

ACADEMIE DE MONTPELLIER  
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

## THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques  
du Languedoc  
pour obtenir le grade de DOCTEUR D'ETAT - Mention SCIENCES

# LE FONCTIONNEMENT DU TRANSPORTEUR TONOPLASTIQUE DU CITRATE DU LATEX D'HEVEA BRASILIENSIS : RELATIONS AVEC L'ACTIVITE ADENOSINE-TRIPHOSPHATASE MEMBRANAIRE

PAR

BERNARD MARIN

Soutenue le 2 Octobre 1981 devant la Commission d'Examen :

Jury : MM. C. LIDRET, Université de Paris XI, Président  
J. D'AUZAC, U.S.T.L.,  
Mlle D.C. GAUTHERON, Université de Lyon I,  
MM. C. GRIGNON, E.N.S.A.M.,  
E. KOMOR, Universität Bayreuth, R.F.A.,  
U. LUTTGE, Technische Hochschule Darmstadt, R.F.A.,  
Mme N. PARIS, U.S.T.L.

" A NICOLAS "

*Ad augusta per augusta*  
(Vers des résultats suprêmes par  
des voies étroites)  
VICTOR HUGO (*Hernani*, IV<sup>ème</sup> acte).

*Cherchons comme cherchent*  
*Ceux qui doivent trouver,*  
*Et trouvons comme trouvent*  
*Ceux qui doivent chercher encore,*  
*Car il est écrit :*  
*Celui qui est arrivé au terme*  
*Ne fait que commencer.*  
Saint Augustin (*De Ord.*, II, 19).

Il y a dans toute recherche, une sorte d'excitation et d'enthousiasme instinctive qui est animée par l'ardeur de trouver. Elle en devient prenante à tout sacrifier. Elle devient passionnante. Elle le demeure à en devenir exclusive.

Dès lors, aucun mot ne peut être suffisamment fort pour rendre compte de l'infinie reconnaissance, de la profondeur de ma gratitude pour celle qui partage ma vie.

" J'ai tout appris de toi pour ce qui me concerne,  
qu'il fait jour à midi, qu'un ciel peut être bleu,  
que le bonheur n'est pas un quinquet de taverne,  
tu m'as pris par la main dans cet enfer moderne,  
où l'homme ne sait pas ce que c'est qu'être deux"

(ARAGON, Le Roman Inachevé)

Sa présence a été de chaque instant. Elle a tout accepté avec ce sourire ineffacé qui rend tout possible, même dans les situations les plus délicates. Elle sait mieux que moi sans doute ce que le mot Recherche signifie, de ce que la recherche implique dans la vie de tous les jours. Je suis le Rêve, elle en est la Réalité. Une réalité faite de sacrifices conscients et inconscients pour celui qui veut aboutir, en dépit de tout et envers tout, pour celui qui se veut de résoudre le problème qui lui est posé.

La Recherche, c'est une création et "comme toute création", c'est à l'origine, la lutte d'une forme en puissance contre une forme imitée" (André MALRAUX, la Création Artistique, III). Elle a eu cette trop rare intelligence de le comprendre. Elle m'a aidé de toute son âme, de tout coeur, pour franchir le mieux possible les difficultés de toute nature qui jonchent inévitablement cette vie de chercheur.

Tout est simple *a priori*. Combien ne le pense-t-il pas encore en toute ingénuité, comme s'il n'avait jamais vécu. Mais un problème qui se résoud n'est en fait qu'une porte ouverte sur un univers où dix autres se créent. Ma femme m'a donné cette énergie qui permet de tout affronter. Elle a été souvent ce recours qui m'a manqué. "*Ex nihilo nihil*" (Rien vient de rien) (PERSE). Un travail infatigable vient à bout de tout. Et quelle est la personne qui le saurait mieux qu'elle !

Elle m'a conforté dans ces moments difficiles de la vie où tout nous échappe, où rien ne va et où tout devient rien. Elle était là avec moi, me guidant à tout surmonter. Elle a subi avec la même intensité que moi toutes ces difficultés qui émaillent cette vie ingrate que constitue la vie de chercheur. C'est une succession de réussites et d'échecs. Ce n'est pas toujours une expérience réussie, et nous apprenons souvent plus dans l'échec. "*Amicus certus in re incerta cernitur*" (C'est dans l'adversité que se révèlent les vrais amis) (Quintus EURIPIUS).

La vie de chercheur, ce n'est pas une vie banale, une vie simple faite d'habitudes. C'est une vie imprégnée de luttes sans fin et inégales, non justifiées, d'abnégations amères, de contraintes inhumaines, certes librement consenti par le chercheur que je suis, que je tends à vouloir être (j'en ai fait initialement le choix à l'âge des inconséquences et des insouciances) mais qui est imposée à celle qui partage ma vie. Elle l'a acceptée. Elle en a eu ce talent. On comprendra dès lors que ce travail qu'elle a supporté, qu'elle a soutenu aussi lorsqu'il devenait insoutenable, soit aussi son oeuvre. C'est un peu

d'elle qui transpire à chaque phrase de ce mémoire. Sa contribution est incommensurable. Elle a su être là dans ces moments difficiles où tout fuit, où tout devient conflictuel. Elle a su apporter ce baume qui cicatrice ce dégoût, cette amertume qui s'exaltent après toute déception. La vérité est souvent dure mais "*Verum est, id quod est*" (La vérité est ce qui est) (SAINT AUGUSTIN).

Je tenais à le dire pour tous ceux qui ne le savent pas ou pour qui la vérité n'est qu'un mot vide de tout sens.

Le Professeur J. D'AUZAC m'a tendu une main secourable, lors de mon retour en France, en m'accueillant dans son Laboratoire. Je ne saurais l'oublier.

Je le remercie aussi de m'avoir proposé un programme de recherches séduisant. Certes, sa réalisation ne s'est pas faite sans difficultés. Toutefois, ses encouragements, sa disponibilité et son dynamisme m'ont beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail. Sa patience inépuisable et l'immense richesse de ses conseils avertis, fruit d'une longue expérience du latex d'*Hevea brasiliensis*, prodigués au cours de nombreuses discussions passionnées et passionnantes, ont permis de le faire aboutir.

Je crois que le travail contenu dans ce Mémoire est le meilleur moyen de lui exprimer la reconnaissance que je lui porte pour la sollicitude qu'il a toujours montrée à mon égard.

Ma gratitude va aussi au Professeur C. LIORET pour l'attention sans cesse renouvelée avec laquelle il a suivi la progression de ce travail et l'entière confiance qu'il m'a témoignée quant à la conduite de cette recherche. Je suis particulièrement heureux de l'honneur qu'il me fait de bien vouloir juger ce travail et de présider ce Jury de Thèse.

Ce travail de longue haleine a bénéficié de l'aide de nombreuses personnes qui, soit par leurs conseils, soit par le matériel qu'elles mettaient à ma disposition, en ont permis la réalisation.

J'aurais toujours un souvenir particulièrement marqué de mes séjours en Allemagne. S'il fallait résumer, en quelques mots, toute cette période d'intense activité, dûe aux conditions rencontrées, le plus simple serait de reprendre ces si beaux vers écrits par A. DE LAMARTINE, en 1829, pour un tout autre propos :

*"O temps, suspends ton vol ! et vous, heures propices,  
suspendez votre cours "*

Ils reflètent merveilleusement bien mon état d'esprit car, en effet, c'est un plaisir, chaque fois renouvelé, que de travailler avec le Professeur E. KOMOR.

Il ne m'est pas possible d'exprimer en si peu de mots toute ma reconnaissance à celui qui m'a consacré la majeure partie de son temps de travail pour réfléchir sur les problèmes arduos posés par le matériel biologique que nous étudions et les comprendre. Il n'a pas ménagé sa peine pour aboutir à des solutions satisfaisantes et constructives. Qu'il en soit vivement et chaleureusement remercié ici !

Je n'oublierais pas le Professeur U. LUTTGE qui, avec la gentillesse qui le caractérise, me permit de continuer ce travail dans son laboratoire, en m'offrant toute l'aide matérielle et financière dont j'avais besoin pour le terminer. Ses travaux sur le vacuome végétal me rendent encore plus précieuse sa présence dans ce Jury.

Rien n'est évident dans le domaine des transports membranaires. Ils ne peuvent se résoudre en quelques termes simples, ou qui se voudraient simples, se devant de refléter l'hypothèse initiale de travail. *"Homines id quod volunt credunt"*. (Les hommes croient ce qu'ils désirent), (Jules César, Guerre Civile, III, 18, 6). Une telle démarche d'esprit ne procède en rien d'une logique scientifique rationnelle.

J'ai beaucoup apprécié le cartésianisme dynamisant de Mademoiselle le Professeur D.C. GAUTHERON. Je soulignerais l'enthousiasme qu'elle communique à tous ceux ou à toutes celles qui l'approchent. L'intérêt qu'elle a constamment porté à ce travail et les précieux conseils qu'elle m'a prodigués chaque fois que nous nous sommes rencontrés m'ont permis de progresser rapidement dans ce domaine difficile que



représente la transduction de l'énergie au niveau des membranes biologiques. Je lui en suis particulièrement reconnaissant.

Le Professeur C. GRIGNON m'a initié à toute une méthodologie du traitement de l'information. Il m'a fait découvrir tout un aspect de la biochimie et de la biophysique du transport au niveau des membranes végétales. Ses suggestions m'ont été particulièrement précieuses. Je dois reconnaître qu'il m'a permis de surmonter un bon nombre de difficultés tant sur le plan théorique que sur le plan interprétatif. Sa bonne humeur de chaque instant et son inlassable tenacité m'ont permis de mieux comprendre le mécanisme du transporteur tonoplastique du citrate dans le latex d'*Hevea brasiliensis*. Je suis particulièrement touché par toutes les heures qu'il a bien voulu me consacrer, malgré ses trop rares instants disponibles. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères en me faisant l'honneur d'être de ce Jury.

Madame le Professeur N. PARIS, en acceptant de participer à ce Jury, témoigne de l'intérêt qu'elle a toujours porté à l'avancement de ce travail. Cette occasion me permet de lui renouveler mes vifs remerciements et l'assurer de l'importance que j'attache à sa présence.

Que les collègues et amis qui m'ont aidé et encouragé pour faire progresser ce travail, tant à Montpellier qu'à Darmstadt ou à Régensburg, avec beaucoup de gentillesse et une infinie bonne humeur, trouvent ici, l'expression de toute ma reconnaissance. Je tiens à souligner la collaboration particulièrement chaleureuse de J.A.C. SMITH et de D. KRAMER avec lesquels j'ai été amené à travailler dans le laboratoire du Professeur U. LUTTGE. Je n'oublierais pas les interminables discussions que j'ai eues avec F. BLASCO et R. JEANJEAN. Qu'ils en soient tous remerciés très vivement !

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse de l'Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique (I.R.C.A., Abidjan, Côte D'Ivoire), et de L. PRIMOT plus particulièrement, qui a consacré une partie de son temps pour sélectionner les arbres, pour prélever le latex, pour préparer les fractions purifiées et pour les lyophiliser.

Je ne saurais terminer sans remercier les Services Scientifiques Centraux de l'O.R.S.T.O.M., et Madame RAILLOT D., et Madame CREQUIGNE M., plus particulièrement, qui ont assuré la réalisation technique de ce Manuscrit.

# ABREVIATIONS

-----

|                   |                                                                 |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------|
| ATP               | Adénosine-triphosphate                                          |
| ATPase            | Activité adénosine-triphosphatase                               |
| $\Delta pH$       | Gradient transmembranaire de pH                                 |
| $\Delta \Psi$     | Variation de potentiel transmembranaire                         |
| DCCD              | N, N'-dicyclohexyl-carbodiimide                                 |
| DDA <sup>+</sup>  | Ion dibenzyl-diméthyl-ammonium                                  |
| DMO               | 5,5-diméthyl-oxazolidine-2,4-dione                              |
| DO                | Densité optique                                                 |
| EDTA              | Acide éthylène-diamine-tetra-acétique                           |
| FCCP              | Carbonyl-cyanide-p-trifluoro-methoxy-phenyl-hydrazone           |
| HEPES             | Acide N-2-hydroxy-éthyl-piperazine-N'-2-ethane-sulfonique       |
| I.E.              | Indice d'éclatement                                             |
| K <sub>a</sub>    | Constante d'association                                         |
| K <sub>m</sub>    | Constante d'affinité                                            |
| MDH               | Activité malate-deshydrogénase                                  |
| MES               | Acide 2-[N-morpholino]-éthane-sulfonique                        |
| MOPS              | Acide 3-[N-morpholino]-propane-sulfonique                       |
| PB                | Prang-Besar (clone d' <i>Hevea brasiliensis</i> )               |
| Pi                | Orthophosphate                                                  |
| PNPP              | p-nitrophenyl-phosphate                                         |
| PPO               | 2,5-diphényl-oxazole                                            |
| P.O.P.O.P.        | 1,4.-di-2(5-phényl-oxazolyl)-benzène                            |
| S-13              | 5-chloro-3- <u>tert</u> -butyl-2'-chloro-4-nitro-salicylanilide |
| T.E.A.            | Triéthanolamine                                                 |
| TPMP <sup>+</sup> | Ion triphényl-méthyl-phosphonium                                |
| TPP <sup>+</sup>  | Ion tetraphényl-phosphonium                                     |
| Tris              | 2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3-propane-diol                       |
| Triton X-100      | Ether de polyoxyéthylène                                        |
| V <sub>m</sub>    | Vitesse maximale                                                |
| V/V               | Volume à volume                                                 |
| ±                 | Ecart-type.                                                     |

U N I V E R S I T E  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DU LANGUEDOC

L I S T E   D E S   P R O F E S S E U R S

Président : L. THALER

Vices-Présidents : MM. CORRIU, PIETRASANTA et NOUAZE.

Doyens honoraires à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :

P. MATHIAS  
S. CHARLES  
A. CASADEVALL

Présidents honoraires :

P. DUMONTET  
J. ROUZAUD

Professeurs Honoraires de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :

|             |               |              |
|-------------|---------------|--------------|
| R. JACQUES  | J. SALVINIEN  | J.M. MORETTI |
| M. CASTERAS | M. MOUSSERON  | G. COUCHET   |
| E. TURRIERE | P. CHATELAIN  | P. DEMANGEON |
| C. CAUQUIL  | A.M. VERGNOUX | J.P. ROIG    |
| G. DENIZOT  | E. KAHANE     |              |
| J. GRANIER  |               |              |

Secrétaire Général :

E. SIAU

Professeurs titulaires :

|                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| M.J. AVIAS .....        | Géologie              |
| M. JJ. MOREAU .....     | Mécanique rationnelle |
| M. B. CHARLES .....     | Mathématiques Pures   |
| M. R. JOUTY .....       | Physique              |
| M. R. LEGENDRE .....    | Zoologie              |
| M. I. ASSENMACHER ..... | Physiologie Animale   |
| M. Ch. ROUMIEU .....    | Analyse Supérieure    |
| M. J. ROBIN .....       | Physique              |

|                            |                        |
|----------------------------|------------------------|
| M. B. PISTOULET            | Physique               |
| M. A. POTIER               | Chimie Minérale        |
| M. R. LAFONT               | Physique               |
| M. R. JACQUIER             | Chimie                 |
| M. J. FALGUEIRETTES        | Minéralogie            |
| M. J. REGNIER              | Chimie                 |
| Mme J. CHARLES             | Mathématiques          |
| M. J. ROUZAUD              | Chimie                 |
| M. P. CAILLON              | Physique               |
| M.H. CHRISTOL (E.N.S.C.M.) | Chimie                 |
| M. H. ANDRILLAT            | Astronomie             |
| Mme G. VERNET              | Biologie Animale       |
| M. L. CECCHI               | Physique               |
| M. L. EUZET                | Zoologie               |
| M. C. DELOUPY              | Physique               |
| M. M. MATTAUER             | Géologie               |
| M. M. SAVELLI              | Physique               |
| M. R. MARTY                | Psychophysicologie     |
| M. A. BONNET               | Botanique              |
| M. G. LAMATY               | Chimie                 |
| Mme S. ROBIN               | Physique               |
| M. R. CORRIU               | Chimie                 |
| Mme N. PARIS               | Physiologie Végétale   |
| M. J. ZARZYCKI             | Sciences des Matériaux |
| M. M. MAURIN               | Chimie Minérale        |
| M. L. THALER               | Paléontologie          |
| M. S. GROMB                | Chimie Physique        |
| M. J.V. ZANCHETTA          | Chimie Générale        |
| M. P. SABATIER             | Mathématiques          |
| M. F. SCEUE                | Chimie Organique       |
| M. E. GROUBERT             | Physique               |
| M. Ch. CASTAING            | Mathématiques          |
| M. M. ROUZEYRE             | Physique               |
| M. F. PROUST               | Géologie               |
| M. J. PARIS                | Biologie Animale       |
| M. A. GROTHENDIECK         | Mathématiques          |
| M. C. DURANTE              | Physique               |
| M. G. BOUGNOT              | Physique               |
| M. G. LECOY                | E.E.A                  |
| M. R. GAUFRES              | Chimie                 |

|                              |                           |
|------------------------------|---------------------------|
| M. JD BAYLE .....            | Physiologie Animale       |
| M. JL IMBACH .....           | Chimie                    |
| M. J.P. FILLARD .....        | E.E.A.                    |
| M. N. ROBY .....             | Mathématiques             |
| M. Ph. JEANTEUR .....        | Biochimie                 |
| M. M. AMANIEU (I.S.I.) ..... | Hydrologie et Mariculture |
| M. A. COMMEYRAS .....        | Chimie Organique          |

Professeurs sans Chaire :

|                                   |                           |
|-----------------------------------|---------------------------|
| M. G. TOURNE .....                | Chimie                    |
| M. J. REMY .....                  | Géologie                  |
| Mme H. GUASTALLA .....            | Biologie Physico-Chimique |
| M. R. LENEL .....                 | Biologie Animale          |
| M. A. BASSOMPIERRE .....          | Physique                  |
| M. R. JONARD .....                | Botanique                 |
| M. R. CANO (I.U.T.) .....         | Mesures Physiques         |
| M. P. MOLINO .....                | Mathématiques             |
| M. J. LEGRAND .....               | Physiologie Animale       |
| M. J. D'AUZAC .....               | Physiologie Végétale      |
| M. G. BOUX .....                  | Zoologie                  |
| M. M. DENIZOT .....               | Biologie Végétale         |
| M. B. BRUN .....                  | Chimie Physique           |
| M. L. GIRAL .....                 | Chimie Organique          |
| M. JP QUIGNARD .....              | Zoologie                  |
| M. Ph. VIALLEFONT .....           | Chimie                    |
| M. A. RAIBAUT .....               | Zoologie                  |
| M. P. VITSE .....                 | Chimie Minérale           |
| M. J. GRIMAUD (E.N.S.C.M.) .....  | Chimie                    |
| M. J. GARCIA (I.U.T. NIMES) ..... | Génie Mécanique           |
| M. P. LOUIS .....                 | Géophysique Appliquée     |
| M. Cl. BOCQUILLON .....           | Hydrologie                |
| M. A. DONNADIEU .....             | Physique                  |
| M. M. LEFRANC .....               | Mathématiques             |
| M. G. MASCHERPA .....             | Chimie                    |
| M. C. GOUT .....                  | Physique                  |
| M. JP. TRILLES (I.U.T.) .....     | Biologie Appliquée        |
| M. F. HALLE .....                 | Biologie Végétale         |
| M.G. BORDURE (I.U.T.) .....       | Génie Electrique          |
| M. JP NOUGIER .....               | Electronique              |
| M. M. GODRON .....                | Ecologie Végétale         |

|                            |                                            |
|----------------------------|--------------------------------------------|
| M. L. LASSABATÈRE (I.U.T.) | E.E.A.                                     |
| M. J. LAPASSET (I.U.T.)    | Physique Mesure Physique                   |
| M. M. AVEROUS (I.U.T.)     | Physique Génie Electrique                  |
| M. G. MAURY                | Chimie                                     |
| M. G. LOUPIAS              | Mathématiques                              |
| M. R. BEN AIM (I.S.I.)     | Génie chimique et Traite-<br>ment des eaux |
| M. J. CROUZET (I.S.I.)     | Biochimie Appliquée                        |
| M. L. COT (ENSCM)          | Chimie                                     |
| M. JC CHEFTEL (I.S.I.)     | Biochimie Appliquée à<br>l'Alimentation    |
| M. P. JOUANNA (I.U.T.)     | Génie Civil                                |
| M. E. MATHIEU (I.S.I.)     | E.E.A.                                     |

Professeurs Associés :

|                |               |
|----------------|---------------|
| M. M. MICALI   | Mathématiques |
| M. E. BILGER   | Physique      |
| M. G. AUBERSON | Mathématiques |

Professeurs associés d'Université :

|                  |                     |
|------------------|---------------------|
| M. L. DAUZIER    | Physiologie Animale |
| M. GALZY         | Biochimie           |
| M. C. MAURIN     | Biologie Animale    |
| M. R. SENOUILLET | Economie et Gestion |
| M. E. SERVAT     | Géologie            |
| M. C. VAGO       | Biologie Animale    |
| Mme M. VAN CAMPO | Biologie Végétale   |
| M. E. VERDIER    | Chimie              |
| M. F. WINTERNITZ | Chimie              |

Maître de Conférences :

|                            |                           |
|----------------------------|---------------------------|
| M. R. HAKIM                | Mathématiques             |
| M. F. LAPSCHER             | Mathématiques             |
| Mlle M. LEVY (I.U.T.)      | Chimie                    |
| M. J. LAGARRIGUE (I.U.T.)  | Biologie Appliquée        |
| M. CL DROGUE (I.S.I.)      | Hydrogéologie             |
| M. P. GENESTE (E.N.S.C.M.) | Chimie Physique Appliquée |

|                                    |                                                                    |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| M. Y. PIETRASANTA (E.N.S.C.M.)     | Chimie Appliquée                                                   |
| M. B. LEMAIRE (I.S.I.)             | Mathématiques Appliquées<br>Informatique                           |
| M. M. VALADIER                     | Mathématiques                                                      |
| M. JL ROBERT (IUT NIMES)           | Génie Electrique                                                   |
| M. O. MAISONNEUVE                  | Mécanique                                                          |
| M. R. BRUNEL                       | Physique                                                           |
| M. M. CADENE                       | Physique                                                           |
| M. P. DELORD                       | Physique                                                           |
| M. A. PAVIA                        | Chimie                                                             |
| M. JM BESSIERE                     | Chimie                                                             |
| M. JP BARD                         | Géologie                                                           |
| M. P. BESANCON (I.S.I.)            | Physiologie de la nutri-<br>tion appliquée à l'alimen-<br>tation   |
| M. Y. NOUAZE                       | Mathématiques                                                      |
| M. J. PETRISSANS                   | Chimie                                                             |
| M. JY. GAL                         | Chimie Analytique Appliquée                                        |
| M. C. BENOIT                       | Physique                                                           |
| M. H. GIBERT (I.S.I.)              | Génie Alimentaire                                                  |
| M. A. LIEGEOIS (I.S.I.)            | Automatique                                                        |
| M. B. TARODO DE LA FUENTE (I.S.I.) | Biochimie Appliquée et<br>Techniques des Matières<br>Alimentaires. |
| M. Y. ESCOUFIER                    | Informatique                                                       |
| M. A. SANS                         | Psychophysiologie                                                  |
| M. G. DURAND                       | Chimie                                                             |
| M.B. FILLIATRE (I.S.I.)            | Informatique et Gestion                                            |
| M. JJ. MACHEIX                     | Physiologie Végétale                                               |
| M. P. HINZELIN                     | Génie Civil                                                        |
| M. Cl. BOKSENBAUM                  | Informatique                                                       |
| M. G. CAMBON (I.S.I.)              | E.E.A                                                              |
| M. J. FERRIE (I.S.I.)              | Informatique                                                       |
| M. E. AKUTOWICZ                    | Mathématiques                                                      |
| M. CH HEBANT                       | Paléobotanique                                                     |
| M. J. LANCELOT                     | Géophysique                                                        |
| M. D. AUVERGNE (I.S.I.)            | E.E.A                                                              |
| M. B. LEBLEU                       | Biochimie                                                          |
| M. C. JOUANIN                      | Physique                                                           |
| M. M. RIBES                        | Chimie                                                             |
| M. JP ROQUE                        | Chimie                                                             |
| M. JL AUBAGNAC                     | Chimie                                                             |
| M. CL ALIBERT                      | E.E.A                                                              |



|                             |                                        |
|-----------------------------|----------------------------------------|
| Mlle H. ASTIER .....        | Physiologie Animale                    |
| M. F. ARTHAUD .....         | Géologie                               |
| M. G. ROYO .....            | Chimie Organique<br>Mesures Physiques. |
| M. PH.FOUCOU (I.U.T.) ..... | Sciences Economiques                   |

---

FASCICULE A

TEXTE

.

## SOMMAIRE

|                                                                                                                                    |               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>CHAPITRE I : INTRODUCTION.....</b>                                                                                              | <b>1</b>      |
| I - L'ORIGINE DU LATEX . LA MISE EN PLACE DES LATICIFERES<br>ET LEUR ONTOGENESE.....                                               | 5             |
| II - LA COMPOSITION MORPHOLOGIQUE DU LATEX.....                                                                                    | 7             |
| III - LE CARACTERE VACUO-LYSOSOMAL DES LUTOIDES.....                                                                               | 11            |
| A. La fonction lysosomale.....                                                                                                     | 11            |
| B. La fonction vacuolaire.....                                                                                                     | 13            |
| 1) La fonction déttoxifiante.....                                                                                                  | 13            |
| 2) La compartimentation des acides organiques,<br>des amino-acides et des ions dans le latex<br>d' <i>Hevea brasiliensis</i> ..... | 14            |
| IV - LES CARACTERISTIQUES DE LA MEMBRANE LUTOÏDIQUE.....                                                                           | 17            |
| A. La composition lipidique de la membrane lutoidique et<br>ses conséquences.....                                                  | 17            |
| B. La présence d'activités enzymatiques constitutives...                                                                           | 19            |
| 1) La fonction NADH-cytochrome C-réductase....                                                                                     | 19            |
| 2) L'activité ATPase.....                                                                                                          | 20            |
| 3) L'activité $\alpha$ -mannosidase.....                                                                                           | 21            |
| C. La mise en évidence de transporteurs.....                                                                                       | 22            |
| 1) Le transport des amino-acides.....                                                                                              | 22            |
| 2) Le transport des acides organiques.....                                                                                         | 24            |
| V - CONCLUSIONS : PRESENTATION DU TRAVAIL ET DE SON INTERET.....                                                                   | 27            |
| <br><b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>                                                                                 | <br><b>31</b> |
| I - MATERIEL.....                                                                                                                  | 33            |
| II - PREPARATION DES VESICULES LUTOÏDIQUES.....                                                                                    | 35            |
| A. Récolte du latex.....                                                                                                           | 35            |
| B. Isolement des lutoïdes.....                                                                                                     | 35            |
| 1) L'obtention de la fraction jaune.....                                                                                           | 35            |
| 2) L'obtention des lutoïdes.....                                                                                                   | 36            |
| 3) La lyophilisation des lutoïdes.....                                                                                             | 36            |
| C. Formation des vésicules vacuo-lysosomales.....                                                                                  | 37            |
| 1) La destruction des lutoïdes par la lyophili-                                                                                    |               |

|                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| sation.....                                                                                                                                                                                                        | 37 |
| 2) La technique de vésiculation.....                                                                                                                                                                               | 37 |
| III - TECHNIQUES D'INCORPORATION DES MOLECULES RADIO-ACTIVES PAR<br>LES VESICULES LUTOÏDIQUES.....                                                                                                                 | 39 |
| A. Conditions standards d'incubation.....                                                                                                                                                                          | 39 |
| B. Incorporation du [ <sup>14</sup> C]-citrate par les vésicules lu-<br>toïdiques.....                                                                                                                             | 39 |
| C. Mesure de la distribution transmembranaire de<br>molécules lipophiles radioactives.....                                                                                                                         | 41 |
| D. Préparation des échantillons pour la mesure<br>de la radioactivité.....                                                                                                                                         | 41 |
| E. Détermination du rapport de concentration d'une<br>molécule distribuée entre les compartiments<br>extra- et intravésiculaires.....                                                                              | 42 |
| IV - METHODES DE DOSAGE.....                                                                                                                                                                                       | 45 |
| A. Dosages des activités enzymatiques.....                                                                                                                                                                         | 45 |
| 1) L'activité phosphatase acide (EC.3.1.3.2.).                                                                                                                                                                     | 45 |
| 2) L'activité ATPase.....                                                                                                                                                                                          | 46 |
| 3) L'activité malate-déshydrogénase<br>(EC. 1.1.1.37).....                                                                                                                                                         | 46 |
| B. Détermination des teneurs en citrate et en protéines                                                                                                                                                            | 47 |
| 1) dosage du citrate.....                                                                                                                                                                                          | 47 |
| 2) dosage des protéines.....                                                                                                                                                                                       | 47 |
| V - OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES.....                                                                                                                                                                               | 49 |
| <br>CHAPITRE III : LA FORMATION DE VESICULES A PARTIR DE MEMBRANES<br>VACUOLAIRES LYOPHILISEES.....                                                                                                                | 51 |
| I - LA MISE EN EVIDENCE D'UN COMPARTIMENT VESICULAIRE ENGENDRE<br>A PARTIR DE MEMBRANES LUTOÏDIQUES LYOPHILISEES.....                                                                                              | 55 |
| A. Données biochimiques.....                                                                                                                                                                                       | 55 |
| 1) L'utilisation de l'activité phosphatase aci-<br>de résiduelle comme marqueur vésiculaire...                                                                                                                     | 55 |
| 2) La rétention de l'activité malate -<br>déshydrogenase cytoplasmique par les<br>membranes lutoïdiques comme marqueur<br>vésiculaire.....                                                                         | 57 |
| 3) L'emploi de molécules radioactives<br>perméantes et non-perméantes pour la<br>détermination du volume vésiculaire.....                                                                                          | 59 |
| B. Données physico-chimiques: l'utilisation de la<br>méthode de J.B. CHAPPELL (1968) pour suivre toute<br>modification du volume vésiculaire induite pour<br>un changement de la tonicité du milieu d'incubation.. | 62 |
| C. Données morphologiques.....                                                                                                                                                                                     | 63 |
| II - LES MODIFICATIONS DU COMPARTIMENT VESICULAIRE INDUITE<br>PAR LE CONDITIONNEMENT.....                                                                                                                          | 65 |
| A. Séparation des vésicules par centrifugation<br>sur gradient.....                                                                                                                                                | 65 |
| 1) L'influence de la température.....                                                                                                                                                                              | 66 |
| 2) L'influence de la nature du tampon<br>de vésiculation.....                                                                                                                                                      | 67 |
| B. Séparation des vésicules par électrophorèse<br>en veine liquide.....                                                                                                                                            | 68 |

|                        |    |
|------------------------|----|
| III - CONCLUSIONS..... | 71 |
|------------------------|----|

#### CHAPITRE IV : CARACTERISTIQUES DE L'INCORPORATION DE CITRATE PAR LES VESICULES VACUOLAIRES..... 73

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I - CARACTERES VESICULAIRES DE L'INCORPORATION DE CITRATE<br>PAR UN SEDIMENT MEMBRANAIRE. IMPORTANCE DE L'ADSORPTION.... | 75 |
| A. Influence de la température.....                                                                                      | 76 |
| 1) Sur l'amplitude de l'incorporation du<br>citrate pour un compartiment vésiculaire..                                   | 76 |
| 2) Sur l'état des vésicules et leur aptitude<br>à fixer le citrate.....                                                  | 76 |
| B. Influence de l'isotonicité du milieu de reprise.<br>Effet du choc osmotique.....                                      | 77 |
| C. Action des détergents.....                                                                                            | 78 |
| II - DETERMINATION DU $K_m$ ET DU $V_m$ DE LA CINETIQUE D'INCORPORATION                                                  | 81 |
| III - INFLUENCE DU pH DU MILIEU D'INCUBATION SUR L'INCORPORATION<br>DU CITRATE.....                                      | 85 |
| IV - INFLUENCE DE L'EFFLUX DANS DIFFERENTES CONDITIONS<br>EXPERIMENTALES.....                                            | 87 |
| V - EVOLUTION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DU SEDIMENT SPECIFIQUE<br>AU COURS DE L'INCUBATION.....                           | 89 |
| VI - DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.....                                                                                     | 93 |

#### CHAPITRE V : DETERMINATION DE LA FORCE MOTRICE PROTONIQUE DEVELOPPEE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE VACUOLAIRE..... 95

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I - LA MESURE DE LA DIFFERENCE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE.....                                                                         | 101 |
| A. Principe de la méthode.....                                                                                                       | 101 |
| B. Résultats.....                                                                                                                    | 103 |
| 1) Cinétique d'incorporation des molécules<br>lipophiles par les vésicules<br>vacuo-lysosomales.....                                 | 103 |
| 2) Influence du conditionnement des vésicules<br>sur la rétention des molécules lipophiles                                           | 104 |
| 3) Influence des cations diffusibles sur la<br>rétention des molécules lipophiles par les<br>vésicules.....                          | 106 |
| 4) Influence du chlorure d'ammonium et du $TPP^+$<br>sur la distribution à l'équilibre des<br>molécules lipophiles.....              | 108 |
| 5) Influence des ionophores sur l'accumulation<br>du $TPMP^+$ par les vésicules.....                                                 | 108 |
| C. Conclusions.....                                                                                                                  | 111 |
| II - LA MESURE DU GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE pH.....                                                                               | 113 |
| A. Principe de la méthode .....                                                                                                      | 114 |
| B. Résultats.....                                                                                                                    | 115 |
| 1) Estimation du pH intravésiculaire<br>à partir de la distribution transmembranaire<br>à l'équilibre de la méthylamine ou du D.M.O. | 115 |
| 2) Cinétique d'incorporation de la méthylamine<br>et du D.M.O. par les vésicules.....                                                | 116 |
| 3) Influence du conditionnement des vésicules<br>sur la rétention des molécules lipophiles..                                         | 116 |

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4) Influence du pH du milieu d'incubation sur le pH des vésicules.....                                                                     | 118 |
| 5) Influence de fortes concentrations en sels sur le pH intravésiculaire.....                                                              | 119 |
| 6) Influence des ionophores sur le gradient transmembranaire de pH estimé à partir de la distribution à l'équilibre de la méthylamine..... | 120 |
| C. Conclusions.....                                                                                                                        | 121 |
| III - CONCLUSIONS : DIFFERENTES ESTIMATIONS DE LA FORCE MOTRICE PROTONIQUE DEVELOPPEE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE VESICULAIRE                 | 123 |

## CHAPITRE VI : L'EXISTENCE D'UNE POMPE-A-PROTONS AU NIVEAU DE LA MEMBRANE VACUOLAIRE.....

125

|                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I - INFLUENCE DE L'ATP SUR LE GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE pH                                                                      | 129 |
| A. Mise en évidence d'un processus d'acidification.....                                                                            | 129 |
| B. Influence des inhibiteurs de l'ATPase vésiculaire sur l'acidification induite par l'ATP.....                                    | 130 |
| C. Effet du pH du milieu d'incubation sur le processus d'acidification induit par l'ATP.....                                       | 131 |
| II - INFLUENCE DE L'ATP SUR LA DIFFERENCE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE.....                                                            | 133 |
| A. Mise en évidence d'une dépolarisation associée à l'hydrolyse de l'ATP-Mg <sup>2+</sup> .....                                    | 133 |
| B. Influence des inhibiteurs de l'ATPase vésiculaire sur l'amplitude de la dépolarisation induite par l'ATP-Mg <sup>2+</sup> ..... | 134 |
| C. Effet du pH du milieu d'incubation sur l'amplitude de la dépolarisation induite par l'ATP.....                                  | 134 |
| III - CONCLUSIONS.....                                                                                                             | 137 |

## CHAPITRE VII : LE COUPLAGE DE L'INCORPORATION DU CITRATE AVEC LE GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE pH.....

141

|                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I - LA VESICULATION DANS DES MILIEUX DE pH DIFFERENTS.....                                                                                           | 145 |
| A. Influence du pH de vésiculation (pour un pH de même nature).....                                                                                  | 145 |
| B. Influence de la nature du milieu de vésiculation et de la valeur de son pH.....                                                                   | 146 |
| C. Influence de l'E.D.T.A.....                                                                                                                       | 146 |
| II - L'EMPLOI D'IONOPHORES DANS DES CONDITIONS OU LE GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE pH EST MODIFIE.....                                                | 147 |
| A. L'intervention du potentiel membranaire dans l'accumulation du citrate.....                                                                       | 147 |
| B. L'intervention du gradient transmembranaire de pH dans l'accumulation du citrate.....                                                             | 148 |
| 1) Intervention de la nigréicine sur l'incorporation du citrate par des vésicules préparées dans un milieu de Tager normal (300 mM mannitol, pH 6,0) | 148 |
| 2) Influence de la nigréicine sur l'incorporation de citrate par des vésicules préparées en présence de KCl.....                                     | 148 |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| III - L'INCUBATION DANS DES CONDITIONS EXPERIMENTALES           |     |
| OU L'ATPase MEMBRANAIRE EST FONCTIONNELLE.....                  | 151 |
| A. Influence de l'ATP sur la cinétique de l'absorption          |     |
| du citrate par les vésicules.....                               | 151 |
| B. Effet de la concentration en ATP du milieu                   |     |
| d'incubation sur l'incorporation du citrate.....                | 152 |
| C. Relation entre le fonctionnement de la pompe-à-protons       |     |
| et la capacité d'incorporation du citrate.....                  | 153 |
| D. Influence des inhibiteurs de l'ATPase et des                 |     |
| découplants sur l'incorporation du citrate.....                 | 153 |
| IV - INFLUENCE DU CHLORURE D'AMMONIUM, DE LA METHYLAMINE        |     |
| ET DU TPP <sup>+</sup> SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR LES   |     |
| VESICULES VACUO-LYSOSOMALES.....                                | 155 |
| V - CONCLUSIONS.....                                            | 157 |
|                                                                 |     |
| CHAPITRE VIII : ANALYSE DES RESULTATS .....                     | 159 |
|                                                                 |     |
| I - L'ACTIVITE ATPase EN TANT QUE POMPE-A-PROTONS.....          | 162 |
| II - L'ORIGINE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE                    |     |
| (EN ABSENCE D'ATPase FONCTIONNELLE).....                        | 167 |
| III - LA DISTRIBUTION DU CITRATE EN SES DIFFERENTES FORMES..... | 171 |
| IV - LES PROBLEMES POSES PAR LE TRANSPORT DU CITRATE.....       | 173 |
| A. La nature du substrat.....                                   | 173 |
| B. L'effet du transport du citrate sur le potentiel             |     |
| membranaire.....                                                | 174 |
| C. L'effet du potentiel membranaire sur le transport            |     |
| du citrate.....                                                 | 175 |
| D. L'intervention du magnésium dans le transport et dans        |     |
| l'accumulation du citrate.....                                  | 177 |
| E. L'intervention des protons dans le transport                 |     |
| du citrate.....                                                 | 179 |
| F. L'existence d'une compartimentation interne                  |     |
| d'ordre cinétique.....                                          | 181 |
| V - LE COUPLAGE DU TRANSPORT DU CITRATE AVEC L'ACTIVITE         |     |
| ATPase FONCTIONNANT COMME UNE POMPE-A-PROTONS.....              | 183 |
| VI - TENTATIVES DE MODELISATION DU TRANSPORT DU CITRATE.....    | 187 |
| A. Hypothèse d'un simple rééquilibrage des différentes          |     |
| formes de citrate entre les compartiments extra et              |     |
| intravésiculaires dû au gradient transmembranaire               |     |
| de pH.....                                                      | 189 |
| B. Hypothèse du fonctionnement du transporteur selon            |     |
| un mécanisme antiport $RH^{2-}/nH^{+}$ .....                    | 191 |
| C. Insuffisance de la seconde hypothèse                         |     |
| et complémentarité.....                                         | 193 |
| 1) Schéma du fonctionnement du transporteur                     |     |
| selon le mécanisme antiport $RH^{2-}/H^{+}$ .....               | 193 |
| 2) Effet de la teneur initiale en citrate et                    |     |
| de la présence de $Mg^{2+}$ dans le milieu                      |     |
| d'incubation sur l'incorporation et                             |     |
| l'accumulation de citrate.....                                  | 194 |
| 3) La prise en compte de l'effet du potentiel                   |     |
| électrique dans le modèle.....                                  | 195 |
| D. Bilan.....                                                   | 199 |

|                                                                                              |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| VII - L'EXIGENCE ENERGETIQUE DU TRANSPORT DU CITRATE.....                                    | 201     |
| A. L'exigence liée au transport de la forme perméante.....                                   | 201     |
| B. L'exigence liée à l'accumulation du citrate.....                                          | 204     |
| C. Bilan.....                                                                                | 205     |
| VIII - CONCLUSIONS.....                                                                      | 207     |
| A. La capacité d'accumulation du citrate par les vésicules vacuolaires.....                  | 207     |
| B. Comparaison avec les différents autres systèmes membranaires transportant le citrate..... | 209     |
| 1) le tonoplaste des plantes crassulaciennes                                                 | 209     |
| 2) les membranes mitochondriales.....                                                        | 210     |
| 3) les membranes bactériennes.....                                                           | 212     |
| C. Bilan.....                                                                                | 214     |
| <br>CHAPITRE IX : <u>CONCLUSIONS GENERALES</u> .....                                         | <br>215 |
| <br>BIBLIOGRAPHIE.....                                                                       | <br>227 |



CHAPITRE I

I N T R O D U C T I O N

De par son importance économique, l'*Hevea brasiliensis*, un arbre tropical appartenant à la famille des Euphorbiacées, a fait l'objet de nombreuses études en relation avec la production de caoutchouc. En effet, le latex récolté en incisant l'écorce (ce qui correspond à saigner l'arbre) constitue la principale source de caoutchouc naturel.

Malgré les progrès certains caractérisant la chimie des polyisoprénoïdes de synthèse, il n'a pas été possible encore de remplacer totalement le caoutchouc naturel par un produit de substitution de qualité équivalente à un coût moindre.

Mais, ce n'est pas là le seul intérêt du latex d'*Hevea brasiliensis*. Ses propriétés biologiques en font un matériel végétal particulièrement intéressant notamment pour étudier les caractéristiques d'un organite subcellulaire. Il s'agit d'un compartiment vacuolaire présentant des caractéristiques lysosomales (S. PUJARNISCLE, 1968 ; D. RIBAILLIER et al, 1971).



# I - L'ORIGINE DU LATEX. LA MISE EN PLACE DES LATICIFERES ET LEUR ONTOGENESE.

Le latex d'*Hevea brasiliensis* est contenu dans des vaisseaux anastomosés présents dans tous les organes de la plante, ce qui l'oppose à celui des Apocynacées, des Asclépiadacées, des Moracées, des Urticacées et de certaines Euphorbiacées, où il se trouve enfermé dans une immense vacuole contenue dans un tube simple au protoplasme très réduit (F. MARTY, 1968 ; W.A. SOUTHORN, 1961 et 1964.)

Les laticifères sont des productions libériennes, se formant au niveau de l'écorce du tronc. Certes, il existe une certaine variabilité structurale fonction de nombreux facteurs (age de l'arbre, type du clone, rythme des saisons, multiplicité des saignées, état du panneau de saignée,...). Mais, si l'on considère la structure type décrite par C. HEBANT et E. DE FAY (1980), le cambium s'accroît de façon rythmique. Dans la zone située près du cambium, au sein d'un phloème secondaire, se trouvent une couche étroite de phloème conducteur, caractérisé par un ensemble de tubes criblés fonctionnels, puis une couche de phloème non actif où les tubes criblés s'avèrent écrasés. Les vaisseaux laticifères sont produits rythmiquement au sein de ce phloème. Seulement, un nombre limité d'anneaux de vaisseaux laticifères (2 à 6) est observé au sein de la zone de phloème conducteur. Il est nettement plus important (25 à 35) dans le phloème externe non conducteur. La majorité des laticifères se trouvent dans la zone des tubes criblés écrasés. Ils se répartissent en des manteaux concentriques reliés spatialement les uns aux autres par des rayons multisériés existant autant

dans le phloème que dans le xylème. La présence de ces rayons est fondamentale dans l'alimentation des laticifères. Il existerait un transit vertical assuré par les vaisseaux du xylème (eau, ions) et les tubes criblés du phloème (assimilats) et un transit horizontal où seraient impliqués ces rayons (C. HEBANT et E. DE FAY, 1980).

Initialement, les jeunes laticifères sont formés de cellules courtes, où l'on trouve, à côté de constituants normaux de toute cellule végétale (noyaux, microsomes, mitochondries, ribosomes,...) tout un ensemble de structures qui leur sont spécifiques, les lutoïdes et les particules de Frey-Wyssling (W. BOBILIOFF, 1923 ; E.H. ANDREWS et P.B. DICKENSON, 1961 a et b ; P.B. DICKENSON, 1965 et 1969). Par la suite, les parois transversales des cellules laticifères disparaissent et les cytoplasmes fusionnent pour constituer des systèmes anastomosés décrits comme formant le manteau laticifère. L'évolution de ce tissu laticifère aboutira à des vaisseaux plus âgés ne contenant plus que des particules de caoutchouc (P.B. DICKENSON, 1965 et 1969).

Le fait de saigner périodiquement un arbre constitue un aspect non naturel de la récolte du latex. Il conduit inévitablement à modifier la régénération de l'écorce voire à l'altérer de telle façon qu'à l'extrême, il ne s'écoule plus aucun latex des laticifères. Le phénomène de l'encoche sèche apparaît. Diverses recherches visent aujourd'hui à réduire son incidence économique.

Ainsi, le latex, obtenu par saignée, en effectuant une encoche dans l'écorce de l'arbre, correspond au cytoplasme fluide des vaisseaux laticifères les plus superficiels (E.H. ANDREWS et P.B. DICKENSON, 1961 a et b ; E.G. COCKBAIN et W.A. SOUTHORN, 1962 ; P.B. DICKENSON, 1965 et 1969).

Mais, comme le souligne F. HALLE (1977), le latex provenant de la saignée, est un mélange de constituants à des stades ontogéniques différents qui, par conséquent, ont des caractères histologiques et biologiques très variés. Par ailleurs, il contient aussi des constituants d'origine cellulaires diverses (tannins, sève élaborée...). C'est un point essentiel souvent oublié.

## II - LA COMPOSITION MORPHOLOGIQUE DU LATEX.

Par un moyen simple, ne nécessitant aucune intervention drastique détruisant les structures cellulaires présentes dans le cytoplasme, il est possible d'obtenir des quantités souvent non limitantes de cytoplasme. Aussi, ne faut-il pas s'étonner que ce matériel biologique ait fait l'objet de nombreuses études autant morphologiques que biochimiques, en relation ou non avec la synthèse du caoutchouc (voir le Colloque sur la Physiologie du latex d'*Hevea brasiliensis*, 9-10 septembre 1975, Montpellier, ou les différents Proceedings of the Natural Rubber Research Conference, Kuala-Lumpur, 1960, 1968 et 1975).

Depuis les travaux de A.S. COOK et B.C. SEKHAR (1955) qui ont séparé trois phases par centrifugation du latex, des études morphologiques faites en microscopie électronique ont permis de décrire l'ensemble des organites qu'il contient (E.H. ANDREWS et P.B. DICKENSON, 1961 a et b ; P.B. DICKENSON, 1965 et 1969 ; C. HEBANT et E. DE FAY, 1980).

On y trouve :

- Les particules de caoutchouc,

Elles représentent 30 à 40 % de la masse et 60 % du volume de latex frais. Elles ont la forme de sphérules dont la taille varie de 0,03 à 3 $\mu$ m. Elles seraient entourées d'un mince film phospholipoprotéique (J.R. RICHES et E.G.B. GOODING, 1952) voire gluco-phospho-lipoprotéique (C. HEBANT et E. DE FAYE, 1980).

- Les Lutoïdes,

Découverts par L.N.S. HOMANS et G.E. VAN GILS (1949), ils représentent 10 à 20 % de la masse et environ 15 à 20 % du volume de latex frais. Leur taille varie de 1 à 15  $\mu\text{m}$ . Ils sont limités par une membrane simple de 8 à 10 nm d'épaisseur (E.H. ANDREWS et P.B. DICKENSON, 1961 a et b ; P.B. DICKENSON, 1965 et 1969 ; J.B. GOMEZ et W.A. SOUTHORN, 1969).

Comme le souligne M. COUPE (1977), des organites analogues ont été décrits dans la plupart des plantes à latex examinés jusqu'à ce jour (H. MOLISCH, 1901 ; J. RUINEN, 1950 a et b ; W.A. SOUTHORN, 1964 ; W. SOUTHORN, 1961 ; F. MARTY, 1968, 1971 et 1978).

- Les particules de Frey-Wyssling,

Elles ont été découvertes par A. FREY-WYSSLING (1929). Elles représentent 1 à 3 % du volume total du latex. Leur taille varie de 1 à 3  $\mu\text{m}$ . Elles contiennent des inclusions de caroténoïdes qui leur sont spécifiques et qui leur donnent cette coloration jaune caractéristique. Elles sont délimitées par une double membrane, dont le feuillet interne engendre des invaginations complexes (P.B. DICKENSON, 1965 et 1969).

- Les Ribosomes,

Leur isolement, sous forme de polysomes (M. COUPE et J. D'AUZAC, 1972), a permis d'analyser les caractéristiques de la synthèse protéique qu'ils sont capables de catalyser (M. COUPE et J. D'AUZAC, 1974 a) dans les conditions connues pour augmenter la productivité de l'*Hevea brasiliensis* (M. COUPE et al., 1976 ; M. COUPE et C. LAMBERT, 1977 ; M. COUPE, 1977).

- Les autres organites du latex,

A en croire les travaux de P.B. DICKENSON (1969), les noyaux et les mitochondries existent dans les jeunes laticifères. Mais, au cours de leur ontogénèse, ils disparaissent en par-

tie et le reste se confîne dans un cytoplasme pariétal visqueux (C. HEBANT et E. DE FAYE, 1980). Ils sont rarement présents dans le latex récolté lors de la saignée. J. TUPY (1969) a caractérisé quelques noyaux en dosant l'ADN. J. D'AUZAC (1965) et S. PUJARNISCLE (1968 et 1971) ont discerné quelques mitochondries par mise en évidence d'activités enzymatiques liées au cycle de Krebs et d'activité cytochrome-oxydase. La présence d'activité catalase et d'activité peroxydase pose le problème de l'existence des peroxysomes (M. COUPE et al., 1972).

Finalement, le latex obtenu par saignée correspond au cytoplasme fluide d'un syncytium laticifère ne contenant essentiellement que les organites qui lui sont spécifiques : les particules de caoutchouc, les lutoïdes et les particules de Frey-Wyssling.





### III - LE CARACTERE VACUO-LYSOSOMAL DES LUTOIDES.

Ces lutoïdes ont fait l'objet de nombreuses études. Ils constituent dans le latex d'*Hevea brasiliensis* un vacuome polydispersé à caractère lysosomal (S. PUJARNISCLE, 1965, 1966, 1968 et 1971 ; D. RIBAILLIER et al., 1971). On retrouve cette dualité de la fonction vacuolaire qui a fait de nombreuses polémiques en son temps (P. MATILE, 1969 et 1978 ; P.B. GAHAN, 1973).

#### A. LA FONCTION LYSOSOMALE

L'équipement enzymatique des lutoïdes devient particulièrement bien connu depuis les études initiées par R.H. SMITH (1953) caractérisant une activité phospholipase. Elles ont été poursuivies par B.L. ARCHER et al. (1969) découvrant une activité adénosine-ribohydrolase et une activité phosphatase acide ou par S.J. TATA et al. (1976) mettant en évidence une activité lysozyme. Elles ont été continuées par S. PUJARNISCLE (1965, 1966, 1968 et 1971) identifiant un large spectre d'activités hydrolases acides (phosphatase, phosphodiesterase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, cathepsine, ribonucléase, déoxyribonucléase, phospholipase D, différentes estérases non spécifiques). En effet, l'optimum d'activité est obtenu vers pH 3,6 pour la cathepsine, vers pH 5,0 pour la phosphatase acide et pour la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, vers pH 5,5 pour la  $\beta$ -galactosidase et

pour la ribonucléase acide, vers pH 6,0 pour la phosphodiesterase et pour la deoxyribonucléase et vers pH 7,0 pour la  $\beta$ -glucosidase. Certaines d'entre-elles ont même été isolées (J.L. JACOB et N. SONTAG, 1974 ; S.J. TATA et al., 1976).

Toutes ces activités hydrolytiques sont sous forme latente dans ces organites. Elles ne peuvent être révélées que dans la mesure où la membrane limitante est rompue, soit par traitement avec un détergent non ionique (Triton X-100 ou X-114), soit par choc osmotique par exposition dans un milieu hypotonique (S. PUJARNISCLE, 1968).

Les lutoïdes ne s'avèrent donc pas différents des vacuoles isolées de protoplastes de *Saccharomyces cerevisiae* voire de tissus végétaux supérieurs.

En effet, la plupart des connaissances sur la composition enzymatique des vacuoles proviennent d'études faites sur des champignons unicellulaires comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Neurospora crassa*. Toutefois, le développement des techniques introduites par E.C. COCKING (1960) pour engendrer des protoplastes et par G.J. WAGNER et E.N. SIEGELMAN (1975) pour en isoler les vacuoles a permis de généraliser ces résultats aux tissus des végétaux supérieurs. Aussi, ne faut-il pas être surpris outre-mesure si, à partir de toutes les données récentes concernant la compartimentation des activités enzymatiques dans la cellule végétale, P. MATILE en a conclu que la vacuole pouvait être comparé directement au compartiment lysosomal des cellules animales (P. MATILE, 1969, 1975 et 1978 ; P. MATILE et A. WIEMKEN, 1976).

C'est une conclusion à laquelle S. PUJARNISCLE était parvenu dans son étude faite dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* dès 1968.

On remarquera l'existence d'une activité peroxydase dans le compartiment lutoïdique (M. COUPE et al., 1972). La localisation vacuolaire de cette activité enzymatique est originale. Elle a été longtemps contestée pour les autres tissus végétaux. Mais, c'est maintenant un fait bien établi, soit par isolement direct des vacuoles (P. PARISH, 1975 a et b ; T. BOLLER et M. KENDE, 1979 ; K. GROB et P. MATILE, 1980), soit par localisation cytochimique (N. POUX, 1969 et 1974 ; Y. CZANINSKI et A.M. CATESSON, 1969 ; F. MARTY, 1971 et 1978 ; F. MARTY et D. BRANTON, 1980).

