

UNE TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE ET SON UTILISATION EN ÉVALUATION : L'AUTORADIOGRAPHIE

Alain Monchamp
Jacques Dewaele

A propos de l'étude de la synthèse des protéines, un graphique, classique pour les biologistes, qui rassemble des données obtenues par les techniques de marquage radioactif et par la microscopie électronique a été donné à analyser à des élèves de classe Terminale.

Les réponses des élèves sont classées et commentées. Beaucoup ne semblent pas pertinentes par rapport à ce qu'on attend de la récitation d'un savoir. Ces erreurs sont-elles condamnables ? Une présentation des techniques utilisées et une analyse historique couvrant une période de 15 ans des travaux originaux, montrent que les erreurs des élèves peuvent être considérées comme légitimes mais évitables si un bagage technique leur est donné en même temps qu'un savoir théorique historique.

1. LA SITUATION D'ÉVALUATION EN CLASSE DE TERMINALE

La correction classique des réponses d'élèves à un exercice consiste à trier les mauvaises des bonnes réponses et à attribuer un certain nombre de points à ces dernières. Celles qui n'étaient pas attendues sont considérées comme erronées et laissent entendre que l'élève n'a pas fourni le travail de mémorisation et de réflexion nécessaire.

des réponses
erronées

1.1. Hypothèses sur l'origine des erreurs

Sur un exercice d'autoradiographie, souvent proposé en Terminales D et C, les auteurs ne se sont pas intéressés à la "bonne réponse" mais aux "mauvaises" et à leurs formes multiples en émettant deux hypothèses (1) :

- certaines réponses inattendues auraient pu être proposées

1. Gaston BACHELARD, *La formation de l'esprit scientifique*, Paris, Vrin, 1980

des hypothèses pour les expliquer

parce que le bagage de l'élève, en physique en particulier, la précision de l'énoncé étaient insuffisants, laissant le champ libre à des errements.

- d'autres réponses correspondraient à des analyses et à des interprétations que les chercheurs ont déjà proposées à partir de certains résultats expérimentaux, mais que des résultats postérieurs, ignorés des élèves, ont rendus caduques.

Dans le cadre de ces deux hypothèses, les réponses inexactes des élèves ne correspondent plus à une carence intellectuelle, mais ne seraient que des conséquences **logiques** possibles d'une ignorance soit de faits physiques soit de l'histoire de la recherche qui a permis de produire le document-base de l'exercice. Toutes ces considérations interdisent de pénaliser l'élève et amènent le professeur à s'interroger sur la qualité de l'exercice.

Les travaux expérimentaux qui ont conduit à produire le document de Palade entre autres, (prix Nobel en 1974), ont donc été analysés de 1952 à 1967, en s'efforçant d'y repérer les hypothèses semblables à celles proposées par les élèves.

Les auteurs ont été ainsi amenés à réfléchir sur l'intérêt didactique des techniques abordées et sur l'opportunité d'introduire leur étude dans l'enseignement de la biologie en Terminale scientifique.

1.2. Nature de l'exercice proposé

- Enoncé

Ce sujet est emprunté au manuel de Terminale D. Paris. Bordas. 1983. Il doit être effectué en 40 minutes.

Document 1. La biosynthèse des protéines

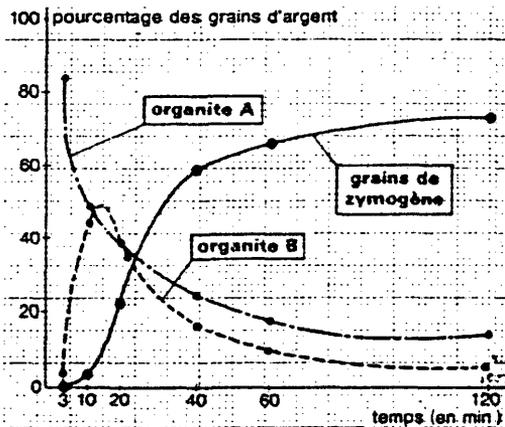
Pour étudier le lieu de synthèse et le devenir d'une protéine, on procède à l'expérimentation suivante. Au temps t₀, on injecte à un rat, soumis à un jeûne préalable, une solution contenant un précurseur de la protéine (un acide aminé radioactif, la leucine tritiée), suivie immédiatement d'une nouvelle injection (la leucine est, cette fois, non radioactive). On effectue alors, au niveau du pancréas de l'animal, une série de prélèvements à des temps différents

- échantillon 1, t = + 3 min
- échantillon 2, t = + 10 min
- échantillon 3, t = + 20 min
- échantillon 4, t = + 40 min
- échantillon 5, t = + 60 min
- échantillon 6, t = + 120 min.

Ces échantillons sont immédiatement préparés en vue d'un examen autoradiographique.

Sur chaque autoradiographie, on détermine le pourcentage des grains d'argent au niveau de différents organites cellulaires : les résultats sont indiqués sur le schéma et le graphique ci-après.

Comment, à partir de vos connaissances sur la synthèse et le devenir des protéines dans la cellule, pouvez-vous interpréter ces expériences ?



Il s'agit d'un sujet déjà évolué puisqu'on y précise que la leucine tritiée est un précurseur de la protéine et qu'on dilue l'acide aminé radioactif par une injection de leucine non radioactive ("chasse").

un énoncé plus précis que beaucoup d'autres

De nombreux énoncés sont privés de l'une, de l'autre ou des deux informations.

Nous verrons que ces informations sont d'une grande importance. Pourtant, elles ne sont pas souvent comprises par l'élève qui n'a pas eu la possibilité d'y réfléchir en cours.

- Conditions d'interrogation

Ce graphique a été proposé en évaluation sommative après le cours sur la protéosynthèse et les liens entre les structures et certaines fonctions cellulaires. Lors de la correction des copies, un relevé méthodique des diverses réponses a été effectué. On n'a pas procédé à une étude statistique des fréquences des réponses. Celles qui ont été recueillies ne proviennent pas d'une seule classe ni d'une seule année. Nous avons cherché à détecter les difficultés qui subsistaient dans la compréhension des élèves et qui pouvaient obscurcir l'analyse du document. Cela pouvait aussi permettre de mieux comprendre les procédés utilisés par l'élève pour décrypter un document et d'évaluer la part du cours qui était mise en oeuvre en fonction des questions abordées.

Une vérification des savoirs (par restitution), lors de la correction du contrôle a permis de constater que la majorité des élèves ayant fourni une réponse "inattendue" connaissait suffisamment son cours pour être capable de répondre "correctement".

1.3. Propositions des élèves.

L'étude des interprétations proposées par les élèves, nous montre que l'on peut les classer en trois groupes selon leur nature.

- Interprétations de nature métaphysique

Les élèves pensent que l'incorporation croissante d'acides aminés dans le reticulum endoplasmique rugueux - RER - est suivie d'une décroissance parce qu'il y a **destruction** des protéines synthétisées (et des organites correspondants) par les rayons ionisants. Les acides aminés libérés diffusent plus profondément dans la cellule et sont réutilisés par l'appareil de Golgi où des phénomènes identiques aux précédents se répètent pour recommencer au niveau des grains de zymogène.

la peur de l'atome destructeur

- Interprétations de nature physique

L'élève ne remet pas en cause le transfert de protéine du RER aux grains de zymogène mais il n'y aurait pas incorporation des acides aminés radioactifs (marqueurs) dans les protéines syn-

une épidémie de radioactivité

thétisées (pour certains il pourrait même ne pas y avoir de synthèse du tout). Les élèves pensent donc que les protéines préexisteraient, et qu'elles deviendraient de plus en plus radioactives, dans le RER d'abord, **par simple contact** avec les marqueurs.

Une variante de l'interprétation précédente repose sur le fait que l'atome radioactif aurait une vie courte, mais qu'avant de "mourir", il aurait le temps de **contaminer** et de rendre donc radioactif un atome stable.

une épidémie
mortelle ... pour
l'atome

Ainsi, la radioactivité introduite dans la cellule contaminerait le RER (d'où l'augmentation de sa radioactivité) puis les substances contaminées perdraient leur radioactivité tout en rendant les atomes de l'appareil de Golgi radioactifs (d'où la baisse de la radioactivité dans le RER et son augmentation dans le Golgi). Ainsi de suite.

• Les interprétations de nature biologique

le marqueur n'est
pas incorporé

HYPOTHESE 1 (HYP1). On a regroupé sous ce titre, toutes les propositions d'élèves dans lesquelles ils révèlent que pour eux la radioactivité détectée dans la cellule n'est due qu'aux seules molécules d'acides aminés libres radioactifs injectés.

l'atome radioactif
peut être inséré
dans n'importe
quelle molécule

HYPOTHESE 2 (HYP2). Cette fois-ci la radioactivité mesurée dans la cellule peut aussi bien révéler la présence de protéines néosynthétisées que la présence de molécules carbonées devenues différentes des acides aminés car on a appris que ces derniers peuvent être l'objet de transformations chimiques en tant que métabolites : polycondensation en protéines, dégradation, conversion etc....

l'injection
déclencherait la
synthèse

HYPOTHESE 3 (HYP3). Ici l'injection d'acides aminés radioactifs dans le sang déclencherait la synthèse des protéines. La pente positive des courbes "organe B et grains de zymogène" montrerait que la synthèse protéique, nulle au moment de l'injection, se développe pour diminuer ensuite et s'arrêter.

de multiples lieux
de synthèse

HYPOTHESE 4 (HYP4). En formulant cette interprétation, l'élève suppose que le document l'autorise à penser que l'incorporation des acides aminés radioactifs dans les protéines peut avoir lieu en de multiples endroits de la cellule : RER, appareil de Golgi, grains de zymogène et membrane plasmique lors de l'exocytose. Cette dernière proposition est fréquente si l'exercice insiste sur deux faits en corrélation : l'injection dans le sang d'acides aminés radioactifs (et qui entrent donc dans la cellule) et la présence de protéines dans la lumière de l'aci-

nus quelques temps plus tard. En effet, le cours (et le manuel) enseigne que des protéines sont synthétisées au niveau du RER puis transportées vers les grains de zymogène pour être enfin excrétées, mais il ne leur a pas appris que les acides aminés **libres** n'étaient pas transférés selon cette voie.

l'hydrolyse rapide des molécules synthétisées serait suivie d'une nouvelle synthèse, ailleurs

HYPOTHESE 5 (HYP5). En questionnant les élèves on peut également recueillir la proposition d'une synthèse des protéines au niveau du RER suivie d'une hydrolyse et d'une réutilisation des acides aminés radioactifs au niveau de l'appareil de Golgi puis des grains de zymogène. On retrouve ici l'idée des lieux de synthèse multiples des protéines associée à celle d'une durée de vie courte de ces mêmes molécules et d'un réemploi des produits d'hydrolyse.

Nous voyons que la persistance des représentations de nature physique nous empêche d'évaluer ce que nous voulions évaluer en donnant cet exercice, à savoir l'acquisition d'un certain savoir biologique.

L'abandon de ces représentations passe par l'appropriation par l'élève d'un savoir physique relatif à la radioactivité, dont nous allons voir le contenu.

2. NATURE ET RÔLE DES SAVOIRS PHYSIQUES EN JEU

2.1. Connaissances sur les isotopes

Tout repose sur la réponse à la question : **Qu'est-ce qu'un isotope ?** (2) (3)

Les élèves abordent cette notion dès la classe de Seconde, mais il y a nécessité de la leur rappeler en Première S puis en Terminale, où ils n'étudient ce sujet qu'en fin d'année.

Rappelons qu'un atome est constitué d'un noyau et d'une couronne d'électrons répartis en plusieurs couches. Les propriétés de cet atome sont dues aux caractéristiques de la couche électronique externe. Le noyau, lui, est constitué de particules :

- les protons, chargés positivement et en nombre égal aux électrons dont ils équilibrent les charges ;
- les neutrons, en nombre égal ou proche du nombre de protons.

2. F. LOT, *Les isotopes radioactifs*, Paris, Hachette, 1952

3. M. TUBIANA, J. DUTREIX, A. WAMBERSIE, *Radiobiologie*, Paris, Hermann, 1986

Exemple :

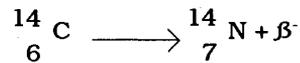
$^{12}_6\text{C}$ Cet atome de carbone possède donc 12 particules nucléaires, dont 6 protons et 6 neutrons.

