque liminaire, nous utiliserons, indifféremment et dans le même sens, les vocables « molécules marquées » et « substance » ou « produit marqué ».

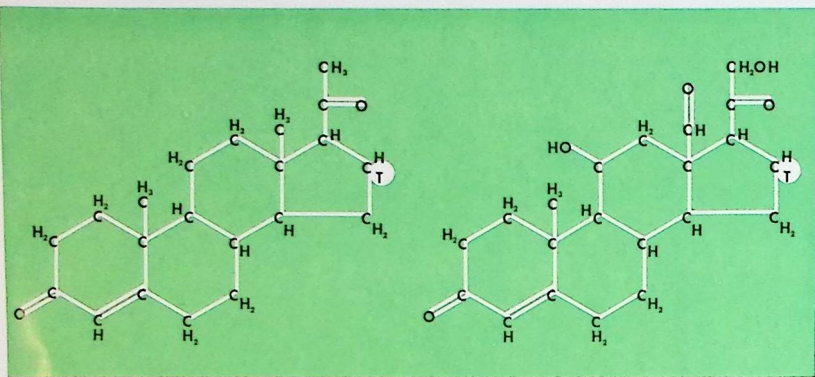


Figure 1.  
 16-<sup>3</sup>H-progesterone → 16-<sup>3</sup>H-aldostérone  
 Dans les formules, le symbole T remplace <sup>3</sup>H.

Généralement, le rendement isotopique sera d'autant plus élevé que le précurseur sera plus complexe et plus spécifique et que le système biologique sera plus simple, de manière à éviter une dérivation du nucléide marqueur vers les produits de réactions secondaires parasites. Mais ce qui mesure le mieux la valeur pratique d'une technique, c'est le produit: rendement isotopique x coût de la quantité de précurseur marqué contenant une unité du nucléide marqueur.

Nous allons passer en revue quelques exemples de préparation de molécules marquées par biosynthèse en discutant brièvement les problèmes posés par l'interaction des variables que nous venons d'évoquer.

On peut utiliser un précurseur non spécifique, marqué avec un radio-isotope coûteux, dans un système biologique complexe, à condition de vouloir marquer des substances qui sont naturellement abondantes dans l'organisme choisi. On donne du <sup>14</sup>C<sub>2</sub> à des chlorelles illuminées pour préparer des acides aminés marqués au <sup>14</sup>C; le rendement isotopique est bon: le <sup>14</sup>C<sub>2</sub> est utilisé complètement par l'algue, qui est riche en protéines (macromolécules qui peuvent être découpées en acides aminés par hydrolyse). On peut même essayer d'améliorer le rendement isotopique global en extrayant des mêmes cellules d'autres produits comme les lipides, les sucres, les acides nucléiques, etc.; en fait, l'algue est devenue une véritable mine de substances marquées les plus diverses. Il faut cependant savoir que les méthodes d'extraction les

plus efficaces pour un produit ne sont pas nécessairement celles qui conviennent le mieux pour un autre, de telle sorte que le rendement global n'est pas la somme des rendements individuels possibles. Par ailleurs, comme la multiplication de cette algue monocellulaire est très rapide, on peut lui donner du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> très actif sans craindre un effet létal des radiations sur l'organisme: les produits isolés ont donc des radio-activités spécifiques<sup>2</sup> très élevées.

Le problème est différent quand il s'agit de préparer une substance rare, comme la digitoxine (glucoside cardiotonique), élaborée par une plante à croissance lente. On peut faire pousser une digitale (*digitalis purpurea*) dans une atmosphère de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>; le rendement est nécessairement très pauvre puisque le glucoside est peu abondant dans la plante. Les préparations de ce genre ont reçu le nom de « culture isotopique » ou « isotope farming ». La croissance lente du végétal ne permet l'emploi que de faibles quantités de <sup>14</sup>C de manière à éviter de le tuer par irradiation; les produits finalement obtenus n'ont qu'une très faible radio-activité.

