Méthodologies, désintégrations et contrôle métabolique

I Utilisation d'isotopes

A. Molécules marquées par isotopes radioactifs

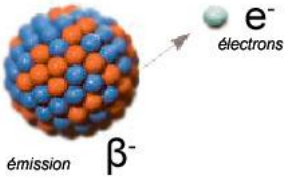
1) Définition

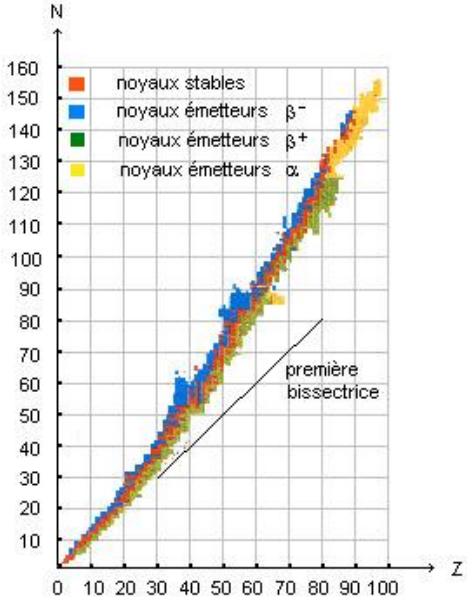
Deux isotopes ont les mêmes nombres de charge (Z) mais des nombres de masse (A) différents.

On dénombre 1500 isotopes dont 300 sont naturels. Seuls les isotopes instables ont une utilité en biologie (soit les 1200 artificiels + 50 naturels).

2) Types de rayonnement

- Rayonnement ò$^-$



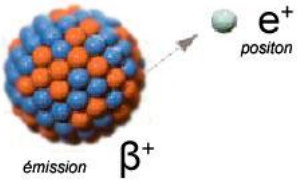


Les noyaux qui ont un excès de neutrons par rapport à la forme stable émettent des électrons :

n^0 à p^+ + ò$^-$

Ex : $_{15}^{32}P$ à $_{16}^{32}S$ + $_{-1}^{0}e$

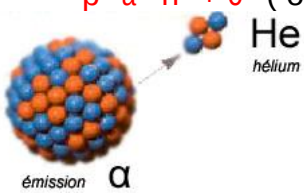
- Rayonnement ò$^+$



Les noyaux qui ont un excès de protons par rapport à la forme stable émettent des positions :

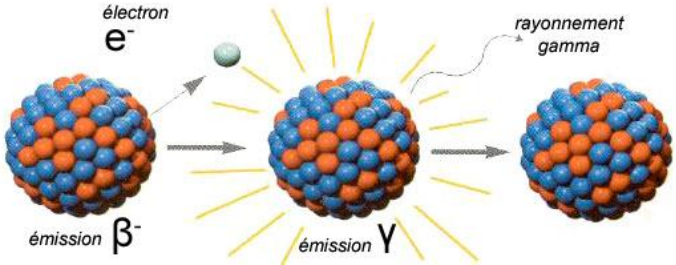
p^+ à n^0 + ò$^+$ (ou p^+ + ò$^-$ à n^0)

- Rayonnement Ñ



Ce sont les noyaux lourds qui émettent des particules d'hélium.

- Rayonnement ó



Create PDF with GO2PDF for free, if you wish to remove this line, click here to buy Virtual PDF Printer

Ce rayonnement vient à la suite d'une excitation d'un atome. Celui-ci, pour revenir à son état normal, émet un rayonnement électromagnétique. Son excitation peut provenir d'un rayonnement $\grave{o}^-$.

Remarque : On utilisera en biologie, les isotopes à rayonnements $\grave{o}^-$ purs. Ils sont moins ionisants que les rayonnements Ñ, $\grave{o}^+$ ou $\grave{o}^-$ à Ó.Malheureusement ce sont les émetteurs ò les moins nombreux.