Il existe des atomes (produits dans les réacteurs nucléaires le plus souvent), qui ne diffèrent d'autres atomes que par le nombre de neutrons. Par exemple, $^{14}_6\text{C}$ (existant dans la nature mais également produit par l'homme), possède 6 protons

mais (14-6) neutrons soit 8 neutrons. Il s'agit d'un **isotope** (mot créé par Soddy qui signifie "même place, même case dans la classification périodique des éléments"), qui a les mêmes propriétés chimiques que le corps équilibré (C^{12}) puisque le nombre d'électrons et leur répartition dans les différentes couches sont identiques.

Cependant, l'excès de matière dans le noyau entraîne un déséquilibre qui déclenche parfois la transformation d'un neutron en proton plus un électron, ceci dans le cas du carbone 14 mais également dans le cas d'autres isotopes utilisés en Biologie : tritium etc...

Le proton supplémentaire apparu fait changer la nature de l'atome :



β^- est l'électron émis avec une certaine énergie, il forme le rayonnement β^- .

C'est précisément ce rayonnement β^- qui va conférer à cet atome la propriété nécessaire pour l'utiliser comme marqueur, traceur, indicateur ou d'une façon plus imagée espion.

Mais il faut savoir qu'un isotope n'est pas radioactif en permanence. Il se comporte comme l'atome stable et n'est donc pas détectable jusqu'au moment, imprévisible où il y a transformation d'un neutron avec émission du rayonnement β^- . Il faut donc travailler sur un grand nombre d'atomes pour que l'on ait quelques chances d'obtenir des transformations pendant l'expérience. Dans les expériences étudiées il y a environ 200 000 à 300 000 désintégrations par seconde, ce qui correspond à une radioactivité de 5 à 8 μcuries .

L'électron émis est capable de télescoper un des atomes d'une molécule environnante, l'eau par exemple. Il peut alors modifier la position d'un électron dans sa couche (excitation) ou bien le chasser purement et simplement. L'atome modifié, s'il était lié par la mise en commun d'un électron (liaison covalente) avec un autre atome se retrouve libéré et ionisé. Il peut devenir un radical libre chimiquement très actif (ex : OH \cdot), capable de changer la nature chimique d'une molécule et donc ses propriétés et bouleverser en cela le métabolisme cellulaire. Si la concentration en isotopes est élevée, les chances de collisions efficaces sont importantes augmentant d'autant plus le risque

quand les neutrons ne sont pas au même nombre que les protons

un déséquilibre source de rayonnement décelable

d'altération des protéines, des acides nucléiques, etc...(4). La cellule ainsi modifiée pourra réparer ou bien mourir selon l'ampleur des dégâts.

2.2. Interprétations des réponses d'élèves.

la radioactivité
ne peut être que
mauvaise

Par leur interprétation métaphysique, les élèves montrent que pour eux la radioactivité est **dangereuse** pour toute vie. Ils connaissent sa capacité **destructrice** mais la comprennent mal. Nous voyons fonctionner ici une représentation irrationnelle de la radioactivité surdéterminée par l'inconscient collectif (Hiroshima et Nagasaki) et les médias (Tchernobyl). Pour répondre à cela, il faut donc leur préciser que la concentration d'isotopes utilisée est calculée de façon à ne pas entraîner de troubles modifiant le fonctionnement cellulaire de façon sensible.

D'autre part, un atome radioactif transformerait, par son rayonnement, un atome stable voisin en atome instable ; il y aurait contamination, augmentation de la radioactivité de proche en proche.

et envahissante

On objectera à cela que si le rayonnement β^- est capable de modifier la répartition des électrons sur leur couche, il ne peut en aucun cas modifier un noyau. Pour qu'un noyau devienne instable dans notre cas il faudrait qu'il reçoive un neutron, ce qui n'est pas possible dans nos expériences puisque la source de neutrons est absente. De plus les noyaux fissiles comme l'uranium, dont les particules du noyau peuvent être séparées en sous-groupes et libérer des neutrons ne peuvent être que des noyaux **lourds**. Ils ne font pas partie des "atomes biologiques". Il ne peut donc pas y avoir **contamination**. Ceci répond à la première interprétation physique des élèves.

En ce qui concerne la seconde interprétation physique, la décroissance de la radioactivité serait spontanée, due à la disparition des atomes radioactifs suite à leur propre transformation.

Pour qu'ils ne puissent plus la formuler il faut qu'ils maîtrisent la notion de **période** d'un radioisotope. Cette période correspond au laps de temps pendant lequel la moitié d'une quelconque masse de matière radioactive s'est désintégrée. Cette valeur est constante pour un isotope donné, elle est de 12,6 années pour le tritium et de 5568 années pour le carbone 14 qui sont les deux isotopes utilisés dans nos expériences. Les atomes instables ne peuvent donc pas tous se désintégrer au cours des manipulations qui ne durent au maximum que quelques semaines.

On voit donc l'intérêt qu'il y aurait en classe de Terminale (mais aussi en Première S) à rappeler les connaissances de base sur l'atome et les compléments dont nous venons de parler ici. Ceci

4. Ibid (2).

devrait empêcher les élèves de proposer des interprétations non "pertinentes" et de se détourner des interprétations biologiques. Ces dernières peuvent paraître fantaisistes, produites par un esprit qui n'aurait approché le cours que de très loin. Elles pourraient, cependant, aussi bien être produites par un esprit qui, cherchant à tirer le maximum d'informations possibles du graphique "jouerait à la devinette", en multipliant les hypothèses au lieu de proposer des hypothèses explicatives en mobilisant ses connaissances sur la synthèse et le transport intracellulaire des protéines. Cet élève pourrait ne pas avoir bien compris ou accepté les règles présidant à la rédaction d'un sujet de Baccalauréat, instituant une fausse redécouverte de ce que l'on a appris en cours à partir d'un document. En travaux pratiques, en effet, on étudie un document nouveau pour en tirer une idée, une propriété qui participe à la construction du cours théorique. Mais en contrôle ou au Bac, l'élève doit faire l'opération inverse, c'est-à-dire rechercher dans son cours ce qui correspond à la question posée et chercher à montrer comment le document justifie ou démontre la connaissance, ce qui n'est plus la même chose !

Lors de la correction, le fait d'imposer la "bonne réponse" se référant au cours n'améliore pas la situation de l'élève qui n'a "pas su". Pour faire évoluer les choses, il faudrait le **convaincre** qu'il a tort. En effet, **aucune des réponses d'élèves recensées n'est illogique**. Elles sont fausses par rapport à ce que nous savons, ce que nous acceptons comme vrai, ce que nous disons en cours mais pas nécessairement par rapport à la représentation que l'élève s'est faite du phénomène avec les seules informations apportées par l'énoncé.

N'aurait-on pas oublié ou effacé des éléments d'information en voulant simplifier les données expérimentales ? N'aurait-on pas méconnu la "richesse" de l'exercice et l'intérêt qu'il y avait à décrire les conditions **réelles** d'obtention du graphique ?

Retournons donc à la source pour mieux chercher à comprendre les éventuelles carences de l'exercice et tenter d'éclairer les propositions des élèves. Pour cela nous avons étudié en détail les travaux de nos maîtres (essentiellement Palade) pour comprendre dans quel contexte le document est né et pour mesurer l'ampleur des simplifications et leurs inconvénients.

3. LES SAVOIRS BIOLOGIQUES : LES TRAVAUX DE PALADE (1967)

3.1. Principes méthodologiques

Palade et coll. en 1967 mettent au point un protocole réunissant pas moins de cinq techniques expérimentales. La coopération de ces techniques doit leur permettre d'obtenir des

présenter la correction d'un contrôle, un travail délicat

quand un document "simple" cache une "forêt" de techniques

résultats incontestables qui valideront l'hypothèse émise neuf ans plus tôt.

- L'autoradiographie

Rétrospectivement et en suivant la démarche de Guy Rumelhard (5) on peut repérer que la technique qui nous intéresse, à savoir l'autoradiographie, est commandée par un modèle élaboré dans le but de surmonter les difficultés dues à la nature même du phénomène étudié. La synthèse et le transport des protéines étudiées étant intracellulaire la méthode expérimentale analytique est mise en échec (6). Pas question en effet d'ouvrir la cellule sans détruire les structures fonctionnelles responsables du phénomène que l'on veut étudier. C'est là qu'intervient le **modèle à compartiment** qui va nous permettre de désigner la cellule comme une **boîte noire** que l'on n'ouvre pas mais dans laquelle nous allons pouvoir introduire des indicateurs pour observer leur localisation à un moment donné ou à des moments successifs en stoppant et en figeant le phénomène qui, nous le savons, se déroule dans le temps et dans l'espace. L'indicateur appartiendra à la famille des radioisotopes à propos desquels A. Kohn a écrit : *"Introduire quelque-part des radioisotopes, cela revient à attacher un grelot au cou de certains atomes... où qu'arrivent ceux-ci, engagés dans n'importe quelle combinaison chimique, le grelot, toujours tintant signalera leur présence."* A ceci près que, dans notre cas, chaque grelot ne tinte qu'une seule fois mais que cela suffira si l'on a placé au-dessus une gélatine contenant des ions argent. L'émission d'un électron sera à même de réduire un de ces ions en argent métallique et pourra être définitivement matérialisée et conservée par le traitement chimique du développement photographique.

l'introduction
d'indicateurs dont
le grelot ne tinte
qu'une fois

- L'incubation "in vitro" de tranches de pancréas

Sans être directement commandée par un modèle, cette technique repose sur les concepts de théorie cellulaire et de milieu intérieur qui permettent de concevoir la vie des cellules (unités fonctionnelles relativement autonomes) en dehors de l'organisme, pour peu qu'on leur fournisse un milieu de survie proche du milieu intérieur. Il est intéressant de penser que, si un modèle est intervenu ici, c'est à la fin du 18ème siècle lorsque le modèle technologique qui permettait de se représenter l'organisme a été détrôné par un modèle sociologique communautaire : la république des cellules. C'est en effet ce changement de modèle qui a permis l'élaboration de la théorie

expérimenter sur
des cellules
séparées de
l'organisme

-
5. Guy RUMELHARD, "Statut et rôle des modèles dans le travail scientifique et dans l'enseignement de la biologie", *Aster*, INRP, n° 7, 1988, 21
 6. Georges CANGUILHEM, *La connaissance de la vie*, Paris, Vrin, 1980

cellulaire. Se libérant des contingences de l'organisme entier (dilution du traceur, temps de mise à disposition aux cellules de ce dernier trop long), ils sont à même de réaliser la technique suivante.

- La technique du "pulse"

Elle va permettre le marquage des protéines sécrétoires grâce à la mise à disposition des cellules d'un marqueur radioactif en quantité importante pendant un temps très court. Elle nécessite la réalisation d'une "chasse" efficace.

- La technique du fractionnement cellulaire

En isolant les organites cellulaires les uns des autres, cette technique permet de suivre le trajet de la radioactivité à l'intérieur de la cellule, ceci en coopération avec l'autoradiographie.

- La technique de l'extraction biochimique

Elle permet d'extraire d'une façon spécifique :

- soit les **protéines totales** des tranches de pancréas
- soit les **protéines sécrétoires** des différentes fractions cellulaires fournies par le fractionnement.

Ce dernier point est **capital** car il permet de s'assurer que le trajet intracellulaire de la radioactivité correspond bien à celui des protéines sécrétoires synthétisées à partir du marqueur fourni et non pas à celui du marqueur libre ou à toute autre molécule radioactive.

3.2. La technique d'autoradiographie et ses limites.

visualiser un phénomène

recherche dominante d'une satisfaction intellectuelle

toute technique, malgré ses insuffisances...

En 1967, l'autoradiographie est suffisamment performante pour permettre la visualisation du trajet des molécules dont nous voulons étudier le transport intracellulaire, même si elle présente certaines limitations que nous devons connaître pour interpréter les images qu'elle nous donne. Ces limitations ont trait à son pouvoir de résolution. En effet, il arrive parfois que la taille des grains d'argent soit supérieure à la taille des organites au-dessus desquels ils sont situés. Ainsi les plus petits grains d'argent ont un diamètre de $0,1\mu$ alors que le diamètre de certaines vacuoles lisses à la périphérie du Golgi est de $0,05\mu$. Il devient alors impossible d'affirmer que le marqueur se trouve bien dans l'organite considéré et non dans le hyaloplasme. A cela nous pouvons ajouter le trajet oblique des rayons β^- qui vont réduire des cations Ag^+ à une certaine distance de leur source.