L'idée de donner des chlorelles cultivées en présence de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> à des animaux pour marquer des substances rares, comme certaines hormones, élaborées uniquement dans les tissus de ceux-ci, a dû être abandonnée: le procédé ne conduit qu'à des produits très peu actifs et extrêmement coûteux.

2.activité par unité de poids

Le problème se poserait différemment avec un nucléide appartenant à un autre élément. Prenons le cas de <sup>3</sup>H qui, contrairement au <sup>14</sup>C, ne coûte presque rien et dont la radio-activité par atome-gramme est environ 1000 fois plus élevée. L'un des avantages les plus marquants de <sup>3</sup>H est de permettre la préparation de molécules très radio-actives qui sont des indicateurs ultra-sensibles pour les études métaboliques: on peut, avec <sup>3</sup>H, aborder des problèmes qui dépassent les possibilités du <sup>14</sup>C. On pourrait croire que l'eau tritiée permettrait de préparer simplement, par biosynthèse, toute une gamme de molécules marquées en commençant par celles qui sont les plus abondantes dans le protoplasme; il n'en est rien: le pourcentage de l'hydrogène qui traverse la cellule sous la forme d'eau, entraîné dans la biosynthèse des molécules organiques, est très faible. La pauvreté de ce rendement isotopique n'est pas grave du point de vue économique puisque <sup>3</sup>H ne coûte presque rien et qu'on peut récupérer l'eau tritiée; mais l'eau forme la plus grande partie du tissu vivant et un faible pourcentage de tritium suffit pour entraîner rapidement la mort des cellules par irradiation. La méthode ne se prête donc qu'à la préparation de molécules faiblement radio-actives qui sont sans intérêt pour de nombreux travaux.

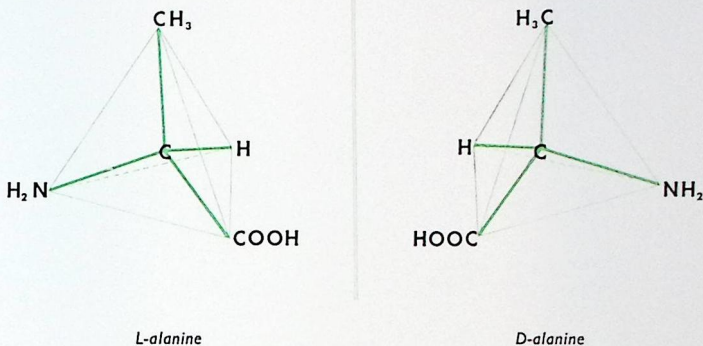
Pour préparer un produit compliqué et peu abondant dans les organismes vivants, comme un alcaloïde ou une hormone, la meilleure technique est souvent de partir

d'un précurseur plus spécifique qui peut alors avoir une très grande radio-activité spécifique. Le danger d'irradiation excessive n'existe plus parce que la concentration de ce précurseur dans le milieu biologique n'est jamais très élevée. Parallèlement, il y aura souvent avantage à simplifier le système biologique pour éviter un gaspillage par des transformations parasites: c'est ainsi qu'on a utilisé des tranches de glande surrénale pour préparer de la  $^3\text{H}$ -aldostérone à partir de  $^3\text{H}$ -progestérone (figure 1). Idéalement, il suffirait d'une solution des enzymes nécessaires pour les réactions biochimiques que l'on veut utiliser: on a préparé de la  $^{14}\text{C}$ -thymidine à partir de  $^{14}\text{C}$ -thymine et de désoxyribose-phosphate en présence de la transférase spécifique (enzyme) extraite du foie de rat (figure 2). L'avantage de la biosynthèse peut être décisif pour la préparation de produits naturels marqués «optiquement actifs».

La synthèse chimique d'une substance qui possède un atome de carbone autour duquel on peut disposer le reste de la molécule de deux manières différentes (isomères optiques - voir figure 3) donne habituellement le mélange des deux formes (racémique), alors que les produits naturels possèdent l'une des structures à l'exclusion de l'autre. La biosynthèse conduit évidemment à l'isomère naturel marqué, qui est beaucoup plus intéressant que le racémique pour les travaux de biologie. C'est ainsi que les acides aminés élaborés par *Chlorella* sont tous de la variété L.