## B. LA FONCTION VACUOLAIRE

Cette fonction vacuolaire du compartiment lutoïdique, suggérée par L.K. WIERSUM (1957), a été caractérisée par de nombreuses études autant morphologiques que biochimiques. Ces études permettent de retrouver les propriétés caractéristiques d'un vacuome :

- la membrane lutoïdique présente une hémiperméabilité partielle, associée à une perméabilité sélective,
- elle maintient la turgescence cellulaire liée aux phénomènes osmotiques d'entrée d'eau,
- ce compartiment assure une fonction détoxifiante vis-à-vis de certains produits du métabolisme en les accumulant,
- il réalise une fonction de stockage de réserves, susceptible d'être mobilisées ultérieurement.

Nous ne chercherons pas à être exhaustif. Cependant, nous développerons ces deux derniers points.

### 1) La fonction détoxifiante

Cette fonction détoxifiante vis-à-vis de certains produits du métabolisme ou de molécules exogènes a été décrite maintes fois.

Ainsi, B.L. ARCHER et al. (1969) démontrent que les lutoïdes sont capables d'accumuler l'ergothionéine absorbée dans le sol par les racines d'*Hevea brasiliensis*. Toutefois, ce n'est pas spécifique des lutoïdes. La couleur jaunâtre des iodo blastes des tissus de *Macleaya cordata* est due à la sanguinarine localisée dans les vacuoles (D. NEUMANN et E. MULLER, 1967). La nicotine se retrouve intégralement dans le vacuome de *Nicotiana rustica* (J.A. SAUNDERS, 1979). L'essentiel de la morphine du latex de *Papaver somniferum* est contenue dans le compartiment vacuolaire (J.W. FAIRBAIRN et al., 1974).

Les résultats obtenus depuis les travaux de D. RIBAILLIER et al. (1971) montrent une compartimentation extrêmement marquée de certains effecteurs voire de métabolites intermédiaires dans le latex d'*Hevea*

*brasiliensis*.

2) *La compartimentation des acides organiques, des amino-acides et des ions dans le latex d'Hevea brasiliensis.*

Comme l'indiquent les travaux de D. RIBAILLIER (1972), les acides organiques et les acides aminés sont en larges quantités dans les lutoïdes. Les glucides ne le semblent pas.

- les acides organiques,

Les acides malique et citrique représentent plus de 90 % du pool des acides organiques trouvé dans le latex d'*Hevea brasiliensis* (J. D'AUZAC et S. PUJARNISCLE (1959) cité dans D. RIBAILLIER et al. (1971)). Mais, seul l'acide citrique s'accumule dans le compartiment lutoïdique, l'acide malique se répartissant à peu près également dans les compartiments lutoïdique et cytoplasmique. Cette compartimentation des acides organiques est une propriété caractéristique du vacuome végétal.

Le tonoplaste sépare, dans la cellule végétale, un espace où s'accumulent les acides organiques, le vacuome, d'un espace où se situent des activités enzymatiques souvent sensibles au pH acide. Rappelons que, dans le latex d'*Hevea brasiliensis*, on a établi des corrélations entre la production de caoutchouc et l'amplitude du gradient transmembranaire de pH existant au niveau du compartiment vacuolaire (M. COUPE et al., 1978 ; J. BRZOWSKA et al., 1979). Par ailleurs, diverses enzymes intervenant dans la synthèse isoprénique (invertase, pyruvate-decarboxylase, phospho-~~éno~~l-pyruvate-carboxylase,...) sont sensibles au pH cytoplasmique et à sa variation dans une gamme de valeurs très restreinte.

Parmi les acides organiques trouvés dans le vacuome végétal, on rencontre l'acide citrique, l'acide malique, l'acide oxalique et l'acide isocitrique (G.J. WAGNER, 1979 a). L'accumulation vacuolaire de l'acide malique est un phénomène très bien étudié chez les plantes crassulacées comme *Bryophyllum daigremontianum* ou *Kalanchoë daigremontia*. C'est une observation obtenue, soit par analyse compartimentale (M. KLUGE et B. HEININGER, 1973), soit par analyse du contenu de vacuoles isolées à partir de protoplastes de tissus foliaires (C. BUSER

et P. MATILE, 1977 ; ...).

- les amino-acides,

Dans le latex d'*Hevea brasiliensis*, si la concentration globale en amino-acides se trouve identique dans les compartiments lutoïdique et cytoplasmique, il existe une différence fondamentale dans la distribution des amino-acides contenus dans ces deux compartiments (J. BRZOZOWSKA, P. HANOWER et R. CHEZEAU, 1974). Ainsi, l'acide glutamique et son amide, l'alanine et l'acide aspartique représentent 81 % du pool cytoplasmique. Toutefois, les lutoïdes se distinguent par une forte proportion d'amino-acides basiques, équivalent à plus de 50 % de la teneur globale. Par conséquent, un gradient de concentration important existe entre les deux compartiments au niveau des composés basiques, leur concentration dans les lutoïdes étant de 5 fois (lysine) à 20 fois (acide  $\alpha,\gamma$  - diamino-butyrique) supérieures à celle trouvée dans le cytoplasme.

Une telle compartimentation des amino-acides a été démontrée chez *Saccharomyces cerevisiae* (K.J. INDGE, 1968 a et b ; A. WIEMKEN et P. NURSE, 1973 ; A. WIEMKEN et M. DURR, 1974), chez *Neurospora crassa* (E. MARTINOIA et al., 1979) ou de *Candida utilis* (O. HUBER-WALCHLI et A. WIEMKEN, 1979). Dans la plupart des cas, l'essentiel de l'ornithine et de l'arginine voire de la citrulline se retrouvent dans le vacuome alors que la proline et la glycine se répartissent de façon égale dans les compartiments vacuolaire et cytoplasmique.

Les données expérimentales concernant le vacuome de tissus de végétaux supérieurs sont peu nombreuses. Elles sont souvent contradictoires lorsqu'elles existent (G.J. WAGNER, 1979 a et b). Nous n'en ferons donc pas mention.

- les ions,

La compartimentation peut affecter aussi des substances inorganiques. Ainsi, pour le latex d'*Hevea brasiliensis*, D. RIBAILLIER et al. (1971) ont effectué des analyses quantitatives sur la distribution de quelques ions inorganiques entre le cytoplasme et les lutoïdes. Le plus grand facteur d'accumulation est observé pour le magnésium. Toutefois, le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Ca}^{2+}$  sont également accumulés dans

le vacuome à un moindre degré. Pour ce qui est du potassium, il est uniformément distribué de part et d'autre de la membrane lutoïdique (cf tableau 8.I.). Ces données expérimentales ne sont pas sans importance quand on connaît leur impact sur la régulation d'un certain nombre d'activités enzymatiques présentes dans le cytoplasme (cf Colloque sur la Physiologie du Latex d'*Hevea brasiliensis*, 1977). Par ailleurs, il existe un contenu relativement important en phosphate acido-soluble dans les lutoïdes. Le facteur d'accumulation observé est de l'ordre de 8,7 (D. RIBAILLIER et al., 1971). Mais, la nature de ce phosphate n'est pas définie.

Les études menées sur le vacuome de *Saccharomyces cerevisiae* montrent que celui-ci contient surtout un polyphosphate dont le rôle est essentiel dans le processus d'accumulation des cations (K.J. INDGE, 1968 b ; K. URECH et al., 1978).

Notre propos n'est pas d'être exhaustif. Des études particulièrement approfondies sur la compartimentation ionique dans les cellules végétales ont été faites (E.A.C. Mc ROBBIE, 1970, 1971, 1975, et 1977). Nous le mentionnons car elles constituent des références fondamentales auxquelles chacun peut se reporter, le cas échéant. Nous ne nous attachons qu'à démontrer ici la similitude existant entre les lutoïdes et le vacuome des végétaux supérieurs.

On fera une remarque particulière sur un travail d'E. MARTINOIA et al. (1981). Ces auteurs considèrent le vacuome isolé de feuilles d'orge comme le site préférentiel de l'accumulation intracellulaire de nitrate. Il semblerait qu'il en soit de même pour le latex (J.L. JACOB, communication personnelle). Cette observation constitue un autre point de convergence entre les lutoïdes et le vacuome végétal.

#### IV - LES CARACTERES DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE.

Peu de choses sont connues sur les propriétés du tonoplaste des cellules végétales. La plupart des données expérimentales, dont nous disposons actuellement, proviennent des levures mais aussi du latex d'*Hevea brasiliensis*.

##### A. LA COMPOSITION LIPIDIQUE DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE ET SES CONSEQUENCES.

Ainsi que le révèle P. MATILE (1978), les propriétés du tonoplaste et du plasmalemme semblent différer considérablement. Elles concernent, par exemple, la stabilité des protoplastes et des vacuoles en fonction du pH et de l'osmolarité du milieu. Elles ne sont pas également sensibles aux antibiotiques polyéniques et aux polycations.

Par ailleurs, non seulement le contenu en lipides mais aussi la composition phospholipidique varient entre le plasmalemme et le tonoplaste. Le tonoplaste isolé de *Saccharomyces cerevisiae* s'avère pauvre en stérols, plus particulièrement en ergostérol, et riche en phospholipides, avec une grande proportion d'acides gras insaturés (R. KRAMER et al., 1978). Le phospholipide le plus représenté est le phosphatidylstérol. Cette composition expliquerait en partie la résistance de cette membrane à la nystatine mais aussi sa remarquable élasticité (W. NIEDERMEYER et al., 1976 a et b ; J. SCHWENCKE et al., 1976).

En cela, ce tonoplaste s'oppose à la membrane lutoïdique du latex



d'*Hevea brasiliensis*, qui est sensible au choc hypotonique (S. PUJARNISCLE, 1969). Mais, sa composition lipidique est particulière et originale. Elle se montre complètement dépourvue de phosphatidyl-choline et de phosphatidyl-éthanolamine, deux phospholipides azotés généralement bien représentés dans le règne végétal. Ce contenu contraste avec celui décrit pour la membrane vacuolaire de *Beta vulgaris* (F. MARTY et D. BRANTON, 1980). Par contre, la membrane lutoïdique est très riche en acide phosphatidique (J. DUPONT et al., 1976). Cet acide phosphatidique représente plus de 80 % de la masse totale des phospholipides. Près de la moitié des acides gras estérifiant cet acide sont saturés. Ce sont essentiellement les acides palmitique et stéarique, le reste étant représenté par les acides oléique et linoléique. L'acide linoléique en est absent.

Une telle composition de la membrane lutoïdique rend compte d'un certain nombre de propriétés connues. D'une part, la grande teneur en acide phosphatidique lui confère une charge électronégative très élevée qui permet ainsi aux lutoïdes de rester en suspension dans le latex, à l'intérieur des vaisseaux laticifères, les particules de caoutchouc étant eux-mêmes chargées négativement. La neutralisation partielle de cette charge serait à l'origine du processus de coagulation. Mais, il s'agit là d'un phénomène complexe faisant intervenir plusieurs processus différents (P. HANOWER et al., 1976). D'autre part, l'accumulation de certains cations ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , ...) dans le milieu vacuolaire peut être facilitée par la présence de ce phospholipide acide, comme cela a été suggéré par ailleurs (L. SCHLATZ et G.V. MARNETTI, 1972). Enfin, la teneur relativement élevée en acides gras saturés (palmitique et stéarique) de la membrane lutoïdique semble comparable à celle de la membrane externe des mitochondries végétales ou de l'enveloppe des chloroplastes (R. DOUCE et al., 1978). Elle peut expliquer dans une certaine mesure la relative rigidité de la membrane des lutoïdes caractérisée par J.B. GOMEZ et W.A. SOUTHORN, (1969) en microscopie électronique. De plus, la grande fragilité des lutoïdes lorsqu'ils sont exposés dans un milieu hypotonique, trouverait son interprétation dans un manque de fluidité de la membrane, dû à une trop grande richesse en acides gras saturés.

## B. LA PRESENCE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES CONSTITUTIVES.

La caractéristique de ce tonoplaste semble être la présence d'un certain nombre d'activités enzymatiques constitutives, éléments à part entière de cette membrane.

Parmi ces activités membranaires, on notera la NADH-cytochrome c-réductase, l'ATPase et l' $\alpha$ -mannosidase.

### 1) L'activité NADH - cytochrome c-réductase.

La distribution de l'activité NADH-cytochrome c-réductase dans le latex d'*Hevea brasiliensis* est rigoureusement parallèle à celle de la phosphatase acide, ce qui implique que cette activité oxydo-réductase se trouve étroitement associée aux lutoïdes (F. MOREAU et al., 1975). Le choc osmotique, par exposition dans un milieu hypotonique, en démontre sa nature membranaire.

Dès 1968, P. MATILE avait considéré une telle activité comme un marqueur possible du tonoplaste de la cellule végétale bien qu'elle puisse se retrouver au niveau du reticulum endoplasmique, de la membrane nucléaire voire de la membrane mitochondriale externe. Si, pour les lutoïdes, la situation n'est pas ambiguë, il n'en est pas de même pour le vacuome isolé des autres cellules végétales. Les résultats sont contradictoires. Pour certains auteurs, cette activité serait effectivement associée au tonoplaste (R.A. LEIGH et D. BRANTON, 1976 ; P. MATILE, 1968 ; P. MATILE et A. WIEMKEN, 1967 ; J.A. SAUNDERS, 1979). Par contre, d'autres en contestent le bien-fondé (I.J. METTLER et R.T. LEONARD, 1979, G.J. WAGNER, 1979 a).

Dans le cas des lutoïdes et de la membrane lutoïdique, cette activité est insensible à l'antimycine. Elle est spécifique du NADH. Par contre, le ferricyanure de potassium peut-être substitué au cytochrome c comme accepteur d'électrons. Toutefois, il existe deux cytochromes de type b au niveau de cette membrane. L'un, connu comme le cytochrome  $b_{563}$ , est partiellement réduit par le NADH mais il est insensible au NADPH. L'autre, caractérisé comme le cytochrome  $b_{561}$ , est réduit uniquement par l'hydrosulfite. Par contre, il n'y a pas de traces de cytochrome  $P_{450}$ . Si un tel système d'oxydo-réduction (la NADH-cytochrome  $b_5$ -oxydo-réductase) peut être rapproché de celui observé au niveau des microsomes végétaux ou animaux (P. STRITTMATTER et S.F. VELICK,

1957 ; R.P. RICH et D.S. BENDALL, 1975), il en manquerait l'élément qui lui est associé, la NADPH-cytochrome P<sub>450</sub>-réductase.

## 2) L'activité ATPase.

Le fait le plus important semble être la caractérisation, de façon non ambiguë, au niveau de la membrane lutoïdique, de l'activité ATPase (J. D'AUZAC, 1975 et 1977). Elle a été dissociée d'une activité phosphatase acide, contaminante, capable d'hydrolyser l'ATP, par l'emploi d'un inhibiteur spécifique de cette hydrolase, le molybdate d'ammonium. Cette approche s'est généralisée. Elle a été employée avec succès sur le tonoplaste de tissus racinaires de *Beta vulgaris* (A. ADMON, B. JACOBY et E.E. GOLDSCHMIDT, 1980 b ; B. JACOBY, communication personnelle ; R.A. LEIGH et R.R. WALKER, 1980).

La mise en évidence d'une activité ATPase associée aux membranes vacuolaires est essentielle dans la mesure où elle peut intervenir dans un quelconque processus d'énergisation membranaire. Elle peut dès lors être impliquée dans un processus de transport nécessitant une source d'énergie (J. D'AUZAC, 1978).

Une activité ATPase a été également détectée au niveau des tonoplastes isolés des protoplastes de *Tulipa sp.* et d'*Hippeastrum sp.* (W. LIN et al., 1977) voire de *Nicotiana rustica* (J.A. SAUNDERS, 1979). Elle est suggérée pour les tissus racinaires de *Beta vulgaris* (S. DOLL et al., 1979). Les récents résultats d'A. ADMON et al. (1980) et de R.A. LEIGH et al. (1980) le confirment.

Dans la plupart des cas, cette activité présente un pH optimum vers 6,0, contrastant avec les résultats de J.D'AUZAC (1977), indiquant une valeur variant entre 6,5 et 7,75 selon la nature du milieu (phosphate de potassium ou tris). Notons cependant que B. JACOBY (communication personnelle) et R.A. LEIGH et R.A. WALKER (1980) ont trouvé, pour leur part, respectivement une valeur de 7,5 pour un milieu tris et de 8,0 pour un milieu tris-M.E.S. Par ailleurs, elle est activée par K<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup>. Le manque d'effet de l'oligomycine en élimine son éventuelle nature mitochondriale. L'absence d'action du D.E.S. et du vanadate en exclut sa nature plasmalemmique.

Naturellement, sa présence est décelée chez *Saccharomyces cerevisiae* (A. WIEMKEN, 1969 et 1975 ; A. WIEMKEN et al., 1979). Ces auteurs séparent deux activités hydrolysant l'ATP : une première, insen-

sible à l'oligomycine et dont le pH optimum est 7,0 et une seconde, présentant le même pH optimum, mais insensible à  $\text{NaN}_3$ . De part ces propriétés, ils en déduisent que la première serait d'origine tonoplastique alors que la seconde serait de nature mitochondriale. Une co-sédimentation des membranes plasmalemmique et mitochondriale avec le tonoplaste est toujours possible, ainsi que le suggèrent W. VAN DER WILDEN et P. MATILE (1978). Ces auteurs observent une co-sédimentation, dans la même fraction, d'une activité NADPH-cytochrome c-réductase et d'une activité ATPase associée à l' $\alpha$ -mannosidase, une activité marqueur du tonoplaste de *Saccharomyces cerevisiae* (W. VAN DER WILDEN et al., 1973). Cette fraction contient aussi de l'ARN ribosomal. Ce résultat est à rapprocher de ceux de B. MARIN (1978) sur la membrane lutoïdique du latex d'*Hevea brasiliensis*.

De tels résultats s'inscrivent dans une querelle byzantine. Ainsi, I.J. METTLER et R.T. LEONARD (1979) estiment que cette activité ATPase tonoplastique est artéfactuelle. L'hydrolyse de l'ATP serait effectuée par une activité phosphatase acide résiduelle qualifiée d'aspécifique. Mais, dans ce travail, aucune tentative particulière n'est faite pour l'inhiber et pour savoir dans quelle mesure il n'existe pas une activité ATPase potentielle selon la méthodologie introduite par J. D'AUZAC (1975).

### 3) L'activité $\alpha$ -mannosidase.

Selon W. VAN DER WILDEN et al. (1973), cette activité enzymatique est typiquement membranaire. Mais, pour les lutoïdes, près de 95 % de l'activité se retrouve dans le milieu interne (J. D'AUZAC, 1981). Son optimum est obtenu à pH 4,25.

Le caractère acide de cette hydrolase est manifeste. Seule, sa localisation dans le vacuome est ambiguë (T. BOLLER et H. KENDE, 1979 ; H. CANUT, 1980 ; E. MARTINOIA et al., 1981). Elle est, soit membranaire, soit soluble. J. D'AUZAC (1981) estime que la présence d'activité  $\alpha$ -mannosidase au niveau du tonoplaste serait artéfactuelle.

### C. LA MISE EN EVIDENCE DE TRANSPORTEURS.

L'existence même d'une compartimentation aboutissant à la mise en place d'un gradient transmembranaire de concentration implique un processus de transport assuré par un transporteur situé au niveau du tonoplaste. Il a été maintes fois suggéré (G.G. LATIES, 1975 ; E.A.C. Mc ROBBIE, 1975). Mais, son étude n'est pas simple. La plupart des données expérimentales dont nous disposons résultent d'approches indirectes, pouvant être sophistiquées comme l'analyse compartimentale, faites sur des tissus entiers voire des cellules isolées (cf C. GRIGNON, 1974 ou A.M. PENNARUM, 1980, par exemple).

Toutefois, avec la préparation des protoplastes, il est devenu possible d'isoler le vacuome et d'étudier directement de nombreux transporteurs membranaires.

Cependant, là encore, les travaux effectués sur le vacuome de *Saccharomyces cerevisiae* voire de *Neurospora crassa* mais aussi sur les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* demeurent très avancés.

#### 1) Le transport des amino-acides

La pénétration d'acides aminés (acide glutamique), neutre (alanine) et basique (lysine) dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* a été étudiée (P. HANOWER et al., 1977). Il s'avère que seul l'acide glutamique n'est pas accumulé. Les deux autres acides aminés sont incorporés. Par la suite, ce type de recherches a été mené essentiellement sur la lysine et sur l'arginine.

Ainsi, la lysine se trouve transportée contre un gradient transmembranaire de concentration, en absence de toute source d'énergie métabolique, selon un processus linéaire pendant au moins 30 mn. Il suit une cinétique michaelienne en fonction de la concentration en lysine du milieu extérieur. Par ailleurs, il dépend à la fois de la température et du pH.

L'incorporation de la lysine est importante à un pH (7,0) où la quasi-totalité des molécules est représentée par la forme trois fois ionisée. Son optimum se situe entre 7,5 et 8,5. A titre indicatif, l'incorporation de la L-alanine est maximale à pH 6,0. Par conséquent, la pénétration serait optimale pour des valeurs situées au voisinage

du point iso-électrique des molécules transportées. P. HANOWER et al. (1977) en déduisent que les molécules à charges compensées pénètrent mieux la membrane lutoïdique.

Cette incorporation s'accroît en présence d'ATP. Elle se trouve diminuée considérablement en présence de 2,4-dinitrophénol, de chlorure d'ammonium ou de N-éthyl-maléimide. En conséquence, toute modification du gradient transmembranaire de pH entraîne une altération sub-séquente de la capacité d'incorporation de l'acide-amino considéré. L'ATP, en acidifiant le pH intralutoïdique, en augmente l'amplitude. Le chlorure d'ammonium et le 2,4 - DNP le dissipe. Une corrélation entre l'amplitude de l'incorporation de la lysine et la grandeur du gradient transmembranaire de pH est établie. L'hypothèse d'un système de transport spécifique assurant l'échange couplé entre un proton et une molécule de lysine est retenue (P. HANOWER et al., 1977).

De toute cette étude, on doit en conclure qu'il existe un site de transport pour les acides-amino basiques au niveau de la membrane lutoïdique. La spécificité de ce site est discutée. Ainsi, l'incorporation de la L-Lysine se trouve inhibée compétitivement par l'arginine. Or, cette inhibition peut être liée non à l'existence d'un seul site de transport mais à une compétition possible au niveau de l'énergie disponible.

Ce type de transporteur est décrit au niveau du tonoplaste de *Saccharomyces cerevisiae* (T. BOLLER et al., 1975 ; M. DURR et al., 1976 ; M. DURR et al., 1979). L'accumulation de l'arginine est assurée par un transporteur médiat situé au niveau de la membrane vacuolaire (T. BOLLER et al., 1975 ; M. DURR et al., 1979). Sa nature protéique est démontrée (M. DURR et al., 1976). Un tel résultat peut être généralisé au tonoplaste de *Neurospora crassa* (E. MARTINOIA et al., 1979). Mais, dans chaque cas, il s'agit d'une perméase commune pour tous les acides-amino basiques, dont les caractéristiques diffèrent complètement de celle située au niveau du plasmalemme.

Remarquons que cette accumulation d'arginine par le vacuome de *Saccharomyces cerevisiae* ne correspondrait pas à un transport actif (T. BOLLER et al., 1975). Il n'y a pas d'accumulation nette. En conséquence, une quantité stoechiométrique d'arginine (interne) non marquée est libérée dans le milieu d'incubation et échangée avec l'argi-

nine (externe) radioactive utilisée comme traceur. Aussi, dans cette étude de T. BOLLER et al. (1975), ce qui est considéré comme un transport doit-il être considéré comme un échange au travers du tonoplaste bien qu'un gradient de concentration soit maintenu ! Le même phénomène est décrit chez *Streptococcus faecalis*, en absence de toute source d'énergie (T.D. BROCK et G. MOO-PENN, 1962 ; S.S. ASGHAR, E. LEVIN et F.M. LEVIN, 1973). On doit en conclure que seule une partie de l'arginine vacuolaire peut être échangée, le reste étant présent sous une forme non diffusible. Des études faites en dialyse à l'équilibre confirment cette hypothèse : cette molécule, chargée positivement au pH du vacuome, entre en interaction avec un anion polyphosphate (M. DURR et al., 1977). Par conséquent, la rétention de l'arginine par le vacuome peut s'interpréter en termes d'un équilibre de Donnan. D'où toute une série de mécanismes possibles pour expliquer l'accumulation et la rétention de l'arginine par le vacuome (T. BOLLER, 1977). Dans une de ces hypothèses, on peut remarquer la relation entre l'ATP cytoplasmique, représentant un couplage électrique d'un influx net d'arginine, et la formation d'un polyanion vacuolaire, confirmée par les résultats de M. DURR et al. (1979).

On notera qu'il existe une différence fondamentale dans le mécanisme de l'accumulation des amino-acides basiques entre les lutoïdes, constituant le vacuome du latex d'*Hevea brasiliensis* (échange couplé  $H^+$ /lysine), et le compartiment vacuolaire de *Saccharomyces cerevisiae* (influx d'arginine lié à la synthèse de polyphosphate). Toutefois, les études sont moins avancées sur les lutoïdes.

## 2) Le transport des acides organiques

Le transport des acides organiques au travers de la membrane lutoïdique a été également étudié très en détail (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977).

J. D'AUZAC et C. LIORET (1974) ont défini un certain nombre de propriétés du mécanisme d'absorption du citrate par les lutoïdes, placés dans un milieu isotonique non énergétique. Cette incorporation thermodépendante suit une cinétique linéaire pendant au moins 30 mn à température ambiante. Elle s'avère michaëlienne en fonction de la concentration en citrate du milieu extérieur. Par ailleurs, la présence d'ATP multiplie par 2 la vitesse d'absorption sans modifier le  $K_m$  apparent de l'incorporation alors que le 2,4-dinitrophénol et la N-

éthyl-maléimide inhibent la pénétration du citrate.

Tous ces résultats sont en faveur de l'existence d'un transporteur qui peut accumuler autant de citrate (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977) que le succinate ou le malate (M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977). Il pourrait s'agir d'un même site pour ces trois acides organiques. Les cinétiques d'absorption sont très semblables. Elles correspondent à un transport saturable en fonction de la concentration en substrat, avec des valeurs très voisines de Km. Ces observations sont compatibles avec l'existence d'un système transporteur unique.

Toutefois, on doit signaler une différence notable au niveau de l'optimum de pH observé dans le transport de ces trois acides organiques. Il est de l'ordre de 7,0 pour le citrate et le malate alors qu'il est inférieur à 5,5 pour le succinate (M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977). Mais, l'ionisation de ces molécules n'est pas identique selon le pH du milieu. Par conséquent, l'action du pH peut dès lors s'exercer au niveau de l'affinité du substrat pour ce transporteur unique.

Par ailleurs, de tous ces travaux, il se dégage l'idée d'un couplage du transport du citrate avec le gradient transmembranaire de pH, qui existe entre le vacuome et le cytoplasme du latex d'*Hevea brasiliensis*. Toute modification de ce gradient, induit par le 2,4-dinitrophénol ou par une autre molécule le dissipant, affecte l'incorporation du citrate. Quant à l'ATP, son action correspondrait à une augmentation de ce dernier, liée à un mouvement de protons (C. LAMBERT, 1975).

Ce type de travail n'est pas limité au compartiment lutoïdique du latex d'*Hevea brasiliensis*. Ainsi, l'analyse du transport de l'acide malique a été étudié chez *Kalanchoë daigremontiana* (U. LUTTGE et E. BALL, 1979). Le mécanisme de l'accumulation vacuolaire est évoqué. La considération des gradients électrochimiques pour les différents ions résultant de la dissociation de l'acide malique (i.e.  $H^+$ ,  $H^+ mal^-$  et  $mal^{2-}$ ) calculés à partir de l'équation de Nernst (en considérant le pH et la concentration du malate dans les compartiments cytoplasmique et vacuolaire) montre qu'il existe un transport actif de  $H^+$  et de  $Hmal^-$  du cytoplasme vers la vacuole alors que le  $mal^{2-}$  doit être passivement distribué au niveau du tonoplaste. Les données expérimentales d'U. LUTTGE et E. BALL (1979) amènent à suggérer un mécanisme concrète-



tisant une accumulation active de l'acide malique dans les vacuoles des plantes à métabolisme de type crassulacéen. Il correspondrait à un mouvement actif de protons couplé avec un mouvement passif de  $\text{mal}^{2-}$  au niveau du tonoplaste par un site transporteur (réalisant une diffusion facilitée). Il en résulterait la formation subséquente de  $\text{Hmal}^-$  ( $2\text{H}^+ + \text{mal}^{2-} \rightarrow \text{H}^+ + \text{Hmal}^-$ ) au pH estimé du vacuome.

De tous ces résultats, on doit conclure à l'existence de sites transporteurs des différents acides organiques (acide citrique, acide malique, acide succinique, ...) au niveau du tonoplaste. Toutefois, leur energisation et leur mécanisme restent à connaître.

## V - CONCLUSIONS : PRESENTATION DU TRAVAIL ET DE SON INTERET.

Ainsi, dans cette introduction, nous nous sommes efforcés de montrer que les travaux développés sur les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* s'inscrivent dans le cadre général des préoccupations et des investigations effectuées sur le vacuome végétal. Ils sont souvent ignorés parce que le terme générique de lutoïde, utilisé pour qualifier le micro-vacuome qu'il contient, est employé (cf les travaux de T. BOLLER et H. KENDE (1979) ou de K. GROB et P. MATILE (1980), par exemple). Mais, les problèmes que posent le transport, puis l'accumulation des molécules dans ce vacuome particulier sont du même ordre (P. MATILE, 1978 ; P. MATILE et A. WIEMKEN, 1976).

Les lutoïdes isolés du latex d'*Hevea brasiliensis* ne diffèrent pas fondamentalement des vacuoles isolées avec difficulté des tissus végétaux (cf P. MATILE, 1978). On comprend dès lors tout l'intérêt du latex d'*Hevea brasiliensis* qui, de par sa structure morphologique, constitue un cytoplasme contenant très peu d'éléments figurés autres que les lutoïdes, les particules de Frey-Wyssling et les particules de caoutchouc. De plus, ces organites ont conservé leurs propriétés natives, une caractéristique les opposant au vacuome (W.H. KENYON et al., 1978 ; J.A. SAUNDERS et C. CONN, 1978 ; G.J. WAGNER et H.W. SIEGELMAN, 1975 ; H. LORZ et al., 1976 ; G.J. WAGNER, 1979 ; T. BOLLER et H. KENDE, 1979.)

Notre travail a consisté à retrouver une partie des propriétés liées au transport du citrate sur un compartiment vésiculaire obtenu

à partir de membranes lutoïdiques (= vacuolaires ou vacuolysosomales, selon la terminologie de P. MATILE) lyophilisées et à élucider, dans la mesure du possible, le mécanisme d'énergisation impliqué dans l'accumulation du citrate par les lutoïdes.

Comme nous l'avons indiqué, l'intervention du gradient transmembranaire de pH a été maintes fois suggérée pour l'expliquer (cf le paragraphe IV de ce Chapitre). Mais, cette proposition, pour aussi séduisante qu'elle soit, n'a jamais été démontrée à notre connaissance. Nous avons donc cherché à en prouver son bien-fondé sur ces vésicules actives, celles-ci ayant conservé leur aptitude à incorporer le citrate (toutefois à un degré moindre) et leur pouvoir d'hydrolyser l'ATP (moins généralement).

En conséquence, notre étude s'est développée de façon à mettre en évidence tout un ensemble de faits expérimentaux concrétisant :

- la vésiculation à partir de membranes lutoïdiques lyophilisées,
- la conservation des propriétés d'accumulation du compartiment vésiculaire dans différentes conditions expérimentales mimétiques de la situation rencontrée dans le latex,
- le fonctionnement de l'activité ATPase lutoïdique en tant que pompe-à-protons,
- l'influence du gradient transmembranaire de pH sur l'incorporation du citrate,
- le degré de couplage existant entre le transport du citrate et l'amplitude du fonctionnement de la pompe-à-protons,

La discussion de tous ces résultats aboutit à une tentative de modélisation de l'incorporation et de l'accumulation du citrate par les vésicules lutoïdiques. Le transport du citrate fonctionnerait selon un mécanisme antiport  $\text{Hcitrate}^{2-}/\text{H}^+$  entraîné indirectement par la pompe-à-protons. L'intervention d'un flux couplé d'ions compensant le déséquilibre de charge qu'il implique est suggéré. Par ailleurs, le rôle important susceptible d'être joué par le magnésium est évoqué (intervention dans le processus d'accumulation du citrate par les vésicules lutoïdiques et possibilité d'un flux compensatoire de charge directement couplé à l'influx de citrate).

Jusqu'à présent, ainsi que nous avons eu maintes fois l'occasion de l'observer dans cette revue du travail effectué sur le vacuome végétal, aucune étude de ce type a pu être réalisée, ce qui souligne l'importance du matériel sur lequel nous travaillons pour résoudre les problèmes liés à ce type d'organites. Les données expérimentales d'U. LUTTGE et E. BALL (1980) relatives à l'accumulation de l'acide malique ont été obtenues sur des fragments de tissus foliaires de *Kalanchoë daigremontiana*.



CHAPITRE II  
MATERIEL  
ET  
METHODES



## I - MATERIEL

Le latex provient de la saignée d'arbres situés sur les plantations de la station expérimentale de BIMBRESSO (Côte d'Ivoire) de l'Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique (I.R.C.A.)

Comme l'indique M. COUPE (1977), la variabilité de l'*Hevea* est très grande. Elle impose une sélection stricte du matériel végétal. Tout au long de cette étude, seul le latex d'arbres issus du clone PB 86 a été utilisé.





## II - PREPARATION DES VESICULES LUTOIDIQUES

### A. RECOLTE DU LATEX.

Le latex est récolté dans un récipient refroidi par de la glace fondante. Les premiers ml de la saignée sont éliminés : ils correspondent à un latex destabilisé (riche en lutoïdes éclatés) enrichi en bactéries. On prélève ensuite 30 à 100 ml de latex par arbre.

Il est traité sur champ par l'addition de 6 % (vol./vol.) de triéthanolamine molaire, ajusté à pH 7,5 et contenant 100 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, ajusté à pH 7,5 avec HCl).

### B. ISOLEMENT DES LUTOIDES

#### 1) L'obtention de la fraction jaune.

Dès le retour au laboratoire, le latex ainsi préparé est centrifugé pendant 60 mn à 39.000 x g à 4°C. Le sédiment obtenu correspond à la fraction jaune des auteurs saxons.

Certes, cette fraction est riche en lutoïdes mais elle contient aussi des particules de Frey-Wyssling, abondantes en caroténoïdes, ce qui lui confère sa coloration jaunâtre. Elle constitue le sédiment lutoïdique brut.

En ce qui concerne le surnageant, il se compose d'un sérum clair et d'une couche de caoutchouc. Ce sont là les trois fractions subcellulaires décrites par A.S. COOK et B.C. SECHAR (1955).

## 2) L'obtention des lutoïdes.

Les lavages répétés du sédiment lutoïdique permettent d'éliminer toutes les structures contaminantes présentes dans le cytoplasme fluide que constitue le latex :

- absence de noyaux (noyaux entiers, fragments de membranes nucléaires, traces d'ADN,...)
- absence de mitochondries (aucune activité liée au cycle de Krebs, aucune activité cytochrome-oxydase,...)
- les particules de Frey-Wyssling, en partie, voire totalement,
- les particules de caoutchouc, non absorbées à quelques fragments membranaires de structures lutoïdiques éclatées, disparaissant en partie.

Ces résultats confirment les observations faites par S. PUJARNISCLE (1968 et 1977). La pureté de ce sédiment a été analysée maintes fois et décrite par ailleurs (cf S. PUJARNISCLE, 1968 ; B. MARIN, 1974 ; B. MARIN et al, 1975, par exemple).

## 3) La lyophilisation des lutoïdes.

La fraction lutoïdique ainsi lavée et purifiée est congelée à - 20°C, puis immédiatement lyophilisée.

### REMARQUE :

L'isolement et la purification de la fraction lutoïdique sont effectués en Afrique (laboratoire de Physiologie Végétale, I.R.C.A., Station de Bimbresso, Abidjan, Côte d'Ivoire). Le lyophilisat nous parvient par avion à Montpellier (laboratoire de Physiologie Végétale appliquée, U.S.T.L., Montpellier, France), où il est conservé à - 30°C jusqu'au moment de son utilisation.

### C. FORMATION DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

#### 1) La destruction des lutoïdes par la lyophilisation.

La lyophilisation suffit pour détruire les lutoïdes par rupture de la membrane limitante (cf chapitre III). L'activité phosphatase, enzyme marqueur de ces organites, est solubilisée. Toutefois, une partie non négligeable de cette activité reste associée à la membrane lutoïdique (J. D'AUZAC, 1977 ; B. MARIN, résultats non publiés).

#### 2) La technique de vésiculation

##### - L'homogénéisation initiale,

Une simple remise en suspension dans un milieu tamponné (qualifié, par la suite, de milieu de reprise) de quelques mg de membranes lyophilisées (à raison de 100 ml par g de lyophilisat) suffit pour obtenir, par une simple centrifugation à basse vitesse (10.000 x g, 3 mn, 4°C) un sédiment membranaire vésiculé et un surnageant correspondant pour l'essentiel au contenu intralutoïdique.

La vésiculation s'effectue toujours dans la glace pilée (ou à la température d'une chambre froide) en assurant 25 allers dans le corps de verre de l'homogénéiseur (du type Potter).

##### - La nature du milieu de reprise,

La nature du milieu de reprise est variable, selon l'expérience :

##### - un milieu phosphate-mannitol,

Sa composition est la suivante :

50 mM phosphate de potassium, 50 mM acide citrique,  
5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 300 mM mannitol, pH 6,0  
ou pH 7,5

- un milieu de type imperméant, le milieu de Tager.

Il a la composition suivante :

25 mM H.E.P.E.S., 25 mM M.E.S., 25 mM M.E.S.,  
25 mM M.O.P.S., 300 mM mannitol, 5 mM  $\beta$ -mercap-  
toéthanol, pH 6,0 ou 7,5.

D'autres solutions tamponnées ont été employées. Nous en ferons mention le moment venu, notamment lorsqu'il s'est agi de préparer des vésicules en milieu salin (le mannitol est alors remplacé par 185 mM KCl).

- Les conditions de lavage,

Le sédiment membranaire est lavé de deux à trois fois dans le tampon d'homogénéisation (ou par un tampon plus spécifique) dans les mêmes conditions (reprise du culot dans généralement le même volume ; homogénéisation à l'aide d'un Vortex ; centrifugation identique). Puis il est remis en suspension dans le milieu d'incubation (initialement refroidi à 0°C) employé lors de l'incorporation du citrate (soit un milieu phosphate-mannitol, soit un milieu de Tager, ajusté à pH 7,5 par addition de Tris-base, et contenant ou non 5mM acide citrique voire 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>).

On doit remarquer que les conditions de centrifugation ne sont pas identiques pour l'ensemble des manipulations décrites dans ce travail. Initialement, la suspension membranaire était sédimentée à 39.000 x g pendant 10 à 20 mn à 4°C. Par la suite, elles ont été modifiées (10.000 x g, 3 mn, température variable). Cette différence est liée aux conditions expérimentales employées pour stopper les incorporations de molécules radioactives par les vésicules lutoïdiques.

### III - TECHNIQUES D'INCORPORATION DES MOLECULES RADIO-ACTIVES PAR LES VESICULES LUTOIDIQUES.

#### A. CONDITIONS STANDARDS D'INCUBATION

La plupart des expériences sont effectuées à pH 7,5, un pH supérieur à celui du latex, et à température ambiante (25-30°C).

Le milieu d'incubation varie selon la nature de l'expérience : c'est, soit un milieu phosphate mannitol, soit un milieu de Tager. Initialement, il ne contient ni citrate, ni magnésium. Mais, les additions peuvent être variées. Ainsi, il pourra contenir 5 mM citrate, et, le cas échéant, 5 mM ATP-  $Mg^{2+}$ . Afin d'éviter toute hydrolyse du nucléotide par l'activité phosphatase acide résiduelle, du molybdate d'ammonium (0,2 mM) est ajouté au milieu réactionnel (J. D'AUZAC, 1975).

Les autres détails expérimentaux, spécifiques de chaque expérience, seront précisés dans la légende de la figure qui la décrit.

#### B. INCORPORATION DU $^{14}C$ -CITRATE PAR LES VESICULES LUTOIDIQUES.

Les vésicules vacuo-lysosomales (= lutoïdiques) sont placées dans un milieu isotonique dépourvu de tout matériel métabolique énergétique. Toute addition pourra dès lors être testée pour en connaître sa conséquence sur l'amplitude de l'incorporation ultérieure de citrate.

Chaque ml de milieu d'incubation contient  $0,1 \mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -citrate (marqué sur le carbone 1). L'activité spécifique de la molécule introduite varie de 28,6 à  $30 \mu\text{Ci} \times \mu\text{M}^{-1}$  (selon le lot fourni par le C.E.A.). La concentration de l'acide citrique non radioactif du milieu est sensiblement égale à celle du cytoplasme, soit 5 mM. L'incubation est réalisée de façon à ce que le gradient naturel de contraction pour l'acide citrique soit respecté (ce n'est pas toujours le cas).

Au temps désiré, quatre parties aliquotes de 0,1 ml sont prélevées. L'arrêt de l'incorporation est assurée en mélangeant chacune avec 3 ml de solution refroidie dans la glace fondante et dépourvue de tout radio-élément. Sa composition est variable. Généralement, elle reflète celle du milieu d'incubation au nucléotide près qui en est omis. Le plus rapidement possible, on centrifuge dans les conditions de préparation des vésicules ( $30.000 \times g$ , 10 mn,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le sédiment obtenu est lavé deux fois. Cela s'avère suffisant pour éliminer toute trace de citrate radioactif non absorbé.

Lorsque l'échantillonnage est trop grand, une autre méthode tout aussi efficace est employée. Elle correspond à déposer l'incubat sur une couche de 3 ml de solution d'arrêt contenant du dextrane T-70 à une concentration variant entre 1,5 et 2,5 % (p/vol.). La concentration à choisir est fonction de la population vésiculaire engendrée. Un test préalable est nécessaire pour la déterminer. Les conditions de sédimentation sont identiques. Le surnageant obtenu sera aspiré en partie. Le haut de la couche restante de dextrane sera dilué plusieurs fois de façon à diminuer la radioactivité résiduelle contaminante. Finalement, après plusieurs aspirations, le total du surnageant sera éliminé et le sédiment, asséché.

Il s'avère que les vésicules s'allègent au cours de l'incubation. La quantité sédimentable de protéines devient de moins en moins importante à mesure que le temps s'écoule. C'est la limite de cette méthode, par ailleurs satisfaisante, car elle est beaucoup plus rapide que la précédente : elle n'implique pas les deux lavages indispensables caractérisant la méthode de J. D'AUZAC et C. LIORET (1974).

Les sédiments obtenus pourront être alors préparés pour déterminer la radioactivité qu'ils contiennent.

### C. MESURE DE LA DISTRIBUTION TRANSMEMBRANAIRE DE MOLECULES LIPOPHILES RADIOACTIVES.

L'incorporation des traceurs radioactifs utilisés pour mesurer le potentiel transmembranaire ou le gradient de pH est effectuée dans un milieu d'incubation iso-osmotique contenant les vésicules vacuolysomales, en présence d'eau tritiée ( $0,5 \mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$ ) et de, soit la  $^{14}\text{C}$ -méthylamine ( $0,1 \mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$ ), soit le  $^{14}\text{C}$ -thiocyanate ( $0,1 \mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$ ), soit le  $^{14}\text{C}$ -triphenyl-méthyl-phosphonium ( $0,1 \mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$ ), soit le  $^{14}\text{C}$ -dextrane ( $0,1 \mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$ ). Sa composition est variable selon le type de la manipulation réalisée.

Une préincubation de 10 mn est nécessaire avant que le premier prélèvement soit opéré. C'est le temps indispensable pour que la distribution transmembranaire à l'équilibre de la sonde employée soit obtenue. C'est généralement la période au bout de laquelle le  $^{14}\text{C}$ -citrate est introduit dans le tube correspondant, en prenant soin que le rapport des radioactivités  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$  soit respecté (la valeur de 0,2 étant choisi pour avoir des mesures satisfaisantes).

Après chaque prélèvement (0,1 - 0,5 ml), les vésicules sont immédiatement sédimentées à l'aide d'une centrifugeuse microfuge Eppendorf modèle 3200 (ou 5412) pendant 3 mn à vitesse maximale (10.000 x g environ) à température ambiante.

De chaque tube, le surnageant est séparé du sédiment le plus rapidement possible. Une partie aliquote est prélevée en premier lieu. Le reste est aspiré jusqu'à assécher complètement le sédiment. Les parois du tube et la surface du sédiment sont lavées deux fois en prenant soin de ne pas perturber l'intégrité du culot. Finalement, le tube sera renversé pour éliminer toute trace éventuelle du sédiment par un surnageant résiduel. Ensuite, le fond du tube est tranché. Son contenu est alors transféré dans un récipient, où il est repris par un agent de dispersion, fonction du type d'analyses à effectuer.

### D. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MESURE DE LA RADIOACTIVITE.

Les différents échantillons (200  $\mu\text{l}$  pour le surnageant, une partie aliquote du sédiment conservé n'ayant pas été en contact avec le surnageant) sont solubilisés dans 0,2 à 0,3 ml de Triton X-100 à 0,1 %



(p./p.) pendant toute une nuit à température ambiante.

Une partie aliquote de 100 à 250 µl de la suspension finale est incorporée dans un mélange scintillant de composition variée et dont le choix est fonction du type d'isotope employé (B.W. FOX, 1976). Il peut s'agir :

- soit, d'un mélange, comme celui utilisé par J. D'AUZAC et C. LIORET (1974) et dont la composition est
  - 700 ml de toluène,
  - 300 ml de méthanol,
  - 4 g de 2,5-diphényl-oxazole (P.P.O.),
  - 0,4 g de 1,4-di-2(5-phényl-oxazol-) benzène (P.O.P.O.P.)
- soit d'un mélange dioxanne-naphtalène, dérivant du mélange de Bray classique (G.A. BRAY, 1970) et dont la composition est :
  - 1000 ml de dioxanne,
  - 60 g de naphtalène,
  - 4 g de P.P.O.,
  - 0,4 g à 0,6 g de P.O.P.O.P.,
- soit d'un mélange Instagel, une solution scintillante prête à l'emploi fournie par Packard Instrument Company, Inc. (U.S.A.).

Pour chacun de ces mélanges, le volume employé n'est pas le même : 15-20 ml pour le premier, 10-12 ml pour le second et 4 ml pour le dernier.

Dans tous les cas, après une vive agitation et un séjour d'une nuit, soit dans une chambre refroidie à 4°C, soit directement dans le compteur, la radioactivité est mesurée.

#### **E. DETERMINATION DU RAPPORT DE CONCENTRATION D'UNE MOLECULE DISTRIBUEE ENTRE LES COMPARTIMENTS EXTRA ET INTRAVESICULAIRES.**

Les concentrations en  $^3\text{H}_2\text{O}$ , en  $^{14}\text{C}$ -TPMP<sup>+</sup>, en  $^{14}\text{C}$ -méthylamine, en  $^{14}\text{C}$ -dextrane et en  $^{14}\text{C}$ -citrate sont calculées à partir de leurs activités relatives dans le sédiment et dans le surnageant selon la méthode

décrite par R.G. JOHNSON et A. SCARPA (1976) pour la détermination du gradient transmembranaire de pH et par E. KOMOR et W. TANNER (1976) pour l'analyse quantitative du potentiel membranaire.

Les concentrations de la molécule indicatrice dans les deux compartiments définis par la membrane vacuo-lysosomale sont déterminés respectivement sur un surnageant débarrassé de toute structure membranaire close et sur un sédiment, obtenus par sédimentation de la suspension vésiculaire mise en incubation. La centrifugation rapide donne un sédiment, constitué par une fraction vésiculaire mais aussi par une fraction extra-vésiculaire, dont les caractéristiques sont bien connues.

Chacune de ces fractions peut être estimée à partir de la distribution à l'équilibre de l'eau tritiée (elle n'est soumise à aucune compartimentation ; elle pénètre tout l'espace qui lui est offert), du  $^{14}$ C-dextrane (il ne se trouve que dans l'espace extra-vésiculaire) et de la molécule indicatrice, qui se répartit de part et d'autre de la membrane selon les molécules qui agissent sur elle.

Dans le paragraphe précédent, est indiquée la façon dont une partie aliquote du sédiment et du surnageant sont traitées. Dès lors, la mesure de la radioactivité permet de connaître le nombre de dpm dû au  $^3$ H (provenant de l'eau tritiée) et le nombre de dpm dû au  $^{14}$ C (provenant de la molécule indicatrice ou du dextrane) dans une fraction aliquote de 200  $\mu$ l. On peut définir les rapports suivants :

$$\begin{aligned} - I_c &= \frac{\text{dpm dus à la molécule indicatrice dans le culot}}{\text{dpm dus à l'eau tritiée dans le culot}} \\ - I_s &= \frac{\text{dpm dus à la molécule indicatrice dans le surnageant}}{\text{dpm dus à l'eau tritiée dans le surnageant}} \\ - D_c &= \frac{\text{dpm dus au dextrane dans le culot}}{\text{dpm dus à l'eau tritiée dans le culot}} \\ - D_s &= \frac{\text{dpm dus au dextrane dans le surnageant}}{\text{dpm dus à l'eau tritiée dans le surnageant}} \end{aligned}$$

En reprenant les données développées par ailleurs (S. ADDANKI et J.F. SOTOS, 1969 ; B. MARIN, 1978), le développement des calculs conduit à la relation :

$$\frac{C_{in}}{C_{ex}} = \frac{I_c}{I_s} + \frac{D_c}{D_s - D_c} \cdot \left[ \frac{I_c}{I_s} - 1 \right] \quad (2.1)$$

Employéepar R.G. JOHNSON et A. SCARPA (1976), cette expression n'est pas différente de celle proposée par D. J. REIJNGOUD (1978) et M. HOLLEMANS et al. (1979). Elle permet de déterminer le rapport d'accumulation (Cin/Cex) à partir des données expérimentales dont nous disposons.

#### IV - METHODES DE DOSAGE

##### A. DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

###### 1) L'activité phosphatase acide (E.C. 3.1.3.2.)

L'activité phosphatase acide, qui constitue l'enzyme caractéristique des lutoïdes (S. PUJARNISCLE, 1968 et 1971), est dosée en présence de p-nitrophényl-phosphate de sodium, en milieu acétate de sodium 0,1 M, pH 5,0, avec ou sans Triton X-100 (0,1 % p./v.) (K.LINHARDT et K. WALTER, 1963).

Généralement, elle est mesurée dans un ml de milieu réactionnel. L'incubation, réalisée à 25°C, est stoppée par 0,2 ml d'un mélange 1,25 HClO<sub>4</sub>-8 % (p./vol.) acide silico-tungstique. Après centrifugation, à un ml de surnageant limpide, 3 ml d'un mélange glycine-carbonate de sodium sont ajoutés. Cette addition permet de développer la coloration due au noyau p-nitrophényl libéré au cours de l'hydrolyse.

La mesure de la densité optique est effectuée à 400 nm et un coefficient d'extinction moléculaire de 18,8 M<sup>-1</sup>x cm<sup>2</sup> est employé.

L'activité phosphatase acide est exprimée en  $\mu$ M de p-nitrophénol libérées par mn.

## 2) L'activité ATPase

Elle est mesurée selon la méthode développée sur ce matériel par J. D'AUZAC (1975 et 1977). Elle correspond à estimer enzymatiquement l'ADP formé au cours d'une incubation dans un milieu réactionnel de composition variable, mais contenant initialement toujours 5mM ATP-Mg<sup>2+</sup>, le substrat de cette enzyme.

Généralement, l'incubation est réalisée pendant au moins 30 mn à 30°C dans un milieu, variant de 1 à 2 ml au plus, de composition sujette à variation (le plus souvent : 50mM triéthanolamine, pH 7,5 ou 7,75, 5 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,2 mM molybdate d'ammonium). La réaction est arrêtée par 0,2 ml de HClO<sub>4</sub> 6 M. Le milieu est neutralisé, en présence de rouge de méthyle, par addition de KOH 6 M. Dès que le précipité est formé, au bout de 10 mn dans un bain de glace fondante, la suspension est centrifugée. Le surnageant obtenu sert au dosage enzymatique de l'ADP.

Ce dosage implique le couplage de deux réactions enzymatiques (pyruvate-kinase, lactate deshydrogénase) entraînant l'oxydation du (NADH + H<sup>+</sup>) présent dans le milieu réactionnel et, en conséquence, une modification de l'absorption à 340 nm.

L'activité ATPase est généralement exprimée en  $\mu$ M d'ADP apparues par mn.

H. CRETIN (1980) ayant montré l'existence d'une activité NADH-oxydo-réductase liée aux membranes lutoïdiques, on a vérifié l'absence d'oxydation du (NADH + H<sup>+</sup>) en présence d'ATP.

## 3) L'activité malate-deshydrogénase (E.C. 1.1.1.37).

L'activité malate-deshydrogénase est mesurée selon la méthode développée sur ce type de matériel par M. COUPE et al. (1972). Elle est estimée enzymatiquement en suivant la variation de densité optique à 340 nm induite par l'oxydation du (NADH + H<sup>+</sup>).

## B. DETERMINATION DES TENEURS EN CITRATE ET EN PROTEINES.

### 1) Dosage du citrate.

Le citrate présent dans l'échantillon (préparé selon les méthodes décrites dans les paragraphes précédents) est déterminé selon le protocole de H. MOLLERING et W. GRUBER (1966). Il implique le couplage de deux réactions enzymatiques (citrate-lyase, malate-deshydrogenase) entraînant une oxydation du  $(\text{NADH} + \text{H}^+)$  présent dans le milieu réactionnel et, en conséquence, une modification de l'absorption à 340 nm.

Le détail de ce dosage est décrit ailleurs (B. MARIN, 1978). Il sera possible de déterminer la teneur de l'échantillon en utilisant un coefficient d'extinction moléculaire de  $6,22 \text{ cm}^2 \times \text{u mole}^{-1}$ .

### 2) Dosage des protéines.

Par commodité, les protéines sont dosées selon la méthode d'O.E. LOWRY et al (1951) en prenant un certain nombre de précautions, les protéines membranaires étant pour la plupart difficilement solubilisables en absence de détergent.