Ceci étant dit les résultats du document 2 nous paraissent d'une interprétation limpide. Ce sont d'ailleurs ces résultats traduits sous forme de courbes qui servent de support à la plupart des exercices proposés aux élèves.

Document 2.**Distribution des grains d'argent au dessus des composants cellulaires**

	% de grains d'argent					
	3-mn pulse	temps de chasse				
		+7mn	+17mn	+37mn	+57mn	+117mn
Reticulum Endoplasmique rugueux	<u>86,3</u>	43,7	37,6	24,3	16,0	20,0
Appareil de Golgi*						
microsome lisse	2,7	<u>43,0</u>	37,5	14,9	11,0	3,6
vacuoles de condensation	1,0	3,8	19,5	<u>48,5</u>	35,8	7,5
Grains de zymogène	3,0	4,6	3,1	11,3	32,9	<u>58,6</u>
Lumière de l'acinus	0	0	0	0	2,9	7,1
Mitochondries	4,0	3,1	1,0	0,9	1,2	1,8
Noyaux	3,0	1,7	1,2	0,2	0	1,4
Nbre de grains comptés	300	1146	587	577	960	1140

* A aucun moment il n'a été trouvé un nombre significatif de grains d'argent en association avec les saccules golgiennes.

Ces résultats nous montrent que le % de grains d'Ag est d'emblée maximum au-dessus du RER juste après le pulse ; puis que ce % décroît au-dessus du RER pour croître en même temps au-dessus des petites vésicules périphériques golgiennes.

Celles-ci voient à leur tour leur % décroître au profit de celui observé au-dessus des vacuoles de condensation qui ne tardent pas à perdre leur radioactivité alors que celle des grains de zymogène augmente.

Tout naturellement ces résultats se prêtent à l'interprétation classique : si la radioactivité est d'emblée maximum **dans** le RER c'est parce que la cellule y synthétise ses protéines sécrétoires.

...peut faire naître
des hypothèses
fécondes

Ces protéines se déplacent ensuite comme **une seule vague** du RER aux vésicules périphériques du Golgi, puis de ces vésicules aux vacuoles de condensation puis aux grains de zymogène sans jamais passer par le hyaloplasme.

Mais il faut être conscient que cette interprétation nécessite deux **présupposés implicites** que l'élève ne formule pas. Quels sont-ils ?

ce qu'on voit
n'est pas toujours
ce qu'on croit
être

- Les grains d'argent identifieraient la radioactivité des protéines sécrétaires synthétisées à partir du marqueur.

Or l'autoradiographie n'en donne pas la preuve absolue à elle toute seule. Les grains d'argent révèlent la présence du marqueur un point c'est tout ! Il peut être ou ne pas être incorporé dans une protéine. Et si c'est le cas comment savoir s'il s'agit d'une protéine sécrétaire et non pas d'une protéine membranaire ?

ce qu'on a appris
n'a pas toujours
été évident

- Il n'existerait qu'un seul lieu de protéosynthèse : le RER. Là encore la seule technique d'autoradiographie qui consiste à suivre un marqueur fourni aux cellules sans autres précautions ne permet pas de réfuter l'hypothèse supposant la pluralité des lieux de synthèse. La cellule pouvant continuer à incorporer le marqueur tout au long de l'expérience. Ce faisant si on retrouve de la radioactivité dans l'appareil de Golgi 20 mn après la mise à disposition du marqueur, celui-ci continuant à être disponible dans la cellule, rien ne s'oppose à ce que les protéines aient été synthétisées à partir de ce dernier dans le Golgi.

Nous voyons donc qu'il **faut apporter les preuves expérimentales de la véracité de ces présupposés**. Ce n'est qu'à ce prix que l'interprétation classique deviendra la seule possible.

Ces preuves vont nous être fournies par les résultats des travaux de Jamieson et Palade.

3.3. Méthodes et résultats

- Les techniques biochimiques

- Ils prélèvent les pancréas sur des cobayes à jeun depuis 27 heures. Chaque pancréas fournira à peu près 30 tranches, chaque tranche pesant environ 50 mg et mesurant 0,5 x 7 x 5 mm. Toutes les opérations de découpage sont effectuées à 4° C.

- Les tranches sont mises en incubation dans une solution de Krebs-Ringer à pH 7,6 avec 95 % d'O₂, 5 % de CO₂ et 14 mM de glucose. Ce milieu de survie reçoit un complément de tous les L-acides aminés, sauf la L-leucine froide, au moment du pulse.

- Ils vont ensuite s'assurer que ces tranches restent capables de prélever à partir du milieu de survie de la leucine 14 C et de l'incorporer à l'intérieur des protéines cellulaires. Pour cela huit tranches sont mises à incuber dans le milieu de survie dans lequel on a ajouté la leucine radioactive plus le complément

d'acides aminés. Huit autres tranches sont mises à incuber dans le même type de milieu exception faite du complément d'acides aminés. Les protéines totales des tranches sont extraites après 1, 2, 3 et 4 heures d'incubation.

Il est **indispensable** pour pouvoir interpréter sans équivoque les résultats ultérieurs, de connaître les techniques d'extraction biochimique utilisées par les auteurs. Pour simplifier, la tranche de pancréas après broyage et homogénéisation au mixer, ou la fraction cellulaire étudiée subit l'action de l'acide trichloracétique (TCA) qui a pour action de précipiter toutes les protéines, celles-ci pourront donc être qualifiées de fraction biochimique - **TCA insoluble** - alors que toutes les molécules protidiques non précipitées correspondant aux acides aminés seront appelées fraction biochimique - **TCA soluble** - libre. A cela s'ajoute l'extraction **spécifique** en milieu alcalin (NAC, NaHCO_3 , pH 8,4) des **protéines sécrétoires** à partir des différentes fractions cellulaires.

Le taux d'incorporation du marqueur va ensuite être quantifié grâce à la mesure de l'**activité spécifique** (A.S.) de la fraction TCA insoluble extraite des tranches pancréatiques.

- Unité de mesure

Il nous faut maintenant définir cette grandeur. Pour cela voyons comment nous l'obtenons.

Les protéines de chaque fraction sont donc extraites par précipitation à l'acide trichloracétique (TCA), puis pesées. La radioactivité de l'échantillon est mesurée par comptage au compteur à scintillations, ce qui donne l'activité de l'échantillon en coups par minute (cpm). L'activité spécifique de l'échantillon est obtenue en divisant l'activité de l'échantillon par la masse de protéines en milligrammes, elle sera donc exprimée en **cpm/mg**. Cette unité, est importante car elle permet de comparer la radioactivité des protéines extraites de différentes fractions à différents moments. Mais on divise cette activité spécifique par la masse du pancréas en gramme afin de pouvoir comparer les différentes valeurs obtenues à partir de différents animaux.

La valeur de l'activité spécifique se référant à la radioactivité d'un milligramme de protéine, on peut dire qu'elle se réfère à un nombre constant de molécules de protéines. Si l'A.S. croît, c'est parce que le nombre de molécules d'acides aminés radioactifs incorporés dans un même nombre de molécules de protéines croît. Du fait de leur concentration croissante, lors de leur diffusion, les acides aminés radioactifs deviennent de plus en plus nombreux à être disponibles pour la protéosynthèse. L'évolution de la valeur de l'A.S. ne permet donc pas de savoir si le nombre de molécules de protéines augmente par unité de temps. On ne peut donc pas dire que la protéosynthèse est stimulée par l'injection d'acides aminés radioactifs, comme l'HYP3 des élèves le prétend.

Nous voyons donc que les techniques biochimiques spécifiques de l'extraction des protéines ainsi qu'un système

surtout, rendre les résultats comparables !

tout ceci permettant de tester la troisième hypothèse des élèves...

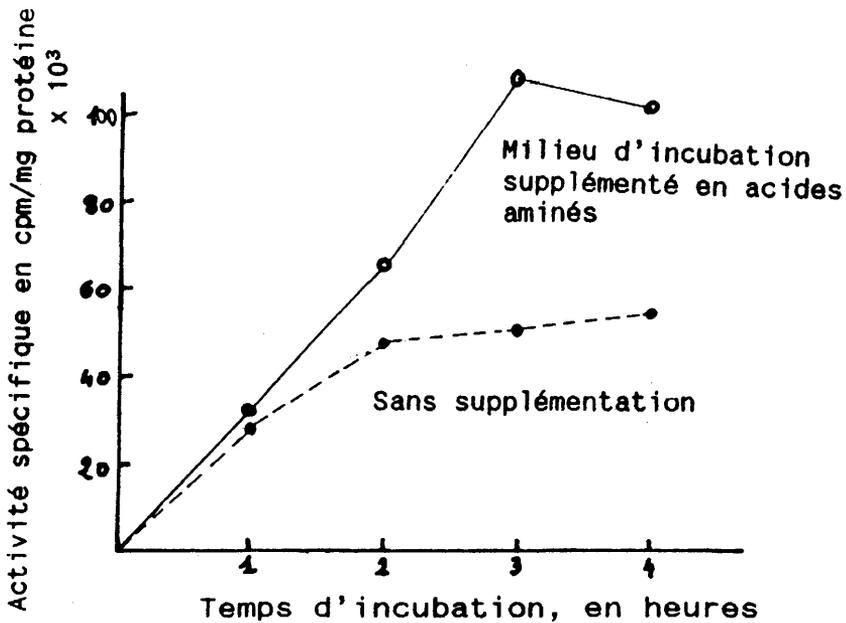
d'unités rigoureux permettent de faire correspondre, sans ambiguïté, la radioactivité mesurée à la quantité de protéines ayant incorporé le précurseur, que l'on peut alors suivre à la trace à l'intérieur des différents compartiments cellulaires.

mais aussi les deux premières

Leur maîtrise permet de démontrer alors la véracité du premier présupposé indispensable à l'interprétation classique des résultats autoradiographiques. De plus, ces renseignements techniques fournis, les élèves n'ont donc plus à prendre en compte le suivi éventuel de la radioactivité du traceur libre ou de toute autre molécule ayant hérité de l'atome radioactif par interconversion métabolique (HYP1 et HYP2).

Les courbes du document 3 traduisent les résultats obtenus.

Document 3. Cinétique de l'incorporation de L. Leucine ^{14}C à l'intérieur de tranches de pancréas.



Chaque point est donné par la mesure de l'Activité Spécifique des protéines extraites de deux tranches. Interprétation : voir texte.

Ceux-ci montrent que les tranches en survie sont tout à fait capables d'incorporer le traceur fourni et ce, d'autant plus activement qu'un complément d'acides aminés leur est fourni. Les causes de l'arrêt de l'incorporation au bout de trois heures ne sont pas connues. La conséquence de ces résultats est que la majorité des expériences réalisées ensuite le furent en utilisant un milieu de survie supplémenté en acides aminés.

• Technique du "pulse"

S'étant assuré que les cellules continuaient à fonctionner normalement en dehors de l'organisme pendant un laps de temps suffisant, on peut ensuite procéder à la mise en oeuvre du "PULSE" dont voici la description rapide.

- Huit tranches sont mises à incuber pendant 10 mn à 0°C dans une fiole de 50 ml contenant le milieu de survie plus le marqueur (L.Leucine ¹⁴ C).

- La fiole est ensuite mise au bain-marie à 37°C pendant 3 mn.

- Puis les tranches sont sorties du milieu chaud et **rincées** avec un nouveau milieu d'incubation où la Leucine C est remplacée par de la Leucine froide en concentration 800 fois supérieure. Ce milieu correspond au milieu de **chasse**.

Deux tranches sont immédiatement broyées et subissent le fractionnement cellulaire (voir plus loin).

La valeur de l'A.S. de chaque fraction correspondra à celle du temps zéro de l'expérience : zéro minute d'incubation dans le milieu de chasse.