3) Décroissance radioactive

l Loi de décroissance radioactive :

C'est une réaction cinétique du premier degré : ÛN = - dN / dt

D'où $N(t) = N_0 e^{-Ût}$ et $t_{1/2} = \ln 2 / Û$

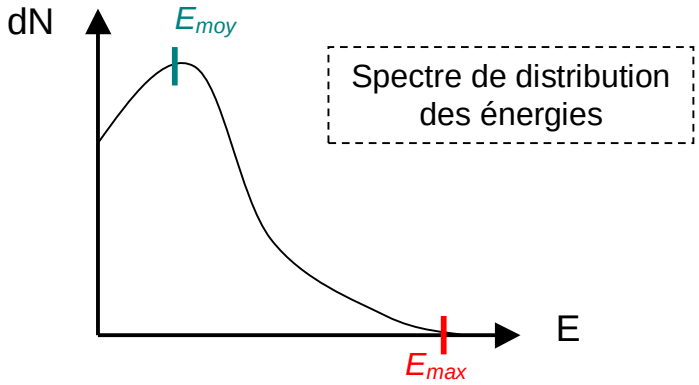
N_0 est le nombre initial de noyaux radioactifs
N(t) est le nombre de noyaux radioactifs à un instant t
Û est la constante de désintégration
$t_{1/2}$ est la demi-vie de l'élément

Exemples de demi-vies :
- ^{3}H *Tritium* :12 ans
- ^{14}C *Carbone 14* : 5600 ans
- ^{32}P *Phosphore 32* : 14 jours

4) Distributions d'énergie

Les particules radioactives d'une même espèce ne transmettent pas de rayonnements tous de la même énergie. On se réfère alors à :

- E_{max} : énergie maximale de rayonnement de l'espèce
- E_{moy} : énergie moyenne calculée à partir du spectre de distribution des énergies du l'espèce.



5) Unités de mesure des désintégrations

L'activité spécifique est le nombre de désintégrations en unité de masse par rapport au temps d'une espèce donnée. On peut utiliser :

- Le Curie, c'est le nombre de désintégrations d'un gramme de Radium par seconde : 1 Ci = $3,7 * 10^{10}$ désintégrations.s^{-1}
- Le Bequerel : 1 Bq = 1 désintégration.s^{-1}

6) Scintillation liquide : principe

Create PDF with GO2PDF for free, if you wish to remove this line, click here to buy Virtual PDF Printer

Un rayonnement électromagnétique va exciter le solvant dans lequel le scintillateur va à son tour être excité par ce solvant, perdant son excitation. Le scintillateur va alors revenir à son état stable en éjectant des photons.

B. Molécules marquées par isotopes non radioactifs

Certains isotopes ne sont pas radioactifs. On peut alors toujours les différencier par leurs propriétés physiques différentes. Quelques fois, les isotopes disponibles sont seulement stables (isotopes de l'oxygène par exemple)

On marque les molécules cibles en enrichissant leur milieu en éléments isotopes (ex : eau lourde).

1) Spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse est constitué de cinq parties principales :

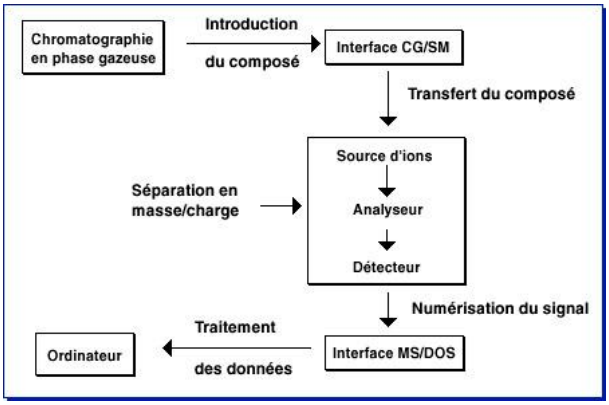
_ Le système d'introduction qui fait pénétrer l'échantillon dans le spectromètre de masse.