La suspension vésiculaire est incubée de 15 à 30 mn dans un bain-marie porté à 30°C voire 50°C en présence de Triton X-100 à 0,1 % (p./vol.). Puis, les protéines d'une fraction aliquote sont précipitées par addition de 2 ml de mélange 1,2 M  $\text{HClO}_4$  - 8 % (p./vol.) acide silico-tungstique. Le sédiment est repris par 0,5 ml de NaOH 0,4 N. La suspension protéique est incubée de 1 à 4 h dans un bain-marie porté à 50°C. Après avoir été diluée par 1,5 ml d'eau distillée, le dosage des protéines est effectué tel qu'il est décrit dans la méthode suivie.

La gamme étalon est réalisée avec de la sérum-albumine bovine, traitée dans les mêmes conditions.



#### V - OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES.

Les préparations membranaires sont examinées en microscopie électronique après fixation dans la glutaraldéhyde à 4 % en présence de mannitol 0,3 M (généralement dans le milieu d'incubation utilisé exempt de nucléotide, pH 7,5) pendant au moins 15 mn et post-fixation d'une heure dans un milieu véronal à pH 7,5 contenant de l'acide osmique à 1 %.

Les échantillons sont déshydratés à l'éthanol et inclus dans le mélange de Spurr (A.R. SPURR, 1969).





CHAPITRE III

LA FORMATION DE VESICULES

A PARTIR DE MEMBRANES

VACUOLAIRES LYOPHILISEES



Si la lyophilisation est une méthode employée pour conserver les activités présentes au niveau des membranes lutoïdiques, il est évident qu'elle ne permet pas de préserver l'intégrité des organites. La continuité de la membrane limitante n'est pas maintenue ainsi que l'indique la répartition de l'activité phosphatase acide, enzyme marqueur de ce compartiment cellulaire (S. PUJARNISCLE, 1971).

Cependant, il pourra y avoir revésiculation à partir des résidus membranaires. Par conséquent, l'espace interne de la vésicule ainsi constituée pourra retenir toute molécule non perméante qui ne se trouvait pas initialement à l'intérieur des lutoïdes. La nature de cette molécule peut être variée. L'essentiel est qu'on puisse en suivre aisément le devenir en la dosant par une méthode simple touchant, soit à son activité biochimique (une activité enzymatique, par exemple), soit à sa structure (l'emploi d'un radio-isotope, par exemple).

Cela se concrétisera, pour une activité enzymatique (comme l'activité malate-deshydrogénase, par exemple), par la caractérisation d'une activité libre et d'une activité totale (seulement mesurable lorsqu'un détergent, comme le Triton X-100, ajouté à la suspension membranaire, viendra rompre la membrane vésiculaire). L'existence d'une activité non accessible au substrat constitue une première mise en évidence d'un compartiment vésiculaire fermé.

Ce n'est pas la seule façon de caractériser la vésiculation se faisant à partir de membranes lyophilisées. L'espace vésiculaire est accessible à toute molécule pouvant traverser la membrane le limitant.

La différence existant entre les cinétiques de diffusion de molécules perméantes et non perméantes (non sollicitées par un quelconque site de fixation membranaire) constitue une autre approche dans la résolution de ce problème.

Par ailleurs, les informations apportées par la microscopie électronique confirment leur existence. Nous en ferons mention avec les limites qu'implique une telle analyse.

I - LA MISE EN EVIDENCE D'UN COMPARTIMENT VESICULAIRE ENGENDRE A PARTIR DE MEMBRANES LUTOIDIQUES LYOPHILISEES.

A. DONNEES BIOCHIMIQUES.

1) *L'utilisation de l'activité phosphatase acide résiduelle comme marqueur vésiculaire.*

L'activité phosphatase acide est l'enzyme marqueur des lutoïdes (S. PUJARNISCLE, 1968 et 1971). Elle a été utilisée pour démontrer l'existence d'ARN dans ce compartiment cellulaire (J. D'AUZAC et al., 1977 ; B. MARIN, 1976, 1977 et 1978 ; B. MARIN et al., 1974 ; B. MARIN et P. TROUSLOT, 1975). Il existe une très forte activité résiduelle dans les lyophilisats de membranes lutoïdiques. On pourrait l'utiliser comme marqueur vésiculaire.

a) Définition de l'indice d'éclatement :

Dans la mesure où le p-nitrophényl-phosphate (PNPP), substrat synthétique de cette activité phosphatase acide, conserve ce coefficient de diffusion très faible observé sur les lutoïdes fraîchement isolés (S. PUJARNISCLE, 1968 et 1971), il ne pourra être hydrolysé que par une activité accessible, soluble ou absorbée. C'est l'activité libre. L'addition dans le milieu réactionnel de Triton X-100 à une con-

centration de 0,05 % (p./vol.) (qui ne dénature pas cette enzyme mais rompt toute membrane limitant un espace vésiculaire) démasque toute l'activité potentielle. C'est l'activité totale. Dès lors, on peut définir l'indice d'éclatement comme étant la valeur du rapport de ces deux activités, exprimée en pourcent (D. RIBAILLIER, 1968).

$$I_E = \frac{\text{act. Pase libre}}{\text{act. Pase totale}} \times 100 \quad (3.1)$$

β) Mise en évidence d'un compartiment non accessible au PNPP.

Lorsque cet indice d'éclatement est mesuré sur une suspension membranaire (préparée comme il est indiqué dans le Chapitre "Matériel et Méthodes"), la valeur obtenue est variable. Dans tous les cas, elle est très élevée, de l'ordre de 60 à 80 %, selon l'intensité de l'homogénéisation (faite dans un Potter), quel que soit le milieu tamponné utilisé. Malgré tout, elle indique l'existence d'un espace où ne diffuse pas le PNPP et qui contient de 20 à 40 % de l'activité phosphatase acide totale. Cet espace correspond au compartiment vésiculaire.

γ) L'utilisation de ce critère pour suivre la vésiculation.

La considération de l'indice d'éclatement, pour aussi aisée qu'elle soit, n'apporte pas une information suffisante pour suivre l'évolution d'une population vésiculaire non purifiée.

Le Tableau 3.I. donne une idée assez représentative des résultats obtenus. Certes, il existe une importante activité libre qu'il est possible d'éliminer en partie par deux lavages. Mais, cet enrichissement relatif en activité phosphatase acide non accessible se traduit par une perte non négligeable d'activité totale (de l'ordre de 48 % de l'activité initiale, pour le motif témoin, par exemple).

On se heurte à plusieurs difficultés :

- l'activité phosphatase acide libre, présente dans un sédiment, est toujours élevée, même après plusieurs lavages,

- l'activité absorbée est souvent importante :  
il n'est guère possible de s'en débarrasser sans affecter les propriétés mêmes de la membrane lutoïdique.

Ce critère permet de mettre en évidence un compartiment vésiculaire fermé engendré à partir de membranes lyophilisées dans les conditions employées. Mais, il ne peut être utilisé valablement pour suivre l'évolution d'une population vésiculaire, au cours d'une incubation, l'activité phosphatase acide absorbée étant trop importante.

2) *La rétention de l'activité malate-deshydrogénase cytoplasmique par les membranes lutoïdiques comme marqueur vésiculaire.*

L'activité malate-deshydrogénase (EC.1.1.1. 37) du latex d'*Hevea brasiliensis* a été caractérisée comme étant distribuée en presque totalité dans le compartiment cytoplasmique (M. COUPE et al., 1972). L'activité résiduelle serait associée à un compartiment peroxysomal. Par conséquent, elle peut constituer un marqueur pour mettre en évidence, et suivre éventuellement, tout phénomène de vésiculation à partir de membranes lutoïdiques lyophilisées.

Sa purification aisée (J.L. JACOB, résultats non publiés) et la mesure facile de son activité (H.U. BERGMAYER, 1973) en font une molécule idéale pour un tel travail. De plus, l'emploi d'un détergent, comme le Triton X-100, à 0,05 % (p./vol.), ne modifie pas son activité dans les conditions expérimentales employées. Dès lors, il devient possible d'estimer les activités MDH libre et totale présentes dans une suspension membranaire et, par voie de conséquence, l'activité MDH non accessible au substrat, le critère nous permettant d'affirmer l'existence d'un compartiment vésiculaire.

Les problèmes à résoudre sont les mêmes que ceux posés par l'activité phosphatase acide. Toutefois, il faut remarquer que le lyophilisat ne contient pas d'activité MDH endogène. Aussi, sera-t-elle introduite dans le milieu au moment de la vésiculation.



α) La mise en évidence d'un compartiment non accessible au substrat.

Comme pour l'activité phosphatase acide, il est possible de définir un indice d'éclatement. Il représente le rapport de l'activité MDH accessible au substrat sur l'activité MDH totale (obtenue après addition de Triton X-100 à 0,05 % dans le milieu réactionnel), exprimé en pourcent.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, il est très élevé :  $91,4 \pm 4,0$ . Malgré tout, il confirme l'existence d'un compartiment vésiculaire, caractérisée par cette faible activité MDH non accessible au substrat.

β) L'utilisation de ce critère pour suivre la vésiculation.

Après le lavage intensif d'un culot membranaire provenant de la sédimentation d'une suspension préparée dans un milieu T.E.A.-mannitol (20 mM T.E.A., 5 mM β-mercaptoéthanol, 300 mM mannitol, pH 7,5), on n'obtient pas une diminution sensible de l'indice d'éclatement : au bout du quatrième lavage, sa valeur passe seulement de 92,5 à 81,7 % (Tableau 3.II). L'essentiel de l'activité MDH récupérée dans un sédiment lutoïdique se trouve, par conséquent, lié à des sites membranaires aspécifiques externes. Cette hypothèse expliquerait en partie pourquoi l'activité MDH non accessible au substrat ne représente que 18,3 % de l'activité présente dans la fraction sédimentée, après trois lavages.

La perte d'activité MDH non accessible au substrat est globalement de même grandeur à chaque lavage : 52,9 % après la première centrifugation ; 51,9 après la seconde et 71,4 % pour la dernière (Tableau 3.II). Après une première centrifugation, faite pour sédimenter les vésicules, un lavage intensif de la fraction membranaire (constituant le culot) ne représente pas la meilleure des méthodes pour éliminer l'activité accessible au substrat qui est, selon toute vraisemblance, liée à la membrane ou encore qui provient de vésicules dont la membrane s'est rompue.

De plus, la quantité d'activité MDH non accessible au substrat est fonction de la quantité de lyophilisat manipulée (Figure 3.1.). Ce résultat est compatible avec l'interprétation suivante : plus il y a de membranes, plus le nombre de sites membranaires aspécifiques fixant l'activité MDH est grand ou encore, plus l'espace vésiculé enclavant une activité MDH libre est importante. En conséquence, que ce soit dans un cas ou dans l'autre, voire les deux, tout contribuera à accroître la quantité d'activité MDH présente dans le sédiment membranaire. Les corrélations obtenues sont satisfaisantes :  $r = 0,9139$  pour l'activité totale sédimentaire et  $r = 0,8757$  pour l'activité non accessible au substrat. A titre indicatif, pour l'échantillonnage considéré, la valeur du coefficient de corrélation correspond à une probabilité comprise entre 80 et 90 % (D. SCHWARTZ, 1974).

Comme pour l'activité phosphatase acide, on se heurte à plusieurs difficultés de même ordre :

- l'activité MDH libre, présente dans le sédiment, est très élevée, même après plusieurs lavages,

- l'activité adsorbée est très importante : il n'est guère possible de s'en débarrasser sans modifier les caractéristiques de la membrane lutoïdique.

En conséquence, c'est un critère difficile à employer pour suivre l'évolution d'une population vésiculaire, au cours d'une incubation.

### *3) L'emploi de molécules radioactives perméantes et non perméantes pour la détermination du volume vésiculaire.*

L'existence d'un compartiment vésiculaire dans une suspension membranaire correspond à la mise en place d'une barrière de diffusion qu'un nombre limité de molécules traverse.

Les molécules radioactives susceptibles d'être employées doivent satisfaire à plusieurs critères, qui sont fonction du but recherché. Leur analyse exhaustive sera faite ultérieurement (cf Chapitre V).

Dans le cas concerné, trois conditions sont à remplir :

- la molécule choisie ne doit pas être transportée activement,
- elle n'entre pas en interaction positive (adsorption) ou négative (répulsion) avec les membranes du milieu (qui la contient),
- elle a un coefficient de perméabilité, soit particulièrement élevé (pour obtenir très rapidement une distribution homogène dans toute la suspension membranaire), soit proche de zéro à défaut d'être nul (pour ne diffuser que dans l'espace extra-vésiculaire).

Ainsi, pour une telle étude de compartimentation, l'eau tritiée est généralement utilisée pour évaluer le volume du sédiment. On réserve l'emploi de macromolécules, comme l'albumine marquée par l'iode 135, l'inuline ou le dextrane marquée par le carbone 14, pour l'estimation du volume extra-vésiculaire du sédiment.

α) Les cinétiques de diffusion de l'eau tritiée, du sorbitol et du dextrane.

Dans les conditions expérimentales décrites dans la Figure 3.2., la suspension membranaire est incubée pendant 6 mn à 0°C. Chaque prélèvement est centrifugé au travers d'une couche de silicones 3 mn à 13.000 x g à température ambiante. La quantité de radioactivité présente dans le sédiment est alors mesurée.

Il s'avère que la quantité d'eau tritiée liée au sédiment reste constante au cours de l'incubation. En conséquence, si l'eau tritiée pénètre toute la suspension membranaire, et plus particulièrement tout le sédiment, la quantité de radio-élément introduite dans le volume initial étant connue, un espace lié à la diffusion de l'eau tritiée peut être calculé. Il est constant. Ainsi, dans cette manipulation, le volume du sédiment, résultant de la centrifugation de 0,1 ml de suspension membranaire initiale (correspondant à 15 mg de lyophilisat), est estimé à  $56 \pm 8 \mu\text{l}$  au début de l'incubation et à  $59 \pm 9 \mu\text{l}$

après 6 mn d'incubation. La différence observée n'est pas significative.

Les cinétiques de diffusion du  $^{14}\text{C}$ -dextrane et du  $^{14}\text{C}$ -sorbitol sont comparables (Figure 3.2). L'espace lié au dextrane passe de  $22 \pm 5 \mu\text{l}$  à  $30 \pm 2 \mu\text{l}$  au cours de l'incubation. Dans les mêmes conditions, l'espace lié au sorbitol évolue de  $19 \pm 1 \mu\text{l}$  à  $38 \pm 3 \mu\text{l}$ . Ils ne sont pas sensiblement différents l'un de l'autre. Par contre, ils sont distincts de celui lié à l'eau tritiée. Les espaces incriminés doivent être, par conséquent, distincts. Il semble raisonnable de penser que le dextrane et le sorbitol ne diffusent que dans le milieu extra-vésiculaire du sédiment.

L'hypothèse de travail formulée pour le dextrane et pour le sorbitol ne peut être généralisée au citrate. C'est une molécule accumulée par les lutoïdes (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974).

#### 8) L'utilisation de ce critère pour suivre la vésiculation.

Les cinétiques de diffusion de l'eau tritiée et du dextrane sont suffisamment rapides pour rendre compte de toute évolution du compartiment vésiculaire d'une suspension membranaire lutoïdique.

Cette méthode, développée par H. HELDT et al (1974) ou par R. HENNING (1975), est certainement la meilleure. Mais, au cours de l'incubation, on note un allègement d'une partie des vésicules de la suspension : elles ne traversent plus la couche de silicones employée pour séparer la phase aqueuse de la phase membranaire (vésiculée). Il est alors nécessaire d'en alléger la densité (par addition de silicones de densité plus faible) si nous voulons les récolter.

Toutefois, bien qu'elle soit discutable, la méthode de séparation peut se réduire à une simple centrifugation différentielle, en utilisant les modifications apportées par R.G. JOHNSON et A. SCARPA (cf. le paragraphe 3 du chapitre II).

*B. DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES.*

*L'UTILISATION DE LA METHODE DE J.B. CHAPPELL (1968) POUR SUIVRE  
TOUTE MODIFICATION DU VOLUME VESICULAIRE INDUITE PAR UN CHANGEMENT  
DE LA TONICITE DU MILIEU D'INCUBATION.*

La technique développée par J.B. CHAPPELL (1968) est classique et simple. Tout gonflement du compartiment mitochondrial peut être suivi en mesurant la variation de densité optique à 520 nm. En conséquence, toute modification du milieu d'incubation pouvant induire une variation du volume mitochondrial, voire du volume d'un compartiment vésiculaire, à la limite, pourra être analysée de cette façon (W.T. WISKICH, communication personnelle).

Pour obtenir une variation de densité optique à 520 nm, il est nécessaire d'avoir une suspension membranaire très concentrée, faite à partir d'une préparation très purifiée et très homogène afin d'éliminer tout artéfact induit par la présence de caoutchouc voire d'agrégats d'origine mal définie.

L'analyse du gonflement se fait à 30°C. Aussi, la suspension membranaire, conservée dans un milieu isotonique à 0°C, est-elle pré-incubée quelques mn à 30°C avant d'être diluée dans le milieu réactionnel, soit un milieu G.E.M. (pH 9,5), soit un milieu T.E.A. (pH 7,5), contenant des concentrations croissantes en mannitol !

De toutes les analyses faites, le bilan suivant peut être présenté :

- pour des raisons techniques, seule la variation de densité optique mesurée à 520 nm entre  $t = 20$  sec. et  $t = 270$  sec. est considérée.

(Au mieux, l'enregistrement graphique de la variation débute au bout de 20 sec. : 5 à 7 secondes sont nécessaires pour assurer l'homogénéisation, par agitation douce, et 10 autres, correspondant au temps de réponse de l'ensemble spectrophotomètre-enregistreur.)

- dans ces conditions, l'amplitude de la variation de densité optique est fonction de la tonicité du milieu d'incubation utilisé, quelle qu'en soit sa nature (Figure 3.3). Elle augmente à mesure que la concentration en mannitol diminue (dans une gamme de valeurs situées entre 0,1 et 0,3 M).

Un tel résultat est compatible avec l'existence d'un espace osmotique dans la suspension membranaire. La non conservation des conditions initiales d'isotonicité crée un mouvement d'eau au niveau du compartiment vésiculaire, tendant à en augmenter son volume. Mais, cet accroissement est limité. Lorsque le choc hypotonique est trop grand, la membrane vésiculaire, dont l'élasticité n'est pas infinie, se rompt. La tendance se trouve inversée pour une concentration en mannitol du milieu d'incubation inférieure à 0,1 M.

Il ne faut pas se leurrer sur la portée des résultats obtenus. Ils sont purement qualitatifs. Toutefois, ils confirment l'existence d'un compartiment vésiculaire osmosensible dans la suspension membranaire ainsi préparée à partir du lyophilisat.

### *C. DONNEES MORPHOLOGIQUES.*

Les techniques habituellement utilisées pour l'examen morphologique des organites en microscopie électronique se sont avérées insuffisantes pour obtenir des résultats satisfaisants.

L'observation de vésicules n'est possible dans la mesure où le milieu de fixation contient, en plus de la glutaraldéhyde, du mannitol 0,3 M, du moins pour les suspensions membranaires préparées en tampon phosphate-mannitol. La conservation des conditions d'isotonicité tout au long de la préparation est nécessaire. Ce n'est qu'en les respectant que nous pouvons obtenir les vésicules observées dans la micrographie A de la Planche 3.I.

Pour une préparation membranaire faite en milieu phosphate-mannitol, on observe des structures circulaires dont le diamètre peut varier de 2 à 15  $\mu$ . Une membrane limitante est discernable. Elle définit un espace opaque aux électrons suggérant l'existence d'un contenu intravésiculaire et par conséquent, d'un compartiment vésiculaire.

La nature du milieu de vésiculation doit intervenir dans la stabilité des vésicules contenues dans ce sédiment. En effet, la présence de mannitol n'est pas nécessaire lorsque la vésiculation est effectuée dans un milieu G.E.M. (20 mM glycine, 10 mM E.D.T.A., 5 mM  $\beta$ -mercapto-éthanol, pH 9,5).

L'aspect des structures membranaires d'une préparation faite en milieu G.E.M. n'est pas le même (micrographies A. et B. de la planche

3.II). La mise en évidence de la membrane limitante est aisée car l'espace qu'elle enclave n'est pas plus opaque aux électrons que le milieu qui les contient (micrographie A.). Leurs dimensions sont comparables. Toutefois, des structures tubulaires peuvent être observées dans de telles préparations avec une fréquence élevée. Pour les cytologistes, leur présence traduit le fait qu'il s'agit non plus de vésicules sphéroïdes mais de surfaces membranaires cylindriques emboîtées les unes dans les autres. C'est une conséquence du traitement des membranes par l'E.D.T.A. au moment de la vésiculation. Il s'agit là d'une hypothèse qui nous remémore les lois fondamentales de la géométrie descriptive : représenter, dans un plan, une structure existant dans les trois dimensions.

En conséquence, pour un milieu mannitol-phosphate, les conditions expérimentales employées permettent de former un compartiment vésiculaire avec des membranes lutoïdiques lyophilisées.

## II - LES MODIFICATIONS DU COMPARTIMENT VESICULAIRE INDUITES PAR LE CONDITIONNEMENT.

Les conditions expérimentales utilisées permettent de former un compartiment vésiculaire à partir de membranes lutoïdiques lyophilisées. Il est nécessaire de savoir dans quelle mesure la population vésiculaire qui en résulte est homogène.

Il a été fait appel à de nombreuses techniques mais peu de manipulations ont conduit à des résultats satisfaisants. Aussi, n'est-il décrit, dans cet exposé, que quelques aspects de nombreuses tentatives faites pour séparer les vésicules :

- la centrifugation sur gradient de dextrane ou de saccharose,
- l'électrophorèse en veine liquide,
- la filtration sur gel,...

### A. SEPARATION DES VESICULES PAR CENTRIFUGATION SUR GRADIENT.

De toutes les méthodes actuellement utilisées pour fractionner une suspension membranaire, la centrifugation isopycnique est certainement la meilleure. Elle permet de séparer convenablement les différents éléments figurés qu'elle contient.

Généralement, 3 à 4 ml d'une suspension membranaire, provenant de la reprise d'un sédiment dans un milieu défini (le plus souvent,



le milieu phosphate-mannitol, pH 7,5), sont déposées sur un gradient discontinu de concentration de dextrane allant de 0 à 10 % (p./vol.). On centrifuge pendant au moins 10 mn à 60.000 x g à 4°C. Les différents dosages sont effectués sur les fractions correspondant aux différentes populations vésiculaires qu'il a été possible de séparer.

Le remplacement du dextrane par le saccharose ne donne pas de résultats démonstratifs. Nous n'en ferons donc pas mention ici.

### *1) Influence de la température.*

De toutes les manipulations faites, il se dégage l'idée suivante.

La distribution des vésicules sur un gradient de dextrane est fonction de la température à laquelle elles sont exposées et de la durée du traitement.

Ainsi, comme le montrent les Figures 3.4 et 3.5, plus la durée d'exposition des vésicules à 30°C est longue, plus leur allègement est important et plus la fréquence de répartition dans les couches peu denses est élevée.

On a cherché à représenter cette fréquence de répartition dans les schémas des tubes de centrifugation.

Pour des vésicules constituées dans un milieu phosphate-mannitol (pH 6,0) et incubées à 0°C, l'analyse de leur distribution (les vésicules étant caractérisées par un indice d'éclatement faible, une forte activité ATPase et un rapport activité ATPase/activité phosphatase acide élevé) sur un gradient discontinu de dextrane (1-5 % p./vol.) indique que l'essentiel des vésicules se trouve réparti entre deux fractions : les fractions  $F_{III}$  et  $F_{IV.A}$  (contenant respectivement 11,6 et 8,4 des protéines totales déposées sur le gradient). Elles correspondent aux frontières des couches 2 et 3 ( $F_{III}$ ) et des couches 3 et 4 ( $F_{IV.A}$ ). Il s'agit des deux fractions les plus riches en activité ATPase, une activité démontrée comme étant membranaire (J. D'AUZAC, 1975).

Par contre, si ces vésicules sont incubées 60 mn à 30°C (Figure 3.5.), l'essentiel du matériel membranaire se situe à la frontière entre les couches 4 et 5 (fraction V) et les couches 3 et 4 (fraction IV). Dans la fraction V, on retrouve 42,3 % des protéines récupérées, 23,8 %

de l'activité phosphatase acide et 43,5 % de l'activité ATPase initiales. Bien que le gradient discontinu utilisé ne soit pas identique, il existe indiscutablement un allègement des vésicules, se produisant au cours de l'incubation effectuée à 30°C.

Toutefois, l'incorporation de  $^{14}\text{C}$ -citrate la plus importante caractérise la fraction  $F_{\text{IV}}$  (Figure 3.5). Cependant, la radioactivité spécifique la plus grande est obtenue pour la fraction  $F_{\text{III}}$ , la fraction où se trouve l'essentiel de la population vésiculaire dans le motif témoin (Figure 3.4). A titre indicatif, la Figure 3.6. rend compte de l'incorporation de  $^{14}\text{C}$ -citrate par la suspension membranaire dont la distribution est analysée sur ce type de gradient. Au bout de 60 mn d'incubation, la radioactivité spécifique s'élève à  $308 \text{ dpm} \times \mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$  Cette valeur peut être comparée à celle calculée pour la fraction  $F_{\text{IV}}$  ( $537 \text{ dpm} \times \mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$ ) et à celle évaluée pour la fraction  $F_{\text{III}}$  ( $1207 \text{ dpm} \times \mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$ ). Ces fractions correspondraient à des populations vésiculaires purifiées, débarrassées en partie des protéines exogènes les contaminant.

## *2) Influence de la nature du tampon de vésiculation.*

Le fait de vésiculer dans un milieu différent (citrate-phosphate, pH 7,5, ou G.E.M., pH 9,5) modifie la répartition des vésicules formées sur un gradient de dextrane identique. Ces différences corroborent celles observées en microscopie électronique. La taille des vésicules engendrées dans ces deux milieux n'est pas comparable et la distribution des vésicules sur le gradient de dextrane peut en être le reflet.

Par ailleurs, il faut retenir l'importance du lavage des membranes après la vésiculation et de la présence de l'E.D.T.A. dans le milieu de lavage, quel que soit le type de milieu employé. Il altère la distribution des vésicules sur le gradient de dextrane, en modifiant les fractions lourdes ( $F_{\text{II}}$  et  $F_{\text{III}}$ ). Elles se trouvent éliminées par un processus d'allègement dont l'origine est discutée (intervention d'ions ou de particules de caoutchouc). Malheureusement, jusqu'à présent, aucun rôle particulier d'ions, comme le calcium ou le potassium, n'a pu être mis en évidence mais cela ne signifie pas pour autant qu'ils n'en possèdent pas.

Nous tenions à rendre compte de ces résultats qui soulignent la

complexité du problème à résoudre.

#### *B. SEPARATION DES VESICULES PAR ELECTROPHORESE EN VEINE LIQUIDE.*

Cette technique, pratiquée en routine dans le Laboratoire de Physiologie cellulaire de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris), permet de séparer les structures membranaires biologiques, selon leur charge. Elle a été utilisée avec succès pour séparer les lysosomes, des mitochondries (R. STAHN, R.P. MAIER et K. HANNIG, 1970), les membranes mitochondriales (H.G. HELDRICH, R. STAHN et K. HANNIG, 1970), les chloroplastes (V.W. KLOFAT et J.C. KADER, 1968) et les autres fractions subcellulaires (K. HANNIG et H.G. HEIDRICH, 1974 ; H.G. HEIDRICH, R. KINNE, E. KINNE-SAFRAN et K. HANNIG, 1972).

On a recherché, par cette technique, dans quelle mesure, il était possible de mettre en évidence des structures différentes dans la population vésiculaire, formée à partir des membranes lutoïdiques lyophilisées.

Les vésicules, engendrées à partir du lyophilisat, sont dispersées dans quelques ml de tampon d'électrophorèse, de façon à avoir une suspension membranaire compatible avec le fonctionnement de l'appareil (Free-flow electrophoresis system, type FF-5, Bender et Hobein, Munich, Allemagne de l'Ouest). Dans toutes ces manipulations, seul le milieu phosphate-mannitol a été utilisé.

Lorsque les vésicules sont formées dans un milieu, soit à pH 6,0, soit à pH 7,5, et que l'électrophorèse s'effectue à pH 6,0, les différences dans leur migration sont faibles (Figure 3.7., courbe A). Les vésicules, formées à pH 6,0, migrent selon un spectre étroit. Pour celles formées à pH 7,5, la même description peut être faite au détail près que le faisceau est légèrement décalé vers la cathode. De tels résultats indiquent clairement l'existence d'une population relativement homogène de vésicules chargées négativement.

Si les vésicules, formées à pH 7,5, sont incubées 60 mn à 30°C, il en résulte un faisceau beaucoup plus large comme l'indique le motif témoin (incubé le même temps à 0°C) (Figure 3.8, courbes C et D), quelle que soit la valeur du pH du milieu d'incubation et de l'électrophorèse. Il en est de même pour les vésicules formées à pH 6,0 (Figure 3.8, courbes A et B).

Le fait d'incuber à 30°C les vésicules pendant 60 mn augmente l'étendue du spectre, qui finit par devenir très large. A la limite, il devient difficile de distinguer nettement les bandes initiales.

Par cette technique, il est donc démontré que la population vésiculaire, formée dans les conditions habituelles, est homogène quant à sa charge électrique. D'une manipulation à l'autre, la charge globale nette n'est pas identique car les migrations observées sont différentes. Toutefois, toutes les vésicules qui la constituent sont chargées négativement. Il n'y a pas de structures correspondant à une polarité inversée et, par conséquent, chargées différemment. Elle nous apprend aussi qu'au cours de l'incubation à 30°C, la charge globale est modifiée : la répartition n'est pas la même bien qu'elle corresponde à une charge nette de même signe.



### III - CONCLUSIONS.

Par des méthodes fort différentes (enclavement d'activités enzymatiques natives, comme l'activité phosphatase acide, ou non, comme l'activité malate-deshydrogénase ; incorporation différentielle de molécules non chargées et non transportées activement ; diffraction de la lumière ; caractérisation de vésicules en microscopie électronique), il est possible de mettre en évidence des structures vésiculaires osmosensibles dans la suspension membranaire préparée à partir de lyophilisat de fractions lutoïdiques dans les conditions expérimentales utilisées.

Certes, la population vésiculaire est morphologiquement hétérogène. Elle se constitue de sphérules de 2 à 15  $\mu$  de diamètre. Elle se concrétisera par l'obtention de plusieurs fractions membranaires par centrifugation sur un gradient discontinu de concentration de dextrane. Dans la mesure où les conditions de centrifugation sont isopycniques, leur densité moyenne peut être estimée entre 1,0267 g x cm<sup>-3</sup> et 1,0290 g x cm<sup>-3</sup>.

La distribution des vésicules entre ces différentes fractions membranaires est fonction des conditions de préparation (type de l'homogénéisation ; nature et pH du milieu de vésiculation ; mode du lavage ; nature et pH du milieu de lavage ; ...). Le profil de cette distribution est tout-à-fait différent lorsque le milieu de vésiculation couramment utilisé (le milieu phosphate-mannitol, pH 7,5) est remplacé

par un milieu G.E.M. (pH 9,5). L'addition de molécules comme l'E.D.T.A. dans le milieu, soit de vésiculation, soit de lavage, influe aussi sur cette répartition.

Toutefois, il n'existe pas, dans cette population vésiculaire, de structures membranaires chargées différemment. Toutes les vésicules sont chargées négativement. Leur charge nette globale semble du même ordre de grandeur. La technique employée et mise au point par J.C. KADER est estimée suffisamment fine pour affirmer une telle hypothèse. L'hétérogénéité morphologique ne se concrétise pas par une hétérogénéité de charge.

En conséquence, il ne semble pas déraisonnable de vouloir étudier des processus aussi complexes que l'accumulation du citrate avec de telles structures membranaires en relation avec le développement d'une force motrice protoniques au niveau de la membrane vésiculaire.

Aucun système n'est idéal. Ainsi, il faut remarquer que, dans les conditions expérimentales employées lors de l'incubation, il existe un phénomène d'allègement des vésicules. Leur densité moyenne est de l'ordre de  $1,019 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$  après une incubation de 60 mn à  $30^{\circ}\text{C}$ . La population qu'elles forment devient beaucoup plus hétérogène. Mais, cette hétérogénéité n'est pas discernable par centrifugation sur gradient de dextrane. On ne le voit qu'en électrophorèse en veine liquide. Par ailleurs, on doit noter aussi que leur charge nette globale est devenue légèrement moins négative.

CHAPITRE IV

CARACTERISTIQUES DE L'INCORPORATION

DU CITRATE PAR LES VESICULES

VACUOLAIRES





I - CARACTERES VESICULAIRES DE L'INCORPORATION DE CITRATE PAR UN  
SEDIMENT MEMBRANAIRE. IMPORTANCE DE L'ADSORPTION.

Les conditions expérimentales employées permettent d'obtenir un sédiment membranaire contenant des vésicules dont la morphologie est fonction du milieu de vésiculation utilisé. Mais, cela n'implique pas pour autant que le  $^{14}\text{C}$ -citrate susceptible d'être fixé par ce sédiment membranaire soit le résultat d'une accumulation transmembranaire. L'hypothèse d'une adsorption chimique, faisant intervenir des liaisons covalentes ou électrostatiques avec les groupements polaires membranaires, peut être aussi suggérée.

L'approche rigoureuse du phénomène d'adsorption est analysée en détail par N. LAKSHMINARAYANAIH (1969) ou par W.D. STEIN (1967).

Toutefois, à défaut de suivre la méthode que ces auteurs préconisent, l'effet de la variation de la température ou de la tonicité du milieu de reprise (qui peut s'identifier dans la plupart des cas au milieu d'incubation, aux additions près spécifiques de chaque motif expérimental) et l'action des détergents sur la rétention de  $^{14}\text{C}$ -citrate par un sédiment membranaire confirmeront le caractère de l'adsorption potentielle.

#### A. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

##### 1) *Sur l'amplitude de l'incorporation du citrate par un compartiment vésiculaire.*

La Figure 4.1 montre que la fixation instantanée de citrate par un sédiment membranaire, au moment de la mise en contact, est faible : elle est égale au plus à  $7,4 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$

L'évolution de ce processus est fonction des conditions d'incubation. Au bout de 60 mn, cette fixation s'avère plus faible à  $0^{\circ}\text{C}$  ( $11,8 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) qu'à  $30^{\circ}\text{C}$  ( $56,6 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). La température influe donc sur le phénomène observé.

S'il s'agissait d'une simple réaction avec une surface polaire, elle devrait être complète en quelques secondes. Or, le temps nécessaire pour obtenir un équilibre apparent entre le citrate et les sites membranaires susceptibles de l'adsorber est relativement long. Sa dépendance vis-à-vis de la température montre qu'elle nécessite une forte énergie d'activation. En conséquence, la présence de  $^{14}\text{C}$ -citrate dans le sédiment correspond davantage à une entrée de molécules dans un compartiment vésiculaire qu'à une interaction (aspécifique) avec quelques groupements membranaires. De par la charge portée par le citrate, au pH de l'expérience (cf Chapitre VIII, paragraphe 3), cette interaction est peu probable car la charge nette globale des membranes est négative.

##### 2) *Sur l'état des vésicules et leur aptitude à fixer le citrate.*

L'effet de la température sur l'état des vésicules peut être étudié de deux façons différentes selon que l'on fait varier la température lors de la vésiculation ou lors d'une phase de préincubation précédant la mise en contact avec le  $^{14}\text{C}$ -citrate.

Les courbes A et B de la Figure 4.2 montrent que l'abaissement de la température au moment de la vésiculation favorise l'incorporation ultérieure, même si entre la vésiculation et l'incorporation, les vésicules ont été replacées pendant une heure à  $30^{\circ}\text{C}$ . La préincubation (qui suit la vésiculation) a elle-même un effet même si elle

ne peut compenser les conséquences d'une température élevée lors de la vésiculation (Figure 4.2, courbe C). L'incorporation est d'autant plus accentuée que la température de préincubation est plus basse (Figure 4.2, courbes A, B, et C.)

Dans chacun de ces cas, la fixation immédiate de citrate s'avère indépendante de la température de vésiculation, de préincubation ou d'incorporation ( $6,8 - 7,8 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), contrastant ainsi avec celle observée au bout de 60 mn d'incubation.

Plusieurs explications peuvent être imaginées a priori : dénaturation du site de translocation ; développement d'un efflux plus important au cours de l'incubation ; dissipation d'un gradient ionique nécessaire à l'énergisation du transport ; .... On en discutera le moment venu.

En résumé, la fixation instantanée de citrate par un sédiment membranaire, au début de la manipulation, peut être considérée comme une adsorption indépendante de l'incorporation mesurée après une incubation de 60 mn à 30°C (Figure 4.1). Cette absorption, qui possède une sensibilité élevée à la température dépend au contraire du conditionnement des vésicules. Elle présente les traits d'une absorption réelle.

#### B. INFLUENCE DE L'ISOTONICITE DU MILIEU DE REPRISE. EFFET DU CHOC OSMOTIQUE.

Les vésicules sont formées dans un milieu de vésiculation isotonique contenant du mannitol. Mais, elle peuvent être reprises par un milieu d'incubation d'osmolarité différente.

La Figure 4.3 montre qu'au bout de 60 mn d'incubation, l'incorporation est plus élevée dans un milieu contenant du mannitol (courbe A) que dans un milieu qui en est dépourvu (courbe B).

L'omission de l'agent osmotique peut se faire au cours des lavages du sédiment ayant incorporé le  $^{14}\text{C}$ -citrate pendant 60 mn à 30°C. La quantité de  $^{14}\text{C}$ -citrate retrouvée dans le sédiment membranaire est fonction de la concentration de mannitol présente dans le milieu de lavage (Figure 4.4., courbe B). On observe également une perte de protéines (courbe A). La courbe d'activité spécifique ( $\text{dpm} \times \mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$ ) est croissante en fonction de la concentration en mannitol du milieu de lavage (courbe C). Ceci révèle que la perte de protéines par

éclatement vésiculaire est relativement plus faible que la perte de citrate.

Il en résulte deux hypothèses :

- soit les grosses vésicules ont une activité spécifique plus faible (cette situation impliquant que la quantité de protéines est proportionnelle au volume vésiculaire et que l'accumulation de citrate l'est au nombre de sites de transport, et par conséquent, à la surface vésiculaire) et sont plus résistantes à la diminution de la tonicité du milieu,
- soit, lors de l'abaissement de la concentration de mannitol, la récupération des protéines est plus élevée qu'en présence de mannitol du fait de la meilleure sédimentation des membranes non vésiculées.

La seconde semble plus probable que la première, mais aucun fait expérimental particulier nous permet de l'affirmer.

Toutefois, même si le choc hypotonique n'est pas suffisant pour rompre toutes les membranes vésiculaires en raison même de l'hétérogénéité des dimensions des compartiments qu'elles définissent (cf Chapitre III, paragraphe I), les résultats obtenus constituent une démonstration non ambiguë du caractère vésiculaire de la fixation de  $^{14}\text{C}$ -citrate par un sédiment membranaire lutoïdique.

#### *C. ACTION DES DETERGENTS.*

L'introduction d'un détergent non ionique, comme le Triton X-100, dans le milieu de lavage, peut éliminer totalement le  $^{14}\text{C}$ -citrate que les membranes sont capables de retenir (Figure 4.5, courbe A).

Mais la quantité de citrate résiduelle présente dans le sédiment est avant tout fonction de la quantité de détergent ajoutée dans le milieu de lavage. Lorsque le Triton X-100 est utilisé à une concentration de 0,01 % (p./vol.), elle est estimée à 7,5 % de la quantité contenue dans le motif témoin (Figure 4.5., courbe A). Dans

ces conditions, seulement 58,5 % des protéines du sédiment sont solubilisées (courbe B). Toutefois, pour cette concentration, le détergent rompt la membrane vésiculaire : toute l'activité phosphatase acide endogène et toute l'activité malate-deshydrogénase, introduite dans l'espace vésiculaire, deviennent accessibles au substrat (cf Chapitre III, paragraphe I).

En conséquence, tout le citrate incorporé, présent dans le sédiment, se trouve libéré à une concentration de détergent pour laquelle les protéines ne le sont pas entièrement.

Malgré tout, ces résultats confirment l'hypothèse d'une rétention de la majorité du citrate sédimenté par une barrière de perméabilité et de la présence d'une faible quantité de citrate adsorbé.



## II - DETERMINATION DU $K_M$ ET DU $V_M$ DE LA CINÉTIQUE D'INCORPORATION

L'incorporation du citrate par les vésicules vacuolysosomales a été étudiée en fonction de la concentration de citrate présent dans le milieu d'incubation, dans une gamme allant de 0 à 30 mM.

La vitesse du transport, exprimée en molécules de citrate absorbées par une suspension membranaire vésiculée, rapportées à la quantité de protéines, est déterminée sur une période d'incubation de 60 mn à 30°C. Pour le lyophilisat utilisé, la cinétique d'absorption est globalement linéaire pour le temps choisi. Cette linéarité est fonction du lot de membranes lyophilisées employées : cette phase peut durer entre 20 et 60 mn dans les conditions expérimentales utilisées.

La radioactivité spécifique ( $\text{dpm} \times \mu\text{g}^{-1} \text{prot.}$ ) absorbée en 60 mn s'avère maximale pour une concentration de 1 mM (Figure 4.6). Une courbe comparable est décrite avec les lutoïdes fraîchement isolés mais avec un maximum situé à 2,5 mM (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974). La présence d'un maximum tient au fait que, dans ces expériences, l'activité volumique du radio-élément est constante tandis que l'activité spécifique varie évidemment avec la concentration du citrate.

La courbe de la vitesse d'absorption en fonction de la concentration du citrate extravésiculaire suggère l'existence d'une cinétique de saturation bien que, dans les conditions expérimentales utilisées, la saturation n'ait pas été atteinte (Figure 4.7, courbe A).



La forme analytique la plus probable d'une telle cinétique est l'hyperbole associée au modèle de M.L. MENTEN et L. MICHAELIS (L. MICHAELIS et M.L. MENTEN, 1913 ; G.E. BRIGGS et J.B.S. HALDANE, 1925). Pour la détecter, différentes transformations de l'équation de MENTEN-MICHAELIS peuvent être utilisées. Le Tableau 4.1 résume les principes de ces transformations et les estimations des valeurs pour le  $K_m$  et la  $V_m$  auxquelles elles conduisent.

Sur toute la gamme de concentrations employée,  $K_m$  correspond à  $8,2 \pm 3,1$  mM et  $V_m$ , à  $48,5 \pm 9,2$  nmol. citrate  $\times$   $\text{mg}^{-1}$  prot.  $\times$   $\text{hr}^{-1}$ . Cependant, la sédimentabilité des vésicules décroît à mesure que la concentration en citrate du milieu d'incubation croît. D'où une explication possible de la variabilité des résultats obtenus lorsque la concentration en citrate est élevée. En conséquence, dans une gamme de concentration plus restreinte,  $K_m$  devient  $5,1 \pm 0,5$  mM et  $V_m$ ,  $35,4 \pm 2,8$  nmol. citrate  $\times$   $\text{mg}^{-1}$  prot.  $\times$   $\text{hr}^{-1}$ .

La représentation selon H. LINEWEAVER et D. BURK (1934) montre une forte affinité du site de transport du citrate pour son substrat (Figure 4.8.). Mais, elle ne privilégie aucune valeur particulière. Elle donnera un poids exagéré aux faibles doses pour lesquelles de faibles incorporations sont obtenues, ce qui fait que, si un second système de transport à faible affinité existe, il ne pourra pas être décelé.

Or, la représentation selon G.S. EADIE (1942) et B.H.J. HOFSTEE (1952) (Figure 4.9) suggère l'existence d'une branche dont le comportement semble différent et qui se trouve dans la gamme de valeurs 0-2 (prises par le terme  $V/S$ ). Il est tentant de l'associer à l'existence d'un second site de transport du citrate. L'étude analytique de la courbe expérimentale, effectuée selon la méthode de H. SENTENAC (1977), amène à définir deux sites d'affinité différente :

- un premier, avec une forte affinité, le  $K_m$  ayant une valeur de 3,95 mM et un  $V_m$  de 17,83 nmol.  $\times$   $\text{mg}^{-1}$  prot.  $\times$   $\text{hr}^{-1}$ ,
- un second, d'affinité plus faible, dont le  $K_m$  équivaut à 20,4 mM et le  $V_m$ , à 42,53 nmol.  $\times$   $\text{mg}^{-1}$  prot.  $\times$   $\text{hr}^{-1}$ ,

Dès lors, il devient possible de rechercher le formalisme

de la cinétique d'incorporation du citrate et de ses différentes représentations à différentes doses en fonction des hypothèses formulées : unitaire (Figures 4.7, courbe B, et 4.9, courbe B) ou non (Figures 4.7, courbe C et 4.9, courbe C).

Toutefois, les résultats obtenus ne permettent pas de choisir entre ces deux alternatives.

Pour leur part, J. D'AUZAC et C. LIORET (1974) ont décrit des valeurs comparables pour le  $K_m$ . Ils l'estiment à 7 mM. Il faut préciser que leurs conditions expérimentales sont légèrement différentes : leur milieu d'incubation (100 mM phosphate de potassium) est ajusté à pH 6,9.

Par ailleurs, il faut signaler que des valeurs sensiblement distinctes pour le  $K_m$  sont décrites pour un milieu d'incubation différent (100 mM triéthanolamine) ajusté à pH 7,0 (5mM) ou à 7,5 (20 mM) (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977).

Cette différence vient du fait que les constantes cinétiques d'un transporteur varient autant avec le pH qu'avec la composition ionique du milieu d'incorporation. Ceci est en relation directe avec le fonctionnement du transporteur. Les termes de comparaison n'étant pas les mêmes, il est difficile de conclure à leur identité.



### III - INFLUENCE DU PH DU MILIEU D'INCUBATION SUR L'INCORPORATION DU CITRATE.

L'incorporation du citrate par les vésicules vacuolysosomales est sensible au pH du milieu d'incubation (Figure 4.12). Dans la gamme de pH étudiée, le pH du milieu d'incorporation influence nettement la vitesse de pénétration dans les vésicules lutoïdiques.

Le milieu d'incorporation contient 100 mM H.E.P.E.S., 5 mM citrate, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM ATP, 300 mM mannitol et 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Son pH est ajusté de 6,12 à 9,05 par addition de Tris-base.

La vitesse d'absorption décroît fortement lorsque le pH varie de 6,2 à 8,8 (Figure 4.12).

De tels résultats sont à rapprocher de ceux illustrés dans la Figure 8.1, qui décrit la variation de la proportion des différentes espèces moléculaires de l'acide citrique en fonction du pH du milieu. Par analogie, on en déduit que la forme concernée devrait être  $RH^{2-}$  (cf Chapitre VIII, paragraphe 3.)

Les courbes obtenues avec les lutoïdes présentent un optimum à pH 7,0 (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977), un pH où la forme prédominante est  $R^{3-}$ . La différence avec nos résultats peut être due aux qualités des membranes lutoïdiques mais aussi à la nature des milieux employés (triéthanolamine-HCl et Tris-maléate pour les références citées ; H.E.P.E.S. dans notre cas).

Du fait de cette sensibilité de l'incorporation du citrate au pH du milieu d'incubation, il est nécessaire d'employer un milieu possédant un pouvoir tampon important (cf Figure 7.11).

Dans la manipulation décrite dans la Figure 4.12, la variation de pH observée au cours de l'incubation est limitée (0,1 à 0,3 unités de pH, dans la zone du pouvoir tampon de la molécule utilisée). C'est d'ailleurs la raison pour laquelle l'incorporation du citrate a été exprimée en fonction du pH du milieu d'incorporation mesuré, soit au début de l'incubation ( $t_0$ ), soit à sa fin ( $t_{60}$ ). Nous discutons des causes de la variation de pH dans les Chapitres VII et VIII.

#### IV - IMPORTANCE DE L'EFFLUX DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES.

La réversibilité du transport est étudiée en analysant les cinétiques d'efflux dans des conditions expérimentales variées.

Après une mise en contact d'une heure avec le citrate radioactif, les vésicules sont lavées et remises en suspension dans un milieu ne contenant plus que 5 mM citrate non radioactif. Après une seconde incubation de 60 mn, on observe une diminution de la quantité de citrate absorbée par le compartiment vésiculaire (Figure 4.13).

A température ambiante, il ne reste plus que 20 % de la radioactivité initiale dans les vésicules (Figure 4.13, courbe B). Par contre, à 0°C, il en subsistera encore 88 % (courbe A).

La perte de radioactivité ainsi mesurée est d'autant plus importante que la concentration du citrate dans le milieu d'exsorption est plus élevée (Figure 4.14). Dans la manipulation décrite, pour une concentration de 10 mM, 54 % de la radioactivité initialement présente dans le compartiment vésiculaire est échangée au bout de 60 mn de désorption. La constante de temps correspondant à une exsorption de 50 % de la quantité de citrate exsorbable est de 40 mn environ. Par contre, en son absence, cet efflux se réduit à 20 % de la radioactivité incorporée, avec une constante de temps manifestement beaucoup plus élevée. 50 % de la quantité totale exsorbée est déjà sortie en moins de 15 mn.

Il semble que le citrate des vésicules se trouve réparti dans deux compartiments cinétiques, le premier correspondant à une for-

me rapidement exsorbable même à froid et en absence de citrate externe (Figures 4.13, courbe A, et 4.14, courbe A), le second à une forme échangeable lentement, bloquée à 0°C (Figure 4.13, courbe B) et exsorbable seulement contre du citrate extérieur (Figure 4.14, courbes B et C).

Une telle observation a été faite pour d'autres systèmes vésiculaires, comme les vésicules plasmiques isolées de racines d'*Avena sativa* (H.SZE et T.K. HODGES, 1976).

Les résultats obtenus sur les lutoïdes fraîchement isolés sont différents : M.C. MONTARDY et C. LAMBERT (1977) concluent que l'incorporation du citrate est irréversible.

Ces auteurs interprètent la faible perte de radioactivité observée au cours de leur manipulation comme la conséquence de la fragilité des structures lutoïdiques et de leur destabilisation. Leurs conditions expérimentales ne sont pas identiques aux nôtres : leur milieu d'incubation contient 100 mM triéthanolamine, ajusté à pH 7,0 ; leur phase d'incubation dure 30 mn à 25°C et la phase d'exsorption, 45 mn, à la même température. Par ailleurs, les lutoïdes ont conservé leur contenu original (avec tout ce que cela implique et, en particulier, l'existence d'un effet Donnan) alors que nos vésicules ont un milieu qu'il est possible de moduler et de faire varier à volonté.

En conclusion, l'incorporation du citrate par les vésicules vacuo-lysosomales semble un processus réversible dans la mesure où un échange peut s'effectuer.

#### V - EVOLUTION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DU SEDIMENT VESICULAIRE AU COURS DE L'INCUBATION.

Dans le contexte naturel, les vacuoles contiennent du citrate à une concentration de l'ordre de 50 mM (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; D. RIBAILLIER, 1971). Le lyophilisat en contient par conséquent une quantité non négligeable. Dans les conditions expérimentales utilisées, en particulier lorsque la vésiculation se fait en présence de 50 mM citrate, il en résulte une concentration finale de l'ordre de 25 à 50 mM. L'absorption s'effectue donc contre un gradient transmembranaire de concentration, la concentration du milieu d'incubation étant de 5 mM. Néanmoins, il peut s'agir d'un simple échange entre le citrate interne non marqué et le citrate externe radioactif.

D'après les paragraphes précédents, il semble que l'incorporation du citrate s'accompagne au moins partiellement d'une exsorption concomitante. Dans ce cas, on a la relation :

$$\frac{d C_{in}^x}{dt} = \frac{1}{V} (J_{in} \cdot s_{ex} - J_{ex} \cdot s_{in}) \quad (4.1)$$

avec :

$$s_{ex} = \frac{C_{ex}^x}{C_{ex}} \quad (4.2)$$

et :

$$s_{in} = \frac{C_{in}^x}{C_{in}} \quad (4.3)$$



En choisissant correctement les unités de radioactivité, on prendra, par définition,  $S_{ex} = 1$  (dans les conditions expérimentales utilisées,  $(S_o)_{ex} = 1 \mu C_i \times \mu mol.^{-1}$ ), ce qui revient à écrire :

$$S_{in} = \frac{s_{in}}{s_{ex}} \quad (4.4)$$

$$\frac{dC^*_{in}}{dt} = \frac{1}{V} (J_{in} - J_{ex} \cdot S_{in}) \quad (4.5)$$

$S_{in}$  s'exprime alors en une fraction de sa valeur maximale  $s_{ex}$ , évoluant par conséquent de 0 à 1.

Il est évident que :

- V représente le volume vésiculaire,
- $C^*_{in}$ , la concentration interne en soluté radioactif,
- $C_{in}$ , la concentration interne en soluté,
- $C^*_{ex}$ , la concentration externe en soluté radioactif,
- $C_{ex}$ , la concentration externe en soluté,
- $J_{in}$ , l'influx de l'ion considéré,
- $J_{ex}$ , l'efflux de l'ion considéré.

L'équation (4.5) représente la formulation la plus simple du mouvement des molécules de citrate entre le milieu et les vésicules (cf U. LUTTGE et N. HIGINBOTHAM, 1979 ; D.J.F. BOWLING, 1976). Elle peut se compliquer si ce dernier est lié au développement d'un potentiel membranaire ou s'il dépend d'autres forces (couplage avec d'autres mouvements ioniques ; nécessité d'un cofacteur métallique ; ...)

Au cours d'une incubation de 60 mn, réalisée dans les conditions habituelles (les vésicules, préparées dans un milieu phosphate-mannitol, pH 6,0, sont incubées à pH 7,5, en présence de 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>, à 30°C), l'influx net de citrate n'excède pas 49,3 nmol x mg<sup>-1</sup> prot. (Figure 4.15, courbe A). Il correspond à l'augmentation de la quantité de citrate trouvée dans le sédiment vésiculaire (courbe B). En conséquence, il ne s'agit pas là d'un simple échange mais d'une accumulation réelle, la quantité de citrate intravésiculaire augmentant malgré l'existence d'un gradient transmembranaire initial de concentration.

Par ailleurs, l'enrichissement isotopique observé est faible (Figure 4.15, courbe C). Il n'excède pas 0,08 ‰ après 60 mn d'incubation. L'équilibre isotopique n'est donc pas atteint dans les conditions expérimentales employées.