- Les six autres tranches sont mises à incuber dans le milieu de chasse pendant un temps variable 7, 17, et 57 minutes. Le fractionnement cellulaire couplé à l'extraction biochimique effectuée sur deux tranches à la fin de chaque échéance d'incubation devant fournir des résultats permettant de suivre les protéines synthétisées pendant le pulse, à l'intérieur des divers compartiments cellulaires.

Si l'activité spécifique régresse au niveau du RER (voir document 3) c'est parce qu'il y a de moins en moins d'acides aminés marqués disponibles dans la cellule après le pulse, mais la protéosynthèse n'en est pas moins arrêtée pour autant. S'il n'y avait pas de chasse, l'incorporation du marqueur se poursuivrait. L'activité spécifique se maintiendrait constante et on obtiendrait une courbe orientée de façon voisine à l'axe des abscisses qui ne régresserait qu'à l'épuisement de tout le stock de marqueur. Ceci traduisant un certain équilibre entre la synthèse au niveau du RER et l'exportation hors de cet organite.

Quoi qu'il en soit, les résultats ne seront interprétables sans équivoque qu'à une seule condition : **la cellule ne doit plus incorporer de marqueur après les 3 mn d'incubation sur milieu chaud, c'est-à-dire après le pulse. Si ce n'est pas le cas, toute variation de la radioactivité d'un organite pourra être interprétée en terme de transfert mais également en terme de synthèse, d'où l'équivoque.**

le pulse,
technique
indispensable, si
mal connue dans
les lycées

sans pulse, pas
d'analyse d'un
moment de la
protéosynthèse

Jamieson et Palade vont vérifier les conséquences de chaque étape du pulse sur l'incorporation du marqueur.

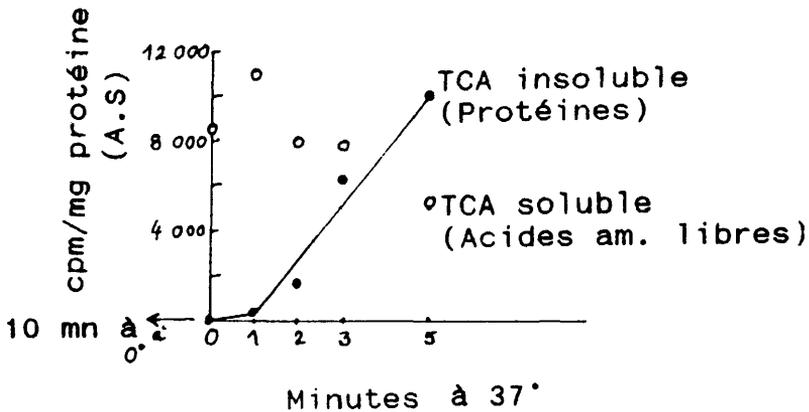
3.4. Expériences de vérification

Pour cela ils procèdent à l'extraction des protéines totales et des acides aminés libres des tranches à la fin de chaque étape.

- Conséquences de l'incubation de 10 mn à 0°C sur milieu chaud

Document 4.

Incorporation de la L. Leucine ^{14}C à l'intérieur des fractions biochimiques TCA soluble et insoluble de tranches de pancréas pendant les 5 premières minutes d'incubation dans le milieu de pulse.



Interprétation : voir texte.

On notera qu'au temps 0 il n'y a pas d'incorporation (A.S. TCA insoluble = 0 cpm/mg) ainsi qu'une forte diffusion du traceur (A.S. TCA soluble = 8000 cpm/mg). Il s'agit donc d'une mise en charge du cytoplasme avec le traceur libre.

- Conséquences de l'incubation de 3 mn à 37° C sur milieu chaud (Voir document 4)

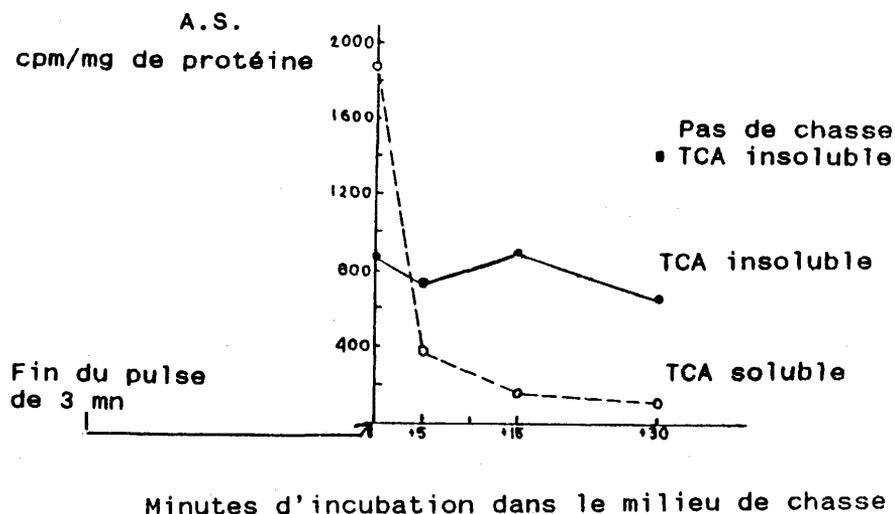
L'A.S. des protéines passe de 0 à 6000 cpm/mg : l'incorporation a donc lieu de façon active ce qui déclenche la diminution de l'A.S. des acides aminés libres qui passe de 11 000 à 8000 cpm/mg. L'incorporation continue avec la même vitesse au-delà de

trois minutes comme le montre la valeur de 10 000 cpm/mg pour l'A.S. des protéines après cinq minutes d'incubation.

- Conséquences du transfert dans le milieu de chasse
(Voir document 5)

Document 5.

Evolution de l'A.S. des différentes fractions biochimiques extraites des tranches de pancréas en fonction du temps d'incubation dans le milieu de chasse (cercles pleins et vides).



Pour le témoin (carré plein) les tranches après les 3' de pulse sont mises à incuber dans un milieu froid mais sans excès de leucine froide. Interprétation dans le texte.

Un témoin sans excès de leucine froide (pas de chasse) nous permet de vérifier les conséquences de l'excès de leucine froide :

- Sur le milieu de chasse, très rapidement (5 mn), l'A.S. des acides aminés libres cytoplasmiques diminue, elle passe de 1800 à 400 cpm/mg. Le traceur devient alors **non disponible pour la synthèse d'autres protéines**. L'A.S. des protéines devrait donc rester constante en se maintenant à la valeur qu'elle avait à la fin de l'incubation de 3 mn à 37° C sur milieu

chaud. C'est ce que l'on observe en mesurant l'A.S. de la fraction TCA insoluble pour 5, 10, 30 minutes d'incubation sur milieu de chasse.

- Le témoin nous montre que le lavage puis le transfert sur milieu non radioactif sans excès de leucine froide ne permet pas de stopper l'incorporation, car dans ce cas l'A.S. des protéines ne cesse d'augmenter.

Les résultats de la vérification des caractéristiques du pulse effectué sur ce système de tranches incubées in vitro nous démontrent la véracité du second présumé nécessaire à l'interprétation classique des résultats radio-autographiques. En effet grâce à ce **véritable pulse**, (c'est-à-dire la mise à disposition des cellules des tranches, d'un précurseur radioactif pendant un temps très court si possible toujours le même, ici trois minutes), nous sommes certains que la cellule n'incorpore plus de marqueur au-delà de trois minutes. De ce fait une petite quantité de protéines se trouve être synthétisée et c'est le transfert de cette dernière que nous allons pouvoir suivre à l'intérieur de la cellule.

Toute modification de la radioactivité d'un organite ne pourra donc être due qu'à un transfert de ce contingent de protéines marquées et non pas à une néosynthèse car après le pulse on est sûr qu'il n'y a plus de marqueur disponible dans la cellule.

Nous comprenons alors que la possession de ces renseignements techniques et de ces résultats doit éviter aux élèves d'émettre certaines HYPOTHESES :

- HYP1 : suivi du marqueur libre - voir conséquences de la chasse.
- HYP4 : pluralité des lieux de protéosynthèse - voir conséquences du véritable pulse.

Pour être complet il faut tirer une autre conclusion de ces résultats. En effet si la masse de protéines radioactives reste constante pendant 30 mn après le pulse cela veut dire que ces protéines ne sont pas hydrolysées pendant ce laps de temps. L'interprétation la plus simple veut que ces protéines aient une durée de vie supérieure à 30 mn. Les élèves n'auront donc plus à envisager l'HYP 5 qui voulait que la diminution de la radioactivité du RER soit due à une hydrolyse des protéines et que l'augmentation de cette même radioactivité au niveau des vésicules golgiennes soit due à une resynthèse de ces protéines utilisant la totalité de la leucine radioactive ayant été incorporée auparavant.

• Fractionnement cellulaire

Les protéines radioactives synthétisées pendant le pulse vont pouvoir être suivies à l'intérieur de la cellule grâce au fractionnement cellulaire et à l'autoradiographie.

Dans la mesure où le fractionnement cellulaire est couplé à l'extraction biochimique cette technique fournit, nous allons le

montrer le
transfert exige
d'éliminer le
marqueur libre

pas d'hydrolyse
des protéines
avant 30 mn

voir, des résultats plus nombreux avec une grande rigueur scientifique.

En 1967 cette technique est très au point et permet grâce à l'utilisation d'un **gradient de centrifugation** d'isoler les petites vésicules lisses de la périphérie du complexe golgien que Jamieson et Palade soupçonnent d'être responsables du transfert des protéines du RER aux grains de zymogène. Cette technique est donc à même de fournir les fractions suivantes :

- Noyaux : "n"
- Mitochondries : "mt"
- Grains de zymogène : "gz"
- Microsome rugueux : "mcr" (RER)
- Microsome lisse : "mcl" (vésicules lisses golgiennes)
- Post microsome : "pmc" (ribosomes libres)
- Surnageant : "spt" (hyaloplasme)

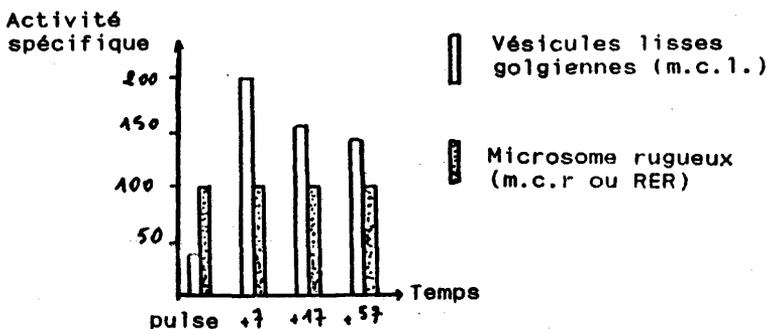
Les protéines de chaque fraction sont extraites puis comptées. Sur les fractions où les variations d'A.S. en fonction du temps sont considérables, à savoir "mcl", "mcr", et "gz", les auteurs vérifient qu'il s'agit bien des protéines enzymatiques vouées à l'exportation et non pas des protéines membranaires, grâce aux résultats de l'extraction biochimique en milieu alcalin qui supprime la quasi totalité de l'A.S. de ces fractions. Cette technique d'extraction, rappelons-le, est connue pour solubiliser spécifiquement les protéines enzymatiques sécrétoires.

Les résultats obtenus pour 0, 3, 7 et 17 minutes de chasse après la fin du pulse permettent de suivre sans ambiguïté la cinétique du transport des protéines du RER aux vésicules lisses du Golgi.

Les mesures d'activité spécifique montre de façon **reproductible** que si tout de suite après la fin du pulse l'A.S. du microsome rugueux est supérieure à celle du microsome lisse, le rapport s'inverse 7 minutes après (voir document 6).

protéines
enzymatiques
excrétoires et
extraction en
milieu alcalin

Document 6. Activité spécifique de vésicules golgiennes en pourcent. de celle du reticulum rugueux



(3mn) durée d'incubation en milieu de chasse (mn)

démonstration définitive du transfert

La **perte absolue** de protéines radioactives par le RER, peut être tout à fait expliquée par le gain en protéines radioactives des vésicules lisses golgiennes car il y a **correspondance quantitative** entre les pertes du premier et les gains du second.