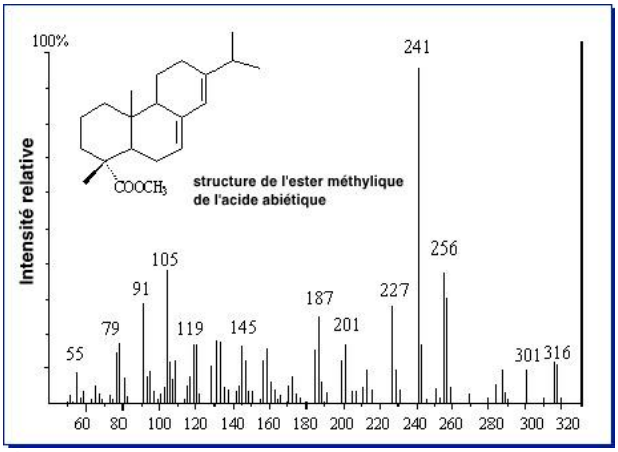
_ La source d'ions dans laquelle les molécules sont ionisées après bombardement électronique. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation, le choix de celle-ci est directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyse souhaitée.

_ L'analyseur qui réalise le tri des ions fragments en fonction du rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique.

_ Un détecteur qui collecte les ions fragments et amplifie le signal associé aux ions.

_ Un ensemble informatique de traitement des données qui permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.





2) Résonance Magnétique Nucléaire

Lorsque des atomes sont soumis à un champ électromagnétique, les noyaux ont leur spin aligné vers celui-ci, s'il correspond à son niveau d'absorption spécifique. Ainsi, en mesurant l'absorption du rayonnement électromagnétique, on peut en déduire quelles sont les différents atomes et liaisons présentes dans telle ou telle molécule.

Create PDF with GO2PDF for free, if you wish to remove this line, click here to buy Virtual PDF Printer

II_ Utilisation de mutants

On utilise les mutants auxotrophes, c'est-à-dire qui ont subi une mutation d'une voie métabolique, de biosynthèse d'un composé, qui est essentielle à la croissance de la bactérie.

Si la bactérie ne dispose pas de ce composé dans le milieu, elle ne croît plus et finit par mourir au bout d'un certain temps.

A. Obtention

Dans la nature, il y a toujours un nombre infime de mutants parmi les bactéries. Mais pour obtenir beaucoup de mutants et du type recherché, on doit procéder à plusieurs étapes.

- Augmentation du nombre de mutants
  - à Par irradiation aux UV ou grâce à des mutagènes chimiques
  - à En présence du composé (que nous appellerons X) nécessaire à la survie du mutant
  - Il ne reste dans le milieu de culture que les bactéries prototrophes (normales) et les bactéries mutantes qui nous intéressent, les autres ne disposant pas de composés nécessaires à leur survie.

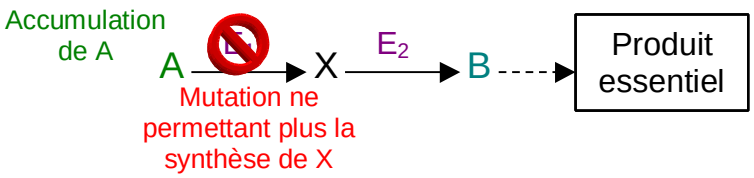
- Tri des bactéries mutées : méthode pénicilline
  - à Retrait du composé X
  - à Injection de pénicilline
  - La pénicilline détruit les bactéries en croissance. Les bactéries mutées ne disposant plus du composé X, elles ne se divisent plus au contraire des bactéries normales. Celles-ci seront alors détruites, les mutantes resteront.

- Culture des bactéries mutées
  - à Présence du composé X dans le milieu

Remarque : Tous les mutants ne sont pas exactement les mêmes. Ils n'ont en commun que la mutation recherchée.