D'autres fois, c'est la biosynthèse qui se trouve dans une position défavorable vis-à-

Figure 3. Isomères «optiques» de l'alanine

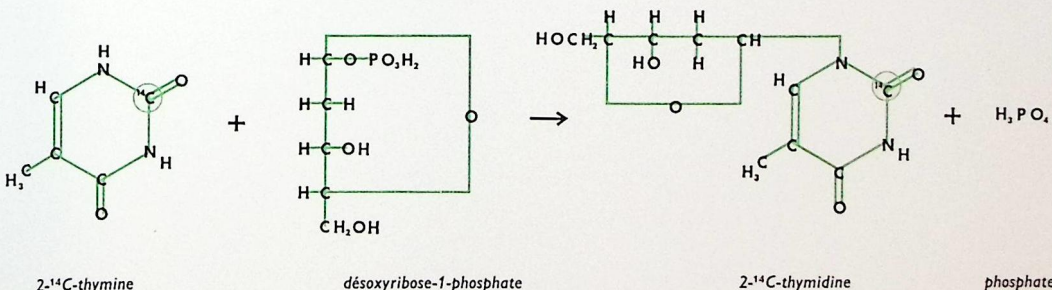


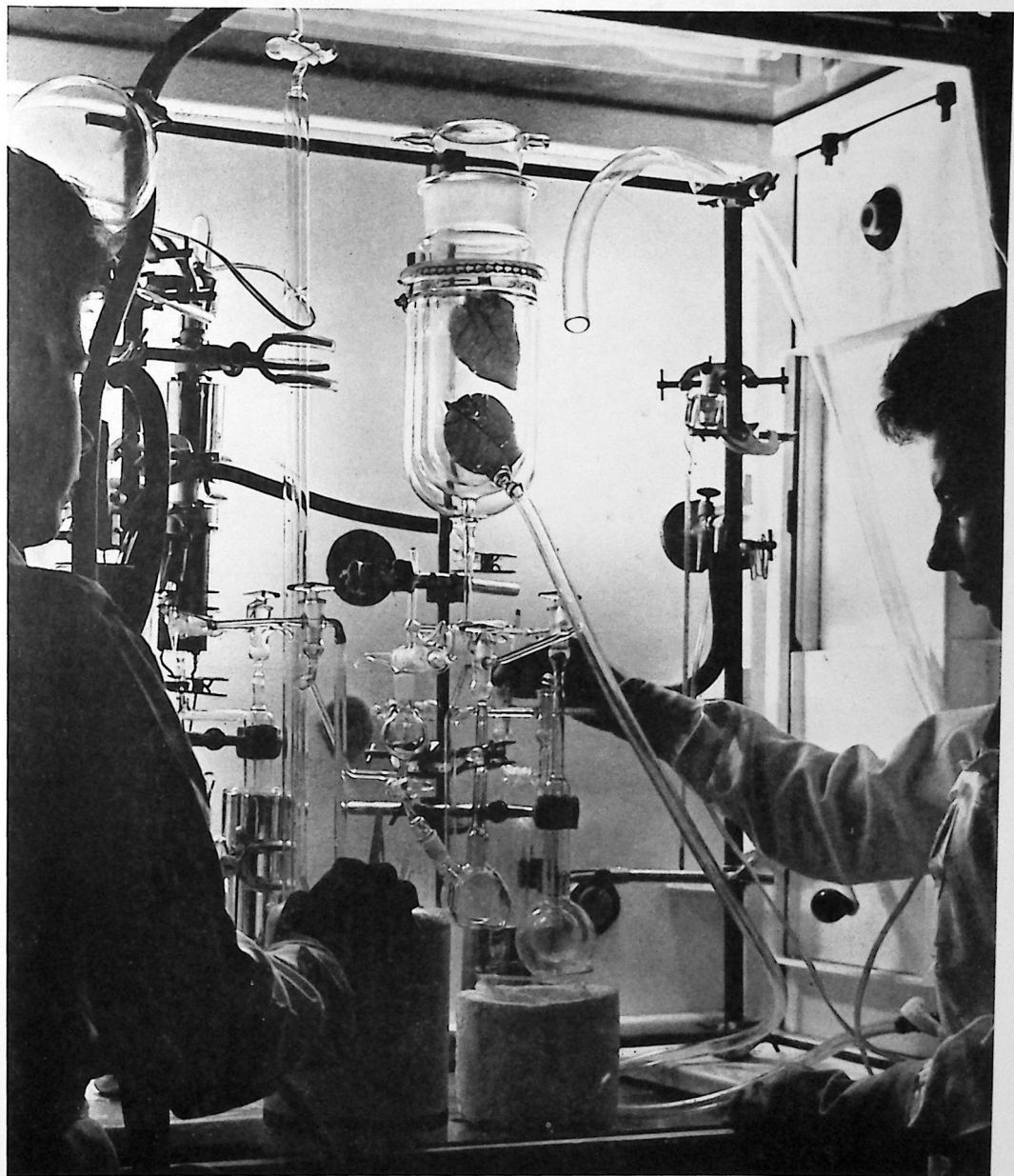
vis de la synthèse chimique. Lorsqu'on utilise un précurseur marqué non spécifique, comme  $^{14}\text{CO}_2$ , la molécule finale est souvent qui, le plus souvent, ne peut être préparée marquée simultanément dans plusieurs de ses atomes. Par exemple, les acides aminés synthétisés par l'algue *Chlorella* en présence de  $^{14}\text{CO}_2$  sont marqués dans tous les carbones. Ces produits radio-actifs conviennent pour étudier la biosynthèse des protéines où ils sont incorporés en entier, mais ils ne peuvent pas être utilisés pour des recherches sur le métabolisme intermédiaire ou le catabolisme, dans lesquelles on désire suivre le sort de chacun des atomes de carbone. Il faut alors une molécule marquée uniquement dans le