3.5. Des recherches originales, aux exercices d'évaluation

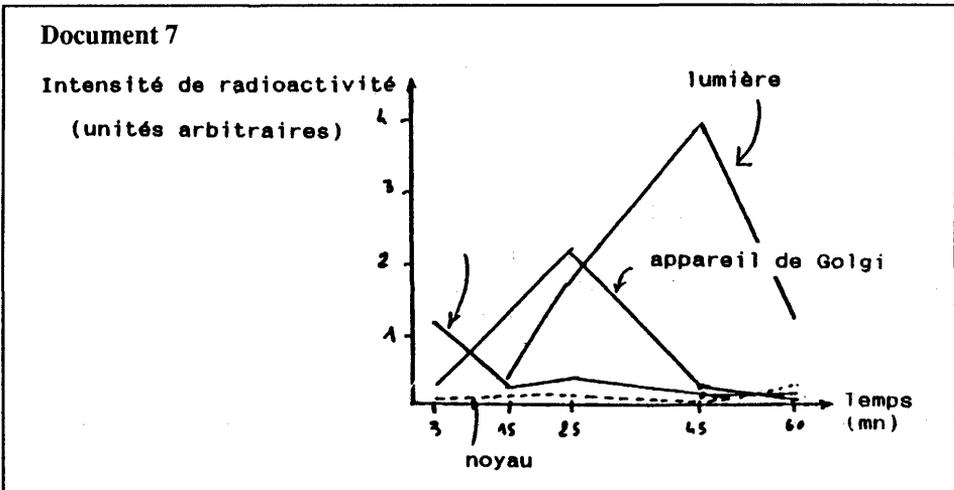
la constance de la radioactivité globale

Tous ces efforts de démonstration peuvent sembler anecdotiques. Le principe qui les sous-tend est cependant capital : lors d'une étude comparée des courbes, la rigueur exige que l'on trouve, à chaque instant, la **même** quantité de radioactivité en calculant la somme des radioactivités déterminées à partir de chacune des courbes.

Pourtant ce principe n'est quasiment plus respecté par les chercheurs 10 ans plus tard. En effet, ceux-ci considèrent que les mécanismes de protéosynthèse et de transfert intracellulaire des protéines sont démontrés, ils ne se préoccupent plus des valeurs d'A.S. obtenues. Ils estiment que le simple fait d'obtenir, sur un autre organe (la glande mammaire par exemple) des courbes "voisines" de celles obtenues par Palade sur le pancréas, suffit pour démontrer l'existence de mécanismes semblables.

ne se retrouve pas toujours

Lors de la construction de sujets de Baccalauréat, les documents sont souvent tirés directement des travaux de chercheurs qui n'étudient plus forcément la protéosynthèse et le transport intracellulaire des protéines mais l'action de telle ou telle drogue sur ces mécanismes. Soumis à des élèves scrupuleux, ces documents peuvent poser problème car on n'y trouve pas, à chaque instant, la constance de la radioactivité globale qui tenait tant à coeur à Palade. La courbe suivante, document 7, extraite d'un sujet de Terminale D (1984, Versailles), illustre ce propos. Les résultats qu'elle exprime sont relatifs à la synthèse et à l'excrétion des protéines du lait chez un mammifère.



Chez Palade, la rigueur scientifique est parfaitement respectée. Si le **pulse** avait duré plus de trois minutes, de la fin de ce présumé pulse jusqu'au premier prélèvement (7 mn de chasse), les auteurs n'auraient pas pu mettre en évidence une diminution de l'activité spécifique du **RER contemporaine** de l'augmentation de celle des vésicules lisses golgiennes. Au contraire, ce dernier aurait continué à incorporer, d'où une augmentation, voir une constance de son activité spécifique, du temps 0 au temps + 7 mn. **L'existence du transfert ne se trouverait pas alors démontrée de façon aussi univoque, aussi rigoureuse**, d'autres hypothèses pourraient encore être avancées telles les hypothèses 4 et 5 des élèves.

Grâce au pulse, ce n'est plus le cas. En effet, lorsque les protéines radioactives apparaissent dans le Golgi, soit 7 mn après la fin du pulse, celui-ci ne peut absolument pas incorporer de traceur dans de nouvelles protéines **puisqu'il n'y a plus de marqueur disponible** (voir document 5).

A cet argument s'ajoute la preuve capitale apportée par les résultats des travaux de 1967, à savoir **l'égalité entre la quantité de protéines perdue par le RER et la quantité de protéines gagnée par le micrososome lisse**.

Désormais, connaissant de façon précise les travaux originaux, il nous est facile de replacer l'exercice dans le contexte expérimental et de mesurer le travail simplificateur de son constructeur.

Ce travail a consisté à isoler les différentes techniques les unes des autres pour n'en privilégier qu'une seule, l'**autoradiographie**. **Sans doute parce qu'elle semble plus pédagogique dans la mesure où elle satisfait la fonction sensorielle que nous prions le plus : la vision**.

Cette technique est supposée connue ou facilement assimilable. On simplifie donc sa présentation en élaguant certains de ses composants.

Ce travail d'élimination révèle l'espérance d'obtenir une seule réponse de l'élève, extirpée du cours. Or si le graphique est bien issu de l'autoradiographie, son interprétation, nous l'avons démontré, n'est possible qu'à travers la connaissance de tous les résultats fournis par les techniques "annexes". En effet loin d'isoler l'autoradiographie de la technique fractionnement cellulaire/ extraction biochimique, Palade et coll. utilisent la dialectique existant entre ces deux techniques : le fractionnement cellulaire en détruisant les rapports anatomiques entre les composants cellulaires leur enlève toute personnalité. Ainsi une forte A.S. à + 7 mn dans le micrososome lisse ne signifie pas obligatoirement que ce micrososome lisse corresponde aux petites vésicules lisses de la périphérie du Golgi. D'autres petites vésicules lisses existent dans ces cellules. Pour soulever l'indétermination Palade a recours aux résultats de l'autoradiographie. Cette dernière indique, pour le même temps de chasse, une forte radioactivité au niveau des vésicules lisses de la périphérie du Golgi et nulle part ailleurs. Mais elle ne peut pas dire si cette radioactivité correspond aux protéines sécrétoires

une simplification
dangereuse...

intravésiculaires. C'est le fractionnement cellulaire qui le dira et qui en prenant en compte l'élimination par l'autoradiographie des autres petites vésicules lisses, pourra affirmer qu'il s'agit bien de protéines sécrétées à l'intérieur des petites vésicules lisses péri-Golgiennes.

Les chercheurs, méticuleux, ont opéré de façon à répondre à un certain nombre de questions et c'est l'ensemble de leurs résultats qui a produit le document, et non pas la seule technique d'autoradiographie : rien n'est dissociable.

Simplifier ne peut consister à supprimer un des composants nécessaires à la compréhension de l'ensemble.

Les interprétations, les hypothèses proposées ne correspondent pas à la réponse attendue par le correcteur car celui-ci en éliminant (consciemment ?) les techniques "annexes" a éliminé d'office, de ses exigences, les interprétations "annexes" dont il n'a, du reste plus conscience. Il est donc tenté de mal juger la copie de l'élève.

où le dogme
menace

Le cours apporte bien la "bonne réponse" et l'élève devrait s'y référer. Mais dans un contexte expérimental particulier et nouveau, plus ou moins bien précisé, l'élève ne retrouve pas toujours spontanément le bon fil conducteur. Il lui manque les éléments nécessaires pour éliminer certaines hypothèses que le document l'amène à formuler.

De plus, on attend de l'élève une interprétation **qualitative** du document alors qu'on lui donne un cadre de réflexion **quantitatif** (compliqué parfois par des ordonnées exprimées en "unités arbitraires" inexploitable).

On ne travaille pas non plus sur des vitesses, ce que la variable "temps" en abscisse laisse croire. On ne doit utiliser que le fait que les acides aminés marqués apportent des informations spatiales en fonction du temps, ceci donnant l'idée d'un déplacement. En fait, il faut se créer une représentation du phénomène à partir des résultats qui suggère l'**image d'une vague** qui se déplace. Le risque est de concevoir un phénomène qui débute, s'amplifie, puis diminue et s'arrête. Il faut, au contraire supposer le phénomène constant (ce que les travaux ont démontré (7)), et que seule la fraction marquée présente cet aspect.

quand le
marquage
temporaire des
protéines fait des
vagues

En prolongement de notre réflexion, on pourrait s'interroger sur les capacités d'analyse d'un élève qui aurait fourni la bonne réponse sans repérer un seul des problèmes posés par le graphique...

Quoiqu'il en soit, on est conduit à penser que la description des conditions d'expériences aurait fourni aux élèves un cadre précis hors duquel ils n'auraient pu divaguer. Mais nombre de collègues vont penser alors que la prolifération des détails

7. M.M. DALY, A.E. MIRSKY, "Formation of protein in the pancreas", *Journal of genetic and physiology*, 36, 1952, 243

donner des
précisions
techniques : une
solution non
reconnue de tous

techniques va alourdir l'énoncé, le rendant difficilement assimilable ou inversement, le rendre trop facile à interpréter puisque les élèves pourraient être étroitement guidés vers la "bonne réponse". Tout est affaire de tempérament !

En ce qui nous concerne, nous faisons nôtre le texte suivant extrait des "Objectifs et procédures d'évaluation - 1ère A et B" (8).

Voici un professeur de la classe de 1ère B, qui a fait un cours sur les aliments. Lors du contrôle, il donne à interpréter des courbes de croissance de rats carencés. Aucune séance de travaux pratiques n'a comporté ce travail personnel sur l'analyse de courbes... Au sens le plus simple, il (l'élève) a "compris" : il est capable de redire dans ses mots les idées reçues. Mais il ne sait pas, ipso facto, transférer ses acquis dans une situation nouvelle. Ce transfert suppose un entraînement, sur divers exemples, dont on fait souvent l'économie, faute de temps. Ne nous étonnons pas des échecs. Personne n'est responsable... Mais alors pourquoi évaluer ce que l'on n'a pas enseigné ?

Toutes les remarques précédentes montrent que cet exercice est délicat à utiliser en évaluation sommative, sans précaution particulière. Par contre, il peut constituer un excellent instrument de sollicitation de l'imagination, de la rigueur, s'il est proposé en travaux pratiques tel quel. Chaque proposition d'élève peut constituer un prétexte pour apporter les précisions techniques complémentaires et ainsi dévoiler progressivement tout ce qui se "cache derrière" le graphique. En fin d'analyse, il devient facile d'en tirer les éléments théoriques essentiels et de construire le cours.

l'étude historique
peut rendre
confiance à
l'élève

Mais, le plus frappant est de constater que des **élèves** confrontés à ce document **se posent** des questions que les **chercheurs se sont eux-mêmes posés et qu'ils ont dû résoudre**. Le fait qu'il y ait correspondance entre les interprétations d'élèves et les interrogations des chercheurs devrait nous amener à plus de bienveillance dans le jugement de la valeur de la copie de l'élève. Pour apprécier davantage la qualité des propositions des élèves, il faudrait avoir clairement à l'esprit **les hypothèses** des chercheurs. Celles-ci n'ont pas été soulignées lors de l'exposé des travaux de 1967. Présenter ces travaux de façon tronquée peut être nuisible car les élèves n'ont que trop tendance à penser qu'on va directement d'un problème à une expérience. Bref, il peut sembler que ces travaux n'ont pas été dépassés, ce qui est faux.

éviter les
simplifications

C'est pourquoi nous proposons une étude historique rapide de la cellule sécrétrice (pancréatique, essentiellement) pour mieux dégager les hypothèses testées et mesurer l'intérêt des propositions des élèves.

8. "Sciences naturelles en 1ère A-B, I- Objectifs et procédures d'évaluation", Education Nationale, Direction des Lycées et Collèges

4. PERSPECTIVE HISTORIQUE : ÉVOLUTION DE LA BIOLOGIE CELLULAIRE

4.1. Évolution des stratégies de recherche

Le pancréas, exploré très tôt par Claude Bernard (9), devra attendre comme beaucoup d'autres organes, le grand tournant technologique fin 40 - début des années 50 pour être analysé de façon approfondie après avoir été seulement et pendant très longtemps scruté au travers d'un microscope.