De par la faible valeur prise par  $S_{in}$ , l'efflux calculé à partir de l'équation 4.5 est nécessairement faible. Or, ce dernier est important (Figures 4.13, courbe B et 4.14, courbe B). Le modèle cinétique envisagé est, par conséquent, insuffisant.



## VI - DISCUSSION. ET CONCLUSIONS.

Toutes les propriétés décrites pour les lutoïdes (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977 ; J. D'AUZAC et al, 1977) se retrouvent avec les vésicules engendrées à partir de membranes lutoïdiques lyophilisées.

Le flux du citrate au travers de la membrane vacuolysosomale se différencie d'une adsorption potentielle toujours possible sur des sites membranaires superficiels par sa cinétique thermodépendante, osmosensible et pouvant être décrite selon un formalisme michaëlien (avec des constantes cinétiques de valeurs comparables à celles données pour les lutoïdes frais).

La représentation selon G.S. EADIE et B.H.J. HOFSTEE (Figure 4.9) indique la possibilité de l'existence d'un second site de transport, dont l'affinité serait faible.

Toutefois, la formalisation des cinétiques d'influx et d'efflux, selon une cinétique hyperbolique classique, est insuffisante pour rendre compte :

- du faible enrichissement isotopique,
- de l'amortissement rapide de l'influx,
- d'un efflux important malgré une activité spécifique relativement faible.

La complexité de la situation a nécessité une simulation digitale (cf Annexe 2 : Procédure de calcul utilisé lors des simula-

tions). Parmi les différents modèles testés, le plus probable s'avère le suivant. Il existerait deux compartiments caractérisés par des constantes cinétiques différentes, le premier susceptible d'être rapidement marqué, d'être très vite en équilibre isotopique avec le milieu d'incubation, ce qui expliquerait l'importance de l'efflux observé. Le second compartiment (cinétique), en équilibre avec le premier, contiendrait l'essentiel du citrate vésiculaire.

A partir des données expérimentales dont nous disposons, il est possible d'ajuster la courbe théorique ainsi obtenue à la courbe expérimentale, en choisissant judicieusement les valeurs des constantes cinétiques.

Cette modélisation rend compte d'une partie des résultats obtenus (Figures 4.16 et 4.17). Elle est compatible avec l'existence d'un efflux important (Figures 4.16, courbe B, et 4.17, courbe B) malgré un enrichissement isotopique faible (Figure 4.16, courbe C).

La simulation faite dans le cadre de cette hypothèse permet l'obtention de la courbe théorique D de la Figure 4.7, qui ne s'avère pas très différente de la courbe expérimentale.

Par ailleurs, ce modèle n'implique pas l'existence d'un second site de transport à affinité plus faible (Figure 5.9, courbe D). Toutefois, il n'explique pas l'effet des doses externes de citrate sur l'efflux. Il ne prévoit pas une variation importante de l'efflux dans les conditions expérimentales utilisées.

Nous discuterons de l'intérêt d'un tel modèle dans le Chapitre VIII.

## CHAPITRE V

### DETERMINATION DE LA FORCE MOTRICE PROTONIQUE DEVELOPPEE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE VACUOLAIRE



L'incorporation du citrate (et son accumulation) par un compartiment vésiculaire nécessite ipso facto le passage de la membrane limitante au niveau d'un site transporteur. Elle se fait contre un gradient transmembranaire de concentration. En conséquence, elle implique de l'énergie. Il existera donc un mécanisme de couplage avec un système lui fournissant l'énergie dont elle a besoin pour se dérouler.

Parmi les différents types de couplage existants, on peut indiquer :

- un couplage chimique, avec la formation d'un intermédiaire riche en énergie (E.C. SLATER, 1953),
- un couplage conformationnel, qui est un cas particulier du précédent, en ce sens que ce n'est plus une liaison mais un état conformationnel qui est en jeu (P.D. BOYER, 1974),
- un couplage chimio-osmotique, avec l'intervention directe ou non du gradient électrochimique protonique (P. MITCHELL, 1966),
- une variante du précédent a été formulé par R.J.P. WILLIAMS (1961).

L'énergie impliquée dans le transport de la plupart des molécules organiques au niveau des membranes végétales est considérée comme dérivant de la force motrice protonique mise en place par une activité ATPase pompe à protons (R.J. POOLE, 1978 ; J.A. RAVEN et



F.A. SMITH, 1977 et 1980 ; F.W. BENTRUP, 1980). C'est l'un des aspects du modèle chimio-osmotique développé par P. MITCHELL (P. MITCHELL, 1961, 1967, 1972, 1973, 1976 et 1977 ; P. MITCHELL et J. MOYLE, 1974). L'ATPase pompe à protons constitue un processus de transport primaire.

Cette ATPase pompe à protons est électrogénique. Elle a été maintes fois caractérisée au niveau du plasmalemme chez les végétaux inférieurs, comme *Chara corallina* (cf U.KISHIMOTO et al., 1980 ; T. SHIMMEN et M. TAZANA, 1977), comme *Nitella translucens* (cf R.M. SPANSWICK, 1972 ; P.W. KEIFER et R.M. SPANSWICK, 1978 ; R.M. SPANSWICK, 1980), comme *Neurospora crassa* (B.J. BOWMAN et C.W. SLAYMAN, 1977 ; B.J. BOWMAN et al, 1980 ; G.A. SCARBOROUGH, 1977) ou encore comme *Saccharomyces cerevisiae*.

Comme le rappelle D.W. KEIFER et R.M. SPANSWICK (1978), les critères principaux permettant de mettre en évidence une pompe ionique électrogène sont les suivants :

- le potentiel membranaire mesuré excède la valeur maximale calculée pour le potentiel de diffusion à partir des mesures des activités interne et externe des principaux ions,
- l'inhibition de la pompe ramène instantanément, et éventuellement réversiblement, la valeur du potentiel membranaire à celle du potentiel de diffusion.

Depuis P. MITCHELL (1961), le concept de force motrice protonique est à la base de toutes des réactions se déroulant au niveau des membranes biologiques. Elles impliquent la formation et l'utilisation d'une différence de potentiel électrochimique protonique ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ). Cette dernière (correspondant à la force motrice protonique) comprend une composante électrique ( $\Delta\psi$ ) et une composante osmotique ( $\Delta pH$ ) liées par la relation :

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = \Delta\psi - 2,303 \cdot \frac{RT}{F} \cdot \Delta pH \quad (5.1)$$

où  $\Delta\psi$  représente le potentiel électrique au travers de la membrane et  $\Delta pH$ , la différence transmembranaire de pH.

Parmi les nombreuses possibilités existantes, dénombrées à 11 selon V.P. SKULACHEV (1979), l'activité ATPase plasmalemmique trouvée chez les végétaux (J. DELHEZ et al, 1977 ; J.P. DUFOUR et

A. GOFFEAU, 1978 ; G.A. SCARBOROUGH, 1975 et 1977 ; B.J. BOWMAN et C.W. SLAYMAN, 1977 ; ...) est un système permettant de coupler l'hydrolyse de l'ATP à la génération d'un  $\Delta\mu\text{H}^+$ . Pour ce qui est de l'ATPase tonoplastique (J. D'AUZAC, 1975 et 1977), cette activité est suggérée mais elle reste à démontrer.

L'hypothèse de P. MITCHELL implique l'existence de tout un ensemble de transporteurs qui facilitent les échanges électriquement compensés des anions avec  $\text{OH}^-$  et des cations avec  $\text{H}^+$ . Il comprendra des transporteurs spécifiques, soit uniports (fonctionnant avec la composante électrique de la force motrice protonique), soit symports ou antiports (faisant intervenir le gradient transmembranaire de pH). Ils constituent un processus de transport secondaire.

Quel que soit le type du couplage énergétique, entraînant le transporteur du citrate, il est fondamental de pouvoir mesurer le potentiel transmembranaire (afin de connaître l'electrogénicité de son fonctionnement) et le gradient transmembranaire de pH, ce qui permettra d'estimer leur contribution relative dans la force motrice protonique.



## I - LA MESURE DE LA DIFFERENCE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE.

Du fait de l'exiguité des vésicules, il est impossible d'utiliser des micro-électrodes pour mesurer le potentiel transmembranaire. Il est donc nécessaire d'employer des méthodes indirectes, comme celles introduites par L.L. GRINIUS et al (1970), qui impliquent la distribution à l'équilibre d'un acide ou d'une base lipophile.

Cette méthode, employée avec succès chez les bactéries (cf F.M. HAROLD et D. PAPINEAU, 1972 ; S. RAMOS et al., 1976, par exemple), n'a jamais été testée, à notre connaissance, sur les vacuoles végétales. Nous avons cherché à en connaître sa validité avec les vésicules vacuolysomales.

### A. PRINCIPE DE LA METHODE.

Elle consiste à mesurer la distribution à l'équilibre de molécules lipophiles pouvant traverser librement les membranes biologiques telles que le  $\text{SCN}^-$ , le dibenzyl-diméthylammonium ( $\text{DDA}^+$ ) (K. ALTENDORF et al, 1975), le tétraphenylphosphonium ( $\text{TPP}^+$ ) (L.L. GRINIUS et al, 1970 ; L.E. BAKEEV et al, 1970 ; E.A. LIBERMAN et V.P. SKULACHEV, 1970 ; V.P. SKULACHEV, 1971) voire le triphényl-méthyl-phosphonium ( $\text{TPMP}^+$ ) (S. SCHULDINER et H.R. KABACH, 1975). Récemment, un nouveau marqueur a été introduit : le N - méthyl - deptropine (MDT) (P.G. RUIFROK et al, 1979).

Ces sondes ont une structure moléculaire suffisamment étrangère à la cellule pour que l'on puisse admettre qu'il n'y a pas de transporteur spécifique capable de les reconnaître et de les entraîner. Leur charge est suffisamment délocalisée pour leur conserver un caractère lipophile, c'est-à-dire une bonne perméabilité passive. Elles peuvent donc diffuser dans la membrane et se mettre à l'équilibre de Nernst entre le milieu et les vésicules.

Nous aurons dès lors la relation :

$$\Delta\mu_i = RT \ln \frac{[i]_{in}}{[i]_{ex}} + Z F \cdot \Delta\psi \quad (5.2)$$

avec :

- $\Delta\mu_i$ , le gradient de potentiel électrochimique pour l'ion  $i$  considéré,
- $\Delta\psi$ , les différences de potentiel électrique (existant entre les deux compartiments séparés par la membrane),
- $[i]_{in}$  et  $[i]_{ex}$ , les activités interne et externe de l'ion  $i$ ,
- $Z$ , la valence de l'ion  $i$ ,
- $R$ ,  $T$  et  $F$  ayant leurs significations habituelles (constante des gaz parfaits, température absolue, équivalent de Faraday).

A l'équilibre, on a  $\Delta\mu_i = 0$

$$ZF \cdot \Delta\psi = - RT \ln \frac{[i]_{in}}{[i]_{ex}} \quad (5.3)$$

$$\Delta\psi = - \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[i]_{in}}{[i]_{ex}} \quad (5.4)$$

La validité de la relation (5.4) ainsi définie à l'équilibre suppose plusieurs conditions implicites :

- seule la forme ionique doit être passivement perméante (et non les formes éventuellement neutres),
- l'équilibre doit être rapidement atteint,

- la sonde ne doit pas entrer en interaction avec les structures membranaires présentes dans le milieu d'incubation,
- son mouvement ne doit pas affecter le potentiel transmembranaire préexistant, ce qui implique que sa concentration soit faible de manière à ne pas modifier la conductivité de la membrane,
- il ne doit pas y avoir d'adsorption.

Ces conditions étant remplies, la précision de la méthode dépendra de la possibilité d'obtenir une accumulation importante de la sonde considérée et une connaissance rigoureuse du volume vésiculaire (ceci afin de pouvoir calculer les concentrations à partir de la mesure des quantités accumulées).

## B. RESULTATS.

### 1) Cinétique d'incorporation des molécules lipophiles par les vésicules vacuo-lysosomales.

La Figure 5.1. rend compte d'une expérience qui permet de suivre, en fonction du temps, l'incorporation des molécules testées, le  $\text{SCN}^-$ , le  $\text{TPMP}^+$  et le  $\text{TPP}^+$ , par les vésicules vacuo-lysosomales.

Les cations ( $^3\text{H-TPP}^+$  et  $^{14}\text{C-TPMP}^+$ ) sont accumulés (Figure 5.1, courbes B et E) alors que l'anion ( $^{14}\text{C-SCN}^-$ ) ne l'est pas (Figure 5.1, courbe E). Ceci indique que l'intérieur des vésicules est polarisé négativement par rapport au milieu.

Au bout de 10 mn d'incubation à 25°C, la valeur prise par le rapport  $[A]_{\text{in}} / [A]_{\text{ex}}$  (A représentant l'une des trois molécules testées) est constante. L'équilibre serait donc atteint au bout de ce temps dans les conditions expérimentales employées.

A l'équilibre, les cations sont accumulés de 25 fois (pour le  $\text{TPP}^+$ ) à 32 fois (pour le  $\text{TPMP}^+$ ), ce qui donne un potentiel de Nernst de l'ordre de - 83 à - 89 mV.

En rassemblant les valeurs moyennes de 3 à 4 expériences semblables à celle décrite ci-dessus, on voit que les valeurs de potentiel membranaire ainsi déterminées sont comparables, quelle que soit

la nature de la molécule lipophile utilisée :

- $89 \pm 14$  mV pour le  $\text{SCN}^-$ ,
- $92 \pm 20$  mV pour le  $\text{TPP}^+$ ,
- $92 \pm 13$  mV pour le  $\text{TPMP}^+$ .

La pénétration des sondes lipophiles employées est relativement rapide. En effet, pour le motif correspondant au temps  $t = 0$  mn, une faible incorporation est notée. Elle a lieu pendant la centrifugation qui ne sépare pas instantanément les vésicules du milieu où est introduit le traceur radioactif. D'où la valeur artéfactuelle trouvée pour ce motif, qui est très différente de la valeur théorique.

## *2) Influence du conditionnement des vésicules sur la rétention des molécules lipophiles.*

La similitude des valeurs déduites des distributions des cations et des anions montre qu'il est peu probable que ces résultats soient faussés par des adsorptions potentielles. Néanmoins, pour déterminer de façon plus sûre si ces molécules sont à l'état libre ou liées à quelques sites membranaires potentiels contenus dans ces vésicules, les conditions d'incubation ont été modifiées : les vésicules sont exposées, soit à un choc osmotique (hypotonique par dilution dans l'eau distillée ou hypertonique par addition de sorbitol), soit à un choc thermique (par augmentation ou par diminution de la température d'incubation).

### a) le choc osmotique

Les vésicules vacuo-lysosomales sont diluées dans de l'eau distillée après une phase d'incubation de 20 mn dans une solution contenant du  $\text{TPMP}^+$ , du  $\text{TPP}^+$  ou du  $\text{SCN}^-$ . Pour les deux premières molécules, la cinétique d'accumulation a été suivie (Figure 5.2., courbes A et C). Pour la dernière, elle n'a pas été observée.

Le choc osmotique hypotonique entraîne probablement l'éclatement d'une partie de la population vésiculaire. Il altère considérablement la quantité de  $\text{TPMP}^+$  et de  $\text{TPP}^+$  liée aux vésicules (Figure 5.2, courbes A et C). Environ 70 % des cations lipophiles accumulés

sont perdus par les vésicules alors que le volume vésiculaire diminue de 57 % (Tableau 5.1.). Cependant, le calcul des concentrations interne et externe après éclatement montre que le terme  $\log[A]_{in}/[A]_{ex}$  (c'est-à-dire la grandeur dont est tiré le potentiel membranaire) ne varie que de 0,2 à 1,5 %.

L'addition de sorbitol dans le milieu d'incubation diminue le volume vésiculaire par choc hypertonique (Figure 5.3, courbe A). La quantité de  $TPMP^+$  ou de  $SCN^-$  incorporée par les vésicules diminue à mesure que la concentration en sorbitol croît (Figure 5.3., courbes B et D). Il existe une relation entre la variation de la quantité de  $TPMP^+$  ou de  $SCN^-$  accumulée et celle du volume vésiculaire. Le rapport d'accumulation, d'où est tiré le calcul du potentiel membranaire (Figure 5.3., courbes C et E), est constant. On en conclut qu'une fraction importante des molécules lipophiles, sinon la totalité, existe sous forme libre dans ces vésicules.

### β) le choc thermique

Le fait d'augmenter la température du milieu d'incubation de 25°C à 100°C se traduit par une diminution considérable du volume vésiculaire (plus de 80 %) pendant la phase de traitement (Tableau 5.1.). Les quantités de  $TPMP^+$ , de  $TPP^+$  et de  $SCN^-$ , retenues par les vésicules, subissent la même évolution (Figure 5.2., courbes A, C et E ; Tableau 5.1). La diminution observée est de l'ordre de 90 %. Il existe donc un parallélisme strict entre la diminution du volume vésiculaire et la quantité de molécules lipophiles accumulées. Par ailleurs, tout au long de l'incubation, le facteur d'accumulation, d'où est tiré le potentiel membranaire (Figure 5.2., courbes B, D et F), est constant. Là encore, nous sommes amenés à conclure que les molécules utilisées comme marqueurs ne sont pas adsorbées sur quelques sites de fixation présents sur la membrane vésiculaire.

L'abaissement de température du milieu d'incubation de 25°C à 0°C a, pour conséquence, une variation non significative du volume vésiculaire de l'ordre de 9 % (Tableau 5.1). La Figure 5.2 (courbes A et C) montre une diminution importante de l'accumulation du  $TPMP^+$  et du  $TPP^+$  par les vésicules. Elle se chiffre respectivement à 64 et 77 % (Tableau 5.1). Corrélativement, la tendance inverse est observée pour le  $SCN^-$ . Il existe une rétention relative plus grande de cette



molécule par les vésicules. Ainsi, au cours de l'incubation, lors de ce traitement, le calcul du potentiel membranaire suggère l'existence d'une dépolarisation se développant à froid (Figure 5.2, courbes B, D et F).

Ces résultats sont à rapprocher de ceux décrits par R. GOLDMAN (1976) et par R. GOLDMAN et H. ROTTENBERG (1973). La conductivité de la membrane lysosomale est modifiée à 0°C. Elle ne conserve pas ses caractéristiques de barrière imperméable aux protons et à différents ions, le potassium en particulier. D'où les difficultés que nous avons eues lorsque nous voulions conserver l'intégrité des vésicules à 0°C : dans quelques cas, le gradient transmembranaire de pH n'était pas maintenu pendant l'incubation.

Nous n'avons pas eu la possibilité d'effectuer un nombre suffisant de répétitions pour donner des résultats sous une forme statistique. Mais, nous pensons qu'il sont suffisamment clairs pour nous permettre de conclure à la validité de la méthode.

### *3) Influence des cations diffusibles sur la rétention des molécules lipophiles par les vésicules.*

Si l'incorporation des sondes lipophiles est le fait du seul potentiel membranaire existant au niveau des vésicules, toute condition expérimentale connue pour dépolariser les membranes biologiques doit modifier l'amplitude de l'accumulation autant du  $\text{TPP}^+$  que du  $\text{TPMP}^+$ , comme le suggèrent E. KOMOR et W. TANNER (1976).

Jusqu'à présent, seules des molécules imperméantes étaient utilisées et le rapport  $[A]_{in}/[A]_{ex}$  demeurait constant.

#### a) l'influence du potassium

L'existence d'un potentiel de diffusion lié au potassium a été mise en évidence sur des lutoïdes conservés dans la glace fondante pendant 36 à 48 h. (B. MARIN, 1979 et 1980 ; B. MARIN et al., 1981). On peut donc prévoir que l'augmentation en potassium du milieu extérieur entraînera une dépolarisation de la membrane vésiculaire.

Du KCl est ajouté à une suspension de vésicules ayant préalablement accumulé l'une des sondes lipophiles radioactives. On observe alors que la radioactivité liée aux vésicules évolue de façon dif-

férente selon la nature de la molécule utilisée (Figure 5.4, courbes A et C).

La comparaison des courbes A et C (Figure 5.4) et le calcul du potentiel membranaire à partir du rapport d'accumulation montrent qu'il y a bien une dépolarisation d'autant plus marquée que la dose externe de KCl est plus élevée (Figure 5.4, courbes B et D). Lorsque la concentration en KCl du milieu d'incubation est multipliée par 10, la dépolarisation est comprise entre 34 et 54 mV. Dans des conditions identiques, E. KOMOR et W. TANNER (1976) obtiennent une dépolarisation de 60 mV chez *Chlorella vulgaris*.

### 8) l'influence des protons

Le fait d'incuber les vésicules, préparées dans les conditions habituelles (la vésiculation s'effectuant à pH 6,0), dans des milieux de pH différents, affecte la distribution à l'équilibre du TPMP<sup>+</sup> (Figure 5.5, courbe A). Cette perturbation est d'autant plus importante que le pH externe est élevée. Elle n'excède pas 20 % dans la gamme de pH située entre 5,0 et 6,5.

L'hyperpolarisation observée, déduite à partir de cette distribution, est de l'ordre de 10 à 20 mV, lorsque le pH du milieu d'incubation varie de 5,0 à 7,0 (Figure 5.5, courbe B).

Une variation du même ordre de grandeur a été décrite pour des protoplastes préparés à partir de tissus foliaires d'*Avena sativa*, dans la même gamme de pH.

Sa signification est complexe, comme nous en discuterons dans le Chapitre suivant (cf Chapitre VI, paragraphe 2). Mais, il faut remarquer les points suivants dès maintenant. Non seulement, la charge nette des cations lipophiles utilisés est indépendante du pH, dans la gamme de pH utilisé mais l'absence d'effet d'une variation d'un facteur de 100 de la concentration en protons sur l'amplitude du potentiel transmembranaire suggère l'existence d'une perméabilité passive aux protons relativement faible. En conséquence, s'il existe un système électrogène utilisant les protons extérieurs, son fonctionnement est peu sensible au pH extérieur.

4) *Influence du chlorure d'ammonium, de la méthylamine et du  $\text{TPP}^+$  sur la distribution à l'équilibre des molécules lipophiles.*

Le Tableau 5.II rend compte de l'effet spécifique des molécules introduites dans le milieu d'incubation sur l'accumulation du  $\text{TPMP}^+$  par les vésicules.

Ainsi, dans le motif témoin, le rapport d'accumulation ne varie pas pendant toute l'incubation. Le potentiel transmembranaire, qu'il est possible d'en déduire, est de l'ordre de -90mV.

L'addition de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50mM) ou de méthylamine (50 mM) en modifie la valeur : la dépolarisation qui en résulte est de l'ordre de 20 à 30 mV.

Si la molécule ajoutée est le  $\text{TPP}^+$  (30 mM), un effet de chase est observé. La dépolarisation calculée à partir du rapport d'accumulation est de l'ordre de 85 à 90 mV.

Les variations de potentiel transmembranaire induites par l'addition de chacune de ces trois molécules sont en accord avec leur mode d'action : le chlorure d'ammonium et la méthylamine dissipent le gradient de pH alors que le  $\text{TPP}^+$  dépolarise la membrane (H. ROTTENBERG, 1979).

5) *Influence des ionophores sur l'accumulation du  $\text{TPMP}^+$  par les vésicules.*

Ainsi que le montre le Tableau 6.III, on doit remarquer qu'il existe une lente dépolarisation de la membrane vésiculaire (de l'ordre de 25 mV). On n'en connaît pas l'origine.

L'addition de nigéricine ( $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) n'altère pas la distribution à l'équilibre du  $\text{TPMP}^+$ , même en présence de KCl (30 mM). La dépolarisation observée est du même ordre de grandeur que celle du motif témoin. Par contre, le gradient de pH est modifié dans le sens d'une alcalinisation du milieu intravésiculaire. La présence de KCl dans le milieu amplifie cette tendance. C'est en accord avec la fonction attribuée à cet ionophore : il agit comme un antiport  $\text{H}^+/\text{K}^+$  (R. ASHTON et L.K. STEINRAUF, 1970). En conséquence, il n'aura aucun

effet sur la distribution transmembranaire du  $\text{TPMP}^+$ . C'est effectivement ce que nous observons.

La valinomycine ( $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) n'assure une dépolarisation importante de la membrane vésiculaire qu'en présence de KCl (30mM). Elle est alors de l'ordre de 95 mV. Cet ionophore électrogène est sans effet sur le gradient transmembranaire de pH, en accord avec son mode d'action.

L'addition de FCCP (1 mM) dans le milieu d'incubation modifie le potentiel transmembranaire. La dépolarisation qui s'en suit s'élève à 93 mV. Elle s'accompagne d'une dissipation du gradient de pH de l'ordre de 0,9 unités. Nous en discuterons plus loin l'origine.

Tous ces résultats indiquent que, dès qu'un équilibre ionique entre les deux compartiments séparés par la membrane vacuolysosomale est modifié par addition, soit d'ions perméants ( $\text{K}^+$ ,  $\text{TPP}^+$ , ...), soit d'ionophores spécifiques rééquilibrant les gradients transmembranaires préexistants, l'amplitude de l'accumulation du  $\text{TPMP}^+$  se trouve altérée en réponse à cette nouvelle situation.



### C. CONCLUSIONS.

Depuis les travaux de E.A. LIBERMAN et V.P. TOPALI (1969) et ceux de L.L. GRINIUS et al (1970), l'emploi des molécules lipophiles pour mesurer le potentiel membranaire au niveau de compartiments cellulaires ou subcellulaires de taille réduite s'est généralisé.

Dans notre cas, peu d'éléments de comparaison existent. Les mesures électrophysiologiques du potentiel transmembranaire de diffusion sont généralement faites sur des systèmes biologiques entiers (tissus, cellules agglomérées voire protoplastes de cellules végétales,...). Ainsi que l'indique une revue bibliographique récente (U. LUTTGE et N. HIGINBOTHAM, 1979), les valeurs décrites sont contradictoires : elles varient de -150 à +88 mV.

Cependant, malgré cette absence de référence pour le matériel étudié, tous les résultats obtenus avec les vésicules suggèrent que les molécules lipophiles utilisées s'équilibrent sans contrainte au travers de cette membrane vacuo-lysosomale en réponse au potentiel transmembranaire développé à son niveau. Le TPMP<sup>+</sup> et le TPP<sup>+</sup> s'accumulent de la même façon et avec la même ampleur, permettant de calculer un potentiel transmembranaire de l'ordre de - 110 mV. Le SCN<sup>-</sup> donne une valeur plus faible, traduisant probablement les difficultés des mesures dans le cas où le rapport d'accumulation est inférieur à l'unité.



## II - LA MESURE DU GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE PH.

De toutes les méthodes possibles, la technique de distribution ionique transmembranaire s'avère la plus utilisée (cf H. ROTTENBERG, 1979). Elle se base sur la distribution d'acides ou de bases faibles parfaitement perméantes au travers de la membrane vésiculaire en réponse au gradient transmembranaire de pH.

Le choix de la molécule indicatrice est fonction de la valeur du pH interne du compartiment étudié : pour un compartiment acide, la méthylamine ou, de façon plus générale, une amine présentant des propriétés physiques particulières (fluorescence, modification de spin, radioactivité,...) ; pour un compartiment basique, la 5,5-diméthyl-Oxazol-idine-2,4-dione (D.M.O.) ou un acide faible, comme l'acide acétique.

C'est la méthode que nous avons choisie pour mesurer le gradient transmembranaire de pH développé au niveau de la membrane vésiculaire.

Toutefois, là encore, il convient d'en vérifier sa validité, suite aux travaux de F.A. SMITH et de ses élèves sur les Characées. Selon ces auteurs, il existerait un transporteur uniport des formes ionisées du D.M.O. et de la méthylamine non seulement au niveau du plasmalemma mais aussi du tonoplaste (N.A. WALKER et F.A. SMITH, 1975 ; F.A. SMITH et N.A. WALKER, 1976 ; J.A. RAVEN et F.A. SMITH, 1978 ; M.I. DE MICHELIS et al., 1979).



# A. PRINCIPE DE LA METHODE.

Elle consiste à mesurer la distribution à l'équilibre de molécules lipophiles acide ou basique. Seules, les formes neutres de ces molécules sont perméantes. Par conséquent, elles se trouvent à concentration égale dans les deux compartiments interne et externe à l'équilibre. Du fait de l'existence d'un gradient transmembranaire de pH, les formes ionisées existent à des concentrations différentes dans ces deux compartiments. La mesure des concentrations totales (de la forme neutre et de la forme ionisée) interne et externe permet de calculer le pH interne comme il est expliqué ci-dessous.

Ainsi, par exemple, dans le cas d'un acide faible, AH, dissociable en A<sup>-</sup> et H<sup>+</sup>, en attribuant l'indice "ex" au milieu et "in" à l'intérieur des vésicules, on peut écrire :

$$pH_{ex} = pK + \log \frac{(A_{ex})}{(AH_{ex})} \quad (5.5)$$

$$pH_{in} = pK + \log \frac{(A_{in})}{(AH_{in})} \quad (5.6)$$

$$(AH_{ex}) = (AH_{in}) \quad (5.7)$$

Or on connaît :

$$C_{ex} = (A_{ex} + AH_{ex}) \quad (5.8)$$

$$C_{in} = (A_{in} + AH_{in}) \quad (5.9)$$

Des relations (5.5), (5.6) et (5.7), on obtient :

$$pH_{in} = pK + \log \left[ \frac{C_{in}}{C_{ex}} (10^{pH_{ex} - pK} - 1) - 1 \right] \quad (5.10)$$

Dans le cas d'une base faible, la relation (5.10) s'écrit :

$$pH_{in} = pK + \log \left[ \frac{C_{in}}{C_{ex}} (10^{pK - pH_{ex}} - 1) + 1 \right] \quad (5.11)$$

Le détail des calculs est donné par ailleurs (B. MARIN, 1978) à partir des développements formulés par S. ADDANKI et J.F. SOTOS

(1969).

La relation entre le pH interne et la distribution de l'indicateur au travers de la membrane vésiculaire peut être calculée dans la mesure où plusieurs conditions sont remplies (W.J. WADDELL et R.G. BATES, 1969 ; A. ROOS, 1965 ; W.J. WADDELL et T.C. BUTLER, 1959 ; H. ROTTENBERG et al., 1972) :

- la constante de dissociation de la molécule indicatrice doit être la même de part et d'autre de la membrane vésiculaire,

$$pK_{in} = pK_{ex} = pK \quad (5.12)$$

- la membrane ne doit être perméable qu'à la forme neutre de la molécule utilisée,
- l'équilibre doit être rapidement atteint,
- la molécule indicatrice ne doit pas être l'objet d'un processus de transport actif,
- la molécule employée ne doit pas être métabolisée, la quantité d'indicateur introduite dans le milieu devant rester constante durant toute l'incubation.

Dans ces conditions, l'équilibre sera atteint dès que les concentrations des formes neutres extra et intravésiculaires sont égales.

## B. RESULTATS.

- 1) *Estimation du pH intravésiculaire à partir de la distribution transmembranaire à l'équilibre de la méthylamine ou du D.M.O.*

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées dans les conditions habituelles, la vésiculation se faisant à pH 6,0, dans un milieu de Tager. Elles sont incubées 10 mn à 25°C, dans un milieu de même composition dont le pH est ajusté à pH 7,5 (par addition de Tris-base), en présence, soit de  $^{14}\text{C}$ -D.M.O., soit de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine. Le pH intravésiculaire est calculé à partir de la distribution transmembranaire du traceur radioactif.

Le Tableau 5.4 rend compte des résultats obtenus. Pour la méthylamine, le facteur d'accumulation, évalué à 19,2, permet d'estimer le pH interne à une valeur de 6,24, en utilisant l'équation (5.11).

Quant au D.M.O., sa distribution transmembranaire donne une valeur de 6,13, à partir de l'équation (5.10). Elle est sensiblement différente de celle obtenue avec la méthylamine. Cette différence est la conséquence de la moindre accumulation de cette molécule dans les vésicules.

## *2) Cinétique d'incorporation de la méthylamine et du D.M.O. par les vésicules.*

La Figure 5.6 montre que, quelle que soit la molécule utilisée, l'équilibre est obtenu au bout de 6 mn d'incubation. Le rapport d'accumulation peut dès lors être considéré comme constant.

En conséquence, il semble suffisant de fixer à 10 mn le temps de mise en contact avec le traceur radioactif, avant d'effectuer la moindre perturbation (modifiant l'amplitude du gradient transmembranaire de pH).

## *3) Influence du conditionnement des vésicules sur la rétention des molécules lipophiles.*

L'adsorption potentielle, pouvant fausser les résultats obtenus, est abordée de la même façon que pour tester la validité de l'emploi des sondes lipophiles pour mesurer le potentiel membranaire (cf. le paragraphe précédent). Les conditions expérimentales sont identiques.

### *α) le choc osmotique*

Dans chacun des cas, la cinétique d'incorporation a été suivie pendant 20 mn dans une solution contenant, soit de la méthylamine (Figure 5.7, courbe A), soit du D.M.O. (Figure 5.7, courbe C).

Le choc hypotonique, obtenu par dilution dans l'eau distillée, entraîne une diminution du volume vésiculaire de l'ordre de 57 %. Les quantités accumulées de méthylamine et de D.M.O. décroissent du même ordre de grandeur : respectivement 58 et 68 % (Tableau 5.5).

L'amplitude des différentes variations est comparable. Par conséquent, on peut en conclure que les deux molécules de nature opposée (l'une étant une base faible ; l'autre, un acide faible) ne sont pas adsorbées par quelques sites membranaires potentiels aspécifiques. Les rapports d'accumulation correspondent à des gradients de pH de l'ordre de 1,20 pour la méthylamine et de 0,88 pour le D.M.O. On remarque qu'après traitement, la variation obtenue est de l'ordre de 2 à 11 % (Tableau 5.5).

L'addition de sorbitol dans le milieu d'incubation diminue le volume vésiculaire par choc hypertonique, comme nous l'avons déjà indiqué par ailleurs (cf. le paragraphe précédent) (Figure 5.8, courbe A). La quantité de méthylamine accumulée par les vésicules diminue à mesure que la concentration en sorbitol croît (Figure 5.8, courbe B). Certes, une forte variabilité liée au matériel existe. Toutefois, on peut conclure qu'il existe une relation entre la quantité de méthylamine incorporée par les vésicules et la variation du volume vésiculaire, induit par l'addition de sorbitol dans le milieu d'incubation. La courbe C (Figure 5.8) souligne la constance de la valeur du gradient de pH calculée à partir du rapport d'accumulation. En conséquence, la quasi-totalité des molécules de méthylamine doivent être présentes dans le compartiment vésiculaire à l'état libre.

### 8) le choc thermique

Comme nous l'avons noté précédemment, le fait d'augmenter la température du milieu d'incubation de 25°C à 100°C entraîne une diminution importante du volume vésiculaire estimée à 82 % (cf Tableau 5.I). Les quantités de méthylamine et de D.M.O., accumulées par les vésicules, évoluent de la même façon (Figures 5.7, courbes A et C). La diminution observée est de l'ordre de 90 % (Tableau 5.V). Toutefois, dès que l'équilibre est atteint, la valeur prise par le rapport d'accumulation, autant pour la méthylamine que pour le D.M.O., reste globalement constante. En conséquence, le gradient de pH qu'il est possible de calculer à partir de cette grandeur, l'est aussi (Figure 5.7, courbes B et D).

L'abaissement de température du milieu d'incubation de 25°C à 5°C n'implique pas une variation significative du volume vési-

culaire. Elle est de l'ordre de 9 %, comme nous l'avions indiqué (cf Tableau 5.I). La Figure 5.7 (courbes A et C) montre un efflux relativement faible de la méthylamine (de l'ordre de 40 %) associé à une rétention accrue de D.M.O. (de l'ordre de 122 %). Le calcul du gradient de pH à partir de ces données expérimentales suggère un mouvement de protons, que concrétise l'évolution symétrique des mouvements transmembranaires de méthylamine et de D.M.O. (Figure 5.7, courbes B et D). Ainsi, au cours de ce traitement, il existe une alcalinisation du milieu intravésiculaire associée à une dépolarisation de la membrane. Nous en avons fait mention plus haut.

De toutes les manipulations, on peut conclure que l'adsorption est un phénomène mineur. Son importance est faible si elle existe. Elle ne contribue pas de façon conséquente à modifier la valeur du rapport d'accumulation, à partir de laquelle le gradient de pH est calculé.

#### *4) Influence du pH du milieu d'incubation sur le pH interne des vésicules.*

Les vésicules sont incubées 10 mn à 25°C dans un milieu de Tager dont le pH est ajusté à la valeur désirée par addition, soit de Tris-base, soit d'un mélange équimoléculaire de M.E.S. et d'H.E.P.E.S. Le pH interne est calculé à partir de la distribution à l'équilibre de la méthylamine ou du D.M.O.

La Figure 5.9 montre que les résultats sont différents particulièrement pour les pH les plus acides, selon la nature de la molécule indicatrice utilisée (courbes B et D). Ces divergences sont le reflet des limites imposées par la méthode (H. ROTTENBERG, 1979). L'estimation du pH interne d'un compartiment vésiculaire sera d'autant meilleure que la valeur du pK de l'indicateur sera différente de celle du pH du milieu à mesurer.

Le pH interne des vésicules, mesuré par cette méthode, se trouve influencé par le pH du milieu d'incubation. Un accroissement du pH externe induit une augmentation relativement plus faible du pH intravésiculaire. Dans chaque cas, la valeur prise par le pH interne est plus faible que celle du milieu d'incubation. Par ailleurs, le gradient de pH est plus faible à pH 5,0 (de l'ordre de 0,20 unités de pH) qu'à pH 7,5 (de l'ordre de 1,28 unités de pH).

On devrait en conclure que la membrane vésiculaire est relativement perméable aux protons. Dans ce cas, du fait de l'existence d'un pouvoir tampon interne, il faut supposer un mouvement de protons suffisant en 30 mn pour rendre compte de ce gradient de pH et de sa variation. Cette exigence, correspondant à un flux net de protons élevé, n'est pas a priori compatible avec un potentiel transmembranaire indépendant de la concentration du milieu en protons (cf le paragraphe précédent de ce Chapitre). Une telle hypothèse suppose alors que les sondes employées ne répondent pas de la même façon en fonction du pH externe. En conséquence, vraisemblablement, leurs formes ionisées seraient perméantes.

*5) Influence de fortes concentrations en sels sur le pH intravésiculaire.*

Si la méthylamine constitue une bonne molécule indicatrice pour mesure le gradient de pH vésiculaire, toute addition de molécules connues pour l'altérer dans des systèmes membranaires équivalents doit modifier l'amplitude de son accumulation (cf D.J. REIJNGOUD et J.M. TAGER, 1973, 1975 et 1977 ; D.J. REIJNGOUD, 1978 ; M. HOLLEMANS et al, 1979, par exemple.)

α) Influence de l'addition de chlorure de potassium

La Figure 5.10 montre que la distribution de la méthylamine entre les espaces intra- et extravésiculaires n'est pas modifiée par l'addition de chlorure de potassium dans une gamme de concentration allant de 0 à 150 mM.

En conséquence, le gradient de pH (calculé à partir de cette distribution) est constant, malgré la grande variabilité existante liée à l'échantillonnage (Figure 5.10, courbe B).

β) Influence de l'addition de chlorure d'ammonium et de la méthylamine.

Le Tableau 5.VI confirme l'action du chlorure d'ammonium (50 mM) et de la méthylamine (50 mM) sur le gradient transmembranaire de pH (cf le paragraphe précédent et le Tableau 5.II). Elle est prati-

quement immédiate : dès l'addition, la dissipation du gradient de pH est de l'ordre de 50 % pour le chlorure d'ammonium et de 35 % pour la méthylamine. Elle n'est pas significativement plus grande au bout de 30 mn d'incubation.

L'effet du  $\text{TPP}^+$  (30 mM) est difficile à comprendre. Le gradient de pH est dissipé en partie dès son addition dans le milieu d'incubation (58 % du gradient initial). E. KOMOR suggère une inhibition partielle des systèmes actifs intervenant dans la constitution du gradient transmembranaire de protons. A une concentration aussi élevée, il altère les propriétés des systèmes associés aux membranes biologiques.

*6) Influence des ionophores sur le gradient transmembranaire de pH estimé à partir de la distribution à l'équilibre de la méthylamine.*

Le Tableau 5.III rend compte des résultats obtenus. On s'attachera à considérer l'effet des ionophores et des découplants sur la distribution de la méthylamine à l'équilibre et, par conséquent, sur le gradient de pH, qu'il est possible de calculer.

La nigéricine ( $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) ne produit une alcalinisation du milieu interne que dans la mesure où le milieu contient du chlorure de potassium (30mM). Elle est de l'ordre de 0,73 unités de pH. C'est en accord avec sa fonction antiport  $\text{K}^+/\text{H}^+$ .

Par contre, la valinomycine ( $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ), même en présence de chlorure de potassium (30 mM), ne modifie pas significativement le gradient transmembranaire de pH. Sa fonction est de transporter électrogéniquement le potassium.

Le FCCP (1 mM), considéré comme un protonophore mais aussi comme un inhibiteur de l'activité ATPase lutoïdique (J. D'AUZAC, 1975 et 1977), dissipe presque entièrement le gradient de pH. La dissipation du gradient de pH préexistant est de l'ordre de 70 %. Associé à la valinomycine et au chlorure de potassium, elle est du même ordre de grandeur.

Il apparaît donc que la répartition transmembranaire de la méthylamine traduit fidèlement les effets que l'on peut attendre des effecteurs classiques du gradient de pH (H. ROTTENBERG, 1979).

### C. CONCLUSIONS.

L'utilisation de la méthylamine, comme molécule indicatrice pour mesurer le gradient de pH, a été, ces derniers temps, très critiquée bien qu'elle soit considérée comme une méthode de choix. Tout semble fonction du matériel biologique choisi.

Les résultats décrits ci-dessus amène à la conclusion que la distribution à l'équilibre de la méthylamine dans les deux compartiments que définit la membrane vésiculaire constitue une méthode satisfaisante pour mesurer le gradient transmembranaire de pH.

Peu de comparaisons sont possibles avec les résultats décrits dans la littérature. Les valeurs que l'on peut recueillir résultent de méthodes d'analyse fort indirectes effectuées sur des systèmes tissulaires végétaux entiers. La valeur du pH vacuolaire oscille entre 4,7 et 5,8, selon le matériel biologique et son conditionnement : 4,9 à 5,0 chez *Chara corallina* (J.A. RAVEN et F.A. SMITH, 1978) ; 5,5 à 5,7 chez *Hydrodictyon africanum* (M.I. DE MICHELIS et al., 1979) ; 5,7 à 5,8 dans les gamétophytes de *Phaeceros laevis* (R.F. DAVIS, 1974).

L'application de cette méthode aux lutoïdes isolés du latex d'*Hevea brasiliensis* donne des résultats en accord avec ceux obtenus par d'autres approches expérimentales (mesure du pH du milieu intralutoïdique après rupture de la membrane limitante et son élimination par centrifugation). On peut retenir que, pour un pH externe de 7,5, le pH intra-lutoïdique peut être estimé de 5,5 à 5,8 (C. LAMBERT, 1975 ; P. HANOWER et al., 1977 ; J. D'AUZAC et al., 1976 ; M. COUPE et C. LAMBERT, 1978 ; P. HANOWER et al., 1979 ; J. BRZOWSKA-HANOWER, H. CRETIN, P. HANOWER et P. MICHEL, 1980).





### III - DIFFERENTES ESTIMATIONS DE LA FORCE MOTRICE PROTONIQUE DEVELOPPEE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE VESICULAIRE.

Dans le cadre de l'hypothèse de P. MITCHELL, la circulation des protons au niveau de la membrane sert comme force d'entraînement pour tout travail chimique, mécanique ou osmotique. Les mécanismes moléculaires qu'elle implique sont complexes.

La quantité de travail qu'une telle circulation peut développer dépendra du flux de protons (lui-même déterminé par l'activité métabolique et par la stoechiométrie moléculaire du transport) et du potentiel électrochimique de ces ions au travers de la membrane.

La force motrice protonique ( $\Delta p$ ), analogue à la force électromotrice d'une batterie, correspond à la quantité de travail fourni par un proton traversant la membrane. Elle est calculée à partir de la relation (5.1):

$$\Delta p = \tilde{\mu}_H^+ = \Delta \Psi - 2,303 \frac{RT}{F} \cdot \Delta pH$$

$$\Delta p \approx \Delta \Psi - 60 \cdot \Delta pH.$$

à la température ambiante (30°C)

Le Tableau 5.VII montre que, pour des vésicules formées à pH 6,0 et incubées à pH 7,5, le  $\Delta pH$  est de l'ordre de 1,4 unités et le  $\Delta \Psi$ , estimé à -120mV. En conséquence, la force motrice s'élève à -37 mV. Elle n'est pas très différente de celle calculée pour les lutoïdes frais [-17,5 mV selon H. CRETIN (communication personnelle)]

ou conservés dans la glace de 36 à 48 h [-48 à - 60 mV (B. MARIN et al., 1981)]

Au bout de 30mn d'incubation à 25°C, le gradient transmembranaire de pH n'est pas modifié. Par contre, une faible dépolarisation est observée (17 mV). En conséquence, la force motrice protonique sera modifiée de la même valeur.

Le Tableau 5.VII récapitule les données expérimentales obtenues lorsqu'une des deux composantes de la force motrice protonique est modifiée. On en conclut que les vésicules se comportent globalement comme un modèle idéal pour étudier les relations entre la variation de la force motrice protonique et l'amplitude de l'incorporation du citrate.

Il faut remarquer que les valeurs décrites dans ce Tableau 5.VII sont très différentes de celles calculées chez les micro-organismes, par exemple [cf. Tableau I dans F.M. HAROLD (1977)]. L'ordre de grandeur est de - 200 mV.

CHAPITRE VI

L'EXISTENCE D'UNE

POMPE-A-PROTONS

AU NIVEAU DE

LA MEMBRANE VACUOLAIRE



L'addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup> dans le milieu d'incubation où baignent les lutoïdes fraîchement isolés du latex d'*Hevea brasiliensis* entraîne une acidification de leur milieu interne (C. LAMBERT, 1975 ; J. D'AUZAC et al., 1976 ; P. HANOWER et al., 1977). Ainsi, au bout de 30 mn d'incubation à 30°C, à pH 7,0, le pH interne des lutoïdes évolue de 6,18 à 5,81 (C. LAMBERT, 1975). Les résultats obtenus par P. HANOWER et al (1977) sont comparables bien que le milieu d'incubation soit différent.

L'existence d'un gradient transmembranaire de pH et son augmentation après addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup> suggèrent fortement l'intervention de l'activité ATPase membranaire dans un processus de transport de protons (C. LAMBERT, 1975 ; P. HANOWER et al., 1977).

Nous avons d'abord cherché à savoir s'il était possible de retrouver cette propriété avec les vésicules qui conservent le gradient transmembranaire de pH (imposé par les conditions expérimentales employées) (cf le Chapitre précédent).



## I - INFLUENCE DE L'ATP SUR LE GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE pH.

### A. MISE EN EVIDENCE D'UN PROCESSUS D'ACIDIFICATION.

Les expériences sont faites dans le milieu de Tager (cf Chapitre V), qui ne contient aucune molécule perméante. Les deux lyophilisats de membranes vacuo-lysosomales, utilisés dans ces manipulations, proviennent de deux récoltes distinctes de latex.

L'un d'eux (dénommé Primot V) forme des vésicules dont le gradient transmembranaire de pH est insensible à l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5 mM) (Figure 6.1, courbe A). Les vésicules, obtenues à partir de l'autre lot (Primot XI) réagissent à l'ATP-Mg<sup>2+</sup> en s'acidifiant nettement (0,335 unités de pH en 30 mn) (Figure 6.1, courbe B). L'addition d'ADP-Mg<sup>2+</sup> (5 mM) ou de SO<sub>4</sub>Mg (5 mM) n'entraîne pas une modification sensible du pH interne (Figure 6.1, courbe B).

Ce processus d'acidification se retrouve dans les différents autres lyophilisats manipulés, avec une amplitude variable.

La Figure 6.2 montre la cinétique d'accumulation de la méthylamine en réponse à la variation du gradient de pH induite par l'ATP. Ce type de mesure permet de détecter commodément l'effet du nucléotide sur le gradient de pH bien qu'il ne soit pas possible de calculer le gradient de pH lui-même. La facilité de sa mise en oeuvre nous a conduit à l'utiliser fréquemment par la suite.



*B. INFLUENCE DES INHIBITEURS DE L'ATPASE VESICULAIRE SUR L'ACIDIFICATION INDUITE PAR L'ATP.*

L'acidification du milieu interne des vésicules, induite par l'addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup> dans le milieu d'incubation, s'explique si l'on admet que l'ATPase, mise en évidence par J. D'AUZAC (1975 et 1977), fonctionne comme une pompe à protons (C. LAMBERT, 1975 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977 ; J. D'AUZAC et al., 1977 ; B. MARIN, 1979 ; B. MARIN et al., 1979). C'est une hypothèse souvent formulée (D.J. REIJNGOUD, 1978 ; D.J. REIJNGOUD et J.M. TAGER, 1977 ; D.L. SCHNEIDER et E. CORNELL, 1978 ; D.L. SCHNEIDER, 1979 a et b ; P. DELL'ANTONE, 1979 ; J.L. MEGO et al., 1972 ; M. HOLLEMANS et al., 1980).

Pour vérifier le bien-fondé de cette hypothèse, nous avons employé plusieurs inhibiteurs de l'activité ATPase lutoïdique.

Le carbonyl-cyanide-p-trifluoro-methoxy-phenyl-hydrazone (FCCP) inhibe à 50 % l'activité ATPase lutoïdique quand il est employé à la concentration de 1 mM (J. D'AUZAC, 1977). Les Figures 6.2. et 6.4 montrent qu'il supprime partiellement l'acidification induite par l'ATP-Mg<sup>2+</sup>. Dans la Figure 6.3, la diminution observée peut être estimée à 50 %. On peut donc en conclure que le transport des protons, induit par l'ATP, est inhibé dans les mêmes proportions que l'activité ATPase.

Dans certains cas, l'addition de FCCP dans le milieu d'incubation se traduit par une alcalinisation immédiate du milieu intravésiculaire (Figure 6.4). Pour un pH externe de 7,5, le pH interne passe de 6,73 à 7,00 en moins de trois mn. C'est le temps mis par la centrifugeuse pour séparer les vésicules du surnageant. Par la suite, il demeure constant.

Le 5-chloro-3-tert-butyl-2'-chloro-4-nitro-salicylanilide (S-13) est connu pour découpler les phosphorylations oxydatives et pour agir comme un protonophore (W.G. HANSTEIN, 1976 ; E.C. SLATER, 1966 ; L. TOLL et al., 1977 ; L. TOLL et B.D. HOWARD, 1978). Son action est comparable à celle du FCCP sur les vésicules (Figure 6.3).

Par conséquent, on peut retenir l'hypothèse selon laquelle l'addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup> dans le milieu d'incubation se traduit par une acidification du milieu intra-vésiculaire, liée au fonctionnement de l'ATPase membranaire.

*C. EFFET DU pH DU MILIEU D'INCUBATION SUR LE PROCESSUS D'ACIDIFICATION  
INDUIT PAR L'ATP.*

L'acidification du milieu interne des vésicules présente la même dépendance vis-à-vis du pH externe (Figures 6.5, courbes A et B, et 6.6, courbe A) que l'activité ATPase mesurée sur les lutoïdes conservés dans la glace 36 à 48 h (Figure 6.6, courbe B).

Les vésicules voient leur pH interne se modifier en fonction du pH externe (Figure 6.5, courbes A et B ; cf Figure 5.9, courbes B et D).

Mais, on remarque aussi que la présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup> dans le milieu d'incubation modifie cette dépendance. Il y a aussi une acidification accrue du milieu intra-vésiculaire vers pH 7,0 (Figures 6.5, courbes A et B). La Figure 6.6 (courbe A) montre que le maximum de l'acidification est atteint pour une valeur de pH externe située entre 6,9 et 7,2, ce qui confirme que ce processus serait la conséquence du fonctionnement de l'ATPase lutoïdique, la dépendance vis-à-vis du pH étant identique (Figure 6.6, courbe B).



## II - INFLUENCE DE L'ATP SUR LA DIFFERENCE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE.

L'ATPase membranaire, située au niveau du plasmalemma de *Neurospora crassa*, développe un potentiel membranaire à partir de l'hydrolyse de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (G.A. SCARBOROUGH, 1976 et 1980 ; C.L. SLAYMAN et al, 1973 ; C.L. SLAYMAN et D. GRADMANN, 1975 ; B.J. BOWMAN et al, 1978 ; C.L. SLAYMAN et C.W. SLAYMAN, 1974 et 1975). En conséquence, on lui associe une fonction de pompe électrogène..

Nous avons cherché à savoir quelle pouvait être l'influence de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> sur le potentiel membranaire des vésicules vacuolysosomales.

### A. MISE EN EVIDENCE D'UNE DEPOLARISATION ASSOCIEE A L'HYDROLYSE DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup>

La Figure 6.7 compare l'effet de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> sur l'évolution du potentiel membranaire des vésicules préparées à partir des lyophilisats Primot V et Primot XI (cf le paragraphe I de ce Chapitre).

Pour les vésicules formées avec le lyophilisat Primot XI, où une acidification du milieu interne, induite par l'ATP-Mg<sup>2+</sup>, est observée, le mouvement de protons s'accompagne d'une dépolarisation de 56 mV en 30 mn (Figure 6.7, courbe B, et Tableau 6.I). L'absence d'effet de l'ADP-Mg<sup>2+</sup> (5mM) ou de SO<sub>4</sub>Mg (5mM) confirme la spécificité du nucléotide (Tableau 6.I).

Dans les mêmes conditions expérimentales, pour les vésicules provenant du lyophilisat Primot V, la dépolarisation observée est de l'ordre de 70 mV en 30 mn (Figure 6.7, courbe A). Elle ne se trouve pas amplifiée par l'addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup>. Or, ces vésicules sont caractérisées par un milieu interne ne s'acidifiant pas en sa présence.

En conséquence, le flux de protons s'accompagne d'une dépolarisation qui lui est spécifique, lorsque l'activité ATPase est fonctionnelle. Il semble que le transport de protons soit électrogène.

La Figure 6.8 montre la cinétique d'accumulation du TPP<sup>+</sup> en réponse à la variation du potentiel membranaire induite par l'ATP-Mg<sup>2+</sup>. La dépolarisation observée se caractérise par un efflux de TPP<sup>+</sup>. Ce type de mesure permet de détecter commodément l'effet du nucléotide sur le potentiel membranaire bien qu'il ne puisse pas être calculé.