carbone au sort duquel on s'intéresse, et qui, le plus souvent, ne peut être préparée que par le chimiste organicien.

La restriction que nous venons de signaler dans l'emploi des biosynthèses, valable dans le cas de  $^{14}\text{CO}_2$  fourni à une plante, n'est pas générale. Le problème est différent pour d'autres éléments: si on donne à *Chlorella* du  $^{35}\text{S}$  sous la forme de sulfate, il est évident que toutes les substances élaborées qui ne contiennent qu'un atome de soufre par molécule ne seront pas différentes de celles que l'on aurait pu préparer par synthèse chimique; c'est notamment le cas pour les acides aminés sulfurés appelés cystéine et méthionine et la biosynthèse aura ici l'avantage déjà mentionné de fournir le stéréo-

Figure 2. Biosynthèse de la  $^{14}\text{C}$ -thymidine





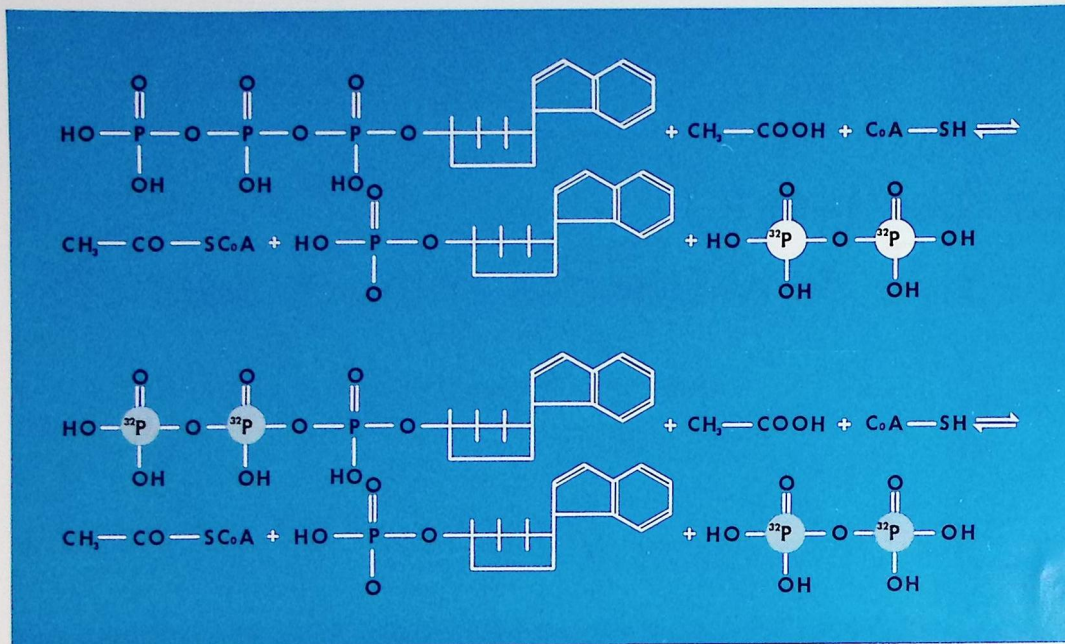


Figure 4. adénosine triphosphate + acétate + coenzyme A  $\rightleftharpoons$  acétyl-coenzyme A + adénosine monophosphate + pyrophosphate  
(La formule du coenzyme A, qui est très compliquée, n'est pas développée parce que, seul, le groupement -SH participe à la bioréaction.)

Au-dessus: La réaction réversible est en cours. Le  $^{32}\text{P}$  est donné sous forme de pyrophosphate.

Au-dessous: Après un certain temps, une partie du  $^{32}\text{P}$  se retrouve dans l'adénosine triphosphate.

Cellule de photosynthèse des sucres marqués au  $^{14}\text{C}$

Du gaz carbonique radio-actif ( $^{14}\text{CO}_2$ ) est introduit dans la cellule, qui contient des feuilles de tabac fraîchement coupées. Sous l'effet de puissantes lampes (2000 watts), le gaz participe au phénomène de photosynthèse et donne naissance à toute une série de composés radio-actifs, dont des sucres marqués au  $^{14}\text{C}$ .