Au niveau d'une cellule, la multiplicité des fonctions qui la maintiennent en vie permet de lui appliquer, par transposition avec changement d'échelle (10), un modèle proposé par C. Bernard pour l'organisme. Celui-ci serait un **"modèle économique** : *la division du travail est la loi de la société comme de l'organisme dont les cellules sont des unités fonctionnelles virtuellement autonomes. L'organisme complexe est constitué de la réunion de ces unités élémentaires. Il assure les conditions de leur vie et la coordination de leurs fonctions.*"

au départ, le schéma de Claude Bernard

Ainsi, il semble que les chercheurs aient abordé l'étude d'une cellule sécrétrice avec ce schéma en tête. Une cellule pourrait aussi être un ensemble d'édifices moléculaires spécialisés et distincts (= organites) mais aux fonctions dépendantes et donc coordonnées.

Ce **compartimentage hypothétique de départ**, que l'observation au microscope photonique laissait espérer, propose une interprétation possible des clichés obtenus au microscope électronique. Comment comprendre tout ce monde de membranes changeantes ? Autant de voiles cachant d'obscures fonctions ?

Pourtant, contrairement au modèle technologique où chaque pièce est indispensable et ne peut fonctionner qu'avec l'ensemble, la transposition du modèle cellulaire permet d'imaginer une possible séparation des organites les uns des autres et leur mise en fonctionnement à l'état isolé. Dans le cadre de ces hypothèses, on a cherché à accélérer les vitesses de centrifugation pour disséquer la cellule et **séparer ses composants** de différente densité. On s'est également assuré de la relative pureté de ces extraits par leur observation au microscope électronique. On a aussi cherché à caractériser chimiquement ces extraits.

Ainsi, Daly et Mirsky (11) déterminent le contenu enzymatique du pancréas de Souris. Ils évaluent les modifications de ce

9. Claude BERNARD, *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1, 1856, supplément 379.

10. Ibid (6), page 70

11. Ibid (7)

un autre
argument
répondant à la
troisième
hypothèse

contenu pendant le cycle de sécrétion et de synthèse, déclenché par un jeûne suivi d'une période d'alimentation ou d'une injection d'un parasymphatico-mimétique. La prise d'un repas (ou la présence de peptones dans le duodénum) active la sécrétion et donc la synthèse présentant entre les repas un rythme lent et régulier. **L'injection d'un acide aminé radioactif ou non, dans le sang ne semble pas activer le pancréas.**

Ces informations permettent de reconsidérer l'hypothèse 3 des élèves ; celle-ci ne peut être rejetée qu'à partir du moment où l'on connaît ces travaux. Le pancréas est déjà en activité, lente ou rapide, lorsque l'on injecte l'acide aminé marqué et sa vitesse de synthèse reste constante. L'ignorance de ces faits contribue à construire une image fautive du phénomène.

D'autre part, la mise à la disposition des chercheurs d'isotopes radioactifs divers permet à la cytochimie d'effectuer un gigantesque bon en avant par l'application de la méthode des indicateurs.

Il ne restait plus qu'à tester le modèle en appliquant deux techniques, "in vivo" mais aussi "in vitro" en **reconstituant un compartiment cellulaire** et en observant son fonctionnement dans **diverses conditions expérimentales.**

Par exemple, à partir de constituants cellulaires isolés de foie (mitochondries, reticulum et enzymes solubles), Siekevitz (12), en 1954, a créé in vitro un mélange capable d'incorporer des acides aminés radioactifs dans des protéines.

En 1955, J.W. LITTLEFIELD et coll. (13) montrent que les ribosomes (RNP ou particules ribonucléoprotéiques fixées aux microsomes) deviennent radioactifs **en premier** après injection in vivo d'un acide aminé radioactif, avant les microsomes et les protéines cellulaires (les microsomes désignant les membranes du RER). PALADE et coll. écrivent plus tard (14) : "*Cette découverte permet de considérer les ribosomes comme étant le siège le plus probable de l'incorporation des acides aminés.*"

PALADE, a choisi le pancréas pour sa production abondante d'hydrolases, tout en reconnaissant que les phénomènes de production de substances, de sécrétion pourraient différer du mécanisme général de synthèse des protéines intracellulaires.

SIEKEVITZ et PALADE (15) puis HOKIN pratiquent l'analyse biochimique des grains de zymogène et constatent la très grande

12. P. SIEKEVITZ, *Journal of biological chemistry* 195, 1952, 549

13. J.W. LITTLEFIELD, *Journal of biological chemistry* 217, 1955, 111

14. J. KIRSCH, G. PALADE, P. SIEKEVITZ, "Aminoacid Incorporation in vitro by ribonucleoprotein particles detached from Guinea Pig Liver Microsomes", *Journal of biological chemistry*, 235, n°5, 1960, 1419

15. G. PALADE, P. SIEKEVITZ, "Aminoacid Incorporation in vitro by ribonucleoprotein particles detached from Guinea pig liver Microsomes", *Journal of biophysical and biochemical cytology* 4, 1958, 203.

quantité d'enzymes (lipases, RNases, amylases et TAPases qui sont des enzymes activant le trypsinogène en trypsine). Ils pensent qu'il s'agit d'un dépôt temporaire d'hydrolases. **La fonction de certains organites se dessine.**

Siekevitz et Palade unissent les études anatomiques au microscope et les analyses biochimiques. Ils tentent de replacer sur les électrographies les pièces du puzzle constituées par les données biochimiques et les observations au microscope électronique des différentes fractions cellulaires comme les grains de zymogène par exemple.

Puis ils vont faire plus qu'observer et reconnaître, ils vont **influencer** l'activité cellulaire : une heure après avoir nourri l'animal (16), la fraction microsomiale montre une grande activité enzymatique (TAPase et RNase). L'observation microscopique des cavités du RER révèle davantage de granules "intracisternaux" en même temps qu'une activité enzymatique accrue dans la fraction microsomiale. Il y aurait selon eux, synthèse de nouvelles enzymes au niveau du RER et accumulation de ces mêmes enzymes, donc, il y aurait transfert cellulaire, mais par où ? ... Pour résoudre ce problème, ils ont l'idée de marquer les protéines par des acides aminés radioactifs et de les suivre par extraction biochimique dans les différentes fractions cellulaires. L'autoradiographie, à cette époque, est encore inapplicable à la microscopie électronique.

pour espionner
les protéines, leur
attacher une
casserole...

4.2. Recherches sur la protéosynthèse

• Etudes "in vivo"

En 1958, Siekevitz et Palade (17) étudient l'incorporation de leucine ^{14}C et entreprennent la vérification de l'hypothèse voulant que **l'augmentation de l'activité enzymatique d'une certaine fraction cellulaire après un repas soit due à une néosynthèse protéique plutôt qu'à une redistribution intracellulaire d'un vieux stock d'enzymes.**

Protocole expérimental :

Quatre cobayes à jeun depuis 48 heures reçoivent une injection intracardiaque de leucine ^{14}C , 15 minutes après le début de leur repas.

- le premier est sacrifié 5' après l'injection
- le deuxième est sacrifié 15' après l'injection
- le troisième est sacrifié 45' après l'injection
- le dernier est sacrifié 120' après l'injection.

16. Ibid (15) "Fonctionnal variations in the enzymatic activity of microsomes", 309

17. Ibid (15) "In vivo Incorporation of leucine-C14 into the proteins of cell fractions", 557

la protéosynthèse
dans les
pancréas de 4 co

Le pancréas est prélevé, pesé, broyé et fractionné. Le fractionnement cellulaire est effectué par centrifugation différentielle simple (le gradient de centrifugation n'est pas encore inventé) qui donne les fractions suivantes :

Noyaux ("n")

Grains de zymogène ("gz")

Mitochondries ("mt")

Microsomes ("mc"), correspondant au RER, c'est-à-dire les membranes, les contenus ainsi que les ribosomes attachés aux membranes

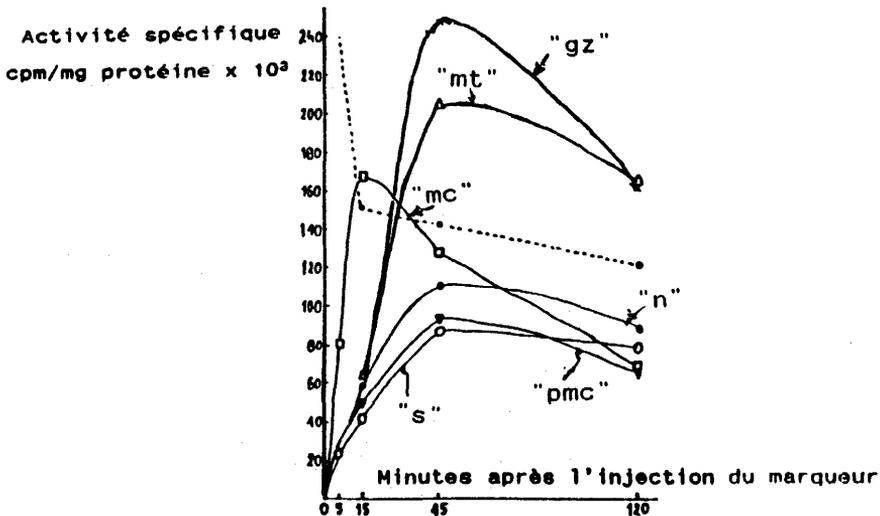
Post-microsomes ("pmc") correspondant aux ribosomes libres

Surnageant ("s") correspondant au hyaloplasme.

L'étude morphologique des fractions montre que les fractions lourdes sont hétérogènes : "gz" étant contaminées par "mt", "mt" étant contaminées par "gz" et "mc". Les fractions "mc" et "pmc" par contre sont relativement homogènes. Puis, pour repérer la présence et/ou la synthèse d'enzymes, ils mettent au point la mesure d'activité spécifique (voir les travaux de 1967). Ces techniques expérimentales étant connues, l'hypothèse faisant état du suivi de l'acide aminé libre radioactif ne peut être émise, mais on découvre que ce fut pour les auteurs une **préoccupation permanente jusqu'en 1967**. Les résultats sont consignés sous la forme du graphique du document 8.

Document 8.

Variations en fonction du temps de l'A.S. des protéines extraites des différentes fractions cellulaires obtenues à partir de pancréas de cochons d'Inde ayant subi au temps 0 une injection de leucine ^{14}C .



Initiales et interprétation : voir texte.

Nous voyons que 15 mn après l'injection du précurseur, l'A.S. maximum se retrouve dans la fraction "mc". Ceci montre clairement que la synthèse de nouvelles protéines existe et "qu'elle s'effectue **en priorité** au niveau du RER". On notera la prudence de cette conclusion qui n'exclut pas d'autres lieux de synthèse.

s'intéresser à la
synthèse d'une
seule protéine

En 1959, Siekevitz et Palade (18) suivent la synthèse du seul chymotrypsinogène et le voient apparaître d'abord au niveau du RER. C'est en étudiant la synthèse de la RNase que Morris et Dickman (19) localisent cette enzyme en premier lieu également au niveau du RER. Ils la retrouveront plus tardivement au niveau des autres sites. Ce retard semble dû à un transfert plutôt qu'à une synthèse. On en reste toujours aux fortes présomptions...

• Etudes "in vitro"

A la fin de 1959, Kirsch, Siekevitz et Palade (20) reprennent leurs travaux mais changent de matériel (foie de cobaye) et leur méthode, **afin de "voir"** si les ribosomes isolés des membranes conservent toujours leur capacité à incorporer "in vitro" les acides aminés marqués. Cette autre manière d'aborder le problème est intéressante car elle est complémentaire de la précédente ("in vivo").

travailler sur des
constituants de
cellules de foie

A partir de cellules vivantes de foie, ils isolent certains constituants qu'ils s'efforcent d'obtenir à l'état pur et dont ils vérifient la pureté au microscope électronique. Puis ils réunissent certains d'entre eux en présence d'acides aminés marqués dans le même tube à essais à 37° pendant 20 minutes :

- ribosomes
- fraction enzymatique soluble (pH 5) correspondant aux protéines hyaloplasmiques (sans membrane de reticulum)
- ATP et GTP
- phosphoénol pyruvate et pyruvate-kinase (dernière enzyme de la glycolyse permettant de régénérer l'ATP).

Les résultats obtenus montrent qu'il y a incorporation de leucine marquée dans les protéines nouvellement synthétisées (HYP1 des élèves).