#### *B. INFLUENCE DES INHIBITEURS DE L'ATPASE VESICULAIRE SUR L'AMPLITUDE DE LA DEPOLARISATION INDUITE PAR L'ATP-Mg<sup>2+</sup>.*

La Figure 6.9 décrit l'effet de deux inhibiteurs de l'activité ATPase lutoïdique, le FCCP et le S-13, sur l'incorporation du TPP<sup>+</sup> par les vésicules vacuo-lysosomales (ce qui donne une mesure de la polarisation de la membrane vésiculaire).

L'addition de FCCP (1 mM) ou de S-13 (10 µg x ml<sup>-1</sup>) supprime l'effet inhibiteur de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> sur l'accumulation de TPP<sup>+</sup>, c'est-à-dire qu'elle empêche la dépolarisation (dûe à l'activité ATPase) de se développer (Figure 6.9).

#### *C. EFFET DU pH DU MILIEU D'INCUBATION SUR L'AMPLITUDE DE LA DEPOLARISATION INDUITE PAR L'ATP.*

La Figure 6.10 montre que le potentiel transmembranaire est relativement insensible au pH du milieu entre pH 5,0 et pH 7,0. L'addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup> modifie ce comportement. Il intervient sur la valeur initiale du potentiel membranaire : de l'ordre de - 140 mV en son absence et de - 100 à - 70 mV en sa présence.

La Figure 6.11 (courbe A) indique que le maximum de la variation de différence de potentiel membranaire est observée pour une valeur de pH externe située vers 7,0, ce qui renforce l'idée que cette

dépolarisation est le fait du flux de protons entretenu par l'ATPase vésiculaire, la dépendance vis-à-vis du pH étant identique (Figure 6.6, courbe B).

En conséquence, lorsque le nucléotide est absent, la faible perméabilité passive de la membrane vésiculaire aux protons permet la mise en place d'un gradient transmembranaire de pH. Il en résulte une différence de potentiel de diffusion liée au protons. Par contre, lorsque le milieu contient de l'ATP-Mg<sup>2+</sup>, la pompe à protons est fonctionnelle. Son activité ne semble pas contrôlée par la concentration externe en protons, comme le montre la Figure 6.10. Les résultats suggèrent qu'il s'agit davantage d'un contrôle cinétique que d'un contrôle thermodynamique.



### III - CONCLUSION.

L'hydrolyse de l'ATP, catalysée par l'activité ATPase membranaire, s'accompagne d'une acidification du milieu interne des vésicules [confirmant ainsi les résultats de C. LAMBERT (1975) et ceux de P. HANOWER et al. (1977), par exemple] et d'une dépolarisation de la membrane vésiculaire.

La concordance des effets des découpleurs (FCCP, S-13) sur l'activité ATPase, sur le transport des protons et sur le potentiel membranaire renforcent l'hypothèse d'une ATPase pompe électrogène à protons.

L'existence d'une pompe à protons au niveau du tonoplaste a été suggérée par de nombreux auteurs mais elle n'a jamais été caractérisée jusqu'à présent. L'énergisation du transport de certaines molécules ionisées ou non (citrate, malate, saccharose,...) au niveau du tonoplaste la rend nécessaire surtout lorsque l'ATP en est un effecteur (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977 ; J. D'AUZAC et al., 1977 ; B. MARIN et al., 1979 ; B. MARIN, 1979 ; S. DOLL et al., 1979 ; J. WILLENBRINK et al., 1979).

Récemment, I.J. METTLER et R.T. LEONARD (1979) ont isolé les vacuoles des protoplastes de tissus de *Nicotiana glutinosa*. Ils en ont caractérisé quelques propriétés enzymatiques notamment celle d'hydrolyser l'ATP. Si nous devons suivre leurs conclusions, ce nucléotide serait hydrolysé par une activité phosphatase acide résiduelle impor-



tante. C'est effectivement le cas même pour les lutoïdes isolés du latex d'*Hevea brasiliensis* (J. D'AUZAC, 1975) si cette activité n'est pas inhibée par le molybdate d'ammonium, comme le suggère S. PUJARNISCLE (1971). Ceci souligne les difficultés qu'ont la plupart des auteurs travaillant sur le vacuome végétal pour mettre en évidence une activité ATPase sensu stricto (cf. A. ADMON et al., 1980 ; R.A. LEIGH et R.R. WALKER, 1980, par exemple).

Néanmoins, que ce soit sur des lutoïdes frais (H. CRETIN, 1981) ou conservés dans la glace pendant 36 à 48 h (B. MARIN, 1979 et 1980 ; B. MARIN et al., 1981) ou sur des vésicules vacuo-lysosomales (B. MARIN et al., 1980 ; B. MARIN et al., 1981), cette activité ATPase membranaire fonctionne comme une pompe à protons.

La présence d'activité ATPase associée au tonoplaste confère à la vacuole un rôle important dans la régulation des balances ioniques chez les végétaux. Il en est discuté dans des revues récentes fort documentées (E.A.C. Mc ROBBIE, 1975 ; J.A. RAVEN et F.A. SMITH, 1979). Nous n'en ferons donc pas mention.

Par contre, nous évoquerons et nous discuterons d'un problème fondamental : le maintien d'un gradient transmembranaire de pH au niveau du tonoplaste.

Deux mécanismes par lequel le gradient de pH peut être maintenu ont été proposés en relation avec leur dépendance vis-à-vis de l'énergie (D.J. REIJNGOUD et J.M. TAGER, 1977 ; D.J. REIJNGOUD, 1978 ; M. HOLLEMANS et al., 1979 et 1980) :

- le gradient de pH est dû à une distribution de protons liée à un équilibre de Donnan imposé par l'existence de groupements anioniques non diffusibles accumulés dans le milieu vacuolaire,
- dans les processus impliquant de l'énergie, une activité ATPase membranaire interviendrait directement en catalysant un influx de protons.

Ces deux mécanismes ne s'excluent pas mutuellement dans la mesure où il est possible qu'une accumulation de protons résulte d'un équilibre de Donnan (réalisé au sens strict lorsque la pompe à protons est arrêtée) et que l'ATPase entraîne un excès d'accumulation de protons par rapport au niveau de base. C'est la raison fondamentale pour

laquelle D.L. SCHNEIDER (1979, a et b ; 1980) obtient des résultats différents de ceux de M. HOLLEMANS et al. (1979, 1980), malgré l'emploi du même matériel, les lysosomes de foie de rat.

On doit remarquer que l'addition de FCCP dans un milieu d'incubation contenant les vésicules n'entraîne pas une dissipation totale du gradient transmembranaire de pH (cf Figure 6.3). Un tel résultat pourrait être attribué à l'existence d'un effet Donnan mais il est connu que ce protonophore agira d'autant mieux qu'il est mis en contact plus longtemps avec les vésicules avant l'addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup>. Son action n'est pas immédiate.



CHAPITRE VII

LE COUPLAGE

DE L'INCORPORATION

DU CITRATE

AVEC LE GRADIENT

TRANSMEMBRANAIRE

DE pH



Pour les lutoïdes, J. D'AUZAC et C. LIORET (1974) ont noté une exaltation de l'incorporation du citrate par l'ATP. La quantité de citrate accumulée double en 30 mn après addition du nucléotide (2,5 mM ATP).

Ce résultat a été confirmé par M.C. MONTARDY et C. LAMBERT (1977) pour le citrate et généralisé au malate, au succinate et aux amino-acides (P. HANOWER et al., 1977).

L'existence d'un transporteur du citrate sur la membrane vacuolaire, d'une sensibilité du transport du citrate à l'ATP et d'une activité ATPase liée à la membrane vacuolaire ont suggéré l'intervention de cette activité ATPase dans le transport du citrate (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; J. D'AUZAC, 1975 et 1977 ; C. LAMBERT, 1975 ; J. D'AUZAC et al., 1977 ; P. HANOWER et al., 1977 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977 ; B. MARIN, 1980 ; B. MARIN et al., 1981).

On a vu dans le Chapitre précédent que l'activité ATPase est associée au transport des protons. Le problème est alors de savoir si le couplage énergétique entre l'hydrolyse de l'ATP et le transport du citrate est assuré par le gradient transmembranaire de pH.

Ce Chapitre décrit diverses expériences destinées à faire varier artificiellement le gradient de pH et à mesurer l'effet obtenu sur le transport du citrate.



## I - LA VESICULATION DANS DES MILIEUX DE pH DIFFERENTS.

### A. INFLUENCE DU pH DE VESICULATION POUR UN MILIEU DE VESICULATION DE MEME NATURE.

Dans les expériences effectuées jusqu'ici, la composition des milieux de vésiculation représentait celle d'un sérum intra-lutoïdique isotonique : 50 mM phosphate de potassium, 50 mM acide citrique, 5 mM  $\beta$ -mercapto-éthanol, 300 mM mannitol, ajusté à pH 6,0 (par KOH). Son emploi permettait alors de comparer directement les propriétés d'absorption des vésicules lutoïdiques et celles décrites pour les lutoïdes.

Il est possible de faire varier la valeur du pH de ce milieu de vésiculation (= milieu phosphate-mannitol). Les quantités de lyophilisat utilisées ( $20 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ ) sont suffisantes pour perturber considérablement le pH des milieux employés si la molarité des tampons n'est pas suffisante (Figure 7.1). Pour cette raison, une molarité minimale de 50 mM a été retenue.

La Figure 7.2 montre que l'incorporation est plus forte lorsque la vésiculation est effectuée à pH 6,0. Malgré la forte variabilité, on voit que les moyennes des résultats au temps  $t = 80 \text{ mn}$  sont significativement différentes au seuil de 10 %.



*B. INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU DE VESICULATION ET DE LA VALEUR DE SON pH.*

Le Tableau 7.1 décrit les milieux choisis pour étudier l'effet du pH de vésiculation sur l'incorporation ultérieure de citrate en milieu phosphate-mannitol à pH 7,5.

Les Figures 7.2 et 7.3 rendent compte des résultats obtenus. La présentation des résultats sous la forme choisie (nmol. citrate x  $\text{mg}^{-1}$  prot.) est vraisemblablement responsable de la forme sigmoïde des courbes de la Figure 7.3 (courbe B). En effet, si l'on exprime les résultats en nmol. citrate x  $\text{ml}^{-1}$  de suspension membranaire (courbe A), on obtient des courbes d'allure plus régulière. Ceci montre que le taux de récupération des protéines varie suivant la nature des milieux employés.

Sur la base de ces résultats, on peut admettre que le niveau d'incorporation du citrate par les vésicules vacuo-lysosomales est d'autant plus élevé que le pH du milieu de vésiculation est plus acide. Cette observation est en accord avec l'hypothèse de l'intervention du gradient de pH dans le système d'accumulation du citrate.

*C. INFLUENCE DE L'E.D.T.A.*

La Figure 7.4 montre l'effet de l'E.D.T.A. sur la cinétique d'incorporation du citrate. La forte inhibition observée lorsque l'E.D.T.A. est ajouté au milieu d'incubation suggère l'intervention d'un ion dans le transport du citrate. C'est une hypothèse maintes fois émise mais jamais vérifiée, même avec les vésicules. Les ions présents dans les lyophilisats de membranes vacuo-lysosomales sont difficilement désorbables sans perturber alors de façon irréversible le processus de vésiculation. D'où le manque d'effet des différents cations supposés intervenir. Ce problème ardu sera discuté en son temps (cf. Chapitre VIII, paragraphe IV).

Toutefois, on doit remarquer que cet effet de l'E.D.T.A. n'est pas toujours obtenu et qu'il s'oppose à celui observé sur des lutoïdes fraîchement isolés (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974).

## II - L'EMPLOI D'IONOPHORES DANS DES CONDITIONS OU LE GRADIENT TRANS-MEMBRANAIRE DE $pH$ EST MODIFIÉ.

L'emploi des ionophores, dans des conditions expérimentales bien déterminées, entraîne une modification, soit du gradient de  $pH$  préexistant, soit du potentiel membranaire initial (A. SCARPA, 1979 ; H. ROTTENBERG, 1979 ; A. GOMEZ-PUYOU et C. GOMEZ-LOJERO, 1977). Ils permettent dès lors de savoir dans quelle mesure chaque composante de la force motrice protonique intervient dans l'accumulation du citrate.

### A. *L'INTERVENTION DU POTENTIEL MEMBRANAIRE DANS L'ACCUMULATION DU CITRATE.*

Lorsque la valinomycine ( $10 \mu g \times ml^{-1}$ ) est ajoutée au milieu d'incubation, en présence de 30 mM KCl, on observe une diminution de l'ordre de 30 % de l'incorporation du citrate (Figure 7.5, courbe B). On a vu, dans un Chapitre précédent (cf. Chapitre V, paragraphe I) que, dans ces conditions, le potentiel transmembranaire passe de - 130 mV à - 35 mV alors que le gradient de  $pH$  n'est pas modifié (cf Tableau 5.III).

En présence de FCCP (1 mM), l'addition de valinomycine se traduit par une diminution plus accentuée de l'incorporation (Figure 7.5, courbe D). Or, le protonophore utilisé seul entraîne une inhibition moitié moins forte (courbe C).

Toutefois, l'inhibition la plus forte est obtenue avec la nigéricine ( $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) (courbe C). Elle est estimée à 80 %.

Cet ensemble de résultats montre que l'inhibition de l'incorporation du citrate par les vésicules vacuo-lysosomales est maximale lorsque les gradients électrique et de pH sont minimisés simultanément (par addition, soit de FCCP et de valinomycine, soit de nigéricine).

#### B. L'INTERVENTION DU GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE $pH$ DANS L'ACCUMULATION DU CITRATE.

##### 1) *Intervention de la nigéricine sur l'incorporation du citrate par des vésicules préparées dans un milieu de Tager normal (300 mM mannitol, pH 6,0).*

On vient de voir que l'inhibition maximale est obtenue avec la nigéricine. L'addition de cet ionophore ( $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) à une suspension ayant été incubée en présence de  $^{14}\text{C}$ -citrate et, par conséquent, ayant accumulé du  $^{14}\text{C}$ -citrate, provoque un efflux net de citrate (Figure 7.6).

Le transfert des vésicules sur un milieu dépourvu de citrate mais contenant de la nigéricine entraîne une forte exsorption du citrate accumulé. Or, on a vu que l'absence de citrate dans le milieu extérieur entraîne normalement un ralentissement de l'efflux (cf. Fig. 4.14). L'exsorption est donc bien ici due à la nigéricine et non au transfert sur la solution dépourvue de citrate. Elle est liée à la dissipation du gradient de pH. Le milieu devait contenir des traces de  $\text{K}^+$ .

##### 2) *Influence de la nigéricine sur l'incorporation de citrate par les vésicules préparées en présence de KCl.*

Les vésicules sont préparées dans un milieu de Tager faiblement tamponné (5mM au lieu de 25 mM) contenant, soit 185 mM KCl, soit 300 mM mannitol (comme agent osmotique) ajusté à pH 7,5 (au lieu de 6,0).

Après une préincubation de 10 mn à  $25^\circ\text{C}$ , temps nécessaire pour qu'un équilibre dans la distribution transmembranaire des molécules lipophiles utilisées (TPMP<sup>+</sup>, méthylamine) soit atteint, le  $^{14}\text{C}$ -

citrate est ajouté et les prélèvements sont faits immédiatement.

La nigéricine catalysant l'échange  $K^+/H^+$ , il est possible en contrôlant la concentration du potassium, soit du milieu d'incubation, soit du milieu vésiculaire, de diriger le sens du flux de protons.

Bien que les pH des milieux de vésiculation et d'incubation soient identiques, il existe un gradient de pH résultant probablement des molécules présentes dans le milieu vésiculaire et douées de pouvoir tampon. Cette hypothèse reste à vérifier mais elle est suggérée par les observations faites sur les vacuoles (= lutoïdes). Fraichement isolées, elles ont un pH interne acide (M. COUPE et J. D'AUZAC, 1978 ; J. BRZOZOWSKA et al., 1980) et les molécules responsables de ce pH pourraient être en partie conservées malgré la lyophilisation et le processus de lavage, qui tendent à les éliminer.

Si l'incorporation du citrate est faite dans un milieu riche en potassium (185 mM ; pH 7,5), la nigéricine n'a que peu d'effet sur l'accumulation du citrate (Figure 7.7, courbe C). L'incorporation de  $TPMP^+$  et de méthylamine permet de suivre l'évolution du potentiel transmembranaire et du gradient de pH. On n'observe plus la dépolarisation habituellement associée à l'absorption du citrate (Figure 7.7, courbe B). Le gradient de pH n'est pas affecté (Figure 7.7, courbe A).

Si on réalise l'expérience symétrique avec des vésicules contenant du KCl (185 mM dans le milieu de vésiculation, pH 7,5), placées dans une solution dépourvue de ce sel, on observe une forte stimulation de l'incorporation de citrate (Figure 7.8, courbe C). Dans ces conditions, la nigéricine entraîne une dépolarisation prononcée non différente de celle observée dans le motif témoin (courbe B) et un accroissement considérable du gradient de pH préexistant (le pH interne devenant plus acide) (courbe A).

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 7.III. L'acidification du milieu intravésiculaire entraîne un flux accru de citrate.



### III - L'INCUBATION DANS DES CONDITIONS EXPERIMENTALES OU L'ATPASE MEMBRANAIRE EST FONCTIONNELLE.

#### A. INFLUENCE DE L'ATP SUR LA CINETIQUE DE L'ABSORPTION DU CITRATE PAR LES VESICULES.

L'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5 mM) a une action plus ou moins marquée selon les préparations membranaires. Les causes de cette variabilité sont multiples, comme nous le verrons. Toutefois, sur l'ensemble des résultats obtenus, on peut noter un accroissement moyen de 23 % (par rapport au motif témoin) au bout de 60 mn d'incubation à 30°C.

La Figure 7.9 illustre une manipulation où les membranes vacuo-lysosomales ont été particulièrement sensibles à l'ATP-Mg<sup>2+</sup>. L'addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5 mM) se traduit par une nette augmentation de la quantité de citrate absorbée (Figure 7.9, courbe C). Cet effet s'estompe en fonction du temps. C'est en relation directe avec la consommation de l'ATP-Mg<sup>2+</sup>. Près de 40 % de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> du milieu d'incubation sont hydrolysés au bout de 20 mn à 30°C.

Bien qu'elle présente elle aussi une forte variabilité, l'action de l'ADP-Mg<sup>2+</sup> semble négligeable (de l'ordre de 5 %).

En conséquence, on retrouve avec les vésicules cette exaltation de l'absorption du <sup>14</sup>C-citrate par l'ATP-Mg<sup>2+</sup> caractérisée in vivo sur les lutoïdes (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974). L'amplitude est toutefois différente.

*B. EFFET DE LA CONCENTRATION EN ATP DU MILIEU D'INCUBATION SUR  
L'INCORPORATION DU CITRATE.*

Les vésicules vacuo-lysosomales sont formées en milieu phosphate-mannitol, pH 6,0, et incubées dans un milieu identique, soit à pH 6,0, soit à pH 7,5. Les concentrations en citrate des milieux de vésiculation et d'incubation sont respectivement 50 et 5 mM.

L'absorption du citrate par les vésicules ainsi formées et incubées se réalise dans une gamme de concentration en  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ , allant de 0 à 10 mM, le nucléotide étant toujours en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  dans le rapport 1.

La Figure 7.10 (courbe C) montre que la réponse de l'activité ATPase à la concentration en  $\text{ATP-Mg}^{2+}$  est comparable à pH 6,0 et à pH 7,5. C'est en accord avec les résultats de J. D'AUZAC (1977) indiqués dans la Figure 8.2. Cependant, l'incorporation de citrate (courbe A) et l'acidification concomitante du milieu d'incubation (courbe B) sont plus marquées à pH 6,0 qu'à pH 7,5. On peut supposer que l'effet du pH s'exerce sur le couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et le transport de  $\text{H}^+$  ou entre celui-ci et l'influx de citrate, et non au niveau de l'activité ATPase elle-même.

Cette conclusion se trouve confirmée par la comparaison des trois courbes de la Figure 7.11, qui indique qu'une acidification du milieu d'incubation n'est observée que dans la mesure où son pouvoir tampon est faible (Figure 7.11, courbe A), et que l'activité ATPase est insensible à la molarité du tampon (phosphate-mannitol) (courbe B). L'incorporation du citrate par des vésicules incubées dans un milieu 200 mM phosphate de potassium (où l'acidification du milieu d'incubation est faible) s'avère malgré tout sensible à l' $\text{ATP-Mg}^{2+}$  (Figure 7.11, courbe C). Elle doit être comparée à celle observée avec des vésicules incubées dans un milieu 20 mM phosphate de potassium (où l'acidification du milieu d'incubation est forte) (Figure 7.9). Les cinétiques sont différentes, notamment dans les 20 premières mn.

*C. RELATION ENTRE LE FONCTIONNEMENT DE LA POMPE-A-PROTONS ET LA CAPACITE D'INCORPORATION DU CITRATE.*

On a vu dans le Chapitre précédent que les lyophilisats provenant des lots Primot V et Primot IX donnent des vésicules à propriétés différentes. Les encadrés de la Figure 7.12 résument les différences de comportement de ces vésicules.

Brièvement, les vésicules préparées à partir du lyophilisat Primot V présentent une activité ATPase associée à un transport de  $H^+$  beaucoup plus faible que les autres formées à partir du lyophilisat Primot XI.

L'incorporation du citrate par les deux matériels a été mesurée simultanément. On remarque sur la Figure 7.12 qu'il existe un bon parallélisme entre le fonctionnement de la pompe à protons et l'incorporation de citrate.

*D. INFLUENCE DES INHIBITEURS DE L'ATPASE ET DES DECOUPLANTS SUR L'INCORPORATION DU CITRATE.*

J. D'AUZAC (1975 et 1977) a caractérisé plusieurs inhibiteurs de l'activité ATPase lutoïdique, le dicyclohexyl-carbodiimide (DCCD) et le FCCP, employés à une concentration élevée (1 mM). On a vu plus haut que le S-13, à la concentration utilisée généralement pour les granules chromaffiniques ( $10-20 \mu g \times ml^{-1}$ ) (L. TOLL et D.B. HOWARD, 1978), est également inhibiteur.

Pour les vésicules préparées dans les conditions habituelles (vésiculation à pH 6,0 et incubation à pH 7,5 en milieu de Tager), l'effet le plus important est obtenu avec le S-13 ( $10 \mu g \times ml^{-1}$ ) (Figure 7.13, courbe B). L'inhibition peut être estimée à 74 %, après 15 mn d'incubation à 30°C. Or, dans les mêmes conditions, l'inhibition de l'ATPase vésiculaire est de 70 à 80 % selon les lyophilisats.

L'addition de FCCP (1 mM) ou de DCCD (1 mM) au milieu d'incubation donne des effets moins marqués (Figure 7.13, courbes A et B).

Le 2,4-dinitrophénol (2,4-DNP) (1mM) diminue l'accumulation vésiculaire de citrate d'environ 40 % (Figure 7.13, courbe A). Des inhibitions de l'ordre de 25 % ont été décrites pour les lutoïdes



(J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974 ; M.C. MONTARDY et C. LAMBERT, 1977).

Le Tableau 7.IV récapitule ces données expérimentales. On constate qu'il existe un certain parallélisme entre l'intensité de l'activité ATPase vésiculaire et l'amplitude de l'incorporation par les vésicules.

IV - INFLUENCE DU CHLORURE D'AMMONIUM, DE LA METHYLAMINE ET DU  $\text{TPP}^+$   
SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR LES VESICULES VACUO-  
LYSOSOMALES.

L'addition de fortes concentrations de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou de méthylamine dans un milieu d'incubation est connue pour dissiper le gradient transmembranaire de pH au niveau des organites cellulaires comme les chloroplastes (A.T. JAGENDORF, 1975 ; L. PACKER et A.R. CROFTS, 1967). C'est une façon de modifier le gradient transmembranaire de pH pré-existant et, en conséquence, d'altérer l'incorporation du citrate, si un mécanisme de couplage existe.

Le Tableau 7.V illustre les résultats d'une manipulation, où l'évolution des deux composantes de la force motrice protonique est considérée. L'addition de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mM) ou de méthylamine (50 mM) dans le milieu d'incubation dissipe partiellement le gradient de pH pré-existant alors que celle de  $\text{TPP}^+$  (30 mM) modifie essentiellement le potentiel transmembranaire.

La présence d' $\text{ATP-Mg}^{2+}$  dans le milieu d'incubation se traduit pas une acidification du milieu intra-vésiculaire mais aussi par une variation positive du potentiel membranaire, compatible avec le transfert de protons associé au fonctionnement de l'activité ATPase (Tableau 7.VI). Le processus d'acidification induit par l'ATPase n'est pas décelable lorsque le milieu contient du chlorure d'ammonium ou de la méthylamine. La composante électrique est peu modifiée :

la dépolarisation n'excède pas 20 mV.

#### V - CONCLUSIONS.

De toute cette étude, il se dégage un faisceau de résultats expérimentaux qui renforce l'hypothèse initiale selon laquelle le transport du citrate par les vésicules serait entraîné par le gradient transmembranaire de protons.

Il existe un couplage entre l'accumulation intravésiculaire du citrate et l'amplitude du gradient transmembranaire de pH mais aussi du potentiel membranaire, comme le suggère l'effet inhibiteur de la valinomycine (cf. Tableau 7.II et Figure 7.5).

L'intervention des deux composantes de la force motrice protonique dans l'entraînement du transporteur du citrate et dans le processus d'accumulation de ce soluté pose le problème du mécanisme par lequel cet acide organique se trouve incorporé et accumulé par les vésicules vacuo-lysosomales.



CHAPITRE VIII

ANALYSE

DES

RESULTATS



En conservant la plupart de ses propriétés natives, les membranes lyophilisées permettent de former des vésicules fermées dont la dimension varie de 2 à 15  $\mu$ . En conséquence, elles constituent un matériel de choix pour essayer de mieux comprendre le mécanisme de l'accumulation de l'acide citrique par les vacuoles.

Des problèmes subsistent cependant, telle la maîtrise de la composition du milieu interne. Il n'est pas possible de se débarrasser de toutes les molécules (en particulier, les ions) initialement présentes dans le milieu intralutoïdique, sans modifier les propriétés membranaires.

Bien qu'une analyse cinétique rigoureuse du transport du citrate, selon la méthodologie introduite par W.D. STEIN et ses collaborateurs (W.D. STEIN et W.R. LIEB, 1973 ; W.R. LIEB et W.D. STEIN, 1974), ne soit pas réalisable encore, il apparaît qu'il ne se résoud pas en un processus simple. Différentes hypothèses peuvent être formulées. Elles seront décrites et discutées en fonction des résultats obtenus.



## I - L'ACTIVITE ATPASE EN TANT QUE POMPE-A-PROTONS.

L'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase membranaire s'accompagne d'une acidification du milieu interne des vésicules de l'ordre de 0,3 à 0,5 unités de pH (Fig. 6.1, courbe B ; Figures 6.2, 6.3, 6.4 et 6.5 ; Figure 6.6 , courbe A) et d'une dépolarisation rapide de l'ordre de 80 mV (Figure 6.7, courbe B) en 30 mn à 30°C.

Ces deux phénomènes ne sont plus observés en présence d'inhibiteurs de l'ATPase comme le FCCP ou le S-13 (Figure 6.3, 6.4 et 6.9).

Par ailleurs, l'acidification des vésicules et leur dépolarisation sont affectées par le pH externe (Figure 6.5, courbes A et B, et Figure 6.6, courbe A, pour le gradient de pH ; Figure 6.10 pour le potentiel transmembranaire) de la même façon que l'est l'ATPase (Figure 6.6, courbe B). Les optima sont très proches.

Ces faits expérimentaux permettent de conclure que l'ATPase membranaire vacuolaire est une pompe électrogène d'injection de protons dans le milieu intra-vésiculaire.

Aucun élément de comparaison existe dans la littérature. La plupart des études faites dans ce domaine sont effectuées sur l'activité ATPase du plasmalemme isolé de, soit *Schizosaccharomyces pombe* (J. DELHEZ et al., 1977 ; J.P. DUFOUR et A. GOFFEAU, 1978), soit *Saccharomyces cerevisiae* (R. SERRANO, 1978 ; G. WILLSKY, 1979), soit *Neurospora crassa* (G.A. SCARBOROUGH, 1977 ; B.J. BOWMAN et C.W. SLAYMAN, 1977 ; B.J. BOWMAN et al., 1978 ; B.J. BOWMAN et al., 1978 ;

B.J. BOWMAN et C.W. SLAYMAN, 1979 ; B.J. BOWMAN et al., 1980). Elles se sont généralisées depuis aux algues, les Charophytes en particulier (C.L. SLAYMAN et al., 1973 ; D.W. KEIFER et R.M. SPANSWICK, 1978 ; R.M. SPANSWICK, 1980) et aux végétaux supérieurs (cf. J. CAMBRAIA et T.K. HODGES, 1980, ou F.M. DU PONT, 1979, par exemple). Les exemples concernant l'activité ATPase vacuolaire sont limités (J. D'AUZAC, 1975 et 1977 ; W. LIN et al., 1977 ; S.DOLL et al., 1979 ; I.J. METTLER et R.J. LEONARD, 1979 ; R.A. LEIGH et R.R. WALKER, 1980). C'est la première fois à notre connaissance que le caractère électrogène de l'ATPase vacuolaire est mis en évidence.

De toute évidence, comme le suggère G.A. SCARBOROUGH (1980), une étude plus approfondie est nécessaire pour confirmer l'électrogénicité de cette ATPase pompe à protons. Rien n'est connu sur la stoechiométrie  $H^+/ATP$ . Par ailleurs, il est essentiel de connaître les cinétiques de saturation de l'hydrolyse de l'ATP, de la variation du potentiel membranaire et de la variation du gradient transmembranaire de pH en fonction de la concentration externe en  $ATP-Mg^{+}$ . De plus, on peut concevoir que le transport des protons et l'hydrolyse de l'ATP soient catalysés par des protéines différentes ayant des cinétiques de saturation identiques (J.B. DAME et G.A. SCARBOROUGH, 1980).

Comme le soulignent N.A. WALKER et F.A. SMITH (1977) ou F.A. SMITH et J.A. RAVEN (1979), le flux électrogène de protons créé un flux compensatoire de charges opposées (influx d'anions) ou non (efflux de cations).

En conséquence, si l'électrogénicité de la pompe à protons lutoïdique est maintenant un fait bien établi nécessitant une étude approfondie (B. MARIN, 1980 ; B. MARIN et al., 1981 ; H. CRETIN, comm. pers.), les problèmes liés à la compensation de charge n'ont jamais été abordés. Le moment est venu d'en discuter les différentes possibilités :

- La compensation de charge par expulsion de cation,

Parmi les candidats possibles, présents dans le milieu interne des lutoïdes, le Tableau 8.I suggère le potassium et le magnésium. Pour des raisons évidentes, le proton est hors de cause.

- le potassium,

L'intervention du potassium est possible. Effectivement, le fait de trouver des concentrations interne et externe de même ordre de grandeur bien que le potentiel transmembranaire soit négatif indique que le potentiel chimique de cet ion est plus élevé dans le milieu extravésiculaire ( $\mu K_{in}^+ < \mu K_{ex}^+$ ). Une telle situation peut être la conséquence d'une expulsion de cet ion. Par ailleurs, l'action dépolarisante du chlorure de potassium sur la membrane renforce cette hypothèse en montrant que la perméabilité des vésicules au potassium est nettement supérieure à celle des anions présents (Figure 5.4).

- le magnésium,

La perméabilité passive à ce cation semble très faible (cf. Paragraphe 2 de ce Chapitre). Par conséquent, si le magnésium assure l'équilibre de charge lors de l'excrétion des protons dans les vésicules, c'est en traversant la membrane lutoïdique par un système non réversible. Il n'est pas impossible que l'efflux de magnésium hors des vésicules soit couplé directement à l'influx de  $H^+$  au niveau de l'ATPase. Toutefois, nous ne disposons d'aucun argument expérimental nous permettant de confirmer une telle hypothèse.

- La compensation de charge par influx d'anions.

En ce qui concerne l'entrée d'anions, le citrate en étant excepté, la seule possibilité existante est le phosphate. Mais, la valeur calculée pour la différence de potentiel électrochimique de cet ion suggère une accumulation active du phosphate (cf. Tableau 8.I). Elle nécessite un couplage direct avec un processus dispensant de l'énergie. En aucun cas, il ne peut s'agir d'un couplage électrostatique. La régulation précise d'un transport actif du phosphate vers l'intérieur des vésicules de manière à compenser le flux de protons dû à l'ATPase est difficile à imaginer. Si cet ion intervient pour rééquilibrer le système, ce devrait être par un mécanisme uniport réversible (diffusion passive ou autre) qui lui permettrait d'obéir librement aux forces électriques. Mais, alors, cet uniport représente un court-circuit peu plausible par rapport au transport actif (suggéré par la valeur calculée de  $\Delta \bar{\mu}$  pour cet ion). Ces arguments ne permettent pas d'écarter absolument l'hypothèse d'une absorption parallèle du phosphate mais le fait que les expériences décrites à partir du Chapitre V aient été faites en absence de cet ion indique qu'il existe d'autres

dispositifs assurant l'équilibre de charge. Certes, l'intervention du phosphate résiduel peut être évoquée mais aucun fait expérimental permet d'en connaître son incidence sur le phénomène observé.

En conséquence, le problème reste entier. Le flux électrogène de protons, associé au fonctionnement de l'ATPase vacuolaire, crée un flux compensatoire de charges, dont la nature reste à élucider.



## II - L'ORIGINE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE (EN ABSENCE D'ATPASE FONCTIONNELLE).

En absence d'ATP-Mg<sup>2+</sup>, la différence de potentiel membranaire est de l'ordre de -150 à -100 mV (Figure 5.1 ; Tableau 5.I ; Figure 5.5 ; Tableau 5.VI ; Tableau 5.VII ; Figures 6.7 et 6.10). S'il s'agit d'un potentiel de diffusion, il nous faut connaître la nature de l'ion impliqué dans la polarisation des vésicules.

On peut concevoir deux mécanismes antagonistes : soit un efflux de cations, soit un influx d'anions, tout deux contribuant à développer un potentiel transmembranaire négatif. Chaque possibilité est envisagée et discutée.

### - Une polarisation due à un efflux de cations,

On peut faire appel, parmi les cations présents dans les lutoïdes, soit au potassium, soit au proton, soit au magnésium (Tableau 8.I).

### - Le potassium,

Dans la mesure où un mécanisme antiport H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> n'existe pas (le potassium ayant été sollicité, dans le paragraphe précédent, pour assurer un flux compensatoire de charges lors du fonctionnement de l'ATPase), l'existence d'un gradient de concentration suffisant pour engendrer un potentiel de diffusion de -100 à -150 mV implique un rapport d'accumulation de l'ordre de 100. Or, le potassium se trouve à la même concentration dans les deux compartiments délimités par la

membrane lutoïdique (Tableau 8.I). En conséquence, cet ion n'est pas à l'origine du potentiel transmembranaire observé.

- Les protons,

Certes, ils sont accumulés via l'activité ATPase fonctionnant comme pompe-à-protons. Toutefois, il faut remarquer à ce propos qu'une partie du gradient transmembranaire de protons peut être imputée à l'existence d'un effet Donnan, le FCCP ou le S-13 ne le dissipant pas entièrement.

Le gradient de concentration correspond à 0,5-1 unité de pH. Il équivaut à une différence de potentiel membranaire de l'ordre de -30 à -60 mV. En conséquence, les protons ne sont pas à l'origine de ce potentiel transmembranaire.

- Le magnésium,

Pour les lutoïdes fraîchement isolés, la concentration interne en magnésium total varie de 40 à 60 mM. Pour sa part, la concentration externe oscille entre 5 et 17 mM (Tableau 8.I). Toutefois, il s'agit là du magnésium total : il comprend les formes chélatées et libres.

Dans un milieu interne où les concentrations en  $Mg^{2+}$  et en citrate sont égales à 50 mM, il restera environ 0,8 mM de  $Mg^{2+}$  libre, à pH 6,0 (Tableau 8.II), l'essentiel du  $Mg^{2+}$  étant sous forme de complexes avec les formes  $RH^{2-}$  et  $R^{3-}$  du citrate (Figure 8.1). Le calcul du potentiel de Nernst donne une valeur de + 40,7 mV. Mais, selon J.L. JACOB, la concentration externe effective en  $Mg^{2+}$  libre s'avèrerait beaucoup plus faible. Elle serait de l'ordre de 0,5 mM. La valeur alors obtenue pour le potentiel de Nernst est égale à + 6,2 mV. Dans ces conditions, on ne voit pas comment le magnésium pourrait être à l'origine du potentiel transmembranaire.

Pour ce qui est des vésicules vacuo-lysosomales, les données expérimentales manquent. En absence d'ATP- $Mg^{2+}$ , la concentration interne en  $Mg^{2+}$  total s'élève à 5 mM. Dans la mesure où la concentration interne en citrate est identique et pour un pH interne de 6,0, la concentration interne en  $Mg^{2+}$  libre est de l'ordre de 0,8 mM. La concentration externe en  $Mg^{2+}$  total (supposé libre en absence de citrate) varierait entre 0,01 mM et 0,05 mM. Le calcul du potentiel de Nernst donnerait une valeur comprise entre - 36 et - 57 mV.

Dans aucun cas, les valeurs obtenues n'expliquent l'ampli-

tude observée du potentiel transmembranaire (Figure 5.1 ; Tableau 5.I ; Figure 5.5 ; Tableaux 5.VI et 5.VII ; Figures 6.7 et 6.10).

Par ailleurs, il faut rappeler que l'addition de  $\text{So}_4\text{Mg}$  dans le milieu d'incubation ne modifie pas la valeur du potentiel membranaire (Figure 6.7, courbes A et B ; Tableau 6.I). Ceci indique que le magnésium ne participe pas directement à l'établissement du gradient électrique et, par conséquent, implique que la perméabilité au magnésium est très faible : cet ion ne traverserait pas la membrane par simple diffusion passive.

- Une polarisation due à un influx d'anions.

L'autre possibilité qui nous est offerte pour expliquer l'électronégativité du potentiel membranaire, c'est l'existence d'un influx d'anions.

A part les acides citrique et malique, le seul anion connu présent dans le milieu intralutoïdique est le phosphate.

Dans les lutoïdes, la concentration interne en phosphate acido-soluble est de l'ordre de 50 mM alors que la concentration externe varie entre 10 et 15 mM (Tableau 8.I). Le potentiel de Nernst pour cet ion est, par conséquent, évalué de l'ordre de +30 à +40 mV.

Pour les vésicules, les concentrations interne et externe varient respectivement entre 10 et 15 mM et 0,2 - 0,3 mM. Le calcul du potentiel de Nernst donne une valeur de l'ordre de + 100 mV.

En conséquence, le phosphate ne peut être considéré comme un candidat plausible impliqué dans la polarisation des vésicules.

Cet échec dans notre tentative pour trouver la nature de l'ion à l'origine de ce potentiel transmembranaire pose le problème de la validité de la méthode employée pour le mesurer.

Ce potentiel membranaire est calculé à partir de la distribution à l'équilibre de molécules lipophiles ( $\text{TPP}^+$ ,  $\text{TPMP}^+$ ) entre les compartiments extra et intravésiculaires.

A priori, on pourrait penser à quelques artéfacts liés à l'emploi de ces molécules. Leur existence suffirait pour obtenir une valeur surévaluée du potentiel membranaire réel.

La grande richesse des membranes lutoïdiques en acide phosphatidique (de l'ordre de 85 % du contenu phospholipidique, selon J. DUPONT et al., 1978) pourrait être à l'origine d'une fixation artéfactuelle des indicateurs lipophiles. Mais cela semble peu probable



car l'accumulation du TPMP<sup>+</sup> par les vésicules vacuo-lysosomales est linéaire en fonction de la dose externe, dans une gamme de concentration faible (ce qui permet raisonnablement d'exclure l'hypothèse d'une adsorption).

En conséquence, le problème ne semble pas d'ordre méthodologique (cf. Chapitre V, pour les autres arguments indiquant que la méthode employée pour mesurer ce potentiel transmembranaire est valable). On doit en conclure que, dans l'état actuel de nos connaissances, il ne nous est pas possible de conclure. Aucun ion dont la compartimentation nous est connue nous permet de rendre compte de la polarisation membranaire observée. Le problème ne sera résolu que dans la mesure où la compartimentation de tous les ions (organiques ou non) présents dans le latex sera établie avec certitude.

### III - LA DISTRIBUTION DU CITRATE EN SES DIFFERENTES FORMES.

L'acide citrique se dissocie en 4 formes de valence 0, -1, -2 et -3, que nous noterons  $RH_3$ ,  $RH_2^-$ ,  $RH^-$  et  $R^{3-}$ . S. PAPA et al. (1971) donnent les valeurs de pk suivantes :

- $pk_1 = 3,128$
- $pk_2 = 4,761$
- $pk_3 = 6,396$

Certaines de ces formes peuvent chélater le magnésium : la valeur de la constante d'association est de 25,1 mM pour  $R^{3-}$  et de 0,5 mM pour  $RH_2^-$  (R.M.C. DAWSON et al., 1969).

Dès lors, il est possible de calculer la distribution du citrate en ces 6 formes, en considérant les équilibres de dissociation qui résultent des situations particulières employées (cf. Annexe 1 : Calcul de la distribution du citrate).

La Figure 8.1 permet de suivre les variations de la concentration de chaque forme en fonction du pH du milieu en présence ou non de  $Mg^{2+}$ . Deux concentrations de  $Mg^{2+}$  ont été considérées. Elles correspondent à deux situations extrêmes : 0 et 50 mM (Tableau 8.II).

Entre pH 6,0 et pH 7,5, en absence de magnésium, les formes prédominantes sont  $RH_2^-$  et  $R^{3-}$ , les autres formes étant faiblement représentées ( $RH^-$ ) voire inexistantes ( $RH_3$ ) (Figure 8.2 , part. A). Selon la valeur du pH, les tendances sont inversées :  $[RH_2^-] > [R^{3-}]$  à pH 6,0 alors que  $[RH_2^-] < [R^{3-}]$  à pH 7,5. Par contre, en présence de

$\text{Mg}^{2+}$ , la forme RM (complexe entre  $\text{R}^{3-}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) devient prédominante (Figure 8.2 , part. B). Les autres formes ( $\text{R}^{3-}$ ,  $\text{RH}^{2-}$  et RHM) sont faiblement représentées. La forme RHM représente le complexe formé entre  $\text{RH}^{2-}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ .

A titre d'exemple, la figure 8.2. compare la distribution des différentes formes de citrate à pH 6,0 (pH interne des vésicules lorsque l'ATPase est fonctionnelle) et à pH 7,5 (pH du milieu d'incubation), en présence ou non de magnésium. On voit que le passage de pH 7,5 à pH 6,0 qui simule l'entrée de citrate dans les vésicules a des effets très différents selon qu'il y ait ou non du magnésium dans les milieux extra-et intravésiculaires.

En conséquence, la distribution du citrate en ses différentes formes est fonction non seulement du pH mais aussi de la concentration du magnésium du milieu considéré.

#### IV - LES PROBLEMES POSES PAR LE TRANSPORT DU CITRATE.

Dans ce paragraphe, on discute des différents résultats, décrits dans les précédents Chapitres, en vue de mettre en place un mécanisme cohérent du fonctionnement du transporteur du citrate.

##### A. LA NATURE DU SUBSTRAT.

L'incorporation du citrate par les vésicules est d'autant plus forte que la forme  $\text{RH}^{2-}$  est plus importante dans le milieu, comme l'indiquent les Figures 4.12 et 8.1 (courbe B).

Vers pH 6,0, c'est la forme  $\text{RH}^{2-}$  qui est prédominante dans la mesure où le milieu d'incubation ne contient pas de  $\text{Mg}^{2+}$  libre. Cette absence de  $\text{Mg}^{2+}$  libre dans le cytoplasme est souvent suggérée mais, à notre connaissance, elle n'a jamais été démontrée (J.L. JACOB, communication personnelle). Bien qu'elle ne soit pas complète (défaut de branche ascendante), on voit que la courbe de concentration de la forme  $\text{RH}^{2-}$  en fonction du pH (Figure 8.1, courbe B) est celle qui se rapproche le plus de la courbe d'incorporation en fonction du pH (Figure 4.12).

Dans la mesure où le transport du citrate dépend non seulement de la concentration de la forme transportée dans le milieu d'incubation mais aussi de l'importance de l'activité ATPase, on peut penser qu'il soit préférable de prendre en considération ces deux facteurs si-

multanément. Ainsi, si l'incorporation est fonction de la concentration de la forme transportée [ $J_{in} = f(\text{citrate})$ ] et si elle est fonction de l'activité de la pompe à protons [ $J_{in} = f(\text{ATPase})$ ], on doit pouvoir écrire :

$$J_{in} = f(\text{citrate}) \cdot f(\text{ATPase}) \quad (8.1)$$

On ne présume pas de la nature de la forme transportée. Après normalisation (la valeur maximale étant égale à l'unité) des variations de la concentration des différentes formes de citrate (Figure 8.1) et de l'activité ATPase (Figure 6.6, courbe B) en fonction du pH, on peut tracer toute une famille de courbes représentant la dépendance de  $J_{in}$  vis-à-vis du pH externe (Figure 8.4). On remarque un optimum vers pH 6,0 pour les formes  $\text{RH}^{2-}$  et  $\text{RHM}$  et un autre vers pH 6,7-7,0 pour les formes  $\text{R}^{3-}$  et  $\text{RM}$  (Figure 8.4, courbes A et B). On retrouve le rôle fondamental du magnésium : sa présence diminue fortement la valeur de  $J_{in}$  calculée pour les formes  $\text{RH}$  et  $\text{RHM}$ . Toutefois, la conclusion précédemment énoncée reste valable.

L'ensemble des résultats suggère que le transporteur du citrate assure l'entrée de la forme  $\text{RH}^{2-}$  à moins que son affinité pour le substrat soit modifiée par le pH. En conséquence, nous prenons comme hypothèse de travail cette conclusion : c'est la forme  $\text{RH}^{2-}$  qui traverse la membrane via le transporteur, les autres formes étant considérées comme non perméantes.

#### B. L'EFFET DU TRANSPORT DU CITRATE SUR LE POTENTIEL MEMBRANAIRE.

L'évolution du potentiel transmembranaire au cours de l'incorporation du citrate par les vésicules renseigne sur le caractère électrogène de ce transport.

Deux situations sont envisagées :

- en absence d' $\text{ATP-Mg}^{2+}$  (la pompe à protons ne fonctionnant pas alors), mais en présence du citrate,

Lorsque la concentration externe en citrate est faible (de l'ordre de 5 mM), on note une hyperpolarisation de l'ordre de -25 à -30 mV, après 20 mn d'incubation à 30°C (Figure 8.5, courbe A).

On ne sait pas exactement ce qu'il se passe lorsque la concentration externe en citrate est augmentée. La variabilité des résul-

tats obtenus est beaucoup trop forte pour en tirer une conclusion sûre. La quantité de vésicules manipulée était trop faible.

- en présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup> (la pompe à protons étant fonctionnelle),

Lorsque la concentration externe en citrate est faible (de l'ordre de 5 mM), on observe une dépolarisation de l'ordre de 65 mV (Figure 8.5, courbe B).

Par contre, si la concentration en citrate est portée à 30 mM, elle s'avère moins importante : elle n'est plus que de 35 mV (Figure 8.4, courbe C).

Tous ces faits indiquent que le transport du citrate est hyperpolarisant. Ceci se voit nettement lorsque l'effet électrogène opposé de l'ATPase est supprimé ou bien lorsque l'hyperpolarisation due au transport du citrate reste visible encore malgré la dépolarisation imposée par l'activité ATPase. Cet effet hyperpolarisant intrinsèque suggère que le complexe transporté a une valence nette inférieure à 0.

Par ailleurs, on doit remarquer, dans certains cas, l'existence d'une dépolarisation supplémentaire de l'ordre de 30 mV lorsque la concentration externe en citrate passe de 5 à 30 mM. Elle ne peut être attribuée au transport du citrate (il est hyperpolarisant). On doit l'attribuer au système dépolarisant la membrane, l'ATPase. En conséquence, pour rendre compte d'un tel résultat, on doit formuler l'hypothèse suivante : l'entrée de citrate dans le milieu interne stimulerait l'activité ATPase (à la face interne de la pompe à protons).

Elle demande à être vérifiée. Elle pourrait expliquer ainsi l'effet activateur du citrate sur l'ATPase noté uniquement en présence de déoxycholate. La désorganisation de la membrane vésiculaire par ce détergent permettrait une hydrolyse accrue de l'ATP en activant l'ATPase au niveau de la face interne de la pompe à protons.

Le Tableau 8.III récapitule les principaux résultats décrits dans ce paragraphe.

### *C. L'EFFET DU POTENTIEL MEMBRANAIRE SUR LE TRANSPORT DU CITRATE.*

Dans la mesure où ce transport ne se fait pas par un antiport neutre de citrate et d'un autre anion ou par un symport neutre avec un cation, le potentiel membranaire doit affecter le flux de ci-

trate. On vient de voir qu'il est électrogène, ce qui conduit à écarter les deux éventualités évoquées ci-dessus. Il importe donc d'examiner maintenant comment un flux d'anion peut être modifié par le potentiel transmembranaire.

Dans l'hypothèse d'un flux diffusionnel, la vitesse de transit du citrate dépendra du champ électrique selon la relation :

$$J_{\text{net}} = J_{\text{in}} - J_{\text{ex}} \quad (8.2)$$

avec comme expression, pour chaque flux :

$$J_{\text{in}} = \frac{Z.P.F.\Psi}{e^{\frac{ZF.\Psi}{RT}} - 1} \cdot C_{\text{ex}} \quad (8.3)$$

$$J_{\text{ex}} = - \frac{Z.P.F.\Psi}{e^{\frac{ZF.\Psi}{RT}} - 1} \cdot C_{\text{in}} \cdot e^{\frac{ZF.\Psi}{RT}} \quad (8.4)$$

$$J_{\text{net}} = \frac{Z.P.F.\Psi}{e^{\frac{ZF.\Psi}{RT}} - 1} (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}} \cdot e^{\frac{ZF.\Psi}{RT}}) \quad (8.5)$$

chaque terme ayant pour signification :

- p, la perméation du citrate,
- z, sa valence,
- $\Psi$ , la différence de potentiel membranaire,
- F, R et T, leurs significations habituelles.

En considérant les données expérimentales des Figures 6.1 (variation du gradient de pH), 6.7 (variation du potentiel transmembranaire) et 7.12 (incorporation de citrate), on peut dès lors calculer les variations de chaque flux en fonction de la polarisation de la membrane.

En normalisant  $J_{\text{in}}$  (par rapport à la valeur maximale qu'il prend lorsque la différence de potentiel membranaire est nulle), la Figure 8.6 récapitule l'effet du potentiel membranaire sur cet influx. On s'est placé dans la situation où les concentrations externe et interne de citrate sont égales à 0,36 mM (représentant la concentration de la forme  $\text{RH}^{2-}$  lorsque le milieu contient 5 mM citrate à pH 7,5).

Ainsi, toute une famille de courbes est calculée pour un

anion dont la valence varie de -1 à -4 (Figure 8.6). On verra, en effet, plus loin que l'une des éventualité à retenir est l'échange  $RH^{2-}/H^{+}$ . Elle correspond en bilan à un influx d'anion trivalent voire uni-valent (s'il est couplé directement avec un influx de  $Mg^{2+}$ ).

Dans les différents cas examinés, l'effet électrogène de l'ATPase, qui se traduit par la dépolarisation des vésicules, favorise la pénétration du citrate (Figure 8.6). De façon plus générale, plus la dépolarisation sera grande, plus l'incorporation de citrate sera élevée et cet effet sera d'autant plus accentué que la valeur de la charge nette transportée sera faible.

Les résultats expérimentaux concernant l'évolution du potentiel membranaire pendant une incubation (Figure 6.7, courbe B) prévoient une cinétique d'influx de citrate compatible avec le mouvement d'une charge nette égale à -1 (Figure 8.7). Cette cinétique doit être comparée à l'incorporation de citrate observée dans ces conditions expérimentales (Figures 7.12, courbe B). On est alors amené à évoquer un mécanisme couplé assurant un bilan net de charge égal à -1.

Toutefois, cette hypothèse n'est pas suffisante. Elle prévoit une incorporation faible lorsque l'activité ATPase ne fonctionne pas. Or, l'incorporation de citrate, en absence d'ATP- $Mg^{2+}$ , est importante : elle représente 53 % de celle observée en sa présence. Dans la mesure où cette hypothèse est plausible, il est nécessaire de la compléter.

#### *D. L'INTERVENTION DU MAGNESIUM DANS LE TRANSPORT ET DANS L'ACCUMULATION DU CITRATE.*

L'E.D.T.A., introduit dans le milieu d'incubation, diminue l'incorporation de citrate par les vésicules vacuo-lysosomales (Figure 7.4). Ce résultat, contrastant avec celui décrit par J. D'AUZAC et C. LIORET (1974), suggère l'intervention d'un métal. Deux explications sont possibles : ce métal peut opérer, soit au niveau du transporteur, soit au niveau de l'ATPase.

En effet, si ce métal est le magnésium, l'E.D.T.A. diminue la concentration effective en ATP- $Mg^{2+}$  (le substrat de l'ATPase) en le chélatant. L'ATP libre n'étant pas hydrolysé par l'ATPase (J. D'AUZAC, 1977), il en résulte une diminution de son activité.



Par ailleurs, la stoechiométrie d'accumulation existant entre le citrate et le magnésium suggère l'existence d'un transport couplé entre le citrate et le magnésium. Un tel mécanisme a été décrit chez les bactéries (K. WILLECKE et al., 1973 ; P. OEHR et K. WILLECKE, 1974). Il en résulterait un effet moins hyperpolarisant du transport du citrate et une exigence énergétique moins grande. S'il en est ainsi dans nos vésicules, il s'agit d'un couplage direct des deux flux (ils ne constituent pas pour autant un symport, les deux flux étant indépendants l'un de l'autre). De toute évidence, il ne peut s'agir d'un flux compensatoire, le  $Mg^{2+}$  étant alors entraîné par le mouvement de  $RH^{2-}$  sous l'effet du champ électrique. En effet, le magnésium n'affecte pas le potentiel membranaire, en présence de citrate.

Les calculs des concentrations des différentes formes de citrate interne montrent que, si le magnésium est présent, il peut chélater une part importante du citrate interne (sous les formes non perméantes RHM et RM) (Figure 8.8). Il en résultera un abaissement de la concentration interne de la forme perméante  $RH^{2-}$ . Ceci contribuera à déséquilibrer le système dans le sens d'un influx.