B. Démarche d'analyse

Imaginons un métabolisme requérant la molécule X, comme suit. Les mutants ne peuvent plus la fabriquer, l'injection de X dans le milieu leur permettant de survivre.

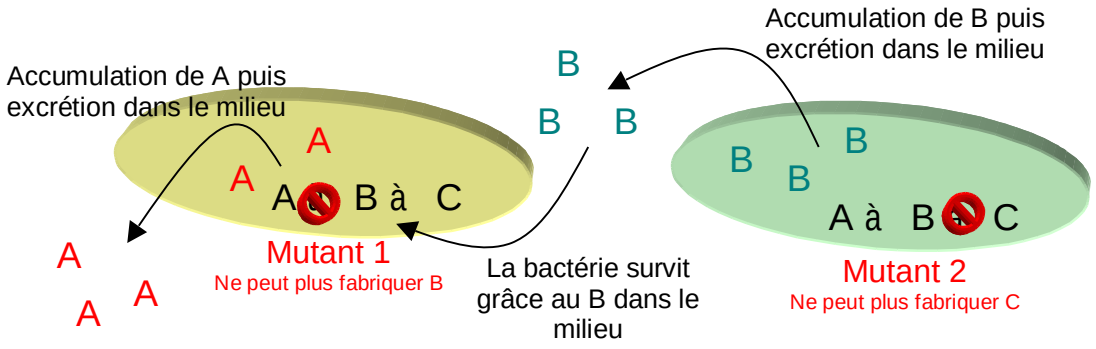


Le composé précédant X dans le métabolisme ne sera alors plus transformé, et on observera une accumulation de ce composé.

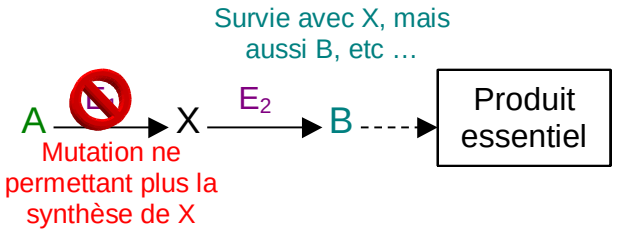
Lorsqu'un composé s'accumule anormalement dans la bactérie, celle-ci se met alors à l'excréter dans le milieu, et l'on peut ainsi mesurer cette excrétion et déterminer la place de X dans son métabolisme.

Create PDF with GO2PDF for free, if you wish to remove this line, click here to buy Virtual PDF Printer

Remarque : Attention, une bactérie mutée sécrétant une substance dans le milieu peut permettre à une autre bactérie de vivre, et on observera alors dans le milieu une autre accumulation parasite.



Reprenons notre exemple précédent. Les bactéries mutées survivent grâce à la présence de X dans le milieu. Mais aussi avec n'importe quel autre composé suivant X (comme B). On appelle cet effet la supplémentation.



En comparant plusieurs mutants entre eux, on peut définir l'ordre des composés dans le métabolisme.

Mutants	Croissance avec insertion dans le milieu de			Endroit de la mutation
	A	B	C	
Type I	-	-	+	Entre B et C
Type II	-	+	+	Entre A et B
Type III	+	+	+	Avant A

On peut alors définir le métabolisme suivant : A à B à C. Tout en gardant en réserve la possibilité d'autres mécanismes entre ces composés.

III Analyse des enzymes et des ARN

En inhibant certains ARN, on observe quelles sont les enzymes inhibées (après une lyse des bactéries, par exemple) et on observe aussi quelles sont les protéines qui ne sont plus fabriquées. On peut alors trouver la chaîne de réaction en cascade qui a lieu à l'intérieur de la cellule.

Create PDF with GO2PDF for free, if you wish to remove this line, click here to buy Virtual PDF Printer