Par contre, la **suppression** d'un des composants du mélange réduit de façon très significative l'incorporation d'acides aminés marqués, ce qui révèle le caractère **indispensable** de la fraction supprimée. Ceci souligne l'importance du rôle des

18. G. PALADE, P. SIEKEVITZ, "In vivo incorporation of leucine-C14 into the chymotrypsinogen of various cell fraction", *Journal of biophysical and biochemical cytology*, 7, 1960, 619

19. A. MORRIS, S. DICKMANN, "Biosynthesis of ribonuclease in Mouse Pancreas." *Journal of biological chemistry* 235, n°5, 1960, 1419.

20. Ibid (14)

ribosomes dans le transfert de l'acide aminé marqué, de l'ARN soluble (ARNt) à la protéine et réduit celui de la membrane du reticulum. Celle-ci semble agir comme un site d'isolement, de séparation de cette protéine destinée à l'exportation.

Donc, toute protéosynthèse ne peut avoir lieu que là où il y a des ribosomes, y compris dans les mitochondries, où la vitesse de synthèse y est réduite par rapport à celle du système lié au reticulum. Aucun élément cellulaire autre n'intervient, exception faite des enzymes hyaloplasmiques et de la source d'énergie citée plus haut.

Cette approche expérimentale est plus rigoureuse que la précédente puisqu'on contrôle mieux les paramètres qu'in vivo (utilisation du principe de variation d'un seul facteur, tube témoin ...).

On notera que l'aspect informationnel du problème de la synthèse des protéines n'est pas envisagé. Si les ARNm ne sont pas encore connus (ils ne le seront qu'en 1960), ce n'est pas le cas des ARNt découverts en 1957. In vitro les expérimentateurs croient maîtriser tous les paramètres. Les acides nucléiques ne sont pas pris en compte et pourtant présents dans les extraits cytoplasmiques, ils interviennent nécessairement.

Ce n'est qu'au prix de toute cette étude que l'on peut rejeter l'HYP4 des élèves selon laquelle il pourrait y avoir synthèse "un peu partout". Il est cependant intéressant de remarquer que Palade a tenu à se procurer un argument supplémentaire pour réfuter cette hypothèse, qui avait manifestement la vie dure. Cet argument supplémentaire lui sera fourni en 1967 par la technique du pulse, comme nous l'avons vu dans le 3.

Si le problème des lieux de synthèse semble résolu, il reste celui du transfert des protéines.

4.3. Recherches sur le transfert des protéines

Les travaux de 1958 (21) posent, à ce sujet, plus de problèmes qu'ils n'en résolvent (Document 8)

Si l'évolution de l'A.S. de chaque fraction est compatible avec un transfert des protéines marquées du RER aux grains de zymogène (croisement des courbes), les résultats quantitatifs ainsi que la technique expérimentale, ne permettent pas d'impliquer les variations d'A.S. de chaque fraction à ce seul transfert.

En effet, il semble peu probable, compte tenu des chiffres que la diminution de l'A.S. du RER puisse être à l'origine de la croissance de l'A.S. des autres fractions, "mt" et "gz" en l'occurrence. Ceci les amène à supposer d'autres lieux de synthèse avec H.M. Bates (22) et A.E. Mirsky (23). De plus, pour expliquer

21. Ibid (16)

22. H.M. BATES, K.M. CRADDOCK, "The incorporation of valine-1-C14 into cytochrome C by rat liver mitochondria", *Journal of american and chemical society*

23. V.G. ALLFREY, A.E. MIRSKY, "Protein synthesis in isolated cell nuclei", *Journal of genetic and physiology*, 40, 1957, 459

l'importance des ribosomes

l'impossibilité des lieux de synthèse multiples

les modalités de transfert les auteurs ne peuvent invoquer, sans ambiguïté, un transport en masse des nouvelles protéines du RER aux grains de zymogène à cause des réserves d'ordre technique suivantes :

- le caractère rudimentaire du fractionnement cellulaire (hétérogénéité des fractions)
- l'impossibilité d'isoler l'appareil de Golgi, compte tenu de son polymorphisme
- la mise à la disposition des cellules, du précurseur pendant un temps très long (15 mn et plus)
- le fait que toutes les protéines cellulaires soient extraites et comptées. On ne suit donc pas la famille particulière des protéines sécrétoires à laquelle appartient l' α chymotrypsinogène. Ceci est ennuyeux car à cette époque rien ne permet d'affirmer que toutes les protéines sont synthétisées selon les mêmes modalités.

Ces réserves interdisent aux auteurs de trancher entre un transfert ou une néosynthèse dans les mitochondries, le noyau et/ou dans les grains de zymogène.

Ils restent donc prudents même s'ils pensent que leur hypothèse est la plus probable : synthèse des protéines au niveau du RER puis transfert dans les grains de zymogène. On ne parle pas encore de l'appareil de Golgi (qui est connu) puisque ses différents constituants se répartissent selon leur densité dans les différentes fractions "gz" et "mc".

Palade cherche à perfectionner sa technique d'analyse biochimique associée à l'observation microscopique. Cela le conduit à l'autoradiographie. Cette technique existe déjà mais elle n'est vraiment maîtrisée qu'en microscopie photonique. Cependant, de nombreux auteurs travaillent déjà à l'adapter à la microscopie électronique. Palade fait partie de ceux-là.

En 1961, grâce à cette technique, Caro et Palade (24) rapportent le fait qu'il y a concentration de leucine marquée dans la zone de l'appareil de Golgi. Est-ce la preuve du transfert de protéines par cet appareil ? Prudents, ils n'écrivent jamais qu'il y a incorporation de marqueurs dans les protéines, en toute certitude car la technique photographique et la technique des indicateurs ne le prouvent pas encore. Par contre, ils rappellent que Siekevitz et Palade ont montré par extraction et ultracentrifugation (voir plus haut) que la leucine était incorporée dans des protéines récemment synthétisées, destinées surtout à l'exportation. Ils ont donc postulé que ces enzymes passent par la zone de Golgi car on les retrouve dans des vésicules golgiennes. Il y a, en effet, corrélation entre ces faits et la forte concentration de leucine marquée dans l'appareil de Golgi. Ils en concluent que la leucine ne peut qu'être incorporée dans les enzymes digesti-

une technique a
aussi ses
faiblesses

introduction
d'une nouvelle
technique :
l'autoradiographie...

24. L. CARO, G. PALADE, "Le rôle de l'appareil de Golgi dans le processus sécrétoire - Etude autoradiographique", *Comptes rendus de la société de biologie*, 115, séance du 27.5.61. 1750.

ves élaborées par la cellule. Ils reconstituent, par le raisonnement le trajet suivi par ces protéines depuis le RER (radioactivité au bout de 4 mn) aux grains de zymogène (radioactivité au bout de 4 heures).

Ces premiers résultats donnent raison à H. Lévi (25) qui écrivait en 1957 après s'être interrogé sur les très nombreuses sources d'erreurs du comptage de grains d'argent dues aussi bien aux défauts possibles de la coupe de tissu que de l'émulsion photographique : "*L'autoradiographie a partagé le sort de tant de nombreux instruments et méthodes, d'abord on s'attendait à ce qu'elle résorbe tous les problèmes et qu'elle réponde à toutes les questions. Puis, on l'a abandonnée comme étant trop complexe, et finalement, quelques investigations prudentes et consciencieuses ont conduit à des résultats encourageants. On espère que cette dernière phase prévaudra dans les temps à venir.*"

L'utilisation de l'autoradiographie est, en effet, riche d'enseignements car on passe de la simple attitude qui consiste à chercher où est l'isotope puis dans quelle molécule il est, à celle qui s'interroge sur le nombre d'isotopes repérés en un endroit précis et qui aboutit à une évaluation de l'activité chimique (synthèse, transfert, concentration) de l'organite ou de la cellule, en fonction du temps.

On peut alors comparer non seulement des localisations mais aussi des quantités, construire des graphiques, ce qui autorisera la rédaction de nombreux sujets de Baccalauréat mais aussi augmentera le risque d'erreurs d'interprétation par les spécialistes comme par les élèves...

Toujours est-il qu'à cette époque (1961), la technique d'autoradiographie n'étant pas exempte de critiques, on s'affaire dans les laboratoires pour résoudre les difficultés (26).

En 1964, Caro et Palade (27) utilisent de la leucine tritiée comme précurseur. Le marquage est obtenu "in vivo". Pour la première fois, la chasse est employée afin de diminuer les artefacts dus à la fixation du précurseur par l'oxyde d'osmium sur des structures étrangères à la synthèse et au transfert des protéines. Elle consiste en une injection, 4 mn après celle du traceur, d'une solution contenant 100 fois plus de leucine "froide".

La justification principale de la chasse n'est pas évoquée. En effet, la finalité principale de la chasse est de ne mettre le

...qui fournit des quantifications à l'origine de graphiques très utilisés

-
25. H. LEVI, "A discussion of recent advances towards quantitative autoradiography", *Experimental cell research*, suppl. 4, 1957, 207
26. L. CARO, R. TUBERGEN, J.A. KOLB, "High-Resolution Autoradiography". 1) "Methods", *Journal of cell biology*, 15, 1962, 189.
2) "The problem of resolution", *Journal of cell biology* 15, 1962, 473.
27. L. CARO, G. PALADE, "Proteins synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell, an autoradiographic study", *Journal of cell biology*, 20, 1964, 473.

précurseur à la disposition des cellules que pendant un temps très court ; de ce fait un véritable "pulse" peut être réalisé. La technique "in vivo" ne permet pas de réaliser un pulse d'une durée inférieure à 15 mn.

Les résultats sont cependant proches de ceux qui seront obtenus en 1967 (voir document 9).

Document 9.

Distribution des grains d'argent de différentes structures cellulaires en fonction du temps après l'injection du marqueur (DL Leucine -4,5 ³H)

Temps après le marquage -mn -	% de grains d'Ag au-dessus					
	RER* %	Golgi %	Grains Zg %	Noyau %	Mitoch. %	Total grains
4	67	27	1	2	3	557
6	53	39	2	5	1	157
20	11	73	10	3	3	518
240	11	10	73	4	2	167

* *Reticulum endoplasmique rugueux et le hyaloplasme contigu.*

pas de preuve
absolue du
transfert au Golgi

Les résultats de l'autoradiographie au microscope électronique suggèrent que les protéines sont synthétisées au niveau du RER puis rapidement transférées vers les petites vacuoles lisses péri-golgiennes. Mais cette dernière remarque n'est qu'une supposition à cause du pouvoir de résolution de la technique qui n'est que de 0,2 à 0,1 μm alors que le diamètre de ces petites vésicules ne dépasse pas 0,05 μm . L'autoradiographie ne peut donc pas donner la preuve absolue du passage des protéines par ces petites vésicules.

Quoiqu'il en soit, le transfert des protéines nouvellement synthétisées du RER au golgi via ces petites vésicules est une supposition **raisonnable**. Cela explique de façon satisfaisante les résultats et est en accord avec les notions acceptées à cette époque sur la synthèse des protéines.

De plus, ce n'est en contradiction avec aucun fait connu. Toute autre interprétation de ces résultats autoradiographiques devrait impliquer des mécanismes multiples pour la synthèse des

protéines. Puisqu'ils s'occupent particulièrement d'une seule classe de protéines, de telles multiplicité et complexité sont hautement improbables.

Ces résultats tendent donc à nous convaincre du rôle de l'appareil de Golgi dans le processus sécrétoire. Il existe une concentration progressive des produits, probablement par déshydratation, dans les grandes vacuoles localisées au centre de l'appareil de Golgi. Ces vacuoles sont appelées vacuoles de concentration, elles se transforment progressivement en grains de zymogène. On connaît donc le rôle des vacuoles de concentration. Ce n'est pas le cas des petites vacuoles lisses à la périphérie de l'appareil de Golgi. Les auteurs en sont réduits aux hypothèses : elles joueraient le rôle de navettes entre le RER et les vacuoles de concentration.

4.4. Réflexions sur les idées émises de 1958 à 1967

On voit qu'en 1958, les grands problèmes sont déjà définis. Aucun n'est résolu même s'il existe de fortes présomptions. Chaque question posée apporte avec elle de nouvelles questions et demande de nouvelles expériences.