On doit souligner que, dans les schémas de la Figure 8.8 (représentant une situation d'équilibre de concentration de la forme perméante), deux paramètres se révèlent essentiels pour la capacité d'accumulation du système :

- la valeur du pH interne,
- l'importance de la quantité de  $Mg^{2+}$  interne.

Néanmoins, cette situation d'équilibre ne tient pas compte de la polarisation membranaire : la différence de potentiel membranaire ayant une valeur moyenne de -120 mV, la concentration interne de la forme perméante ne serait plus égale à la concentration externe mais serait  $10^4$  fois plus faible, comme l'indique la relation :

$$\frac{J_{in}}{J_{ex}} = e^{\frac{ZF \Delta \Psi}{RT}} \quad (8.6)$$

avec comme application numérique :

$$\frac{J_{in}}{J_{ex}} = e^{\frac{+(-2) \cdot F}{RT} \cdot (-0,120)} \approx 10^4 \quad (8.7)$$

On retrouve ici le rôle fondamental de la dépolatization consécutive au fonctionnement de l'ATPase, qui permet de se rapprocher de la situation d'équilibre décrite dans la Figure 8.8.

En résumé, le magnésium peut jouer un rôle important dans l'accumulation du citrate sous une forme imperméante (formes RM et RHM). On remarquera, sur la Figure 8.8., que sa concentration interne est de l'ordre de 6 à 9 mM, ce qui serait en principe en faveur d'un efflux. Mais, il faut se rappeler que le  $Mg^{2+}$  en lui-même n'est pas perméant, comme l'indique son inefficacité à faire varier le potentiel membranaire (cf. Figure 6.7, courbe B, par exemple). Toutefois, le magnésium peut également jouer un rôle dans le transport du citrate lui-même si le couplage de son influx avec celui de  $RH^{2-}$  est direct (comme le suggèrent l'égalité des concentrations internes de citrate total et de magnésium total et l'absence probable de perméation passive pour cet ion).

#### *E. L'INTERVENTION DES PROTONS DANS LE TRANSPORT DU CITRATE.*

Rappelons les faits expérimentaux :

- 1) - l'acidification du milieu extérieur favorise l'incorporation de citrate (Figure 4.12),
- 2) - l'acidification du milieu interne accélère l'incorporation de citrate (Figure 7.2 ; Figure 7.3 ; Tableaux 7.II et 7.III ; Figures 7.7. et 7.8) alors que son alcalinisation la diminue (Figure 7.II ; Figure 7.7),
- 3) - l'incorporation de citrate acidifie le milieu externe (ceci étant visible uniquement lorsque le pouvoir tampon du milieu est faible : Figures 7.9 et 7.11),
- 4) - l'incorporation de citrate alcalinise le milieu interne. Cet effet, qui s'oppose à celui de la pompe à protons, n'est visible que si celle-ci est arrêtée (Figure 8.4, courbe D) ou si la dose externe de citrate est élevée (Figures 8.5, courbe F, et 8.9, courbes A et B).

On a vu que le point 1 s'explique bien pour la sensibilité de l'ATPase au pH extérieur (Figure 6.6, courbe B, et Figure 8.3) et par le fait que la forme transportée est supposée être  $RH^{2-}$  (cf la

partie A de ce paragraphe).

Les points 3 et 4 indiquent que l'entrée du citrate dans le milieu intra-vésiculaire s'accompagne d'une sortie de protons. Un tel couplage permet alors de comprendre le point 2. Le fait que les mouvements de protons associés à l'influx de citrate (points 2, 3, et 4) soient opposés à celui qui est dû à l'ATPase (cf. le paragraphe 1 de ce Chapitre) suggère l'hypothèse suivante : la pompe à protons entraîne l'absorption de citrate indirectement par l'intermédiaire du gradient de pH et de la valeur du pH interne qu'elle impose. On peut remarquer ici qu'une situation analogue existe en ce qui concerne les effets électriques : l'ATPase dépolarise les vésicules alors que l'influx de citrate les hyperpolarise. On aboutit à la même conclusion : le couplage est également indirect (cf. le paragraphe 5 de ce Chapitre).

Le couplage par les protons peut s'exercer de plusieurs façons : il peut y avoir un antiport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^+$  ou (et) un effet de ré-équilibrage acido-basique interne entre les différentes formes de citrate, qui diminue la concentration intravésiculaire de la forme perméante et qui en favorise ainsi l'entrée.

Le calcul montre que le rééquilibrage des différentes formes de citrate dans le milieu extérieur à pH 7,5 après le prélèvement d'un  $\text{RH}^{2-}$  consomme des protons (Figure 8.10). Inversement, le rééquilibrage interne après l'arrivée d'un  $\text{RH}^{2-}$  dans un milieu vésiculaire à pH 6,0 libère des protons. Ces conclusions ne peuvent expliquer l'acidification du milieu extérieur et l'alcalinisation du milieu interne associées à l'incorporation de citrate. En conséquence, il faut admettre qu'il y a réellement un antiport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^+$ .

Dans le cadre de cette hypothèse, le calcul indique que le nombre de protons fixés par molécule de citrate intravésiculaire sera fonction du contenu initial en citrate et en  $\text{Mg}^{2+}$  mais aussi de la concentration externe en  $\text{Mg}^{2+}$  libre (Figure 8.11, courbes A et B). Moins le contenu initial en citrate et en  $\text{Mg}^{2+}$  est élevé, plus la fixation de protons est grande, dans la mesure où la concentration externe en  $\text{Mg}^{2+}$  libre est nulle. Ceci révèle une autre voie du transfert de l'énergie provenant des protons (accumulés par la pompe-à-protons) sur le gradient d'accumulation de citrate.

Un dernier point doit être signalé à propos des interactions entre le flux de protons et le flux de citrate. On a vu que les effets

électrogènes observés (cf. la partie B de ce paragraphe) conduisaient à l'hypothèse d'une activation possible de la pompe-à-protons par le citrate interne. En conséquence, le flux de citrate devrait provoquer une accélération de l'influx de protons.

La Figure 8.12. résume les principales conclusions de ce paragraphe.

#### *F. L'EXISTENCE D'UNE COMPARTIMENTATION INTERNE D'ORDRE CINETIQUE.*

Le compartiment vésiculaire représente une entité morphologique bien définie : un milieu interne délimité par une membrane. Or, les Figures 4.15 et 4.17 suggèrent l'existence d'une compartimentation du citrate vésiculaire en deux pools bien distincts. En conséquence, il s'agira d'une compartimentation cinétique. En effet, l'équilibre isotopique n'est pas atteint : l'enrichissement isotopique ne dépasse pas 0,08 % au bout de 60 mn à 30°C (Figure 4.15, courbe C). Donc, on doit en déduire l'existence d'un pool de citrate interne non accessible au transporteur.

Or, comme nous l'avons vu dans un paragraphe précédent, l'essentiel du citrate est chélaté par le magnésium (cf. Figures 8.2 et 8.8.). Il est possible que ce pool interne important corresponde à la forme RM. En conséquence, la stabilité du chélat freinera les échanges isotopiques.

La présence de magnésium dans les vésicules déplace l'équilibre dans le sens d'une accumulation de citrate sous la forme RM (Figure 8.8.). Toute molécule pénétrant dans le milieu interne, sous forme  $RH^{2-}$ , se trouve piégée, sous forme RM. En conséquence, la concentration interne en  $RH^{2-}$  sera toujours faible. L'exigence énergétique qu'implique ce transport sera d'autant amoindrie. Ainsi, pour une concentration externe totale en citrate de 5 mM, à pH 7,5, et une concentration interne totale de 50 mM, à pH 6,0, la présence de 50 mM  $Mg^{2+}$  fait passer le potentiel de Nernst pour la forme  $RH^{2-}$  de + 118,7 mV à + 52,3 mV (Figure 8.8.).

Il existe donc un très faible pool de citrate, sous forme perméante. L'important efflux observé, lorsque du citrate est présent dans le milieu extérieur, peut alors s'expliquer (Figures 4.13 et 4.14). Le pool interne de citrate transportable est réduit. Il peut donc s'en-

richir relativement très rapidement en  $^{14}\text{C}$ -citrate. L'enrichissement isotopique réel sera alors proche de 1 bien que l'équilibre isotopique apparent ne soit pas atteint. Dès lors, on pourra s'attendre à observer un efflux important, qui sera fonction de la concentration interne en  $\text{RH}^{2-}$  transportable.

L'existence de deux compartiments cinétiques de citrate (l'un correspondant à la forme perméante, la forme  $\text{RH}^{2-}$ ; l'autre à la forme piégée par le magnésium, la forme RM) peut rendre compte des résultats obtenus (Figure 4.17 et, plus particulièrement, Figure 4.15) ainsi que l'ont montré les simulations cinétiques. On admet alors que les complexes formés entre R et M sont suffisamment stables (du point de vue cinétique), c'est-à-dire que leur dissociation et leur réassociation soient plus lentes que le transport du citrate lui-même à travers la membrane vésiculaire.

La Figure 8.13 résume les résultats de ce paragraphe.

#### V - LE COUPLAGE DU TRANSPORT DU CITRATE AVEC L'ACTIVITE ATPASE FONCTIONNANT COMME UNE POMPE-A-PROTONS.

Les résultats obtenus indiquent que le transport du citrate, sous forme  $RH^{2-}$ , s'effectue contre un potentiel transmembranaire négatif. On peut retenir qu'il correspond à un influx net de l'ordre de 100 nmoles  $\times$   $mg^{-1}$  prot. au terme d'une incubation de 60 mn faite à 30°C et à pH 7,5.

Or, l'activité ATPase membranaire mesurée dans des conditions comparables équivaut à l'apparition de 5,3 à 6,5  $\mu$ mol. ADP  $\times$   $mg^{-1}$  prot. Certes, la stoechiométrie de la réaction n'est pas connue : l'hydrolyse d'une molécule d'ATP peut correspondre au transfert de 1 ou 2 protons (cf. N.A. WALKER et F.A. SMITH, 1977, ou U. LUTTGE, 1980). Cependant, on peut raisonnablement envisager que cette activité permet le mouvement de 5,3 à 6,5  $\mu$ équival. de protons  $\times$   $mg^{-1}$  prot.

En conséquence, seulement une faible partie de l'énergie libérée au cours de l'hydrolyse de l'ATP est utilisée par le transporteur du citrate. Leur couplage n'est donc pas strict, pas autant que l'est celui du transporteur du malate avec la pompe-à-protons vacuolaire chez *Kalanchoe daigremontiana* (U. LUTTGE et E. BALL, 1980).

Le moment est venu de discuter du degré de couplage de ces deux processus chez *Hevea brasiliensis*. Deux aspects doivent, en conséquence, être considérés, en relation avec leur dépendance.

- il s'agit de deux mécanismes séparés.

Maints résultats confirment ce point de vue. Ainsi, il faut rappeler que :

- 1) le citrate peut être incorporé sans que l'ATPase fonctionne (par manque de substrat) (cf. par exemple, Figure 7.9, courbe A ; Figure 7.11, courbe C ; Figure 7.12, courbes A et B),
- 2) fondamentalement, la pompe-à-citrate et la pompe-à-protons ont des effets opposés : le transport du citrate (en absence d'ATP-Mg<sup>2+</sup>) hyperpolarise la membrane (Figure 8, courbe A) et alcalinise le milieu interne (Figures 8.5, courbes D et F ; Figure 8.9, courbe B).

En conséquence il s'agit bien de deux mécanismes différents puisque l'un peut fonctionner indépendamment de l'autre.

- les deux mécanismes ne sont pas entièrement indépendants l'un de l'autre.

Cette hypothèse nous est suggérée par les résultats suivants :

- 1) la membrane vésiculaire se trouve davantage dépolarisée, en présence de citrate, lorsque l'ATPase fonctionne,
- 2) selon que l'ATPase est fonctionnelle ou non (par addition de substrat) (cf. Figure 6.1, courbes A et B), le niveau d'incorporation du citrate est différent (Figure 7.12, courbes A et B), ce dernier étant plus élevé lorsqu'elle agit,

- 3) il existe un parallélisme entre le niveau d'inhibition du transport du citrate par les inhibiteurs de l'ATPase (Figure 7.13, courbes A et B) et l'amplitude de l'activité ATPase résiduelle, lorsqu'elle se trouve bloquée par ces agents (Figures 6.3 et 6.4).

Les points 2 et 3 indiquent clairement que la pompe-à-protons entraîne le transporteur du citrate, qui fonctionne contre un gradient transmembranaire de concentration. Il s'agit d'un transport actif.

Cette énergie peut provenir, soit du  $\Delta pH$ , soit du  $\Delta \Psi$  préexistants, ou des deux à la fois (cf. F.M. HAROLD, 1977 a et b ; S. RAMOS et H.R. KABACK, 1977 ; S. RAMOS et al., 1976, par exemple). Or, l'ATPase modifie ces deux grandeurs. En conséquence, le transport du citrate est dépendant du fonctionnement de l'ATPase. C'est un aspect du problème dont nous discuterons plus particulièrement dans les paragraphes suivants.

Toutefois, on peut rappeler le rôle fondamental de l'ATPase en dépotarissant la membrane. En effet, comme nous l'avons suggéré par ailleurs, l'effet électrogène de l'ATPase favorise la pénétration du citrate en diminuant les interactions existant entre l'anion  $RH^{2-}$  et le potentiel transmembranaire initial (fortement électronégatif). Cette interprétation admet implicitement que le transport du citrate équivaut au transfert d'une charge nette égale au plus à -1 (cf. Figures 8.6 et 8.7).

Nous devons en conclure que le couplage du transport du citrate avec l'activité ATPase n'est pas strict. Chacun correspond à un mécanisme différent l'un de l'autre. Mais, le fonctionnement du transporteur du citrate est accru lorsque l'ATPase intervient.





## VI - TENTATIVES DE MODELISATION DU TRANSPORT DU CITRATE.

Dès lors, quatre points doivent être plus particulièrement examinés en construisant le modèle :

- le transport du citrate est-il directement ou indirectement couplé à l'hydrolyse de l'ATP par la pompe-à-protons ?
  - l'effet du pH interne, qui se traduit par une redistribution entre les différentes formes s'opérant dans un milieu interne plus acide, correspond-t-il à une diminution de la concentration interne de la forme perméante  $RH^{2-}$ , ce qui peut entraîner le déplacement de l'équilibre de diffusion dans le sens de l'accumulation ?
  - en ce qui concerne l'effet du gradient transmembranaire de pH, existe-t-il des indications montrant que l'énergie dissipée par l'efflux de protons (préalablement accumulée par la pompe) est récupérée pour entraîner l'influx de citrate ?
  - en ce qui concerne l'effet du champ électrique, la polarisation de la membrane et surtout les variations de la différence de potentiel transmembranaire (dûes à la pompe à protons) affectent-elles le transport du citrate ?
- Dans l'hypothèse d'un cotransport, est-il neutre ou correspond-t-il à une stoechiométrie électriquement déséquilibrée ?

Le modèle doit rendre compte des résultats expérimentaux suivants, qui constituent des réponses partielles aux questions posées :

- une alcalinisation du milieu interne lorsque le milieu d'incubation contient une concentration élevée en citrate,
- la forme  $\text{RH}^{2-}$  est la forme perméante si l'on considère la réponse du transporteur au pH extérieur,
- compte-tenu des conditions de pH et de la présence de magnésium, la forme prédominante est le complexe formé entre  $\text{R}^{3-}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (RM),
- excepté la forme  $\text{RH}^{2-}$ , toutes les autres formes de citrate, complexé ou non avec le  $\text{Mg}^{2+}$ , sont imperméantes (c'est une hypothèse de travail),
- une forte présomption pour un antiport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^{+}$ , l'acidification du milieu extérieur induit par le transport du citrate n'étant visible que dans la mesure où l'activité ATPase est stoppée et que le pouvoir tampon du milieu est faible,
- une dépendance du transport du citrate vis-à-vis de l'énergie fournie par la pompe-à-protons,
- une dépendance du transport vis-à-vis du gradient transmembranaire de pH, l'augmentation de ce dernier favorisant l'influx de citrate,
- une dépendance du transport vis-à-vis de la valeur du pH interne, l'incorporation étant favorisée par un milieu acide, ce qui se produit lorsque l'ATPase fonctionne,
- une hyperpolarisation liée au transport du citrate, seulement visible lorsque l'effet dépolarisant de la pompe-à-protons est supprimé,
- une dépolarisation liée au transport du citrate, lorsque l'ATPase est fonctionnelle,
- une accumulation de magnésium identique à celle du citrate total.

Comme l'hypothèse d'un couplage direct entre le transport du citrate et l'activité ATPase ne peut être retenue, deux autres hypothèses de travail sont considérées :

- soit le transport du citrate correspond à un simple ré-  
équilibrage de ses différentes formes entre les comparti-  
ments extra- et intravésiculaires, en relation avec l'exis-  
tence d'un gradient transmembranaire de pH,
- soit le transport du citrate résulte du fonctionnement  
d'un antiport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^{+}$ .

Nous avons testé la validité de ces deux hypothèses en si-  
mulant le transport du citrate dans les conditions expérimentales ren-  
contrées.

Nous avons utilisé l'analyse numérique en établissant un  
programme permettant d'étudier ce type de transport, comme il est indi-  
qué par ailleurs (cf. Annexe II : Procédure de calcul utilisé dans les  
simulations).

#### A. HYPOTHESE D'UN SIMPLE REEQUILIBRAGE DES DIFFERENTES FORMES DE CITRATE ENTRE LES COMPARTIMENTS EXTRA- ET INTRAVESICULAIRES DU AU GRADIENT TRANSMEMBRANAIRE DE pH.

Dans le cadre de cette hypothèse, la simulation est faite  
en donnant des valeurs identiques à  $J_{\text{max}}^{\text{in}}$  et à  $J_{\text{max}}^{\text{ex}}$  d'une part, et  
à  $K_m^{\text{in}}$  et à  $K_m^{\text{ex}}$  d'autre part. On tient compte du fait que seule la forme  
 $\text{RH}^{2-}$  est perméante. En conséquence, le seul paramètre intervenant dans  
ce type de transport est la modification du gradient transmembranaire  
de pH induite ou non par la pompe-à-protons.

Cette simulation aboutit aux Figures 8.9, 8.10 et 8.11, qui  
ne permettent pas de retrouver les résultats décrits dans les Chapi-  
tres IV et VII.

Pour tenir compte du fait que le pH intravésiculaire varie  
au cours de l'expérience, la courbe expérimentale représentant la  
variation de  $\text{pH}_{\text{in}}$  en fonction du temps (Figure 6.1, courbe B) a été  
ajustée à une courbe empirique, décrite par la relation :

$$\text{pH}_{\text{in}} = (\text{pH}_{\text{in}})_0 - \frac{1,11 \times t}{(t + 61)} \quad (8.8)$$

Cette relation est introduite dans le programme de calcul  
de manière à ce qu'à chaque intervalle de temps considéré, le pH inter-

ne soit corrigé et ramené à la valeur observée (Figure 8.12).

Les autres paramètres caractéristiques du compartiment vésiculaire sont les suivants :

- un volume vésiculaire de l'ordre de  $10 \mu\text{l} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ,
- un contenu vésiculaire en citrate et en  $\text{Mg}^{2+}$  de l'ordre de  $25 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ,
- un pH interne initial de 6,91 (pour simuler l'incorporation de citrate décrite par la Figure 7.12, courbe B).

Le milieu d'incorporation contient toujours 5 mM citrate amené à pH 7,5 (par addition de Tris-Base). Lorsque l'ATP- $\text{Mg}^{2+}$  (5 mM) est ajouté au milieu d'incubation, la concentration en  $\text{Mg}^{2+}$  libre devient égale à 0,93 mM. Elle est calculée selon la méthode indiquée par J.P. DELHEZ et al. (1980).

Les valeurs prises pour l'influx ( $J_{\text{max}}^{\text{in}}$ ) et pour l'efflux ( $J_{\text{max}}^{\text{ex}}$ ) sont égales à  $15 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \times \text{mn}^{-1}$ , ce qui est compatible avec la pente initiale des courbes d'incorporation. La valeur apparente expérimentale de  $K_m$  pour le citrate est de l'ordre de 5 mM, ce qui correspond à 0,362 mM pour la forme perméante à pH 7,5.

Par définition, dans le cadre de cette hypothèse, on a :

$$K_m^{\text{in}} = K_m^{\text{ex}} = 0,362 \text{ mM.} \quad (8.9)$$

Dans aucun des cas de figures considérées [la pompe-à-protons étant (Figure 8.14) ou n'étant pas fonctionnelle (Figure 8.15) les flux de citrate et de  $\text{Mg}^{2+}$  étant ou n'étant pas couplés], l'incorporation de citrate simulée reflète la cinétique observée (cf. Figure 7.12, courbe B, par exemple). Elle n'excède pas  $25 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$  au bout de 15 mn d'incubation. Par la suite, elle se ralentit considérablement (Figure 8.14, courbe A). Il en est de même pour l'accumulation. Cette simulation ne permet pas de retrouver les cinétiques expérimentales, dans les conditions employées.

Par conséquent, un simple rééquilibrage des différentes formes de citrate entre les compartiments extra- et intravésiculaires, consécutif à l'existence d'un gradient transmembranaire de pH et à sa variation, n'est pas suffisant pour rendre compte des résultats obtenus.

B. HYPOTHESE DU FONCTIONNEMENT DU TRANSPORTEUR SELON UN MECANISME  
ANTIORT  $RH^{2-}/nH^{+}$ .

Dans cette hypothèse, on admet l'existence d'un mécanisme antiort  $RH^{2-}/nH^{+}$ . Le transport de  $RH^{2-}$  sera électriquement compensé s'il existe parallèlement une absorption de cation avec une stoechiométrie égale à  $(n + 2)$ . Par contre, il sera dépolarisant si le flux de charges positives est supérieur au flux d'anions  $RH^{2-}$  et à son efflux couplé de  $H^{+}$ . Dans le cas contraire, il sera hyperpolarisant.

L'expression des flux devient :

$$J_{in} = \frac{J_{max}^{in} \cdot (H^{+})_{in}^n \cdot (RH^{2-})_{ex}}{(H^{+})_{in}^n \cdot (RH^{2-})_{ex} + K} \quad (8.10)$$

$$J_{ex} = \frac{J_{max}^{ex} \cdot (H^{+})_{ex}^n \cdot (RH^{2-})_{in}}{(H^{+})_{ex}^n \cdot (RH^{2-})_{in} + K} \quad (8.11)$$

K est la constante d'affinité intrinsèque du transporteur pour  $RH^{2-}$ . Les constantes d'affinité apparentes sont alors :

$$K_{in} = \frac{K}{(H^{+})_{in}^n} \quad (8.12)$$

$$K_{ex} = \frac{K}{(H^{+})_{ex}^n} \quad (8.13)$$

On voit dès lors que les deux constantes sont reliées par la relation :

$$\frac{K_{in}}{K_{ex}} = 10^n (pH_{ex} - pH_{in}) = 10^{n \cdot \Delta pH} \quad (8.14)$$

Ainsi, la différence de pH entre les deux faces de la membrane se traduit formellement par des différences d'affinité du transporteur pour son substrat. Il suffit alors d'introduire la condition ci-dessus dans le modèle précédent (en conservant les paramètres caractéristiques du compartiment vésiculaire).

Dans ce second modèle, les effets électriques ne sont pas pris en considération.

Les Figures 8.14, 8.15 et 8.16 permettent de comparer directement le fonctionnement du transporteur selon les deux hypothèses de travail : la première supposant  $(K_m)_{in} = (K_m)_{ex}$  [c'est le cas examiné dans le paragraphe précédent] ; la seconde avec  $(K_m)_{ex} \cdot 10^{n\Delta pH}$  et  $n = 1$ .

Ainsi, lorsque la pompe-à-protons fonctionne, et quand  $(K_m)_{in} = (K_m)_{ex}$ , comme on l'a vu précédemment, pour une valeur de  $J_{max}^{in}$  et de  $J_{max}^{ex}$ , l'incorporation de citrate n'excède pas  $27 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$  au bout de 15 mn d'incubation (Figure 8.14, courbe A). Par contre, dans l'hypothèse d'un fonctionnement antiport du transporteur, la simulation se rapproche de la courbe expérimentale (Figure 8.14, courbe A). Un meilleur ajustement est obtenu lorsque la valeur de  $J_{max}^{in}$  sont portées de 15 à 9 (Figure 8.13, courbe A).

Il est important de comparer les prévisions des modèles et les observations relatives à l'accumulation de citrate par les vésicules vacuo-lysosomales. Ainsi, cette seconde hypothèse permet de rendre compte de l'accumulation généralement observée (Figure 8.13, courbes B et E). Pour un contenu interne initial en citrate de  $25 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ , elle peut être estimée à  $70 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$  au bout de 60 mn d'incubation (Figure 8.19, courbe B). Elle correspondra à la fixation de  $0,55 \text{ H}^+$  par molécule de citrate.

Cette fixation de protons résulte de l'acidification progressive du milieu interne par la pompe-à-protons, qui rapproche le pH interne de la valeur du pK de la forme  $\text{RH}^{2-}$  (4,761). Elle s'avère très réduite lorsque la pompe-à-protons ne fonctionne pas.

En résumé, ces simulations montrent que les cinétiques d'incorporation de traceurs et d'accumulation nette de citrate peuvent s'expliquer par la présence d'un mécanisme antiport de co-transport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^+$ , d'une imperméabilité des formes autres que  $\text{RH}^{2-}$  et soulignent l'importance des équilibres acido-basiques (c'est-à-dire du pH interne) et des chélation par le magnésium.

C. INSUFFISANCE DE LA SECONDE HYPOTHESE ET COMPLEMENTARITE.

1) Schéma du fonctionnement du transporteur selon le mécanisme antiport  $RH^{2-}/H^+$ .

Le tableau 8 résume le fonctionnement du transporteur selon un mécanisme antiport  $RH^{2-}/H^+$  où :

- La pompe à protons, en fonctionnant permet une acidification du milieu interne,

Pour une molécule de citrate transportée, il y a 60 molécules d'ATP-Mg<sup>2+</sup> qui sont hydrolysées par l'ATPase (cf. le paragraphe 5 de ce Chapitre). En conséquence, 60 protons traversent la membrane vésiculaire (s'il s'agit d'une 1 H<sup>+</sup>-ATPase).

Une grande partie de ces protons sont utilisés lors de l'activation des différents transports (citrate, malate, phosphate,...). Ils interviennent aussi dans l'équilibre acido-basique du milieu interne. L'acidification qui en résulte permet de constituer un pool sur lequel les protons impliqués dans le fonctionnement du transporteur du citrate sont prélevés.

- Le transporteur du citrate assure un échange couplé entre 1  $RH^{2-}$  et 1  $H^+$ ,

Toutefois, l'alcalinisation réelle du milieu interne est plus faible que celle qui correspondrait à l'exportation nette d'un proton, du fait de la libération d'une partie des  $H^+$  apportés par la forme perméante  $RH^{2-}$  (cf. le paragraphe 4 de ce Chapitre).

- La possibilité d'un couplage direct avec le flux d'un cation (ou l'efflux d'un anion),

Si les simulations sont satisfaisantes, elle ne rendent pas compte du fait que le transport du citrate correspond au mouvement d'un anion univalent (ou plus exactement à l'influx d'un bilan net d'une charge négative) (Figures 8.6 et 8.7). D'où l'hypothèse supplémentaire de l'intervention d'un influx de cation (ou de l'efflux d'un anion) de façon à avoir le transfert net d'une seule charge.

Ce modèle a donc besoin d'être complété. D'une part, l'hypothèse d'un flux couplé de Mg<sup>2+</sup> sera discutée. D'autre part, on évoquera



toutes les possibilités permettant de prendre en compte l'effet du potentiel électrique dans ce modèle.

*2) Effet de la teneur initiale en citrate et de la présence de  $Mg^{2+}$  dans le milieu d'incubation sur l'incorporation et sur l'accumulation de citrate.*

L'étude systématique des facteurs en jeu révèle que la cinétique d'incorporation et d'accumulation du citrate dépend fortement de la teneur initiale en citrate des vésicules et de la présence de magnésium dans le milieu (Figures 8.19 et 8.20).

Pour reconstituer la forme des courbes observées, il apparaît qu'il faut partir de vésicules contenant environ 25 à 100 nmol x  $mg^{-1}$  prot. de citrate (Figures 8.19, courbes A et D, pour l'incorporation de citrate ; Figures 8.20, courbes B et E, pour l'accumulation). Ces valeurs sont compatibles avec les résultats expérimentaux obtenus (lorsque la vésiculation se fait en absence de tout citrate exogène).

En ce qui concerne l'effet du magnésium, deux cas extrêmes sont considérés : le milieu contient 0 ou 5,2 mM de  $Mg^{2+}$  libre (Figures 8.19, et 8.20). La valeur de 5,2 mM correspond à la situation où une partie du  $Mg^{2+}$  se trouve piégée par l'ATP. Pour une concentration initiale externe de 10 mM de  $Mg^{2+}$  et de 5 mM pour l'ATP, le calcul permet d'obtenir cette valeur (J.P. DELHEZ et al., 1980).

La présence de  $Mg^{2+}$  libre dans le milieu externe conduit à la chélation d'une grande partie du citrate, ce qui abaisse la concentration de la forme perméante (Figure 8.1, courbes D, E et F ; Figures 8.2 et 8.8). Dans ces conditions, l'incorporation de citrate est plus faible comme l'indique la comparaison entre les Figures 8.13 et 8.14 : la présence de 5 mM  $Mg^{2+}$  externe (libre) correspond à une diminution de l'ordre de 60 % (pour des valeurs identiques de  $J_{max}^{in}$  et de  $J_{max}^{ex}$ ). Quant à l'accumulation, elle devient pratiquement nulle (Figure 8.20, courbe B) lorsque le contenu vésiculaire initial en citrate et en  $Mg^{2+}$  est de 25 nmol. x  $mg^{-1}$  prot. Elle correspond à une décharge accélérée du compartiment vésiculaire lorsque ce contenu est plus élevé (Figure 8.20, courbes E et H).

L'addition simulée de  $Mg^{2+}$  libre (non complexé par l'ATP) dans le milieu d'incubation modifie complètement les cinétiques d'in-

corporation (Figures 8.20, courbes A, D et G) et d'accumulation (Figure 8.20, courbes B, E et H). Elles ne sont en aucun cas conformes à celles que nous observons. On comprend dès lors l'influence opposée du  $Mg^{2+}$  et de l'E.D.T.A. sur l'incorporation de citrate par les lutoïdes (J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974).

Dans le cadre de l'hypothèse envisagée, on ne doit pas avoir de  $Mg^{2+}$  libre dans le milieu d'incubation. On doit le supposer chelaté par l'ATP libre ou fixé sur un site membranaire (ou autre) d'affinité supérieure à celle qu'il a pour le citrate ( $K_a \gg 0,5 \text{ mM}$ ).

3) *La prise en compte de l'effet du potentiel électrique dans le modèle.*

Jusqu'à présent, ce modèle tient compte uniquement de l'effet des pH extra- et intravésiculaire et du gradient transmembranaire de pH.

a) insuffisance du modèle.

Ainsi, lorsque la pompe à protons ne fonctionne pas et que la concentration externe en citrate est de 5 mM, la simulation donne un résultat différent de celui obtenu (Figure 8.23, courbe A).

Or, la différence de potentiel transmembranaire n'est pas identique selon que la pompe à protons fonctionne ou non (Figure 6.7). Une valeur moyenne de - 50 mV peut être retenue pour le motif ATP- $Mg^{2+}$ . Elle est de l'ordre de - 100 mV pour le motif témoin (sans ATP- $Mg^{2+}$  et sans  $Mg^{2+}$  exogène libre).

La composante électrique du gradient d'enthalpie libre du citrate intervient nécessairement comme le suggère l'effet de la valinomycine sur son incorporation par les vésicules (Figure 7.5, courbes B et D). Il s'agit d'en tenir compte dans notre modèle.

En faisant l'hypothèse que, pour un transporteur chargé de 1  $RH^{2-}$  et de 1  $H^+$ , la fréquence de transition ( $1 H_{in}^+ + 1 RH_{ex}^{2-} \rightarrow 1 H_{ex}^+ + 1 RH_{in}^{2-}$ ) est proportionnelle au champ électrique (c'est-à-dire au  $\Delta\bar{\mu}$  électrique), on peut prévoir que l'influx de citrate ( $J_{in}$ ) répond au potentiel membranaire, comme nous l'avons déjà évoqué par ailleurs (cf. le paragraphe 4 de ce Chapitre). Le modèle doit nécessairement en rendre compte, c'est l'objet de la discussion qui suit.

β) L'électrogénicité du transport du citrate et la possibilité d'un flux couplé de  $Mg^{2+}$ .

Le fonctionnement du transporteur du citrate selon un antiport  $RH^{2-}/H^{+}$  est équivalent à un influx d'un anion trivalent. L'importance de l'effet du champ électrique sur le transport du citrate a été suggéré (cf. le paragraphe 4 de ce Chapitre).

On s'aperçoit qu'une dépolarisation allant de - 100 mV à - 50 mV accélère considérablement l'influx d'un anion monovalent (Figure 8.5). Par contre, l'influx d'un anion trivalent reste fortement ralenti pour un potentiel membranaire de - 50 mV (Figure 8.6). Comme nous l'avons indiqué, cette observation suggère que cet antiport  $RH^{2-}/H^{+}$  doit être couplé à un flux de cation (ou à un efflux d'anion) de façon à diminuer l'électrogénicité du transport du citrate.

La stoechiométrie existant entre le citrate total et le magnésium total d'un latex d'*Hevea brasiliensis* (J.L. JACOB, résultats non publiés) pourrait être en faveur d'un flux couplé de  $Mg^{2+}$ , ce qui aboutirait à un flux net d'une charge négative au lieu de trois charges négatives (comme nous l'évoquons dans la Figure 8.21).

Il est nécessaire de discuter le bien-fondé d'une telle hypothèse. L'existence d'une telle forme de transport du  $Mg^{2+}$  expliquerait que cet ion pénètre en grandes quantités dans les lutoïdes et en quantités égales au citrate, sans diffuser passivement (l'addition de  $Mg^{2+}$  dans le milieu d'incubation ne s'accompagnant pas d'effet électrique).

Il est difficile d'imaginer que le magnésium externe libre soit impliqué dans les systèmes de transport envisagés. En effet, la concentration du  $Mg^{2+}$  libre dans le cytoplasme est faible (cf. Tableau 8.I). L'addition d'ATP- $Mg^{2+}$  (5 mM) dans le milieu d'incubation correspond à introduire du  $Mg^{2+}$  libre : sa concentration est de l'ordre de 0,93 mM. La quantité de citrate incorporée n'excède pas 100 à 120 nmol x  $mg^{-1}$  prot. après 60 mn d'incubation. En conséquence, la quantité de magnésium disponible est suffisante. Mais, les calculs indiquent que toute trace de  $Mg^{2+}$  libre dans le milieu externe tend à chélater le citrate libre, à diminuer la concentration en  $RH^{2-}$  susceptible d'être transportée (cf. Figures 8.20, courbes A, D et G) et accumulée (cf. Figures 8.20, courbes B, E et H). On est donc conduit à penser que,

dans la mesure où le magnésium intervient dans ce transport, il n'opère pas sous une forme simple.

Les simulations, faites en prenant comme hypothèse, l'existence d'un flux couplé de  $Mg^{2+}$  à celui du citrate, suggèrent une incorporation et une accumulation accrues de citrate (Figures 8.14, courbe E et 8.15, courbe E, pour l'incorporation ; Figures 8.14, courbe F, et 8.15, courbe F, pour l'accumulation). La capacité d'incorporation et d'accumulation des vésicules vacuo-lysosomales double lorsque la pompe à protons fonctionne. Elle se trouve multipliée par 2,6 lorsque le gradient transmembranaire de pH reste constant. Ces propriétés découlant de la formation du complexe RM dans le milieu interne, en quantité croissante (les cinétiques d'incorporation de  $RH^{2-}$  et de  $Mg^{2+}$  étant identiques) (Figures 8.14, courbe G, et 8.15, courbe G).

Toutefois, dans le modèle présenté, le magnésium ne doit être introduit que pour ramener la valence nette de l'échange du complexe transporteur  $RH^{2-}/H^{+}$  de - 3 à - 1. Les modalités précises de l'atténuation de la charge nette transportée restent très obscures (influx couplé de  $Mg^{2+}$ , influx couplé de cations organiques tels que les amino-acides, basiques accumulés spécifiquement dans le milieu intra-lutoïdique, efflux d'anion,...).

#### γ) La modification des constantes cinétiques par le champ électrique.

Dans toutes les simulations faites jusqu'à présent, on n'a tenu compte que des pH extra- et intravésiculaire et du gradient transmembranaire de pH, en conservant des valeurs identiques pour  $J_{max}^{in}$  et pour  $J_{max}^{ex}$ .

Or, le complexe transporteur est chargé électriquement. On peut dès lors écrire :

$$\overline{T}^{-} = [T, RH^{\equiv}, H^{+}] \quad (8.15)$$

Comme l'indique la Figure 8.22, l'étape de transition intramembranaire entre les formes (a) et (b) (qui correspondent respectivement à la libération de  $RH^{2-}$  à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane) est sensible à la différence de potentiel transmembranaire. On

ne considère pas les étapes d'association et de dissociation qui font intervenir les concentrations de  $\text{RH}_2^-$  et de  $\text{H}^+$  et qui ont lieu aux interfaces milieu-membrane. D'après la théorie des vitesses absolues (cf. J. TONNELAT, 1975 ou G.M. BARROW, 1976, par exemple), les fréquences de transition  $K_1$  et  $K_{-1}$  sont données par les relations :

$$K_1 = \frac{KT}{h} \cdot e^{-\Delta G_1^*/RT} \quad (8.16)$$

$$K_{-1} = \frac{KT}{h} \cdot e^{-\Delta G_{-1}^*/RT} \quad (8.17)$$

où  $\Delta G_1^*$  et  $\Delta G_{-1}^*$  sont les variations d'enthalpies libres standards correspondant à la dissociation des formes activées.

Par conséquent :

$$\frac{K_1}{K_{-1}} = e^{-(\Delta G_1^* - \Delta G_{-1}^*)/RT} \quad (8.18)$$

On voit sur le Tableau 8.X, que :

$$\Delta G^\circ = \Delta G_{-1}^* - \Delta G_1^* \quad (8.19)$$

Or, on peut écrire :

$$\Delta G^\circ = zF \cdot \Delta \Psi \quad (8.20)$$

$$\frac{K_1}{K_{-1}} = e^{-\Delta G^\circ/RT} \quad (8.21)$$

$$\frac{K_1}{K_{-1}} = e^{-zF \cdot \Delta \Psi / RT} \quad (8.22)$$

On peut considérer que les vitesses maximales, qui sont mesurées par  $J_{\text{max}}^{\text{in}}$  et par  $J_{\text{max}}^{\text{ex}}$ , sont proportionnelles aux fréquences de transition  $K_1$  et  $K_{-1}$ .

$$\frac{J_{\text{max}}^{\text{in}}}{J_{\text{max}}^{\text{ex}}} = e^{-zF (\Psi_{\text{in}} - \Psi_{\text{ex}})/RT} \quad (8.23)$$

$$\frac{J_{\max}^{\text{in}}}{J_{\max}^{\text{ex}}} = e^{-ZF \cdot \Delta\psi/RT} \quad (8.24)$$

Concrètement, cela se traduit pas une asymétrie entre les valeurs données à  $J_{\max}^{\text{in}}$  et à  $J_{\max}^{\text{ex}}$ , ces valeurs étant toutefois dépendantes l'une de l'autre par la relation précédente.

Une telle approche a été faite dans les simulations données dans la Figure 8.15. On retrouve les courbes expérimentales :

- pour le témoin, en donnant la valeur 25 à  $J_{\max}^{\text{ex}}$ , la valeur de  $J_{\max}^{\text{in}}$  étant maintenue à 9 (Figure 8.23, courbe A),
- pour une inhibition de la pompe-à-protons par le FCCP, en lui donnant la valeur 30 (Figure 8.23, courbe B),
- pour un fonctionnement de l'ATPase, en diminuant la valeur de  $J_{\max}^{\text{ex}}$  de 9 à 7 (Figure 8.23, courbe D),
- en ce qui concerne l'effet de  $\text{SQ}_4\text{Mg}$  (5 mM), en lui attribuant une valeur de 25 (Figure 8.23, courbe C).

Une telle hypothèse semble vraisemblable même si les valeurs données au rapport  $J_{\max}^{\text{in}}/J_{\max}^{\text{ex}}$  ne correspondent pas tout-à-fait aux variations observées de potentiel transmembranaire. Cependant, en toute rigueur, il faudrait considérer la variation de la valeur de  $J_{\max}^{\text{ex}}$  en fonction de l'évolution de la différence de potentiel transmembranaire au cours de l'incubation. L'approximation en serait meilleure.

#### D. BILAN

En résumé, l'hypothèse d'un antiport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^+$ , couplé à un transport de  $\text{Mg}^{2+}$  (ou tout autre transport) réduisant la charge nette transportée à - 1, dans les conditions de concentration et de pH interne et externe correspondant aux expériences, permet de reconstituer correctement les cinétiques observées. De plus, l'influence du potentiel membranaire peut se traduire par une modification des constantes cinétiques.



## VII - L'EXIGENCE ENERGETIQUE DU TRANSPORT DU CITRATE.

Deux aspects de cette exigence énergétique du transport du citrate sont à envisager :

- d'une part, l'aspect lié au transport lui-même, il concerne le fonctionnement du transporteur uniquement,
- d'autre part, l'aspect lié à l'accumulation, il implique tous les processus tendant à déplacer les équilibres.

On part de l'hypothèse que seule la forme  $RH^{2-}$  est perméante et que le transporteur du citrate fonctionne selon un mécanisme antiport  $RH^{2-}/H^+$ .

### A. L'EXIGENCE LIEE AU TRANSPORT DE LA FORME PERMEANTE.

L'entrée d'une mole de  $RH^{2-}$  se fait à l'équilibre de concentration. En conséquence, on aura :

$$RT \ln \frac{[C_{in}]}{[C_{ex}]} = 0.$$

Elle se fait contre un gradient électrique variant de - 100 à - 20 mV. En effet, dans cette estimation, on peut considérer que la valeur minimale prise par la différence de potentiel électrique en régime stationnaire, lorsque l'ATPase est fonctionnelle, est égale à - 20 mV.



L'entrée d'une mole de  $\text{RH}^{2-}$  correspond à la consommation d'une énergie égale à :

$$z \cdot F \cdot \Delta\psi = - 2 \times 96,5 \times (-0,020) \approx 4 \text{ KJ. mol}^{-1}$$

Du point de vue électrique, la sortie simultanée d'un proton équivaut à une consommation de :

$$+ 1 \times 96,5 \times (+ 0,020) \approx 2 \text{ KJ. mol}^{-1}$$

Toutefois, la quantité d'énergie récupérée, sous forme osmotique (selon la nomenclature mitchellienne), est égale à :

$$RT \ln \frac{[\text{H}^+]_{\text{in}}}{[\text{H}^+]_{\text{ex}}} = RT \ln \frac{10^{-6,5}}{10^{-7,5}} \approx 6 \text{ KJ. mol}^{-1}$$

les pH des milieux intra- et extravésiculaires étant respectivement de 6,5 et de 7,5.

En conséquence, le mouvement du proton correspond à la libération de 4 KJ.  $\text{mol}^{-1}$ .

Le bilan énergétique des deux échanges est donc nul comme le montre le Tableau suivant :

|                     |   |                                                                  |
|---------------------|---|------------------------------------------------------------------|
| Travail dû          | ) |                                                                  |
| au $\text{RH}^{2-}$ | ) |                                                                  |
| transporté          | ) | $- 2 \times 96,5 \times (-0,020) \approx 4 \text{ KJ. mol}^{-1}$ |

|            |   |                                                                     |
|------------|---|---------------------------------------------------------------------|
| Travail dû | ) | $+ 1 \times 96,5 \times (+0,020) \approx 2 \text{ KJ. mol}^{-1}$    |
| au proton  | ) |                                                                     |
|            | ) | $RT \ln \frac{10^{-6,5}}{10^{-7,5}} \approx 6 \text{ KJ. mol}^{-1}$ |

$$\text{Bilan} = 0 \text{ KJ. mol}^{-1}.$$

Dans ces conditions, le système de transport de la forme  $\text{RH}^{2-}$  fonctionne donc à l'équilibre.

Dès lors, il est facile de voir l'importance de la contribution de la pompe-à-protons dans le transport du citrate en examinant différents cas de Figure :

- Si l'ATPase ne fonctionne pas, le calcul précédent peut-être repris en considérant que la différence de potentiel membranaire est de - 100 mV (au lieu de - 20 mV, lorsque l'ATPase fonctionne).

On conserve la même valeur pour le gradient de pH de manière à n'illustrer que l'effet de la contribution électrique de l'ATPase, sur le transport du citrate.

$$\begin{array}{l} \text{Travail dû} \\ \text{au } \text{RE}^{2-} \\ \text{transporté} \end{array} \begin{array}{l} ) \\ ) \\ ) \end{array} \begin{array}{l} \\ - 2 \times 96,5 \times (-0,100) \text{ \# } 19 \text{ KJ. mol}^{-1} \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Travail dû} \\ \text{au proton} \end{array} \begin{array}{l} ) \\ ) \end{array} \begin{array}{l} + 1 \times 96,5 \times (+0,100) \text{ \# } 9,5 \text{ KJ. mol}^{-1} \\ RT \ln \frac{10^{-6,5}}{10^{-7,5}} \text{ \# } 6 \text{ KJ. mol}^{-1} \end{array}$$

$$\text{Bilan} = + 15,5 \text{ KJ. mol}^{-1}$$

- Si le gradient transmembranaire de pH devient nul,  
On conserve, pour le potentiel transmembranaire, la valeur de -20 mV, caractéristique du fonctionnement de l'ATPase, de manière à ne prendre en compte que l'effet de la contribution osmotique de l'ATPase.

$$\begin{array}{l} \text{Travail dû} \\ \text{au } \text{RE}^{2-} \\ \text{transporté} \end{array} \begin{array}{l} ) \\ ) \\ ) \end{array} \begin{array}{l} \\ - 2 \times 96,5 \times (-0,020) \text{ \# } 4 \text{ KJ. mol}^{-1} \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Travail dû} \\ \text{au proton} \end{array} \begin{array}{l} ) \\ ) \end{array} \begin{array}{l} + 1 \times 96,5 \times (-0,020) \text{ \# } 2 \text{ KJ. mol}^{-1} \\ RT \ln \frac{10^{-7,5}}{10^{-7,5}} = 0. \end{array}$$

$$\text{Bilan} = + 2 \text{ KJ. mol}^{-1}$$

- Si l'ATPase ne fonctionne pas (le potentiel transmembranaire demeurant à - 100 mV) et si le gradient transmembranaire de pH est nul,

Travail dû )  
 au  $\text{RH}^{2-}$  ) - 2 x 96,5 x (-0,100) # 19 KJ. mol<sup>-1</sup>  
 transporté )

Travail dû ) + 1 x 96,5 x (+0,100) # 9,5 KJ. mol<sup>-1</sup>  
 au proton )  $RT \ln \frac{10^{-7,5}}{10^{-7,5}} = 0$

Bilan = + 9,5 KJ mol<sup>-1</sup>

On retrouve l'importance de la dépolarisation de la membrane induite par le fonctionnement de l'ATPase. Le maintien du potentiel membranaire à sa valeur initiale (-100 mV) implique une exigence énergétique beaucoup plus grande pour le transfert d'une mole de  $\text{RH}^{2-}$ .

#### B. L'EXIGENCE LIEE A L'ACCUMULATION DU CITRATE.

Le fait que ce système de transport de la forme  $\text{RH}^{2-}$  se produise à l'équilibre et que son fonctionnement corresponde à une accumulation de citrate d'un facteur de l'ordre de 8 à 10 (cf. Tableau 8.1) s'explique par la redistribution des différentes espèces de citrate dans les vésicules, qui introduit sous forme non perméantes une part importante du citrate transporté.

Formellement, cette situation peut se représenter en écrivant que le potentiel électrique standard du citrate, pris dans son ensemble, est différent dans les milieux extra- et intravésiculaires (soit  $\Delta\psi^\circ \neq 0$ ).

On a vu que la redistribution est essentiellement due à la présence de magnésium dans le milieu intravésiculaire et surtout à la valeur du pH interne (Fig. 8.8.). Ceci veut dire que l'énergie d'accumulation du citrate total est finalement fournie par la pompe-à-protons (comme l'indiquent les différents calculs effectués précédemment).

Compte tenu du fait que l'équilibre corresponde à un facteur d'accumulation du citrate de l'ordre de 10 (cf. Figure 8.8 ), on peut considérer la quantité d'énergie égale à :

$$RT \ln 10 \approx 6 \text{ KJ. mol}^{-1}$$

C. BILAN.

En résumé, le coût du transport de la forme perméante  $RH^{2-}$  est de  $15,5 \text{ KJ. mol}^{-1}$  en absence de tout fonctionnement de la pompe à protons. Cette exigence énergétique considérable est la conséquence d'un potentiel transmembranaire électrique d'une électronégativité élevée ( $-100 \text{ mV}$ ). Par contre, lorsque la membrane se dépolarise, l'ATPase pompe à protons fonctionnant, elle se réduit à  $2 \text{ KJ. mol}^{-1}$ . Elle peut devenir nulle.

Pour ce qui concerne l'accumulation, son exigence énergétique est de  $6 \text{ KJ. mol}^{-1}$ . La fourniture de cette énergie est également assurée (indirectement) par l'ATPase.



#### VIII - CONCLUSION.

L'analyse critique des résultats expérimentaux obtenus nous amène à penser que le transporteur du citrate fonctionne selon un échange couplé entre la forme  $\text{RH}^{2-}$  et un proton, avec la possibilité d'un flux compensatoire de  $\text{Mg}^{2+}$  ( ou d'un autre ion ) entraînant une diminution de son électrogénicité. En complément, nous indiquons que la forme perméante  $\text{RH}^{2-}$  est piégée par le magnésium intra-vésiculaire, le déplacement des équilibres au pH du milieu interne allant dans le sens d'une accumulation du citrate sous une forme non perméante (résultant du complexage de la forme perméante  $\text{RH}^{2-}$  par le magnésium).

On peut, tout d'abord, examiner, dans le cadre de cette hypothèse, la capacité de rétention de citrate par les vésicules dans différentes conditions et se demander, dans quelle mesure, les résultats prévus (par les simulations) correspondent aux résultats obtenus.

Dans un second temps, nous comparerons la situation observée au niveau du vacuome du latex d'*Hevea brasiliensis* avec celles décrites pour les différents systèmes membranaires transportant le citrate.

##### A. LA CAPACITE D'ACCUMULATION DU CITRATE PAR LES VESICULES VACUOLAIRES.

La Figure 8.22 décrit la capacité d'accumulation des vésicules vacuolaires observées dans différentes conditions expérimentales.

Le programme de calcul, utilisé dans le cadre de l'hypothèse

se où le transporteur du citrate fonctionne selon un mécanisme antiport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^+$ , donne une estimation de la quantité de citrate qu'un compartiment vésiculaire est capable d'accumuler. C'est la valeur obtenue lorsque l'influx ( $J_{\text{in}}$ ) devient égal à l'efflux ( $J_{\text{ex}}$ ).

Différentes situations sont envisagées. Les conditions employées dans ce calcul sont celles décrites dans le texte (cf. paragraphe 6 de ce Chapitre) :

- le pH interne est considéré comme constant,
- le pH externe a la valeur indiquée, correspondant à celle rencontrée dans nos manipulations dans les différents cas de figures réalisées,
- le volume vésiculaire est estimé à  $10 \mu\text{l} \times \text{mg}^{-1}$  protéines,
- les valeurs données à l'influx ( $J_{\text{max}}^{\text{in}}$ ) et à l'efflux ( $J_{\text{max}}^{\text{ex}}$ ) sont différentes.

La valeur choisie pour l'efflux correspond à celle prise dans la plupart de nos simulations ( $9 \text{ nmol.} \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ). Mais, la valeur employée pour l'influx est définie par la relation :

$$\frac{(J_{\text{max}}^{\text{in}})}{(J_{\text{max}}^{\text{ex}})} = e^{0,0387 \times |\Psi|} \quad (8.25)$$

la différence de potentiel transmembranaire étant exprimée en mV.

Dès lors, la capacité d'accumulation du citrate par les vésicules vacuolaires est donnée en  $\text{nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$

L'examen du Tableau 8.III amène les conclusions suivantes :

- dans les conditions optimales, où le fonctionnement de l'ATPase acidifie le milieu interne (pH 6,0) et dépolarise la membrane vésiculaire (le  $\Delta\Psi$  passant de -100 à -10 mV), la capacité d'accumulation est maximale lorsque le flux de citrate est couplé à un flux de  $\text{Mg}^{2+}$  et lorsque la charge nette transportée est égale à -1 (situation 1). La valeur obtenue correspond à la concentration généralement observée in vivo (40 mM).

- la seule présence de  $Mg^{2+}$  dans le milieu interne (entraînant la formation de complexes RM imperméants) n'est pas suffisante pour expliquer l'accumulation observée de citrate (situation 2).
- la variation de la différence de potentiel membranaire est fondamentale (situation 3). Ainsi, si la dépolarisation induite par le flux de protons n'a pas lieu, l'accumulation est pratiquement nulle.
- l'absence de gradient transmembranaire de pH diminue considérablement l'incorporation de citrate (situation 4). Toutefois, il faut remarquer qu'une alcalinisation du milieu interne favorise la formation du complexe imperméant RM. D'où une capacité d'accumulation non négligeable malgré la dissipation du gradient de pH initial.
- le contenu interne en  $Mg^{2+}$  favorise l'accumulation mais son effet s'avère moins important que celui du  $\Delta pH$  (situation 6).
- l'accumulation est pratiquement nulle lorsque l'antiport  $3H^{2+}/H^{+}$  ne fonctionne pas (situation 5).

Ces conclusions reflètent bien les résultats expérimentaux obtenus dans ces conditions. En conséquence, le modèle proposé semble plausible.

La plupart des courbes décrites dans ce mémoire ont pu être reconstituées dans les simulations faites à partir de ce modèle.

Il est évident qu'il convient d'en vérifier le bien-fondé sur des vacuoles fraîchement isolées, tout ce travail ayant été effectué sur des vésicules vacuolaires. A défaut de pouvoir le faire, nous espérons vivement que cette vérification soit réalisée dans un temps proche.