isomère naturel sans que l'on doive recourir à une séparation laborieuse du racémique. La biosynthèse est une manière élégante de marquer des molécules très complexes comme les protéines, polymères formés par l'union de plusieurs centaines d'acides aminés. Les réactions immunitaires d'un organisme lui permettent de neutraliser l'action de produits étrangers dénommés antigènes par la production d'anticorps; ceux-ci sont des protéines de la classe de globulines que l'on retrouve dans le plasma sanguin. On peut préparer des anticorps marqués en administrant, à un animal que l'on soumet à l'action d'un antigène, des acides aminés radio-actifs. Il existe d'autres procédés que la biosyn-

thèse pour marquer des protéines, mais aucun ne donne les mêmes garanties. Une protéine peut être tritiée en l'exposant à du  $^3\text{H}$ -hydrogène moléculaire (procédé Wiltzbach); la plus grande partie du  $^3\text{H}$  fixé se trouve dans des produits de décomposition de la macromolécule, dont la purification devient très difficile; on n'est jamais certain d'atteindre la pureté radio-chimique, c'est-à-dire d'avoir le  $^3\text{H}$  exclusivement dans des molécules ayant la même constitution et la même structure que la protéine native. On peut aussi fixer un atome de  $^{131}\text{I}$  sur la protéine; ici, manifestement, la molécule radio-active est différente de la protéine à laquelle on veut donner un indicateur. Par contre, la protéine marquée

par biosynthèse est chimiquement identique à la macromolécule naturelle.

Nous terminerons en soulignant que certains marquages par des systèmes biologiques ne sont pas des biosynthèses, mais de simples échanges. Ceci est particulièrement vrai pour la préparation de nombreux composés phosphorés et s'explique par le fait que le phosphore se trouve dans les organismes exclusivement sous la forme d'acide phosphorique et de ses dérivés. Deux enzymes catalysent une réaction réversible qui permet d'introduire dans l'adénosine triphosphate (ATP) le  $^{32}\text{P}$  donné sous la forme de pyrophosphate, sans que le bilan ne montre une synthèse d'ATP (figure 4).