Certaines de ces questions sont bien celles que se sont posées des élèves confrontés au graphique et elles correspondent bien à une interrogation pertinente liée au doute, à l'imagination, c'est-à-dire à l'image que chacun s'est faite du phénomène. Désormais, on conçoit qu'un élève est fondé à se demander, par exemple, s'il n'y aurait pas plusieurs sites de synthèse !

D'autre part, avec un peu de recul, on s'aperçoit que l'année 1959 fut une année charnière et donc intéressante. Les idées s'y opposent ou se recoupent. On hésite encore sur les lieux de transfert des protéines du RER aux grains de zymogène : passent-elles à travers le hyaloplasme, à l'état soluble, comme le pensent Morris et Dickman (28) ou bien sont-elles incluses dans un système membranaire, ce qui amènerait à étudier l'appareil de Golgi qu'on ne distingue pas encore du RER, au plan fonctionnel ?

Cette dernière position est défendue par Sjöstrand et Hanson depuis 1954. Ils se fondent sur l'étude microscopique et les relations intimes entre l'appareil de Golgi et les grains de zymogène. Plus tard, ils ont décrit des grains dans la zone de Golgi, qui semblent représenter la série complète des étapes de formation, du plus petit grain au granule bien caractéristique. D'autres auteurs confirment, Palade, en 1959, propose que les granules soient formés dans le RER. On voit donc que le savoir

1959 : année des mises au point... d'interrogation !

la protéine est passée par Ici... repassera par là...

est hésitant dans sa construction et qu'on ne suit pas une voie linéaire vers la connaissance définitive. Pourquoi l'élève n'aurait-il pas le droit d'être tout aussi hésitant ?

pour se retrouver
dans l'appareil de
Golgi

En 1961, Caro et Palade écrivent : "*En conclusion, nos résultats ont confirmé et précisé l'ancienne hypothèse (1924-1929 / NDLR) du rôle actif de l'appareil de Golgi dans la formation des grains de sécrétion.*" Trente-sept ans pour commencer à rassembler des faits convergents susceptibles d'asseoir l'hypothèse ! Et il a fallu attendre 1964 (29) et surtout 1967 (30) pour avoir une idée encore plus précise. Les preuves, en effet, s'accumulent au cours du temps mais le **doute scientifique persiste**. C'est pourquoi Jamieson et Palade en 1964 (29) puis 1967 (30) imaginent la technique du pulse.

Les résultats obtenus permettent de corriger ceux obtenus en 1958 :

- il est clair que le marquage précoce des grains de zymogène à 20 mn, et avant, était dû à des artefacts expérimentaux (contamination de cette fraction par des vacuoles de concentration partiellement pleines).
- même remarque pour les fractions "mitochondries" et "noyaux". Après neuf ans d'aller et retour entre le modèle confronté aux faits et les résultats confrontés au modèle, des techniques ont été affinées et ont permis d'élucider le rôle des petites vacuoles péri-golgiennes.

Jamieson et Palade jettent donc les **bases du flux membranaire**. Le modèle du compartimentage s'affirme et se consolide, avec le rôle de l'appareil de Golgi dans l'économie du système endomembranaire de la cellule.

difficultés à faire
fonctionner le
modèle du
compartimentage

C'est peut-être l'assimilation de ce modèle qui pose problème à l'élève car il est délicat de le faire fonctionner (31), les propriétés membranaires étant multiples (souplesse, déformabilité, fusion, réactivité, perméabilité ou non aux protéines selon les cas ...) et posant de nombreux problèmes (deux exemples : comment sont déplacées les vésicules golgiennes à l'intérieur du cytoplasme ? La fusion de la membrane de ces mêmes vésicules ne devrait-elle pas réduire la surface des membranes du RER et augmenter la surface de la membrane cytoplasmique ? ...).

Signalons, pour terminer ce paragraphe, que le mot compartimentation, très souvent employé, n'existe pas dans notre langue. Il devrait être abandonné au profit du mot compartimentage, désignant à la fois la division et l'action de diviser.

29. Ibid (27)

30. J. JAMIESON, G. PALADE, "Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell", *Journal of cell biology*, 34, 1967, 577 (I) et 598 (II)

31. Ibid (5)

CONCLUSION

Ce travail de retour aux sources historiques a donc montré :

- d'une part, que **sans connaissances précises en physique, les représentations préexistantes de l'élève le conduisent à imaginer des hypothèses divagantes ou ne relevant pas de la science.**
- d'autre part, **qu'il existe une exacte superposition entre les solutions biologiques proposées par les élèves et les hypothèses formulées par le chercheur.**

Les hypothèses qui ont servi de base à ce travail semblent donc validées.

On retirera de cette réflexion qu'il est toujours intéressant de prendre en considération, à partir de copies d'élèves, les réponses inattendues, considérées comme fausses et qu'il faut, dans ce cas, évaluer la qualité de la copie avec prudence et sagesse.

Beaucoup d'erreurs ne sont pas dues à un manque de travail ou à des capacités intellectuelles vacillantes. Certaines peuvent guider le professeur vers une autre voie, une autre technique d'enseignement et le rendre prudent vis-à-vis du document et l'amener à mieux connaître son histoire et les conditions de sa naissance.

Cette étude nous laisse à penser que cet exercice n'est guère utilisable en dehors de son contexte historique et sans apprentissage de la technique. Autrement utilisé, il montre que notre discipline tend à s'orienter de plus en plus vers les savoirs, en utilisant les expériences comme alibi et non comme support réel d'analyse.

Notre science expérimentale deviendrait-elle moins expérimentale ?

Si le professeur ne demande que de restituer la leçon : RER - - Appareil de Golgi - - Vésicules, le document n'est pas nécessaire. Nous avons essayé de montrer qu'il s'agissait d'une fausse analyse et que la méthode utilisée ne consistait plus à prouver par l'analyse d'un document mais à déclencher une restitution grâce à un document censé orienter cette récitation. Lorsque le document rend possible des interprétations multiples, il est aisé de comprendre qu'on va au devant de surprises...

Il serait cependant dommage d'abandonner ce graphique. Il permet d'évaluer plus que la simple connaissance de l'origine et du transfert des protéines dans la cellule sécrétrice. En effet, l'étude, en cours, du graphique avec analyse critique justifiant des rappels historiques, est bien une activité développant l'esprit expérimental, **même s'il n'y a pas de manipulation réelle.**

validation des hypothèses de départ

pour que les expériences ne soient pas des alibis mais des bases concrètes d'analyse

l'exercice doit être travaillé en phase d'apprentissage et non en évaluation finale

intérêts de l'étude
historique

Les nouveaux programmes de Terminale D prévoient l'étude de "fonctionnement et de structure d'une cellule sécrétrice dans le cadre de l'activité de deux cellules différenciées - cycle de la matière et flux d'énergie." On peut se demander si ce chapitre ne pourrait pas justifier une étude historique, même légère (avec coopération du professeur de philosophie). Cela permettrait :

- d'aborder des techniques et de relier le théorique au pratique.
- de relier des notions appartenant à divers chapitres. En effet, l'étude d'une cellule sécrétrice relève de la même attitude d'esprit que celle du physiologiste qui veut établir des relations d'information, par exemple, entre tel et tel organe (par ablation ou section de nerf...).

relier des notions
de domaines
différents

Les techniques tentent d'éclaircir les mécanismes d'information de la matière première (synthèse des protéines) et de les localiser, puis de révéler dans quel état et selon quel trajet les molécules informées sont transférées, stockées et rejetées. On cherche à savoir par où est passé cette molécule de même qu'on essaie de savoir par où est passée une hormone (analyse du sang) ou un message nerveux (enregistrement des potentiels d'action).

On utilise des instruments qui correspondent à la nature du message mais le **modèle qui appelle ces techniques est toujours le même.**

- enfin, montrer comment se construit une science (32) permettrait certainement d'enrichir l'enseignement en lui apportant une nouvelle dimension, comme a tenté de le montrer Claude Allègre (33) :

"... L'élaboration des théories scientifiques est présentée comme des suites logiques où les - par conséquent - succèdent aux - donc -. Or ce type de raisonnement n'a aucun rapport avec la manière dont les scientifiques explorent et déchiffrent les lois de la nature pour bâtir les sciences. Découvrir les lois de la nature c'est d'abord observer, mesurer, classer des objets, c'est étudier des phénomènes dont la logique est complexe, les causalités multiples et interconnectées. C'est ensuite, par des structurations successives, des hiérarchisations simplificatrices, construire des modèles, représentations du monde dont l'élaboration conduit à la formulation abstraite. Ces modèles une fois bâtis, deviennent des outils pour continuer l'exploration de la nature, mais ce sont des outils provisoires... La science progresse par le va-et-vient incessant entre le réel et l'abstrait, entre la théorie et

appréhender
avec justesse
l'évolution de la
science

32. J.L. CANAL, "Modèles et apprentissages", *compétences méthodologiques en sciences expérimentales*, n°4, Paris INRP-DP1, juin 1988, 25-26 (rapport de recherche interne non publié)

33. C. ALLÈGRE, "Platon vs Aristote : l'équilibre de l'enseignement des sciences en France", *Pour la Science*, n°121, novembre 1987, 7.

l'observation, et ce va-et-vient ne conduit pas toujours à des évolutions simples, logiques, prévisibles...

C'est cette démarche qu'il faut enseigner à nos élèves et à nos étudiants."

Alain MONCHAMP
Lycée Plaisir-Grignon
Jacques DEWAELE
Lycée Aulnay-sous-Bois

Pour plus de renseignements sur les traceurs et l'autoradiographie, on pourra se reporter à l'Encyclopédie Internationale des Sciences et Techniques, Paris, Presses de la Cité.

D'autre part, Schoenheimer R., Ratner S., Rittenberg D., ont publié de nombreuses études utilisant des isotopes lourds (exemple : "The metabolism activity of body proteins investigated with ^{14}C leucine containing two isotopes", *Journal of Biological Chemistry*, 130, 1939, 703). Il semble qu'il s'agisse des tout premiers travaux, portant sur la conversion d'acides aminés.

Les auteurs remercient Mme Ollivier-Bousquet (INRA - Jouy-en-Josas, Yvelines) pour avoir grandement facilité leur recherche bibliographique.

SPIRALE 2
Avril 1989



SPIRALE

IMAGES

- . B. PETERFALVI et A. VERIN, I.N.R.P. : Traduction de textes en schémas
- . B. DAUNAY, Collège de Cappelle-la-Grande : La lecture du schéma en 6^e
- . C. CAIGNAERT, PEN Lille :
Dessiner et utiliser des graphiques : faire des mathématiques ou communiquer de l'information ?
- . M. TARDY, Université Louis Pasteur, Strasbourg :
Le texte iconographique : stratégies et tolérances
- . I. SOUTIF, P.E.N. E.N.G. Douai : Une minute sur l'image
- . J. DELAPORTE, Directrice Ecole Petit Quinquin à Lomme :
De l'observation d'un tableau à la création picturale
- . D. DESCHARLES, Instituteur, Ecole P. et M. Curie de Méricourt
L'enfant et l'image filmique
- . J. POJE-CRETIEN, PEN Lille, et C. ALVES, R.P.P. Lens :
Les images séquentielles : de la lecture d'images à la naissance du récit
- . F. ROELEN, Collège de Grenay : Réalisation de textes littéraires à partir d'images de fiction
- . D. BRASSART, PEN Lille et O. WALQUEMANNE, CPEN Ecole Ampère Lille
De la bande dessinée au texte d'énigme
- . D. VANDERSCHAEVE, Directrice d'Application, Ecole Boucher de Perthes, Lille : L'image réhabilitée
- . A.F. BELAVAL, PEN Lille : Présentation d'une recherche INRP :
Technologies de l'image et développement cognitif

ABONNEMENT : Deux tarifs suivant l'adresse d'expédition :
 - à votre nom dans votre établissement scolaire
 1 an - 2 numéros : 50 F - Le numéro : 30 F
 - à une autre adresse : 1 an - 2 numéros : 70 F - Le numéro : 40 F
 Règlement par chèque bancaire ou postal libellé à l'ordre de
 l'A.P.E.D.I.E.N. - Ecole Normale Mixte - SPIRALE
 58 rue de Londres 59045 LILLE CEDEX