#### B. COMPARAISON AVEC LES DIFFERENTS AUTRES SYSTEMES MEMBRANAIRES TRANSPORTANT LE CITRATE.

##### 1) Le tonoplaste des plantes crassulacées.

On trouve toujours les acides organiques en fortes concen-



trations dans le vacuome des végétaux supérieurs. On leur attribue des fonctions multiples. L'une d'entre elles serait de maintenir le cytoplasme à un pH constant (F.A. SMITH et J.A. RAVEN, 1976).

Mais, les seules études faites sur leur transport au niveau du tonoplaste sont réalisées chez les plantes crassulacées. Ce sont des plantes particulières en ce sens qu'elles accumulent le malate pendant la nuit et qu'elles le métabolisent le jour. D'où les études nombreuses dont elles font l'objet.

Dans une revue récente, U. LUTTGE (1980) pose les différents problèmes relatifs au transport du malate au niveau du tonoplaste. Plus particulièrement, cet auteur s'intéresse au couplage du flux actif de malate avec le fonctionnement d'une activité ATPase tonoplastique.

Comme il le souligne, on ne peut concevoir le transport du malate sous une forme non dissociée. En effet, à pH 7,5, le malate est sous la forme deux fois dissociée. Il existe donc un transporteur tonoplastique.

Quelles que soient les conditions expérimentales employées, en présence ou non de cations lipophiles, qui s'avèrent modifier uniquement la partie active du flux de malate, la stoechiométrie  $H^+$ /malate reste toujours égale à 2. En conséquence, le couplage entre le flux de protons et celui de malate est donc strict. De plus, comme le malate est sous une forme deux fois dissociée, au pH du cytoplasme, on doit en conclure que le mécanisme du transport de cet acide organique au niveau du tonoplaste correspond à une pompe-à-protons entraînant le flux de malate (U. LUTTGE et E. BALL, 1979 et 1980). Selon ces auteurs, ces deux systèmes ne seraient pas indépendants l'un de l'autre.

Ces résultats sont particulièrement intéressants et ils rappellent dans une certaine mesure ce que nous décrivons pour le citrate. La pompe-à-protons entraîne le transporteur du citrate au niveau de la membrane vacuolaire du latex d'*Hevea brasiliensis*. Mais, les deux systèmes sont indépendants l'un de l'autre : l'ATPase assure un influx de protons alors que le transporteur du citrate échange une molécule de citrate contre un proton (correspondant à un efflux).

## 2) Les membranes mitochondriales.

Beaucoup de revues sont consacrées aux différents aspects du transport des anions au niveau des mitochondries (J.B. CHAPPELL,

1968 ; J.B. CHAPPELL et R.H. ROBINSON, 1968 ; A.J. MEIJER et K. VAN DAM, 1974). Il en découle que la plupart des acides carboxyliques, excepté l'acide acétique, nécessite un transporteur, qui assure le transfert d'une forme ionisée. En effet, au pH du cytoplasme, le  $pK_a$  étant très faible, la concentration de la forme non ionisée est très faible ( $10^{-6}$  à  $10^{-5}$  M).

Les travaux de F. PALMIERI et E. QUAGLIARIELLO (1969) ont développé les idées de P. MITCHELL (1966 et 1968). Ces auteurs ont démontré qu'une force motrice protonique était développée au niveau des membranes mitochondriales. Sa composante osmotique ( $\Delta pH$ ) tend à alcaliniser le milieu interne.

On doit remarquer que, chez les végétaux, les mitochondries sont moins énergisées. Les valeurs trouvées pour le  $\Delta\psi$  et pour le  $\Delta pH$  sont plus faibles (D.W. JUNG et G.G. LATIES, 1979). Ce n'est pas la seule différence. Leur contenu endogène en substrats échangeables est plus réduit.

Toutefois, c'est la composante osmotique ( $\Delta pH$ ) qui permet, au anions ( $A^{n-}$ ) de s'accumuler par échange avec  $n OH^-$ . Un processus par symport ( $A^{n-}$  accompagné par  $n H^+$ ) est également possible (P. MITCHELL, 1968).

Dès lors, on s'attend à avoir la relation :

$$\frac{A^{n-}_{in}}{A^{n-}_{ex}} = \frac{(H^+)_{ex}^n}{(H^+)_{in}^n} \quad (8.26)$$

Cette relation est vérifiée dans la plupart des cas décrits dans la littérature, pour des mitochondries, en absence de respiration (F. PALMIERI et al., 1979 ; F. PALMIERI et E. QUAGLIARIELLO, 1969 ; S. PAPA et al., 1971).

On comprend dès lors par quel mécanisme le  $\Delta pH$  existant au niveau de la membrane mitochondriale contrôle la distribution de l'acide citrique, et plus généralement celle de la plupart des métabolites.

Par ailleurs, leur transport correspond à un échange électriquement compensé (cf. K.F. LA NOUE et A.C. SCHOOLWERTE, 1979). Pour sa part, le citrate est échangé avec un malate (B.H. ROBINSON, 1973). Or, ce mouvement, correspondant au transfert net d'une charge, ne développe

pas un potentiel transmembranaire négatif. En conséquence, l'incorporation de citrate s'accompagne d'un flux compensatoire d'une charge positive. Il correspond à un flux de protons. Les mesures des mouvements de  $H^+$  accompagnant l'accumulation du citrate donnent une stoechiométrie  $H^+$ /citrate égale à l'unité (S. PAPA et al., 1971).

C'est une différence fondamentale avec le transport du citrate observé au niveau de la membrane vacuolaire.

### 3) Les membranes bactériennes.

Dans sa revue consacrée aux transports de solutés couplés aux protons chez les micro-organismes, A.A. EDDY (1978) évoque le transport du citrate chez les différentes bactéries.

L'accumulation du citrate est observée chez *Azotobacter vinelandii* (P.W. POSTMA et K. VAN DAM, 1971), chez *Aerobacter aerogenes* (R.G. EAGON et L.S. WILKERSON, 1972), chez *Bacillus subtilis* (K. WILLECKE et al., 1973 ; P. OEHR et K. WILLECKE, 1974), chez *Proteus mirabilis* ou *vulgaris* (K. IMAI, 1977 et 1978) ou encore chez *Salmonella typhimurium* (K. IMAI et al., 1973 ; N.W. KAY et M. CAMERON, 1978 ; G.D. SWEET et al., 1979 ; D.M. ASHTON et al., 1980).

Ce transport implique de l'énergie : les vésicules formées à partir de membranes de *Klebsiella aerogenes* n'incorporent du citrate que dans la mesure où elles peuvent oxyder du D-lactate (C.L. JOHNSON et al., 1975).

L'inhibition du transport du citrate chez *Salmonella typhimurium* par les protonophores (FCCP,...) et par les inhibiteurs de l'ATPase membranaire (CCCP, DCCD,...) suggérerait la participation d'une pompe-à-protons dans ce processus (N.W. KAY et M. CAMERON, 1978). Or, il n'en est rien. Des souches mutantes sans ATPase peuvent incorporer le citrate. En conséquence, l'hydrolyse de l'ATP n'est le facteur primordial. Il s'agirait davantage du gradient électrochimique de protons que l'ATPase est susceptible de mettre en place.

De plus, l'influence des ionophores, comme la valinomycine et la gramicidine pose le problème de l'intervention des ions dans ce transport. Il serait dépendant du potassium (et du sodium) chez *Aerobacter aerogenes* (R.G. EAGON et L.S. WILKERSON, 1972 ; L.S. WILKERSON et R.G. EAGON, 1972 ; R.G. EAGON et M.A. ASHBELL, 1966).

L'ion  $\text{Na}^+$  semble plus spécifique : chez *Klebsiella aerogenes* (C.I. JOHNSON et al., 1975).

Par ailleurs, l'intervention du magnésium est décrite chez *Bacillus subtilis* (K. WILLECKE et al., 1973 ; P.OEHR et K. WILLECKE, 1974) mais aussi chez *Salmonella typhimurium* (K. IMAI et al., 1973) et chez *Proteus mirabilis* (K. IMAI, 1978). Toutefois, il faut remarquer que le travail de l'équipe de K. IMAI a mis en évidence plusieurs systèmes de transporteurs du citrate, et plus généralement des acides tricarboxyliques (au plus 3), l'un d'entre eux étant activable par le magnésium.

Les travaux de K. WILLECKE et al. (1973) effectués chez *Bacillus subtilis* débouchent sur des résultats intéressants. L'incorporation de citrate est stimulée par un facteur de 10 par le magnésium. Des quantités stoechiométriques de citrate et de magnésium sont absorbées, avec des constantes cinétiques comparables. Ces auteurs en déduisent que le citrate et le magnésium formeraient un complexe, qui serait la véritable substrat du transporteur. L'électroneutralité sera réalisée par le développement d'un flux (de charge) compensatoire de  $\text{K}^+$  voire de protons. Mais, le mécanisme par lequel la charge négative, portée par le complexe citrate- $\text{Mg}^{2+}$ , est neutralisée (dans la mesure où elle l'est), n'est pas connu.

La situation n'est pas simple. Dans certains cas, la protéine fixant le citrate (assimulée au transporteur), la protéine C, a été isolée de *Salmonella typhimurium* (G.D. SWEET et al., 1979). Une étude de fixation de ligands, selon la méthode de G. SCATCHARD (1949), indique que le  $\text{Mg}^{2+}$  inhibe et ne favorise pas la fixation du citrate.

Par ailleurs, H.G. LAWFORD et G.R. WILLIAMS (1971 et 1972) montrent que le transport du citrate se ferait, du moins chez *Pseudomonas fluorescens*, selon le modèle évoqué par E.J. HARRIS et J.R. MANGER (1968) pour les mitochondries. Il est nécessaire de remarquer que la sensibilité de ce transporteur aux inhibiteurs mitochondriaux (en particulier, le 2-éthyl-citrate et le benzène-1,2,3-tricarboxylate) n'est pas la même. De plus, ces auteurs n'observent pas cet antiport malate/citrate typique du fonctionnement du transporteur mitochondrial (cf. K. LA NOUE et A.C. SCHOOLWERTH, 1979).

En conséquence, plusieurs transporteurs de l'acide citrique semblent exister au niveau des membranes bactériennes. Mais, à notre

connaissance, aucune étude n'a été faite sur leur fonctionnement. Tout reste à faire.

### C. BILAN.

Le modèle décrit pour le transport du citrate au niveau du tonoplaste est sensiblement différent de celui décrit pour les mitochondries.

Dans un cas, il s'agit d'un antiport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^+$  électrogène alors que, dans l'autre, il correspond à un échange  $\text{RH}^{2-}$ /malate électriquement compensé.

L'étude du transporteur du citrate vacuolaire par lui-même n'a pas été complètement faite. Une étude comparative avec le transporteur mitochondrial pourrait être envisagée, pour établir les analogies et les différences existantes en étudiant sa spécificité vis-à-vis de différents substrats (autres que le citrate), l'action d'inhibiteurs spécifiques autres que ceux qui modifient l'activité ATPase, ... Ainsi, différents inhibiteurs du transporteur du citrate mitochondrial sont connus : 1,2,3-propane-tricarboxylate (F. PALMIERI et al., 1972) ; 1,2,3-benzène-tricarboxylate (F. PALMIERI et al., 1972); 2-éthyl-citrate (R.H. ROBINSON, 1970); ... Ils pourraient être testés sur les vésicules vacuolaires. C'est tout un ensemble d'études qu'il conviendrait d'effectuer.

Il faut toutefois remarquer que les recherches sur le vacuome végétal sont récentes, contrairement à celles effectuées sur le compartiment mitochondrial. Les vacuoles du latex d'*Hevea brasiliensis* constituent, à notre connaissance, le seul matériel où est démontré que l'ATPase membranaire fonctionne comme une pompe-à-protons électrogénique et qu'elle fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement du transporteur du citrate. Le mécanisme intime du couplage reste à élucider.

CHAPITRE IX

CONCLUSION

GENERALE



Au terme de cette étude, qui s'inscrit parfaitement dans le cadre des recherches actuelles sur le vacuome végétal (cf. P. MATILE, 1978, et W. LIN et al., 1980), il nous semble nécessaire de rappeler les principaux faits que nous pouvons dégager des résultats obtenus avec les vésicules formées à partir des membranes vacuolaires lyophilisées isolées du latex d'*Hevea brasiliensis*.

Ce rappel concerne plus particulièrement les relations entre l'absorption du citrate, son accumulation et l'état énergétique des vésicules vacuolaires.

Nous insisterons sur les interprétations possibles que suggèrent ces résultats et sur les perspectives de recherche qui en découlent.

- la formation de vésicules aptes à incorporer le citrate et à hydrolyser l'ATP.

Le latex d'*Hevea brasiliensis* constitue un matériel exceptionnel pour isoler de façon simple de grandes quantités de vacuoles intactes (cf. S. PUJARNISCLE, 1971, et J. D'AUZAC et al, 1977 a et b). Deux centrifugations différentielles sont suffisantes. On peut effectuer une centrifugation sur gradient de saccharose ou de dextrane pour parfaire la purification. Dans la plupart des cas, on peut s'en dispenser. Une telle simplicité dans la préparation contraste avec les méthodes souvent sophistiquées pour obtenir ces organites à partir des végétaux



supérieurs (cf. A. ADMON et al., 1980, a et b ; D.P. BRISKIN et R.T. LEONARD, 1980 ; H. CANUT, 1980 ; R. SCHMIDT et R.J. POOLE, 1980 ; R. KRINGSTAD et al., 1980).

La lyophilisation des fractions purifiées de vacuoles ainsi obtenues et exemptes de toute contamination ne modifie pas leurs propriétés natives. Elles conservent la plupart des activités constatées in vivo, plus particulièrement leur capacité d'incorporer le citrate (cf. J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974) et celle d'hydrolyser l'ATP (cf. J. D'AUZAC, 1975 et 1977). Dès lors, on a pu les étudier en essayant de dégager leurs relations éventuelles. En effet, maintes fois, il a été suggéré que l'activité ATPase vacuolaire entraînait le transport du citrate (cf. J. D'AUZAC et al., 1977 a, B. MARIN, 1979 a et b, ou B. MARIN, A.J.C. SMITH et U. LUTTGE, 1981, par exemple).

On conçoit tout l'intérêt que suscite la formation de vésicules vacuolaires fonctionnelles dans ce type d'études, comme le suggère J.E. LEVER (1980).

- l'incorporation de citrate par les vésicules vacuolaires.

Dans ce travail, nous démontrons que l'incorporation de citrate s'effectue contre un gradient transmembranaire de concentration, en absence de toute source métabolique. Elle suit une cinétique souvent linéaire pendant au moins 30 mn. Mais, elle est plus fréquemment hyperbolique.

Par ailleurs, on obtient une cinétique michaelienne en fonction de la concentration en citrate du milieu extérieur. Elle dépend à la fois de la température et du pH.

Toutes ces propriétés sont comparables à celles observées sur les vacuoles in vivo (cf. J. D'AUZAC et C. LIORET, 1974).

Nous remarquons que l'incorporation du citrate par les vésicules vacuolaires est importante à un pH externe où les formes deux et trois fois dissociées (respectivement  $RH^{2-}$  et  $R^{3-}$ ) sont les plus représentées. Nous supposons que la forme transportée est  $RH^{2-}$ . C'est l'hypothèse de travail que nous avons retenue.

La cinétique d'incorporation hyperbolique (souvent obtenue) peut s'expliquer de plusieurs façons selon que l'on admet l'existence d'un ou de deux transporteurs membranaires.

Parmi les différentes hypothèses qu'il est possible de formuler, l'une d'entre elles est particulièrement séduisante. Elle suggère l'existence de deux pools cinétiques de citrate, présents dans ce compartiment vésiculaire : l'un, de taille réduite, représenté par la forme perméante, l'autre, de taille plus importante (il contiendrait l'essentiel du citrate vésiculaire), correspondant à la forme non perméante (pouvant s'identifier au complexe se formant entre la forme  $R^{3-}$  et le magnésium). Les simulations la rendent très probable.

Par ailleurs, cette incorporation de citrate s'accroît en présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup>, le substrat de l'ATPase vacuolaire (J. D'AUZAC, 1975 et 1977). Elle se trouve considérablement diminuée en présence, soit de découplants (2,4-dinitro-phénol), soit de protonophores (FCCP, S-13), soit d'inhibiteurs de l'activité ATPase (DCCD). Mais, elle se trouve aussi modifiée par l'addition de toute molécule lipophile (TPP<sup>+</sup> à forte concentration) ou de tout ionophore (valinomycine en présence de KCl) connus pour diminuer le potentiel membranaire pré-existant. Elle semble dépendante aussi du potentiel membranaire. En conséquence, la force motrice protonique interviendrait dans ce processus (B. MARIN, A.J.C. SMITH et U. LUTTGE, 1981).

Tous ces résultats indiquent que l'incorporation de citrate par les vésicules vacuolaires équivaut à un transport actif [selon les critères exposés par P.S. NOBEL (1974) ou par U. LUTTGE et N. HIGINBOTHAM (1979)]. Contrairement à ce que peuvent affirmer D.P. BRISKIN et R.T. LEONARD (1980), concernant le mouvement des solutés au niveau du tonoplaste, le transport du citrate ne peut être assimilé à une diffusion facilitée.

- le fonctionnement antiport du transporteur du citrate.

Nous avons toutes raisons de penser que la force motrice protonique intervient dans ce processus (B. MARIN et al, 1980 ; B. MARIN, A.J.C. SMITH et U. LUTTGE, 1981).

Toutefois, au niveau du plasmalemme ou des membranes bactériennes, où elle est importante (cf. C.W. SLAYMAN et C.L. SLAYMAN, 1975 ; S. RAMOS et al., 1976 ou, F.M. HAROLD, 1977 a et b), elle entraîne la plupart des systèmes de transport des solutés par symport (cf.

D.A. BAKER, 1978 ; E. KOMOR et W. TANNER, 1979, ou A.A. EDDY, 1978).

Or, au niveau du tonoplaste, à en croire les mesures de  $\Delta pH$  et de  $\Delta \Psi$  obtenues, la force motrice protonique est plus réduite. Il ne peut dès lors s'agir que d'un antiport comme le suggèrent M. GUY et al. (1979 et 1980).

Cette hypothèse est renforcée par le fait que le transport du citrate s'accompagne d'une alcalinisation du milieu interne et d'une acidification du milieu externe lorsque la pompe-à-protons ne fonctionne pas (ou peu).

Aucun élément de référence existe dans la littérature excepté les travaux effectués sur les plantes crassulacées (cf. U. LUTTGE, 1980). Le transport de l'acide malique au niveau du tonoplaste s'effectuerait selon un mécanisme symport (U. LUTTGE et E. BALL, 1979 et 1980).

En effet, le transport du citrate a été étudié essentiellement chez les bactéries (cf. K. WILLECKE et al., 1973, ou P. OEHR et K. WILLECKE, 1974) et au niveau des membranes mitochondriales (cf. A. SCARPA, 1979, ou K.F. LA NOUE et A.C. SCHOOLWERTH, 1979). Il est alors généralement admis que ce transport correspond à un échange électriquement compensé couplé entre, d'une part, une molécule de citrate et, d'autre part, une molécule d'acide malique et un proton (cf. S. PAPA et al., 1970 ; S. PAPA et al., 1971 ; F. PALMIERI et al., 1977, ou B.H. ROBINSON, 1973). C'est moins évident chez les bactéries (cf. H.G. LAWFOORD et G.R. WILLIAMS, 1971 et 1972).

Par conséquent, l'hypothèse que nous formulons est originale. Nombreuses sont les tentatives actuelles pour intégrer les différents transports de solutés dans la théorie chemiosmotique de P. MITCHELL (1961, 1966, 1968, 1970, 1972, 1973 a et b, 1974, 1976, et 1979) comme l'indiquent les revues de F.M. HAROLD (1977 a et b) ou d'A.A. EDDY (1978). Pour notre part, les résultats obtenus ne nous permettent pas de décrire le transport du citrate selon l'élégant schéma que propose cet auteur : un mécanisme symport avec  $H^+$ . Mais, nous pensons qu'il s'agit là d'une simplification extrême et qu'en réalité, le fonctionnement de tous ces transporteurs est plus complexe (cf. J.A. RAVEN et F.A. SMITH, 1980).

- le fonctionnement de l'ATPase selon une pompe-à-protons.

Comme nous l'avons indiqué, les travaux concernant les activités vacuolaires sont rares et ambiguës (D.P. BRISKIN et R.T. LEONARD, 1980 ; I.J. METTLER et R.T. LEONARD, 1979) excepté ceux de R.A. LEIGH et R.R. WALKER (1980) ou d'A. ADMON et al. (1980·b). La méthode introduite par J. D'AUZAC (1975 et 1977), consistant à inhiber l'activité phosphatase acide vacuolaire par le molybdate d'ammonium, s'est généralisée et a permis de progresser très rapidement.

Nous avons démontré pour les vacuoles, conservées dans la glace (B. MARIN et al., 1981 a), et pour les vésicules vacuolaires, que toute addition d'ATP-Mg<sup>2+</sup> pour le milieu externe s'accompagne simultanément d'une dépolarisation de la membrane vésiculaire et d'une acidification du milieu interne.

Par ailleurs, l'effet du pH du milieu externe sur l'amplitude de ces deux phénomènes est comparable à celui observé sur l'ATPase insensible au molybdate dans le milieu utilisé (B. MARIN et al., 1981 a).

Cette dépolarisation et cette acidification sont spécifiques du fonctionnement de l'ATPase vacuolaire car elles sont simultanément modifiées par les inhibiteurs de cette activité.

En conséquence, cette pompe électrogène (correspondant à une dépolarisation membranaire), induite par l'ATP-Mg<sup>2+</sup>, semble correspondre à l'ATPase vacuolaire membranaire. En effet, en reprenant les conclusions de N.A. WALKER et F.A. SMITH (1977) et celles plus récentes de R.M. SPANSWICK (D.W. KEIFER et R.M. SPANSWICK, 1978 et 1979 ; R.M. SPANSWICK, 1980) sur l'ATPase plasmalemmique, on doit en conclure que l'ATPase vacuolaire est une pompe à protons. Cette hypothèse avait été maintes fois suggérée (S. DOLL et al., 1979 ; R.A. LEIGH et R.R. WALKER, 1980 ; U. LUTTGE et E. BALL, 1979 ; J. RAVEN et F.A. SMITH, 1977, 1979 et 1980 ; W. LIN et al., 1977). Mais, à notre connaissance elle n'avait jamais été démontrée (G.J. WAGNER, communication personnelle).

Le travail d'H. CRETIN, mené de façon indépendante du nôtre et utilisant une technique différente, effectué sur les vacuoles du latex d'*Hevea brasiliensis*, aboutit aux mêmes conclusions (H. CRETIN,

1981 a et b).

Nous devons insister sur le fait que tous ces résultats s'avèrent contradictoires à ceux publiés par l'équipe de R.T. LEONARD (I.J. METTLER et R.T. LEONARD, 1979 ; D.P. BRISKIN et R.T. LEONARD, 1980). En effet, ces auteurs nient l'existence d'une activité ATPase vacuolaire fonctionnant comme une pompe-à-protons. Selon eux, l'hydrolyse de l'ATP serait due à une phosphatase acide aspécifique. Mais, on doit remarquer qu'ils n'ont pas cherché à l'inhiber. En conséquence, leurs conclusions relatives à l'énergisation des transports des solutés au niveau du tonoplaste ne sont guère démonstratives.

- l'importance de l'activité ATPase dans l'incorporation du citrate.

C'est le fonctionnement de l'ATPase en tant que pompe-à-protons qui favorise le transport du citrate en dépolarisant la membrane et en apportant l'énergie nécessaire pour lui permettre de s'effectuer contre un gradient transmembranaire de concentration.

Le transport du citrate est électrogène en soi : il hyperpolarise la membrane. Mais, l'existence d'un potentiel transmembranaire négatif important en limite l'amplitude. On comprend dès lors pourquoi ce transport sera d'autant plus grand que la membrane est plus dépolarisée, cette dépolarisation étant consécutive au fonctionnement de l'ATPase. Une modification progressive des constantes cinétiques induite par la polarisation membranaire s'avère une hypothèse plausible susceptible de rendre compte des résultats obtenus.

Par ailleurs, on comprend dès lors le parallélisme qui existe entre le fonctionnement de l'ATPase et le transport du citrate. Toute inhibition de l'ATPase a pour effet de diminuer l'incorporation de citrate. Toutefois, les deux processus sont indépendants l'un de l'autre, les vésicules pouvant absorber du citrate en absence d'ATP. Le couplage ne semble donc pas aussi étroit que celui décrit pour le transport du malate chez *Kalanchoe daigremontiana* (U. LUTTGE et E. BALL, 1980).

- l'importance de l'intervention du magnésium dans l'incorporation du citrate et son accumulation.

Malgré le peu de données expérimentales dont nous disposons, le  $Mg^{2+}$  étant un ion difficile à analyser cinétiquement dans les conditions employées (cf. A. SCARPA, 1979), nous en sommes arrivés à considérer son intervention au moins à deux niveaux :

- au niveau de l'incorporation, en évoquant la possibilité d'un flux compensatoire (de façon à atténuer l'électrogénicité du transport, la charge nette transportée passant alors de - 3 à -1).
- au niveau de l'accumulation, par déplacement des équilibres dans le sens de l'accumulation d'une forme non perméante (très probablement le complexe formé entre  $R^{3-}$  et  $Mg^{2+}$ ).

Cette interprétation (résultant de simulations) est compatible avec le fonctionnement du transporteur selon un mécanisme antiport et avec l'existence de deux pools cinétiques de citrate, l'un correspondant à la forme perméante  $RH^{2-}$ , l'autre à la forme RM.

Le mécanisme de couplage existant entre le flux de  $RH^{2-}$  et le flux de magnésium ne nous est pas connu. Toutefois, les simulations indiquent que la forme transportée ne saurait être le complexe formé entre le citrate et le magnésium comme le suggère K. WILLECKE et al., (1973) chez *Bacillus subtilis*.

Par ailleurs, la présence de magnésium dans le milieu intravésiculaire est essentielle. Elle entraîne une diminution du potentiel électrochimique de la forme perméante dans le vacuome. En effet, par le jeu des équilibres et leur déplacement dans le sens d'une accumulation de la forme RM, l'essentiel de la forme perméante  $RH^{2-}$  se trouve piégé par le magnésium. Il en résulte un abaissement de la concentration interne de la forme perméante.

La différence de potentiel électrochimique réelle de cette forme est plus faible que celle estimée généralement. L'exigence énergétique impliquée dans un tel déplacement (contre un gradient de concentration amoindri) s'en trouve réduit d'autant.

L'ensemble de ces résultats débouche sur une hypothèse de travail séduisante : le fonctionnement du transporteur du citrate selon un mécanisme antiport, associé à la formation, dans le milieu interne, d'une forme non perméante (avec le magnésium), un flux de magnésium (ou d'un autre ion) pouvant compenser partiellement l'électrogénicité du transport.

Ce travail a été effectué sur des vésicules formées à partir de membranes vacuolaires lyophilisées ayant conservé une partie de leurs propriétés initiales. En conséquence, il conviendra de vérifier le bien-fondé de cette hypothèse sur les vacuoles fraîchement isolées.

On se heurtera au problème de la contribution de l'effet Donnan dans la distribution transmembranaire des protons et des ions perméants (cf. les travaux de l'équipe de J.M. TAGER, en particulier ceux de D.J. REIJNGOUD (1978) et de M. HOLLEMANS (1981), qui s'opposent à ceux de D. SCHNEIDER (1979 a et b), sur les lysosomes isolés du foie de rat). Les difficultés qui en résultent sont à l'origine des querelles concernant l'existence et le fonctionnement d'une ATPase membranaire lysosomale (D.L. SCHNEIDER, 1979 a et b ; D.L. SCHNEIDER et E. CORNELL, 1978 ; R. HENNING, 1975 ; M. HOLLEMANS et al., 1979 ; M. HOLLEMANS et al., 1980).

La poursuite de ce travail devrait naturellement correspondre, d'une part, à la confirmation du rôle joué par le magnésium dans ce mécanisme de transport et d'accumulation, et, d'autre part, à l'isolement des différents systèmes intervenant dans l'incorporation du citrate, le transporteur et la pompe-à-protons qui l'entraîne.

Nous pensons qu'il faut isoler le transporteur du citrate malgré toutes les difficultés qu'un tel travail implique.

L'isolement du transporteur du citrate a été effectué chez *Salmonella typhimurium* (G.D. SWEET et al., 1979) et au niveau des membranes mitochondriales (cf. F. PALMIERI et al., 1978). Dès lors, ses propriétés pourraient être mieux définies par rapport aux différents systèmes connus (cf. F. PALMIERI et al., 1969, 1970, 1972, 1977 et 1978, ou S. PAPA et al., 1970 et 1971) dans la mesure où il a conservé son état natif. L'étude devrait être alors reprise selon la méthode décrite par A. LAGARDE sur le transport du 3-deoxy-2-oxo-D-gluconate (A. LAGARDE, 1976 et 1977 ; A. LAGARDE et B.A. HADDOCK, 1977 ; A.

LAGARDE, J.M. POUYSEGUR et F.R. STOEGER, 1973 ; A. LAGARDE et F.R. STOEGER, 1974, 1975 et 1977).

Par ailleurs, l'isolement de l'ATPase vacuolaire permettrait de mieux connaître le fonctionnement de cette pompe-à-protons et d'en dégager ses particularités par rapport aux autres.

L'idéal serait alors de pouvoir greffer ces deux systèmes sur des structures liposomales et reconstituer le fonctionnement du transporteur du citrate, entraîné par l'ATPase pompe-à-protons.

Il nous paraît intéressant, pour une meilleure compréhension du système de transport du citrate au niveau du tonoplaste, de nous orienter vers une telle approche biochimique. Elle nous permettra de mieux définir les mécanismes moléculaires de ce transport. Ce n'est qu'alors qu'il nous sera possible d'aborder les problèmes liés à sa régulation, comme le suggère R.M. SPANSWICK (1980).





## B I B L I O G R A P H I E



- ADDANKI S. et SOTOS J.F., 1969 - Observations on intra-mitochondrial pH and ion transport by the 5,5-dimethyl-2,4-oxazolidine-dione (DMO) method.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 147 : 756-804.
- ADMON A., JACOBY B. et GOLDSCHMIDT E.E., 1980 (a) - Assessment of cytoplasmic contaminations on isolated vacuole preparations.  
*Plant Physiol.*, 65 : 85-87.
- ADMON A., JACOBY B. et GOLDSCHMIDT E.E., 1980 (b) - Investigations on isolated vacuoles in II<sup>nd</sup> Congress of Federation of European Societies of Plant Physiology, Santiago de Compostela, 27 juillet-1er Août 1980,  
*Abstracts of lectures and poster demonstrations*, p. 164.
- ALTENDORF K., HIRATA H. et HAROLD F.M., 1975 - Accumulation of lipid-soluble ions and of rubidium as indicators of the electrical potential in membrane vesicles of *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem.*, 250 : 1405-1412.
- ANDREWS E.H., et DICKENSON P.B., 1961 (a) - Preliminary electron microscope observations on the ultrastructure of the latex vessel and its contents in young tissues of *Hevea brasiliensis*,  
*Proc. Nat. Rubb. Res. Conf.*, Kuala Lumpur, 1960, : 756-765.
- ANDREWS E.H. et DICKENSON P.B., 1961 (b) - Observations préliminaires en microscopie électronique sur l'ultrastructure des vaisseaux laticifères et du latex dans les tissus jeunes de l'*Hevea brasiliensis*.  
*Rev. Gén. Caout. Plast.*, 38 : 397-402.
- APPS D.K. et SCHATZ G., 1979 - An adenosine triphosphatase isolated from chromaffin granule membranes is closely similar to F<sub>1</sub>-adenosine triphosphatase of mitochondria.  
*Eur. J. Biochem.*, 100 : 411-419.
- ARCHER B.L., AUDLEY B.G., Mc SWEENEY G.P. et TAN C.H., 1969 - Studies on the composition of latex serum and bottom fraction particle.  
*J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21 : 560-569.

- ARCHER B.L., BARNARD D., COCKBAIN E.G., DICKENSON P.B. et Mc MULLEN A.I., 1963 - Structure, composition and biochemistry of Hevea latex in L. BATEMAN, *The chemistry and Physics of Rubber-like substances* : 43-54, Mc LAREN and sons, Ltd, Londres.
- ASGHAR S.S., LEVIN E. et LEVIN F.M., 1973 - Accumulation of neutral amino-acids by *Streptococcus faecalis* : Energy coupling by a protonmotive force. *J. Biol. Chem.*, 248 : 5225-5233.
- ASHTON R. et STEINRAUF L.K., 1970 - Thermodynamic consideration of the ion transporting antibiotics. *J. mol. biol.*, 49 : 547-556.
- ASHTON D.M., SWEET G.D., SOMERS J.M. et KAY W.W., 1980 - Citrate transport in *Salmonella typhimurium* : Studies with 2-fluoro-L-erythro-citrate as a substrate. *Can. J. Biochem.*, 58 : 797-803.
- D'AUZAC J., 1965 - Etude de quelques réactions métaboliques liées, au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*, à la biogénèse du caoutchouc. *Thèse de Doctorat d'Etat, Sciences Naturelles, Université de Paris* , C.N.R.S. n° A-4600.
- D'AUZAC J., 1975 - Caractérisation d'une ATPase membranaire en présence d'une phosphatase acide dans les lutoïdes d'*Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 14 : 671-675.
- D'AUZAC J., 1976 - Etude d'une ATPase liée à la membrane de vacuoles lysosomales : les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 17 : 357-360.
- D'AUZAC J., 1977 - ATPase membranaire de vacuoles lysosomales : les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 16 : 1881-1885.
- D'AUZAC J., 1978 - Intervention des ATPases des plantes supérieures dans l'absorption des solutés. *Physiol. Vég.*, 16 : 37-65.
- D'AUZAC J. - Une  $\alpha$ -mannosidase dans un système vacuolaire végétal : les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, à paraître.

- D'AUZAC J., BRZOWSKA J., HANOWER P., LAMBERT C. et LIORET C., 1977 -  
Un modèle de structure vacuolaire isolée intacte : les  
lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* : I. Accumulation  
et pénétration d'ions organiques dans le compartiment lutoï-  
dique.  
*in* THELLIER M., MONNIER A., DEMARTY M., DAINY J., *Echanges  
ioniques transmembranaires chez les végétaux, Colloque  
International du C.N.R.S., Rouen, Juillet 1976* : 391-398,  
*Editions de l'Université de Rouen et Editions du CNRS.*
- D'AUZAC J. et LIORET C., 1974 - Mise en évidence d'un mécanisme d'ac-  
cumulation du citrate dans les lutoïdes du latex d'*Hevea  
brasiliensis* (Kunth) Müll.-Arg.  
*Physiol. végé.*, 12 : 617-635.
- D'AUZAC J., DUPONT J., JACOB J.L., LANCE C., MARIN B. et MOREAU F.,  
1977 - Un modèle de structure vacuolaire isolée intacte :  
les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. II. Caractéris-  
tiques de la membrane lutoïdique.  
*in* THELLIER M., MONNIER A., DEMARTY M., et DAINY J., *Echan-  
ges ioniques transmembranaires chez les végétaux, Colloque  
International du C.N.R.S., Rouen, Juillet 1976* : 399-406,  
*Editions de l'Université de Rouen et Editions du CNRS.*
- D'AUZAC J. et JACOB J.L., 1969 - Regulation of glycolysis in latex  
of *Hevea brasiliensis*.  
*J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, : 417-444.
- D'AUZAC J. et PUJARNISCLE S., 1959 - Recherches sur l'aspect organique  
du métabolisme du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
*Institut de recherches sur le caoutchouc au Viet-Nam, Rap-  
port annuel* : 49-50 et 58-59.
- BAKEEVA L.E., GRINIUS L.L., JASAITIS A.A., KULIENE V.V., LEVITSKY D.D.,  
LIBERMAN E.A., SEVERINA I.I. et SKULACHEV V.P., 1979 - Conver-  
sion of biomembrane-produced energy into electric form :  
II. Intact mitochondria.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 216 : 13-21.
- BAKER D.A., 1978 - Proton transport of organic solutes by plant cells.  
*New Phytol.*, 81 : 485-498.

- BARROW G.M., 1976 - Chimie physique. Tome 1 : Bases de la thermodynamique chimique. Etude de la liaison chimique.  
*Masson Editeur, Paris, New York, Barcelone et Milan.*
- BENTRUP F.W., 1980 - Electrogenic membrane transport in plants. A review.  
*Biophys. Struct. Mech.*, 6 : 175-189.
- BERMEYER H.U., 1974 - Methods of Enzymatic Analysis.  
*Verlag chemie, Weinheim, et Academic Press, New York et Londres.*
- BOBILIOFF W., 1923 - Anatomy and Physiology of *Hevea brasiliensis*.  
*Institut Orell Füssli, Zurich.*
- BOLLER T., 1977 - Die arginin-permease der Hefevakuole.  
*Ph. D. Thesis E.T.H. n° 5928, Swiss Federal Institut of Technology, Zurich, 224 p.*
- BOLLER T., DURR M. et WIEMKEN A., 1975 - Characterization of a specific transport system for arginine in isolated yeast vacuoles.  
*Eur. J. Biochem.*, 54 : 81-91.
- BOLLER T. et KENDE H., 1979 - Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells.  
*Plant physiol.*, 63 : 1123-1132.
- BONTING S.L., DE PONT J.J.H.H.M., VAN AMELSVOORT J.M.M. et SCHRIJEN J.J., 1980 - Transport ATPases in anion and proton transport.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 341 : 335-354.
- BOYER P.D., 1974 - Conformational coupling in biological energy transductions  
*Biochimica Biophysica Acta Library*, 13 : 289-301.
- BOWLING D.J.F., 1976 - Uptake of ions by plant roots  
*Chapman and Hall, Londres.*
- BOWLING D.J.F. et DUNLOP J., 1978 - Uptake of phosphate by white clover :  
I. Evidence for an electrogenic phosphate pump.  
*J. Exptl. Bot.*, 29 : 1139-1146.
- BOWMAN B.J., BLASCO F., ALLEN K.E. et SLAYMAN C.W., 1980 - Plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa* : Purification and properties.  
*in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J., et DAINTY J., Plant membrane transport : Current conceptual Issues : 195-205, Elsevier : North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York. et Oxford.*

- BOWMAN B.J., BLASCO F. et SLAYMAN C.W., 1978 - Biochemical characterization of the electrogenic proton pump of the *Neurospora* plasma membrane.  
*in* DUTTON P.L., LEIGH J.S. et SCARPA A., *Frontiers of biological energetics*, vol. 1 : 525-533, Academic Press, New-York.
- BOWMAN B.J., MAINZER S.E., ALLEN K.E. et SLAYMAN C.W., 1978 - Effects of inhibitors on the plasma membrane and mitochondrial adenosine-triphosphatase of *Neurospora crassa*.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 512 : 13-28.
- BOWMAN B.J. et SLAYMAN C.W., 1977 - Characterisation of plasma membrane adenosine-triphosphatase of *Neurospora crassa*.  
*J. Biol. Chem.*, 252 : 3357-3363.
- BOWMAN B.J. et SLAYMAN C.W., 1979 - The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*.  
*J. Biol. Chem.*, 254 : 2928-2934.
- BRANTON D., 1969 - Membrane structure.  
*Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20 : 209-238.
- BRAY G.A., 1960 - A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.  
*Anal. Biochem.*, 1 : 279-285.
- BRAY G.A., 1970 - The determination of radioactivity in aqueous samples  
*in* BRANSOME E.D., *The current status of liquid scintillation counting* : 170-180, Grune and Stratton Inc., New-York.
- BRIGGS G.E. et HALDANE J.B.S., 1925 - A note on the kinetics of enzyme action.  
*Biochem. J.*, 19 : 338-339.
- BRISKIN D.P. et LEONARD R.T., 1980 - Isolation of tonoplast vesicles from tobacco protoplasts.  
*Plant Physiol.*, 66 : 684-687.
- BRITTON H.T.S., 1955 - Hydrogen ions. Their determination and importance in pure and industrial chemistry.  
*Chapmann and Hall Ltd., Londres.*
- BROWNE J.L., SANFORD P.A. et SMYTH D.H., 1978 - Transfer and metabolism of citrate, succinate,  $\alpha$ -ketoglutarate and pyruvate by hamster small intestine.  
*Proc. R. Soc., London*, 200 : 117-135.



- BRZOWSKA-HANOWER J., CRETIN H., HANOWER P. et MICHEL P., 1979 -  
Variations de pH entre compartiments vacuolaire et cytoplas-  
matique au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. Influence  
saisonnière et action du traitement par l'ethrel générateur  
d'éthylène. Répercussion sur la production et l'apparition  
d'encoches sèches.  
*Physiol. Vég.*, 17 : 889-905.
- BRZOWSKA J., HANOWER P. et CHEZEAU R., 1974 - Free amino-acids of  
*Hevea brasiliensis* latex.  
*Experientia*, 30 : 894-895.
- BUTCHER H.C., WAGNER G.J. et H.W. SIEGELMAN, 1977 - Localization of  
acid hydrolases in protoplasts. Examination of the proposed  
lysosomal function of the mature vacuole.  
*Plant Physiol.*, 59 : 1093-1103.
- BUSER C. et MATILE P., 1977 - Malic acid in vacuoles isolated from  
*Bryophyllum* leaf cells.  
*Z. Pflanzenphysiol.*, 82 : 462-466.
- CABANTCHIK Z.I. et GINZBURG H., 1977 - Transport of uridine in human  
red blood cells. Demonstration of a simple carrier-mediated  
process.  
*J. Gen. Physiol.*, 69 : 75-96.
- CAMBRAIA J. et HODGES T.K., 1980 - ATPase of plasma membranes of oat  
roots.  
in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J. et DAINITY J., *Plant membrane  
transport : Current conceptual Issues* : 211-222, Elsevier :  
North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- CANUT H., 1980 - Isolement des vacuoles de cellules de *Melilotus alba*.  
Thèse de spécialité, mention Biologie végétale, Université  
Paul Sabatier, Toulouse.
- CHAPPELL J.B., 1968 - Systems used for the transport of substrates into  
mitochondria.  
*Brit. Med. Bull.*, 24 : 150-157 .
- CHAPPELL J.B. et CROFTS A.R., 1965 - Gramicidin and ion transport in  
isolated liver mitochondria.  
*Biochem. J.*, 95 : 393-402.

- CHAPPELL J.B. et CROFTS A.R., 1965 - The effect of atractylate and oligomycin on the behavior of mitochondria towards adenine nucleotides.  
*Biochem. J.*, 95 : 707-716.
- CHAPPELL J.B. et CROFTS A.R., 1966 - Ion transport and reversible volume changes in isolated mitochondria.  
*in* TAGER J.M., PAPA S., QUAGLIARIELLO E. et SLATER E.C., *Regulation of metabolic processes in mitochondria* : 293-316, Elsevier, Amsterdam.
- CHAPPELL J.B. et HAARHOFF K.N., 1966 - The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations.  
*in* SLATER E.C., KANINGA Z., et WOJTCZAK L., *Biochemistry of mitochondria* : 75-91, Academic Press, New-York.
- CHAPPELL J.B. et ROBINSON R.H., 1968 - Penetration of the mitochondrial membrane by tricarboxylic acid anions.  
*Biochem. Soc. Symp.*, 27 : 123-133.
- CHIN HA CHUNG, ELLIOTT R.L. et MEGO J.L., 1980 - Lysosomal membrane adenosine triphosphatase solubilization and partial characterization.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 203 : 251-259.
- COCKBAIN E.G. et SOUTHOORN W.A., 1962 - Structure et composition du latex d'Hevea.  
*Rev. Gen. Caout. Plast.*, 39 : 1149-1156.
- COCKING E.C., 1960 - A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles.  
*Nature*, 187 : 962-963.
- COLLOQUE SUR LA PHYSIOLOGIE DU LATEX D'Hevea brasiliensis. 1977.  
*Journées Latex, Montpellier, 9-10 Septembre 1975, Travaux et Documents ORSTOM n° 68, O.R.S.T.O.M., Paris.*
- COOK A.S. et SEKHAR B.C., 1955 - Fractions from Hevea brasiliensis latex centrifuged at 59.000 x g.  
*J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 14 : 163-167.
- COUPE M., 1977 - Etudes physiologiques sur le renouvellement du latex d'Hevea brasiliensis. Action de l'éthylène. Importance des polysibosomes.  
*Thèse de Doctorat d'Etat, Sciences Naturelles, Université de Montpellier II, U.S.T.L., Montpellier, 213 p.*

- COUPE M. et D'AUZAC J., 1972 - Mise en évidence de polysomes fonctionnels dans le latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll.-Arg.  
*C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 274 : 1031-1034.
- COUPE M. et D'AUZAC J., 1974(a)-Action de l'acide chloro-2-éthyl phosphonique (Ethrel) sur les polysomes du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll.-Arg.  
*Physiol. Vég.*, 12 : 1-11.
- COUPE M. et D'AUZAC J., 1974(b) - Caractéristiques de l'incorporation d'acides aminés par les polysomes isolés du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
*Phytochemistry*, 13 : 85-88.
- COUPE M. et LAMBERT C., 1977 - Absorption of citrate by the lutoids of latex and rubber production by *Hevea*.  
*Phytochemistry*, 16 : 455-458.
- COUPE M., LAMBERT C. et D'AUZAC J., 1976 - Etude comparative des polyribosomes du latex d'*Hevea* sous l'action de l'ethrel et d'autres produits augmentant l'écoulement du latex.  
*Physiol. Vég.*, 14 : 391-406.
- COUPE M., PRIMOT L., LAMBERT C. et D'AUZAC J., 1978 - Effet de traitements répétés de l'*Hevea* par l'acide 2-chloro-ethyl-phosphonique sur les polyribosomes du latex.  
*C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 286 : 45-48.
- COUPE M., PUJARNISCLE S. et D'AUZAC J., 1972 - Compartimentation de diverses oxydo-réductases (peroxydase, *o*-diphénol-oxydase et malate-deshydrogénase) dans le latex d'*Hevea brasiliensis*. (Kunth) Müll.-Arg.  
*Physiol. Vég.*, 10 : 459-480.
- CRAMER C.L., VAUGHN L.E. et DAVIS R.H., 1980 - Basic amino-acids and inorganic polyphosphates in *Neurospora crassa* : Independent regulation of vacuolar pools.  
*J. Bacteriol.*, 142 : 945-952.
- CRETIN H., 1981(a) - The proton gradient across the vacuo-lysosomal membrane of lutoids from the latex of *Hevea brasiliensis* : I. Further evidence for a proton translocating ATPase on the vacuo-lysosomal membrane of intact lutoids.  
*J. Membrane Biol.*, à paraître.

- CRETIN H., 1981 (b) - The proton gradient across the vacuo-lysosomal membrane of lutoïds from the latex of *Hevea brasiliensis* : II. The electrogenic efflux coupled to the vacuo-lysosomal membrane-bound NAOH-cytochrome C-oxido-reductase activity. *J. Membrane Biol.*, à paraître.
- CZANINSKI Y. et CATESSON A.M., 1969 - Localisation ultra-structurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. *J. Microscopie*, 8 : 875-888.
- DAME J.B. et SCARBOROUGH G.A., 1980 - Identification of the hydrolytic moiety of the *Neurospora* plasma membrane  $H^+$ -ATPase and demonstration of a phosphoryl-enzyme intermediate in its catalytic mechanism. *Biochemistry*, 19 : 2931-2937.
- DAVIS R.F., 1974 - Photo-induced changes in electrical potentials and  $H^+$  activities of the chloroplast, cytoplasm and vacuole of *Phaeoceros laevis*.  
in ZIMMERMANN U. et DAINITY J., *Membrane Transport in plants* : 197-201, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg et New York.
- DAWSON R.M.C., ELLIOT D.C., ELLIOT W.H. et JONES K.M., 1969 - Data for Biochemical Research.  
Clarendon Press, Oxford University Press, Oxford.
- DE DUVE C., OHKUMA S., POOLE B. et TULKENS P., 1978 - The intra-lysosomal pH.  
in SRERE P.A. et ESTABROOK R.W., *Microenvironments and metabolic compartmentation*, : 371-380, Academic Press, New-York.
- DELHEZ J., DUFOUR J.P., THINES D. et GOFFEAU A., 1977 - Comparison of the properties of plasma membrane-bound and mitochondria-bound ATPases in the yeast *Schizosaccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 79 : 319-328.
- DELL'ANTONE P., 1979 - Evidence for an ATP-driven "proton pump" in rat liver lysosomal by basic dyes uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86 : 180-189.
- DE MICHALIS M.I., RAVEN J.A. et JAYASURIYA H.D., 1979 - Measurement of cytoplasmic pH by the DMO technique in *Hydrodictyon africanum*. *J. Exptl. Bot.*, 30 : 681-695.

- DICKENSON P.B., 1965 - The ultra-structure of the latex of *Hevea brasiliensis*.  
*Proc. Nat. Rubb. Prod. Res. Ass., Jubilee Conf., Cambridge, 1964* : 52-56, Mc Laren and Sons Ltd., Londres.
- DICKENSON P.B., 1969 - Electron microscopical studies of the latex vessel system of *Hevea brasiliensis*.  
*J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21 : 543-559.
- DOI E., MATOBA T. et OHTSURU C., 1975 - Lysosomal nature of plant vacuoles : I. Apparent absence of lysosomal particles in tomato fruit and leaf homogenates.  
*Plant. Cell Physiol.*, 16 : 571-580.
- DOI E., OHTSURU C. et MATOBA T., 1975 - Lysosomal nature of plant vacuoles : II. Acid hydrolases in the central vacuole of internodal cells of Charophyta.  
*Plant Cell Physiol.*, 16 : 581-588.
- DOLL S., RODIER F. et WILLENBRINK J., 1979 - Accumulation of sucrose in vacuoles isolated from red beet tissue.  
*Planta*, 144 : 407-411.
- DOUCE R., HOLTZ R.B. et BENSON A.A., 1973 - Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts.  
*J. Biol. Chem.*, 248 : 7215-7222.
- DOUCE R., MANNELLA C.A. et BONNER W.D., Jr.- 1973 - The external NADH-deshydrogenases of intact plant mitochondria.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 292 : 105-116.
- DUFOUR J.P. et GOFFEAU A., 1978 - Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma-membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.  
*J. Biol. Chem.*, 253 : 7026-7034.
- DUFOUR J.P. et GOFFEAU A., 1980 - Molecular and kinetic properties of the purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.  
*Eur. J. Biochem.*, 105 : 145-154.
- DUNLOP J., 1973 - The transport of potassium to the xylem exudate of rye grass : I. Membrane potentials and vacuolar potassium activities in seminal roots.  
*J. Exptl. Bot.*, 24 : 995-1002.

- DUNLOP J., 1976 - The electrical potential difference across the tonoplast of root cells.  
*J. Exptl. Bot.*, 27 : 908-915.
- DUNLOP J. et BOWLING D.J.F., 1978 - Uptake of phosphate by white clover : II. The effect of pH on the electrogenic phosphate pump.  
*J. Exptl. Bot.*, 29 : 1147-1153.
- DU PONT F.M., 1979 - Solubilization and partial purification of the plasma membrane adenosine triphosphatase from corn roots.  
*Ph. D. Dissertation, University of California, Riverside*, 110 p.
- DU PONT F.M. et LEONARD R.T., 1980 - Solubilization and partial purification of a corn root plasma membrane fraction.  
*Plant Physiol.*, 65 : 931-938.
- DU PONT F.M., BURKE L.L. et LEONARD R.T., 1981 - Characterization of a partially purified adenosine triphosphatase from a corn plasma membrane fraction.  
*Plant Physiol.*, 67 : 59-63.
- DUPONT J., MOREAU F., LANCE C. et JACOB J.L., 1976 - Phospholipid composition of the membrane of lutoids from *Hevea brasiliensis* latex.  
*Phytochemistry*, 15 : 1215-1217.
- DURR M., BOLLER T. et WIEMKEN A., 1976 - Action of proteinases on the arginine transport of purified vacuoles from *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 73 : 193-199.
- DURR M., URECH K., BOLLER T., WIEMKEN A., SCHWENCKE J. et NAGY M., 1979 - Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).  
*Arch. Microbiol.*, 121 : 169-175.
- EADIE G.S., 1942 - The inhibition of choline-esterase by physostigmine and prostigmine.  
*J. Biol. Chem.*, 146 : 85-93.
- EAGON R.G. et WILKERSON L.S., 1972 - A potassium-dependent citric acid transport system in *Aerobacter aerogenes*.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46 : 1944-1950.

- EDDY A.A., 1978 - Proton-dependent solute transport in micro-organisms  
*Cur. Top. Membr. Transport*, 10 : 279-360.
- EDDY A.A., SEASTON A., GARDNER D. et HACKING C., 1980 - The thermodynamic efficiency of cotransport mechanisms with special reference to proton and anion transport in yeast.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 341 : 494-509.
- FAIRBAIRN J.W., HAKIM F. et ELKHEIR Y., 1974 - Alkaloidal storage, metabolism and translocation in the vesicles of *Papaver somniferum* latex.  
*Phytochemistry*, 13 : 1133-1139.
- FORET M., SCHMIDT R. et REICHERT U., 1978 - On the mechanism of substrate binding to the purine transport system of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Eur. J. Biochem.*, 82 : 33-43.
- FOX B.W., 1976 - Techniques of sample preparation for liquid scintillation counting.  
*North-Holland : American Elsevier, Amsterdam.*
- FREY-WYSSLING A., 1929 - Microscopie investigations on the occurrence of resins in *Hevea* latex.  
*Arch. Rubbercult.*, 13 : 394-434.
- FUHRMAN G.F., WEHRLI E. et BOEHM C., 1974 - Preparation and identification of yeast plasma membrane vesicles.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 363 : 295-310.
- GAHAN P.B., 1973 - Plant lysosomes.  
*in DINGLE J.T., Lysosomes in Biology and Pathology, vol. 3 : 69-85, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Londres.*
- GALE E.F. et LLEWELLIN J.M., 1972 - The role of hydrogen and potassium ions in the transport of acidic amino-acids in *Staphylococcus aureus*.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 266 : 182-205.
- GOLDMAN D.E., 1943 - Potential, impedance and rectification in membranes.  
*J. Gen. Physiol.*, 27 : 37-60.
- GOLDMAN D.E., 1976 - Ion distribution and membrane permeability in lysosomal suspensions.  
*in DINGLE J.T. et DEAN R.T., Lysosomes in Biology and Pathology, vol. 5 : 309-336, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Oxford.*

- GOLDMAN R. et ROTTENBERG H., 1973 - Ion distribution in lysosomal suspensions.  
*F.E.B.S. Letters*, 33 : 233-238.
- GOMEZ J.B. et MOIR G.F.J., 1979 - The ultra-cytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*.  
*Malaysian Rubber Research and Development Board Monograph*.  
n° 4, 48 p., M.R.R.D.B., Kuala Lumpur (Malaysie).
- GOMEZ J.B. et SOUTHOORN W.A., 1969 - Studies on lutoïd membrane ultrastructure.  
*J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, : 513-523.
- GOMEZ-PUYOU A. et GOMEZ-LOJERO C., 1977 - The use of ionophores and channel formers in the study of the function of biological membranes.  
*Curr. Top. Bioenerg.*, 6 : 221-257.
- GRADMAN D. et SLAYMAN C.L., 1975 - Oscillations of an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora*.  
*J. Membrane Biol.*, 23 : 181-212.
- GREGORY D.W. et COCKING E.C., 1966 - Studies on isolated protoplasts and vacuoles : I. General properties.  
*J. Exptl. Bot.*, 17 : 57-67.
- GRIGNON C., 1974 - Etude des flux et de la distribution endocellulaire du potassium chez les cellules libres d'*Acer pseudoplatanus* L.  
*Thèse de Doctorat d'Etat, mention Sciences Naturelles, Université de Paris VII.*
- GRINIUS L.L., JASAITIS A.A., KADZIAUSKAS J.P., LIBERMAN E.A., SKULACHEV V.P., TOPALI V.P., TEOFINA L.M., et VLADMIROVA M.A., 1970 - Conversion of biomembrane-produced energy into electric form : I. Submitochondrial particles.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 216 : 1-12.
- GROB K. et MATILE P., 1980 - Compartmentation of ascorbic acid in vacuoles of horseradish root cells. Note on vacuolar peroxydase.  
*Z. Pflanzenphysiol.*, 98 : 235-243.
- GUFFANTI A.A., BLANCO R. et KRULWICH T.A., 1979 - A requirement for ATP for  $\beta$ -galactoside transport by *Bacillus alcalophilus*.  
*J. Biol. Chem.*, 254 : 1033-1037.



- GUY M., REINHOLD L. et LATIES G.G., 1978 - Membrane transport of sugars and amino-acids in isolated protoplasts.  
*Plant Physiol.*, 61 : 593-596.
- GUY M., REINHOLD L. et MICHAELI D., 1979 - Direct evidence for a sugar transport mechanism in isolated vacuoles.  
*Plant Physiol.*, 64 : 61-64.
- GUY M., REINHOLD L. et RAHAT M., 1980 - Energization of the sugar transport mechanism in the plasmalemma of isolated mesophyll protoplasts.  
*Plant Physiol.*, 65 : 550-553.
- GYENES M., ANDRIANOV V.K., BULYCHEV A.A. et KURELLA G.A., 1978 - Light-induced  $H^+$  accumulation in the vacuole of *Nitellopsis obtusa*.  
*J. Exptl. Bot.*, 29 : 1185-1195.
- HALLE F., 1977 - Morphologie du système laticifère. Phloème. Cellules à tanin.  
*in Travaux et Documents de l'ORSTOM n° 68 : Colloque sur la Physiologie du latex d'Hevea brasiliensis. Journées latex, Montpellier, 9-10 Septembre 1975, : 35-37, ORSTOM Paris.*
- HALLE F. et MARTIN R., 1968 - Etude de la croissance rythmique chez l'Hevea (*Hevea brasiliensis* Müll-Arg., Euphorbiacées, Crotonoïdées).  
*Adansonia*, 2 : 475-503.
- HANES C.S., 1932 - Studies on plant amylases : I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley.  
*Biochem. J.*, 26 : 1406-1421.
- HANNIG K. et HEIDRICH H.G., 1974 - The use of continuous preparative free-flow electrophoresis for dissociating cell fractions and isolation of membranous components.  
*in COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O., Methods in Enzymology*, 31 : 746-761, Academic Press. Inc., New-York.
- HANOWER P., BRZOWSKA J. et LIORET C., 1976 - Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll-Arg. : I. Facteurs agissant sur la coagulation.  
*Physiol. Vég.*, 14 : 677-693.

- HANOWER P., BRZOZOWSKA J. et NIAMIEN N'GORAN M., 1977 - Absorption des acides aminés par les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Physiol. Plant*, 39 : 299-304.
- HANSON J.B., 1977 - Energy coupling in ion and water fluxes across plant membranes.  
in JUNGREIS A.M., HODGES T.K., KLEINZELLER A., SCHULTZ S.G., *Water relations in Membrane transport in plants and Animals* : 277-290, Academic Press. Inc., New-York, San Francisco et Londres.
- HANSON J.B., 1978 - Application of the chemiosmotic hypothesis to ion transport across the root  
*Plant Physiol.*, 62 : 402-405.
- HANSTEIN W.G., 1976 - Uncoupling of oxidative phosphorylation.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 456 : 129-149.
- HANSTEIN W.G., 1976 - Uncouplers of oxidative phosphorylation.  
*T.I.B.S.*, 1 : 65-67.
- HAROLD F.M., 1972 - Conservation and transformation of energy by bacterial membranes.  
*Bacteriol. Rev.*, 36 : 172-230.
- HAROLD F.M., 1977 - Membranes and energy transduction in bacteria.  
*Curr. Top. Bioenerg.*, 6 : 83-149.
- HAROLD F.M., 1977 - Ion currents and physiological functions in micro-organisms.  
*Ann. Rev. Microbiol.*, 31 : 181-203.
- HAROLD F.M. et PAPINEAU J.M., 1972 - Cation transport and electrogenesis by *Streptococcus faecalis* : I. The membrane potential.  
*J. Membrane Biol.*, 8 : 27-44.
- HEBANT C. et DE FAY E., 1980 - Functional organization of the bark of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) : a structural and histo-enzymological study.  
*Z. Pflanzenphysiol.* 97, : 391-398.
- HEFTMAN E., 1971 - Lysosomes in tomatoes.  
*Cytobios*, 3 : 129-136.
- HEGNER D., 1969 - Cation-dependent ATPases in membranes derived from lysosomal granules of bovine polymorphonuclear leukocytes.  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exptl. Pathol.*, 263 : 406-416.

- HEIDRICH H.G., STAHN R. et HANNING K., 1970 - The surface charge of rat liver mitochondria and their membranes. Clarification of some controversies concerning mitochondrial structure. *J. Cell Biol.*, 46 : 137-150.
- HELOT H.W., WERDAN K., MILOVANCEV M. et GELLER G., 1973 - Alcalization of the chloroplast stroma caused by light-dependant proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta*, 314 : 224-241.
- HENNING R., 1975 - pH gradient across the lysosomal membrane generated by selective cation permeability and Donnan equilibrium. *Biochim. Biophys. Acta*, 401 : 307-316.
- HIGINBOTHAM N. et ANDERSON N.P., 1974 - Electrogenic pumps in higher plant cells. *Can. J. Bot.*, 52 : 1011-1021.
- HIGINBOTHAM N., GRAVES J.S. et DAVIS R.F., 1970 - Evidence for an electrogenic ion transport pump in cells of higher plants. *J. Membrane Biol.*, 3 : 210-222.
- HILL A.E. et HILL B.S., 1973 - The electrogenic chloride pump of the *Limonium* salt gland. *J. Membrane Biol.*, 12 : 129-144.
- HILL A.E. et HILL B.S., 1976 - Elimination processes by glands. in LUTTGE U. et PITTMAN M.G., *Encyclopedia of plant physiology, New Series, Vol. 2, Part B*, : 224-243, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- HILL B.S. et HILL A.E., 1973 - ATP-driven chloride pumping and ATPase activity in the *Limonium* salt gland. *J. Membrane Biol.*, 12 : 145-148.
- HODGES T.K., 1976 - ATPases associated with membranes of plant cells. in LUTTGE U. et PITTMAN M.G., *Encyclopedia of plant physiology, New Series, Vol. 2, Part 2*, : 260-283, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
- HOFSTEE B.H.J., 1959 - Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. *Nature*, 184 : 1296-1298.
- HOLLEMANS M., 1981 - The intralysosomal pH. *Ph. D. Thesis, Université d'Amsterdam, Rodopi*.

- HOLLEMANS M., DONKER - KOOPMAN W. et TAGER J.M., 1980 - A critical examination of the evidence for an Mg-ATP-dependent proton pump in rat liver lysosomes.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 603 : 171-177.
- HOLLEMANS M., REIJNGOUD D.J. et TAGER J.M., 1979 - Evidence against an Mg-ATP dependent proton pump in rat liver lysosomes.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 551 : 55-66.
- HOLZ R.W., 1979 - Measurement of membrane potential of chromaffin granules by the accumulation of triphenyl-methyl-phosphonium cation.  
*J. Biol. Chem.*, 254 : 6703-6709.
- HOMANS L.N.S. et VAN GILS G.E., 1949 - Fresh *Hevea* latex : a complex colloidal system.  
*Proc. 2nd Rubb. Technol. Conf. Londres, 1948, : 292-302, W. Heffer and Sons Ltd., Cambridge.*
- HOPE A.B., 1971 - Ion transport and membranes.  
*Butterworths, Londres.*
- HUBER-WALCHI U. et WIEMKEN A., 1979 - Differential extraction of soluble pools from the cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-destran.  
*Arch. Microbiol.*, 120 : 141-149.
- HUTCHINGS V.M., 1978 - Sucrose and proton cotransport in *Ricinus* cotyledons : I.  $H^+$  influx associated with sucrose uptake.  
*Planta.*, 138 : 229-235.
- HUTCHINGS V.M., 1978 - Sucrose and proton cotransport in *Ricinus* cotyledons : II.  $H^+$  efflux and associated  $K^+$  uptake.  
*Planta*, 138 : 237-241.
- IMAI K.O., 1977 - Transport system for citric acid in *Proteus vulgaris*.  
*Agric. Biol. Chem.* 41 : 733-735.
- IMAI K.O., 1978 - Tricarboxylic acid transport systems in *Proteus mirabilis*.  
*J. gen. Appl. Microbiol.*, 24 : 279-285.
- IMAI K.O., IJIMA Teiji et HASEGAWA Takezi, 1973 - Transport of tricarboxylic acids in *Salmonella typhimurium*.  
*J. Bacteriol.*, 114 : 961-965.
- INDGE K.J., 1968 - The isolation and properties of the yeast cell vacuole.  
*J. Gen. Microbiol.*, 51 : 441-446.

- INDGE K.J., 1968 - Polyphosphates of the yeast cell vacuole.  
*J. Gen. Microbiol.*, 51 : 447-455.
- IRITANI N. et WELLS W.W., 1974 - Studies on a  $\text{HCO}_3^-$ -stimulated ATPase and carbonic anhydrase system in rat liver lysosomes.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 164 : 357-366.
- JACOB J.L., 1970 - Particularités de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
*Thèse de Doctorat d'Etat mention Sciences Naturelles, Université d'Orsay, C.N.R.S., n° AO-4129.*
- JACOB J.L. et SONTAG N., 1974 - Purification et étude de la phosphatase acide lutoïdique du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
*Biochimie*, 56 : 1315-1322.
- JACOBY B. et RUDICH B., 1980 - Proton chloride symport in barley roots.  
*Ann. Bot.*, 46 : 493-498.
- JOFFRE-MERCIER A. et POOLE R.J., 1980 - Electrogenic pump activity in red beet : its relation to ATP levels and to cation influx.  
*J. Membrane Biol.*, 55 : 165-174.
- JOHNSON C.L., CHA Y.A. et STERN J.R., 1975 - Citrate uptake in membrane vesicles of *Klebsiella aerogenes*.  
*J. Bacteriol.*, 121 : 682-687.
- JOHNSON R.G., CARLSON N.J. et SCARPA A., 1978 -  $\Delta\text{pH}$  and catecholamine distribution in isolated chromaffin granules.  
*J. Biol. Chem.*, 253 : 1512-1521.
- JOHNSON R.G., PFISTER D., CARTY S.E. et SCARPA A., 1979 - Biological amine transport in chromaffin ghosts. Coupling to the transmembrane proton and potential gradients.  
*J. Biol. Chem.*, 254 : 10963-10972.
- JOHNSON R.G. et SCARPA A., 1976 - Internal pH of isolate-chromaffin vesicles.  
*J. Biol. Chem.*, 251 : 2189-2191.
- JOHNSON R.G. et SCARPA A., 1976 - Ion permeability of isolated chromaffin vesicles.  
*J. Gen. Physiol.*, 68 : 601-631.
- JOHNSON R.G. et SCARPA A., 1979 - Proton motive force and catecholamine transport in isolated chromaffin granules.  
*J. Biol. Chem.*, 254 : 3750-3760.

- JOHNSON R.G., SCARPA A. et SALGANICOFF L. - Measurement of the proton-motive force in amine containing subcellular organelles.  
in DUTTON P.L., LEIGH J.S. et SCARPA A., *Frontiers of Biological Energetics*, vol. 1, : 534-544, Academic Press.
- JUNG D.W. et LATIES G.G., 1979 - Citrate and succinate uptake by potato mitochondria.  
*Plant. Physiol.*, 63 : 591-597.
- JUNG K.D. et LUTTGE U., 1980 - Effects of fusicoccin and abscisic acid on sugar and ion transport from plant glands.  
*Ann. Bot.*, 45 : 339-349.
- KABACK H.R., 1976 - Molecular biology and energetics of membrane transport.  
*J. Cell. Physiol.*, 89 : 575-594.
- KAY W.W. et CAMERON M., 1978 - Citrate transport in *Salmonella typhimurium*.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 190 : 270-280.
- KEIFER D.W. et SPANSWICK R.M., 1978 - Activity of the electrogenic pump in *Chara corallina* as inferred from measurements of the membrane potential, conductance and potassium permeability.  
*Plant Physiol.*, 62 : 653-661.
- KEIFER D.W. et SPANSWICK R.M., 1979 - Correlation of adenosine triphosphate levels in *Chara corallina* with the activity of the electrogenic pump.  
*Plant Physiol.*, 64 : 165-168.
- KENYON W.H., KRINGSTAD R. et BLACK C.C., 1978 - Diurnal changes in the malic acid content of vacuoles isolated from leaves of the crassulacean acid metabolism plant, *Sedum teleplium*.  
*F.E.B.S. Letters*, 94 : 281-283.
- KIPPEN Ian, HIRAYAMA B., KLINENBERG J.R. et WRIGHT E.M., 1979 - Transport of tricarboxylic acid cycle intermediates by membrane vesicles from renal brush border.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 3397-3400.
- KISHIMOTO U., KAMI-IKE N. et TAKEUCHI Y., 1980 - The role of electrogenic pump in *Chara corallina*.  
*J. Membrane Biol.*, 85 : 149-156.

- KLUGE M. et HEININGER B., 1973 - Untersuchungen über den efflux von Malat aus den Vacuolen der assimilierenden Zellen von *Bryophyllum* und mögliche Einflüsse dieses Vorganges auf den CAM.  
*Planta*, 113 : 333-344.
- KNOTH J., HANDLOSSER K. et NJUS D., 1980 - Electrogenic epinephrine transport in chromaffin granule ghosts.  
*Biochemistry*, 19 : 2938-2942.
- KOBAYASHI H., VAN BRUNT J. et HAROLD F.M., 1978 - ATP-linked calcium transport in cells and membrane vesicles of *Streptococcus faecalis*.  
*J. Biol. Chem.*, 253 : 2085-2092.
- KOMOR E. et TANNER W., 1974 - The hexose-proton symport of *Chlorella vulgaris* : specificity, stoichiometry and energetics of sugar-induced proton uptake.  
*Eur. J. Biochem.*, 44 : 219-223.
- KOMOR E. et TANNER W., 1974 - The hexose-proton symport of *Chlorella vulgaris* : pH-dependent change in Km values and translocation constants of the uptake system.  
*J. Gen. Physiol.*, 64 : 568-581.
- KOMOR E. et TANNER W., 1976 - The determination of membrane potential of *Chlorella vulgaris*. Evidence for electrogenic sugar transport.  
*Eur. J. Biochem.*, 70 : 197-204.
- KOMOR E. et TANNER W., 1980 - Proton-cotransport of sugars in plants in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J., and DAINITY J., *Plant Membrane transport : Current Conceptual Issues*, : 247-257, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New-York, Oxford.
- KRAMER R., KOPP F., NIEDERMEYER W. et FUHRMANN G.F., 1978 - Comparative studies of the structure and composition of the plasmalemma and the tonoplast in *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 507 : 369-380.
- KRINGSTAD R., KENYON W.H. et BLACK C.C.Jr., 1980 - The rapid isolation of vacuoles from leaves of crassulacean acid metabolism plants.  
*Plant Physiol.*, 66 : 379-382.

- KUBICEK C.P. et ROHR M., 1978 - The role of the tricarboxylic acid cycle in citric acid accumulation by *Aspergillus niger*.  
*Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5 : 263-271.
- KURKDJIAN A. et GUERN J., 1978 - Intracellular pH in higher plant cells :  
I. Improvements in the use of the 5,5-dimethyl-oxazol-idine-2-[ $^{14}\text{C}$ ], 4-dione distribution technique.  
*Plant Science Letters*, 11 : 337-344.
- KURKDJIAN A., LEGUAY J.J. et GUERN J., 1978 - Measurement of intracellular pH and aspects of its control in higher plant cells cultivated in liquid medium.  
*Respiration Physiology*, 33 : 85-89.
- LAGARDE A., 1976 - A non equilibrium thermodynamics analysis of active transport within the frame-work of the chemiosmotic theory.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 426 : 198-217.
- LAGARDE A., 1977 - Evidence for an electrogenic 3-deoxy-2-oxo-D-gluconate-proton cotransport driven by the proton-motive force in *Escherichia coli* K. 12.  
*Biochem. J.*, 168 : 211-221.
- LAGARDE A. et HADDOCK B.A., 1977 - Proton uptake linked to the 3-deoxy-2-oxo-D-gluconate transport system of *Escherichia coli*.  
*Biochem. J.*, 162 : 183-187.
- LAGARDE A., POUYSSEGUR J.M. et STOEBER F.R., 1973 - A transport system for 2-keto-3-deoxy-D-gluconate uptake in *Escherichia coli* K.12. Biochemical studies in whole cells.  
*Eur. J. Biochem.*, 36 : 328-341.
- LAGARDE A. et STOEBER F.R., 1974 - Transport OF 2-keto-2-deoxy-D-gluconate in isolated membrane vesicles of *Escherichia coli* K.12.  
*Eur. J. Biochem.*, 43 : 197-208.
- LAGARDE A. et STOEBER F.R., 1975 - The energy-coupling controlled efflux of 2-keto-3-deoxy-D-gluconate in *Escherichia coli* K.12.  
*Eur. J. Biochem.*, 55 : 343-354.
- LAGARDE A. et STOEBER F.R., 1977 - *Escherichia coli* K.12 structural KalgT mutants exhibiting thermosensitive 2-keto-3-deoxy-D-gluconate uptake.  
*J. Bacteriol.*, 129 : 606-615.
- LAKSHMINARAYANAI AH L., 1969 - Transport phenomena in membranes.  
*Academic Press Inc., New York.*



- LAMBERT C., 1975 - Influence de l'ATP sur le pH intralutoïdique et sur la pénétration du citrate dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
*C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 281 : 1705-1708.
- LA NOUE K. et SCHOOLWERTH A.C., 1979 - Metabolite transport in mitochondria.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 48 : 871-922.
- LATIES G.G. 1975 - Solute transport in relation to metabolism and membrane permeability in plant tissues.  
*in J.P. DAVIES, Historical and current aspects of plant physiology : a symposium honoring F.L. STEWARD* : 98-151,  
*New York State College Agriculture and Life Science, Ithaca, U.S.A.*
- LAUGER P., 1979 - A channel mechanism for electrogenic ion pumps.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 552 : 143-161.
- LAWFORD H.G. et WILLIAMS G.R., 1971 - The transport of citrate and other tricarboxylic acids in two species of *Pseudomonas*.  
*Biochem. J.*, 123 : 571-577.
- LAWFORD H.G. et WILLIAMS G.R., 1972 - Tricarboxylate transport in *Pseudomonas fluorescens*.  
*in AZZONE G.F., CARAFOLI E., LEHNINGER A.L. et SILIPRANDI N., Biochemistry and Biophysics of mitochondrial membranes*, : 681-700, *Academic Press Inc., New York, Londres.*
- LEGUAY J.J., 1977 - The 5,5-dimethyl-oxazol-idine-2,[<sup>14</sup>C]4-dione distribution technique and the measurement of intracellular pH in *Acer pseudoplatanus* cells.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 497 : 329-333.
- LEIGH R.A. et BRANTON D., 1976 - Isolation of vacuoles from root storage tissue of *Beta vulgaris* L.  
*Plant Physiol.*, 58 : 656-662.
- LEIGH R.A. et WALKER R.R., 1980 - ATPase and acid phosphatase activities associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.)  
*Planta*, 150 : 222-229.
- LIBERMAN E.A. et SKULACHEV V.P., 1970 - Conversion of biomembrane-produced energy into electrical form : IV. general discussion.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 216 : 30-42.

- LIBERMAN E.A. et TOPALI V.P., 1969 - Permeability of bimolecular phospholipid membranes to lipid-soluble ions.  
*Biofizika*, 14 : 452-461.
- LICHKO L.P., OKOROKOV L.A. et KULAEV I.S., 1980 - Role of vacuolar ion pool in *Saccharomyces carlsbergensis* : potassium efflux from vacuoles is coupled with manganese or magnesium influx.  
*J. Bacteriol.*, 144 : 666-671.
- LIEB W.R. et STEIN W.D., 1974 - Testing and characterizing the simple carrier.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 373 : 178-196.
- LIN W., 1980 - Corn roots protoplasts. Isolation and general characterization of ion transport.  
*Plant Physiol.*, 66 : 550-554.
- LIN W., WAGNER G.J. et HIND G., 1977 - The proton pump and membrane potential of intact vacuoles isolated from *Tulipa* petals.  
*Plant Physiol.*, 59 suppl., S-85, p. 471.
- LIN W., WAGNER G.J., SIEGELMAN H.W. et HIND G., 1977 - Membrane-bound ATPase of intact vacuoles and tonoplasts isolated from mature plant tissue.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 465 : 110-117.
- LINEWEAVER M. et BURK D., 1934 - The determination of enzyme dissociation constants.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 56 : 658-666.
- LINHARDT K. et WALTER K., 1963 - Phosphatase : determination in serum with p-nitrophenyl-phosphate in BERMEYER H.U., *Methods of enzymatic analysis*, : 783-785, Academic Press, New-York, Londres.
- LORZ H., HARMS C.T. et POTRYKUS I., 1976 - Isolation of vacuoplasts from protoplasts of higher plants.  
*Biochem. Physiol. Pflanzen*, 169 : 617-620.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent.  
*J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- LUTTGE U., 1975 - Salt glands.  
in BAKER D.A. et HALL J.L., *Ion transport in plant cells and tissues* : 335-376, North Holland Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York.

- LUTTGE U., 1980 - Malic acid transport across the tonoplast of leaf cells : tonoplast biophysics and biochemistry in relation to crassulacean acid metabolism (CAM).  
*in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J. et DAINITY J., Plant membrane transport : Current conceptual Issues, : 39-60, Elsevier : North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New-York, Oxford.*
- LUTTGE U. et BALL E., 1979 - Electrochemical investigation of active malic acid transport at the tonoplast into the vacuoles of the CAM plant *Kalanchoe daigremontiana*.  
*J. Membrane Biol.* 47 : 401-422.
- LUTTGE U. et BALL E., 1980 -  $2\text{H}^+$  : 1 malate  $2^-$  stoichiometry during crassulacean acid metabolism is unaffected by lipophilic cations.  
*Plant, cell and environment*, 3 : 195-200.
- LUTTGE U. et HIGINBOTHAM N., 1979 - Transport in plants.  
*Springer-Verlag, New-York, Heidelberg, New-York.*
- MALPARTIDA F. et SERRANO R., 1980 - Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent.  
*F.E.B.S. Letters*, 111 : 69-72.
- MARETZKI M. et THOM M., 1978 - Transport of organic and inorganic substances by plant cells in culture *in THORPE T.A., Frontiers of Plant Tissue Culture, : 463-473. The International Association for Plant Tissue Culture, Calgary.*
- MARIN B., 1974 - La mise en évidence d'acides ribonucléiques dans les Lutoïdes (compartiment lysosomal) du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll.-Arg.  
*Thèse de Doctorat de Spécialité, Mention Biologie Végétale, Université de Montpellier.*
- MARIN B., 1976 - Les problèmes posés par l'existence d'acides ribonucléiques dans les compartiments lysosomaux végétaux.  
*Ann. Sci. Nat., Bot. Biol. Veg.*, 17 : 361-374.
- MARIN B., 1979 (a) - Internal pH of isolated ( vacuo-lysosomal) vesicles from *Hevea brasiliensis* latex.  
*in Résumés du XIème Congrès International de Biochimie, Toronto, Canada, 8-13 Juillet 1979, Résumé n° 06-1-R13, p. 423, C.N.R.C., S.C.B. et U.I.B.*

- MARIN B., 1979 (b) - Role of magnesium-activated ATPase and a pH gradient in the accumulation of citrate in lutoïd vesicles.  
*in Résumés du XIème Congrès International de Biochimie, Toronto, Canada, 8-13 Juillet 1979, Résumé n° 06-8-R75, p. 471, C.N.R.C., S.C.B., et U.I.B.*
- MARIN B., 1979 (c) -  $\Delta$ pH and citrate accumulation in reconstituted vesicular compartment from lutoïd ( vacuo-lysosomal) membranes of *Hevea brasiliensis* latex.  
*in Résumés du XIème Congrès International de Biochimie, Toronto, Canada, 8-13 Juillet 1979, Résumé n° 06-8-R76, p. 471, C.N.R.C., S.C.B., et U.I.B.*
- MARIN B., 1980 - Some evidence about the occurrence of a Mg-ATP-dependent proton pump in plant vacuo-lysosomal compartment.  
*in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J. et DAINTY J., Plant Membrane transport : Current conceptual issues : 435-436, Elsevier : North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New-York, Oxford.*
- MARIN B., D'AUZAC J. et KOMOR E., 1978 - Une activité adénosine-triphosphatasique associée à la membrane vacuo-lysosomale du latex d'*Hevea brasiliensis*. Relations possibles avec le gradient transmembranaire de protons et le potentiel membranaire existant au niveau de ce compartiment vacuo-lysosomal.  
*Regards sur la Biochimie, 3, p.14.*
- MARIN B., MARIN M., D'AUZAC J. et KOMOR E., 1979 - Une activité adénosine triphosphatasique associée à la membrane vacuo-lysosomale du latex d'*Hevea brasiliensis*. Relations possibles avec le gradient transmembranaire de protons et le potentiel membranaire existant au niveau de ce compartiment vacuo-lysosomal.  
*in Résumés du XIème Congrès International de Biochimie, Toronto, Canada, 8-13 Juillet 1979, Résumé n° 06-1-R14, p. 423, C.N.R.C., S.C.B. et U.I.B.*
- MARIN B., MARIN-LANZA M. et KOMOR E. - The proton-motive potential difference across the vacuo-lysosomal membrane of *Hevea brasiliensis* and its modification by a membrane-bound adenosine-triphosphatase.  
*Biochem. J., à paraître.*

- MARIN B. et TROUSLOT P., 1975 - The occurrence of ribonucleic acid in the lutoïd fraction (lysosomal compartment) from *Hevea brasiliensis* Müll.-Arg. (Kunth.) latex.  
*Planta*, 124 : 31-41.
- MARIN B., TROUSLOT P. et PUJARNISCLE S., 1974 - Some evidence for the occurrence of ribonucleic acid in the lutoïd fraction (lysosomal compartment) from *Hevea brasiliensis* latex.  
*Biochem. J.*, 143 : 479-481.
- MARIN B., SMITH A. et LUTTGE U., 1981 - The proton-motive force and its influence on citrate uptake in vacuolar vesicles of *Hevea brasiliensis* latex.  
*Planta*, à paraître.
- MARIN B., SMITH J.A.C., LUTTGE U. et D'AUZAC J., 1980 - Citrate transport and the proton-motive force in vacuo-lysosomal vesicles from *Hevea brasiliensis*.  
in II<sup>nd</sup> Congress of Federation of European Societies of Plant Physiology, Santiago de Compostela, 27 Juillet-1er Août 1980, Abstracts of lectures and poster demonstrations : 474-475.
- MARINETTI G.V., 1969 - Chromatographic analysis of polar lipids on silicic acid impregnated paper.  
in JANES A.T. et MORRIS L.J., *New Biochemical Separations* : 339-377, Van Nostrand Co., Londres.
- MARTINOIA E., HECK U. et WIEMKEN A., 1981 - Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves.  
*Nature*, 289 : 292-293.
- MARTINOIA E., HECK U., BOLLER T., WIEMKEN A. et MATILE P., 1979 - Some properties of vacuoles isolated from *Neurospora crassa* slime variant.  
*Arch. Microbiol.*, 120 : 31-34.
- MARTY F., 1968 - Infrastructure des laticifères différenciés d'*Euphorbia characias* L.  
*C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 267 : 299-302.
- MARTY F., 1971 - Vesicules autophagiques des laticifères différenciés d'*Euphorbia characias* L.  
*C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 272 : 399-402.

- MARTY F., 1978 - Cytochemical studies on GERL, provacuoles and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75 : 852-856.
- MARTY F. et BRANTON D., 1980 - Analytical characterization of beet vacuole membrane.  
*J. Cell. Biol.*, 87 : 72-83.
- MARTY F., BRANTON D. et LEIGH R.A., 1980 - Plant vacuoles in STUMPF P.K. et CONN E.E., *The biochemistry of plants*, vol. 1, : 625-658, Academic Press. Inc., New-York.
- MATILE P., 1968 - Lysosomes of root tip cells in corn seedlings.  
*Planta*, 79 : 181-196.
- MATILE P., 1969 - Plant lysosomes.  
in DINGLE J.T. et FELL D.B., *Lysosomes in Biology and Pathology*, vol. 1, : 406-430, North Holland Publish. Co., Amsterdam, Londres.
- MATILE P., 1975 - Cell Biology Monographs : Vol. 1 - The Lytic compartment of plant cells.  
*Springer-Verlag, Vienne, New-York*.
- MATILE P., 1976 - Localization of alkaloids and mechanism of their accumulation in vacuoles of *Chelidonium majus* laticifers.  
in LUCKNER M., MOTHES K. et NOVER L., *Leopoldina Symposium on Secondary Metabolism and Coevolution*, Leopoldina Halle (Saale, Allemagne de l'Est), 19-21 Avril 1974, Nova acta Leopold., 7 suppl. : 139-155, Warburg : Eisenach DDR, Stsch. Akad. Naturforsch.
- MATILE P., 1978 - Biochemistry and functions of vacuoles.  
*Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29 : 193-213.
- MATILE P., JANS B. et RICKENBACHER R., 1970 - Vacuoles of *Chelidonium* latex : lysosomal property and accumulation of alkaloids.  
*Biochem. Physiol. Pflanzen*, 161 : 447-458.
- MATILE P. et MOORH., 1968 - Vacuolation : origin and development of the lysosomal property in root-tip cells.  
*Planta*, 80 : 159-175.
- MATILE P. et WIEMKEN A., 1967 - The vacuole as the lysosome of the yeast cell.  
*Arch. Microbiol.*, 56 : 148-155.

- MATILE P. et WIEMKEN A., 1976 - Interactions between cytoplasm and vacuole.  
*in* STOCKING C.R. et HEBER U., *Encyclopedia of Plant physiology*, New Series, 3, part A, : 255-287, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
- Mc CARTY R.E., 1978 - The ATPase complexe of chloroplasts and chromatophores.  
*Curr. Top. Bioenerg.*, 7 : 245-278.
- Mc MULLEN A.I., 1959 - Nucleotides of *Hevea brasiliensis* latex : a ribonucleo-protein component.  
*Biochem. J.*, 72 : 545-549.
- Mc MULLEN A.I., 1961 - A helical polynucleotide template hypothesis for the biogenesis of rubber.  
*Biochem. J.*, 78 : 33-34 P.
- Mc MULLEN A.I., 1962 - Particulate ribonucleoprotein components of *Hevea brasiliensis*.  
*Biochem. J.*, 85 : 491-495.
- Mc ROBBIE E.A.C., 1970 - The active transport of ions in plant cells.  
*Quart. Rev. Biophys.*, 3 : 251-294.
- Mc ROBBIE E.A.C., 1971 - Fluxes and compartments in plant cells.  
*Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 22 : 75-96.
- Mc ROBBIE E.A.C., 1975 - Ion transport in plant cells.  
*Curr. Top. Membr. Transport*, 7 : 1-48.
- Mc ROBBIE E.A.C., 1977 - Ion transport processes at the tonoplast.  
*in* THELLIER M., MONNIER A., DEMARTY M. et DAINITY J., *Echanges ioniques transmembranaires chez les végétaux*, Rouen, Juillet 1976 : 101-107, Editions de l'Université de Rouen et Editions du C.N.R.S.
- MEGO J.L., 1973 - Protein digestion in isolated heterolysosomes.  
  
*in* DINGLE J.T., *Lysosomes in Biology and Pathology*, vol. 3 : 138-168, North Holland Publish. Co. : Biomedical Press., Amsterdam.
- MEGO J.L. et FARB R.M., 1978 - An energy requirement for the degradation of intravenously injected <sup>125</sup>I-labelled albumin in mouse liver and kidney slices.  
*Biochem. J.*, 172 : 233-238.

- MEGO J.L., FARB R.M. et BARNES J., 1972 - An adenosine triphosphate-dependent stabilization of proteolytic activity in hetero-lysosomes : evidence for a proton pump.  
*Biochem. J.*, 128 : 763-769.
- MEIJER A.J. et VAN DAM K., 1974 - The metabolic significance of anion transport in mitochondria.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 346 : 213-244.
- METTLER I.J. et LEONARD R.J., 1979 - Isolation and partial characterization of vacuoles from tobacco protoplasts.  
*Plant Physiol.*, 64 : 1114-1120.
- MICHAELIS L. et MENTEN M.C., 1913 - Die kinetic der Invertase wirkung.  
*Biochem. Z.*, 49 : 333-369.
- MITCHELL P., 1961 - Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.  
*Nature*, 191 : 144-148.
- MITCHELL P., 1966 - Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.  
*Glynn Research Ltd., Bodmin, Grande Bretagne.*
- MITCHELL P., 1968 - Chemiosmotic coupling and Energy transduction.  
*Glynn Research Ltd., Bodmin, Grande Bretagne.*
- MITCHELL P., 1970 - Membranes of cells and organelles : Morphology, transport and metabolism.  
*Symposia of the society for general microbiology*, 20 : 121-166.
- MITCHELL P., 1972 - Chemiosmotic coupling in energy transduction : a logical development of biochemical knowledge.  
*J. Bioenerg.*, 3 : 5-24.
- MITCHELL P., 1973 - Performance and conservation of osmotic work by proton-coupled solute porter systems.  
*J. Bioenerg.*, 4 : 63-91.
- MITCHELL P., 1973 - Cation-translocation adenosine-triphosphatase models : how direct is the participation of adenosine triphosphate and its hydrolysis products in cation translocation ?  
*F.E.B.S. Letters*, 33 : 267-274.
- MITCHELL P., 1974 - A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine-triphosphatases.  
*F.E.B.S. Letters*, 43 : 189-194.



- MITCHELL P., 1976 - Vectorial chemistry and the molecular mechanisms of chemiosmotic coupling : power transmission by proticity. *Biochem. Soc. Trans.*, 4 : 399-430.
- MITCHELL P., 1979 - Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction : a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur. J. Biochem.*, 95 : 1-20.
- MITCHELL P. et MOYLE J., 1974 - The mechanism of proton translocation in reversible proton translocating adenosine triphosphatases. *Biochem. Soc. Special Publication*, 4 : 91-111.
- MOELLERING H. et GRUBER N., 1966 - Determination of citrate with citrate lyase. *Anal. Biochem.*, 17 : 369-376.
- MOIR G.F.J., 1959 - Ultracentrifugation and staining of Hevea latex. *Nature*, 184 : 1626-1628.
- MOLISCH H., 1901 - Studien uber den Milchsaft und Schleimsaft der pflanzen. *Gustav. Fischer-Verlag, Iéna.*
- MONTARDY M.C. et LAMBERT C., 1977 - Diverses propriétés de l'absorption du citrate, du malate et du succinate par les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 16 : 677-680.
- MOREAU F., JABOB J.L., DUPONT J. et LANCE C., 1975 - Electron transport in the membrane of lutoïds from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 396 : 116-124.
- MOREAU F. et LANCE C., 1972 - Isolement et propriétés des membranes externes et internes des mitochondries végétales. *Biochimie*, 54 : 1335-1348.
- NAKAMURA K.D., 1973 - The isolation of vacuoles from *Candida utilis*. *Prep. Biochem.*, 3 : 553-561.
- NEUMANN D. et MULLER E., 1967 - Intrazellularen Nachweis von Alkaloiden in Pflanzen-zellen im licht- und elektronenmikroskopischen Maßstab. *Flora*, 158 A : 479-491.

- NIEDERMEYER W., PARISH G.R. et MOOR H., 1976 - The elasticity of the yeast cell tonoplast related to its ultrastructure and chemical composition : I. Induced swelling and shrinking. A freeze-etch membrane study.  
*Cytobiologie*, 13 : 364-379.
- NIEDERMEYER W., PARISH G.R. et MOOR H., 1976 - The elasticity of the yeast cell tonoplast related to its ultrastructure and chemical composition : II. Chemical and cytochemical investigations.  
*Cytobiologie*, 13 : 380-393.
- NISHIMURA M. et BEEVERS H., 1978 - Hydrolases in vacuoles from castor bean endosperm.  
*Plant physiol.*, 62 : 44-48.
- NISHIMURA M. et BEEVERS H., 1979 - Hydrolysis of protein in vacuoles isolated from higher plant tissue.  
*Nature*, 277 : 412-413.
- NJUS D. et RADDA G.K., 1978 - Bioenergetic processes in chromaffin granules : a new perspective on some old problems.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 463 : 219-244.
- NJUS D. et RADDA G.K., 1979 - A potassium ion diffusion potential causes adrenaline uptake in chromaffin granule ghosts.  
*Biochem. J.*, 180 : 579-585.
- NOBEL P.S., 1974 - Introduction to biophysical plant physiology.  
W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- OEHR P. et WILLECKE K., 1974 - Citrate-Mg<sup>2+</sup> transport in *Bacillus subtilis* : studies with 2-fluoro-L-erythro-citrate as a substrate.  
*J. Biol. Chem.*, 249 : 2037-2042.
- OHKUMA S. et POOLE B., 1978 - Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents.  
*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 75 : 3327-3331.
- OKOROKOV L.A., LICHKO L.P., KHOLODENKO V.P., KADOMTSEVA V.M., PETRIKEVICH S.B., ZAICHKIN E.I. et KARIMOVA A.M., 1975 - Free and bound magnesium in fungi and yeasts.  
*Folia microbiol.*, 20 : 460-466.

- OKOROKOV L.A., LICHKO L.P. et KULAEV I.S., 1980 - Vacuoles : main compartment of potassium, magnesium and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells.  
*J. Bacteriol.*, 144 : 661-665.
- OKOROKOV L.A., PETRIKEVICH S.B., LICHKO L.P. et MELNIKOVA E.V., 1978 - Magnesium pool in cell vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Biol. Nauk.*, 5 : 791-794.
- OVCHINIKOV Y.A., IVANOV V.T. et SHKROBA M., 1974 - Membrane active complexones.  
*Biochim. Biophys. Acta Library*, 12 : 1-464.
- PALMIERI F., GENCHI G., STIPANI I. et QUAGLIARIELLO E., 1977 - The tri-carboxylate carrier of the mitochondrial membrane : characteristics and partial purification.  
*in VAN DAM K. et VAN GELDER B.F., Structure and function of energy-transducing membranes : 251-260, Elsevier tific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New-York.*
- PALMIERI F. et QUAGLIARIELLO E., 1969 - Correlation between anion uptake and the movement of  $K^+$  and  $H^+$  across the mitochondrial membrane.  
*Eur. J. Biochem.*, 8 : 473-481.
- PALMIERI F., QUAGLIARIELLO E. et KLINGENBERG M., 1970 - Quantitative correlation between the distribution of anions and the pH difference across the mitochondrial membrane.  
*Eur. J. Biochem.*, 17 : 230-238.
- PALMIERI F., STIPANI I., GENCHI G. et QUAGLIARIELLO E., 1978 - Partial purification of citrate-binding protein from submitochondrial particles.  
*in AZZONE G.F., AVRON M., METCALPE J.C., QUAGLIARIELLO E. et SILIPRANDI N., The proton and calcium pumps : 239-250, Elsevier : North Holland Biomedical Press, Amsterdam.*
- PALMIERI F., STIPANI I., QUAGLIARIELLO E. et KLINGENBERG M., 1972 - Kinetic study of the tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria.  
*Eur. J. Biochem.*, 26 : 587-594.

- PAPA S., LOFRUMENTO N.E., KANDUC D., PARADIES C. et QUAGLIARIELLO E.,  
1971 - The transport of citric-acid cycle intermediates in  
rat liver mitochondria. Electric nature and coupling of the  
exchange-diffusion reactions with proton translocation.  
*Eur. J. Biochem.*, 22 : 134-143.
- PAPA S., LOFRUMENTO N.E., QUAGLIARIELLO E., MEIJER A.J. et TAGER J.M.,  
1970 - Coupling mechanisms in anionic substrate transport  
across the inner membrane of rat-liver mitochondria.  
*J. Bioenerg.*, 1 : 287-307.
- PARISH R., 1975 - The lysosome-concept in plants : I. Peroxydases asso-  
ciated with subcellular and wall fractions of maize root  
tips. Implications for vacuole development.  
*Planta*, 123 : 1-13.
- PARISH R., 1975 - The lysosome-concept in plants : II. Location of acid  
hydrolases in maize root tips.  
*Planta*, 123 : 15-31.
- PENASSE L., 1974 - Les enzymes : cinétique et mécanisme d'action.  
*Masson et Cie.*
- PENNARUM A.M., 1980 - Mécanismes de la distribution endocellulaire des  
ions sodium dans les cellules libres d'*Acer pseudoplatanus* L.  
*Thèse de Doctorat d'Etat, Mention Sciences Naturelles, Uni-  
versité de Paris VII.*
- PHILLIPS J.H. et ALLISON Y.P., 1978 - Proton translocation by the bovine  
chromaffin-granule membrane.  
*Biochem. J.*, 170 : 661-672.
- PITT D., 1975 - Lysosomes and cell function.  
*Longmans, Londres, New-York.*
- PITT D. et GALPIN M., 1973 - Isolation and properties of lysosomes from  
dark-grown potato shoots.  
*Planta*, 109 : 233-258.
- POOLE R.J., 1974 - Ion transport and electrogenic pumps in storage  
tissue cells.  
*Can. J. Bot.*, 52 : 1023-1028.
- POOLE R.J., 1978 - Energy coupling for membrane transport.  
*Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29 : 437-460.

- POUX N., 1969 - Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radiculaire de *Cucumis sativus* L.  
*J. Microscopie*, 8 : 855-866.
- POUX N., 1974 - Ultrastructural localization of acid phosphatase and peroxydase activities in plant cells.  
*J. Microscopie*, 21 : 265-274.
- POSTMA P.W. et VAN DAM K., 1971 - The inducible transport of di- and tricarboxylic acid anions across the membrane of *Azotobacter vinelandii*.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 249 : 515-527.
- PREZIOSO G., STIPANI I., PALMIERI F. et QUAGLIARIELLO E., 1977 - Transport of citrate in submitochondrial particles.  
*F.E.B.S. Letters*, 81 : 249-252.
- PUJARNISCLE S., 1965 - Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Analogie avec les lysosomes.  
*C.R. Acad. Sci., Sér. D*, 261 : 2127-2130.
- PUJARNISCLE S., 1966 - Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Distribution de la phosphatase acide, de la  $\beta$ -glucosidase et de la cathepsine dans le latex.  
*C.R. Acad. Sci., Sér. D*, 262 : 923-925.
- PUJARNISCLE S., 1968 - Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll.-Arg.  
*Physiol. Vég.*, 6 : 27-46.
- PUJARNISCLE S., 1969 - Etude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll.-Arg. Différences et analogies avec les lysosomes.  
*Thèse Doctorat d'Etat, Mention Sciences Naturelles, Université d'Orsay, C.N.R.S., n° AO-3379.*
- PUJARNISCLE S., 1971 - Etude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll.-Arg. Différences et analogies avec les lysosomes.  
*Mémoires de l'O.R.S.T.O.M. n° 48, ORSTOM éd., I.T.Q.A., Cahors.*

- RACUSEN R.H., KINNERSLEY A.M. et GALSTON A.W., 1977 - Osmotically induced changes in electrical properties of plant protoplast membranes.  
*Science*, 198 : 405-407.
- RAMOS S. et KABACK H.R. 1977 - The relationship between the electrochemical proton gradient and active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles.  
*Biochemistry*, 16 : 854-859.
- RAMOS S., SCHULDINER S., et KABACK H.R., 1976 - The electrochemical gradient of protons and its relationship to active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 : 1892-1896.
- RASI-CALDOGNO F., DE MICHELIS M.I., et PUGLIARIELLO M.C. - Evidence for an electrogenic ATPase in microsomal vesicles from pea internodes.  
*Biophys. Biophys. Acta*, à paraître.
- RAVEN J.A., 1976 - Active influx of hexose in *Hydrodictyon africanum*  
*New Phytol.*, 76 : 189-194.
- RAVEN J.A., 1977 - Regulation of solute transport at the cell level  
*in Society for Experimental Biology Symposium : XXXI. Integration of activity of the higher plant*, : 73-99, Cambridge University Press, Cambridge.
- RAVEN J.A. et SMITH F.A., 1977 - Characteristics, functions and regulation of active proton extrusion.  
*in MARRE E. et CIFERRI O., Regulation of cell membrane activities in plants : 25-40*, Elsevier : North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- RAVEN J.A. et SMITH F.A., 1978 - Effect of temperature and external pH on the cytoplasmic pH of *Chara corallina*.  
*J. Exptl. Bot.*, 29 : 853-866.
- RAVEN J.A. et SMITH F.A., 1979 - Intracellular pH and its regulation.  
*Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30 : 289-311.
- RAVEN J.A. et SMITH F.A., 1980 - The chemiosmotic point.  
*in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J. et DAINITY J., Plant membrane transport : current conceptual issues : 161-174*, Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

- REICHERT U. et FORET M., 1977 - Energy coupling in hypoxanthine transport of yeast. Potentiometric evidence for proton symport and potassium antiport.  
*F.E.B.S. Letters*, 83 : 325-328.
- REICHERT U., SCHMIDT R. et FORET M., 1975 - A possible mechanism of energy coupling in purine transport of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*F.E.B.S. Letters*, 52 : 100-102.
- REIJNGOUD D.J., 1978 - The pH inside Lysosomes.  
*Ph. D. Thesis, Université d'Amsterdam, Rodopi*.
- REIJNGOUD D.J., OUD P.S., KAS J. et TAGER J.M., 1976 - Relationship between medium pH and that of the lysosomal matrix as studied by two independent methods.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 448 : 290-302.
- REIJNGOUD D.J., OUD P.S. et TAGER J.M., 1976 - Effects of ionophores on intralysosomal pH.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 448 : 303-313.
- REIJNGOUD D.J. et TAGER J.M., 1973 - Measurement of intralysosomal pH.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 297 : 174-178.
- REIJNGOUD D.J. et TAGER J.M., 1975 - Effect of ionophores and temperature on intralysosomal pH.  
*F.E.B.S. Letters*, 54 : 76-79.
- REIJNGOUD D.J. et TAGER J.M., 1977 - The permeability properties of the lysosomal membrane.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 472 : 419-449.
- RIBAILLIER D., 1968 - Action in vitro de certains ions minéraux et composés organiques sur la stabilité des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
*Rev. Gen. Caout. Plast.*, 45 : 1395-1398.
- RIBAILLIER D., 1971 - Etude de la variation saisonnière de quelques propriétés du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
*Rev. Gen. Caout. Plast.*, 48 : 1031-1093.
- RIBAILLIER D., 1972 - Quelques aspects du rôle des lutoïdes dans la physiologie et l'écoulement du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth.) Müll.-Arg. Action de produits libérant de l'éthylène. Thèse Doctorat d'Etat, Mention Sciences Naturelles, Université d'Abidjan, C.N.R.S. n° AO-7716.

- RIBAILLIER D., JACOB J.L. et D'AUZAC J., 1971 - Sur certains caractères vacuolaires des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.  
*Physiol. Veg.*, 9 : 423-437.
- RICH R.P., BENDALL D.S.,
- RICHES J.P. et GOODING E.G.B., 1952 - Studies in the physiology of latex : I. Latex flow on tapping - Theoretical considerations.  
*New Phytol.* 51 : 1-10.
- ROBERTS J.K.M., RAY P.M., WADE-JARDETZKY N. et JARDETZKY O., 1980 - Estimation of cytoplasmic and vacuolar pH in higher plant cells by  $^{31}\text{P}$ -NMR.  
*Nature*, 283 : 870-872.
- ROBINSON B.H., 1973 - The role of mitochondrial tricarboxylate anion transport in metabolism.  
in *Symposium of the Society for Experimental Biology : XXVII. Rate control of Biological Processes* : 195-214., Cambridge University Press.
- ROBINSON B.H. et CHAPPELL J.B., 1967 - The inhibition of malate, tricarboxylate and oxoglutarate entry into mitochondria by 2-n-butyl-malonnate.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28 : 249-255.
- ROBINSON B.H. et OEI J., 1975 - Citrate transport in guinea pig heart mitochondria.  
*Can. J. Biochem.*, 53 : 643-647.
- RONA J.P., CORNELL D. et HELLER R., 1977 - Direct measurement of the potential difference between the cytoplasm of free cells of *Acer pseudoplatanus* L. and the external medium.  
*Bioelectrochem. Bioenerg.*, 4 : 185-194.
- RONA J.P., CORNELL D. et HELLER R., 1977 - Determination and interpretation of the electrical profile of free cells of *Acer pseudoplatanus*.  
in THELLIER M., MONNIER A., DEMARTY M. et DAINY J. *Transmembrane ionic exchanges in plants* : 349-356, Editions du C.N.R.S. et Editions de l'Université de Rouen.



- ROOS A., 1965 - Intracellular pH and buffering power of the cat brain.  
*Am. J. Physiol.*, 209 : 1233-1246.
- ROSENBERG T. et WILBRANDT W., 1963 - Carrier transport uphill : I. General.  
*J. Theoret. Biol.*, 5 : 288-305.
- ROTTENBERG H., 1976 - The driving force for proton (s) metabolites co-transport in bacterial cells.  
*F.E.B.S. Letters*, 66 : 159-163.
- ROTTENBERG H., 1979 - The measurement of membrane potential and  $\Delta pH$  in cells, organelles and vesicles in COLOWICK S.P., KAPLAN N.O., *Methods in Enzymology*, 55, Part. F, : 547-569, Academic Press, New-York, San Francisco et Londres.
- ROTTENBERG H., GRUNWALD T. et AVRON M., 1972 - Determination of  $\Delta pH$  in chloroplasts : I. Distribution of  $^{14}C$ -methylamine.  
*Eur. J. Biochem.*, 25 : 54-63.
- RUBINSTEIN B., 1978 - Use of lipophilic cations to measure the membrane potential of oat leaf protoplasts.  
*Plant Physiol.*, 62 : 927-929.
- RUIFROK P.G., KONINGS W.N. et MEIJER D.K.J., 1979 - Determination of the membrane potential in bacterial membrane vesicles from the accumulation of N-methyl-deptropine.  
*F.E.B.S. Letters*, 105 : 171-176.
- RUINEN J., 1950(a) - Microscopy of the lutoïds in *Hevea* latex.  
*Ann. Bogorienses*, 1 : 27-45.
- RUINEN J., 1950(b) - Comparative microscopical observations on latices of *Hevea* and others plants.  
*J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 13 : 121-132.
- RUINEN J. et HAAN-HOMANS L.N.S., 1950 - Investigations concerning the origins of the lutoïds of the latex of *Hevea brasiliensis*.  
*Arch. Rubbercult* 27 : 243-253.
- SADDLER H.D.W., 1970 - The membrane potential of *Acetabularia mediterranea*.  
*J. Gen. Physiol.*, 55 : 802-821.
- SAUNDERS J.A., 1979 - Investigations on vacuoles isolated from tobacco  
I. Quantitation of nicotine.  
*Plant Physiol.*, 64 : 74-78.

- SAUNDERS J.A. et COHN E.C.- 1978 - Presence of cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles of *Sorghum*.  
*Plant Physiol.*, 61 : 154-157.
- SCARBOROUGH G.A., 1976 - The *Neurospora* plasma membrane ATPase is an electrogenic pump.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 : 1485-1488.
- SCARBOROUGH G.A., 1977 - Properties of the *Neurospora crassa* plasma membrane ATPase.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 180 : 384-393.
- SCARBOROUGH G.A., 1980 - Proton translocation catalyzed by the electrogenic ATPase in the plasma membrane of *Neurospora*.  
*Biochemistry*, 19 : 2925-2931.
- SCARPA A., 1979 - Transport across mitochondrial membranes.  
in GIEBISCH G., TOSTESON D.C. et USSING H.H., *Membrane transport in Biology*, vol. 2, *Transport across single Biological Membranes* : 263-355, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
- SCATCHARD G., 1949 - The attractions of proteins for small molecules and ions.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51 : 660-672.
- SCHMIDT R. et POOLE R.J., 1980 - Isolation of protoplasts and vacuoles from storage tissue of red beet.  
*Plant Physiol.*, 66 : 22-28.
- SCHNEIDER D.L., 1974 - A membranous ATPase unique to lysosomes.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61 : 882-888.
- SCHNEIDER D.L., 1974 - Membranous localization and properties of ATPase of rat liver lysosomes.  
*J. Membrane Biol.*, 34 : 247-261.
- SCHNEIDER D.L., 1979 - ATPase and acidification of rat liver lysosomes in LEE C.P., SCHATZ G. et ERNSTER L., *Membrane Bioenergetics* : 495-506, Addison-Wesley Publishing Co., London, Amsterdam, Don Mills.
- SCHNEIDER D.L., 1979 - The acidification of rat liver lysosomes in vitro : a role for the membranous ATPase as a proton pump.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87 : 559-565.

- SCHNEIDER D.L. et CORNELL E., 1978 - Evidence for a proton pump in rat liver lysosomes in SEGAL H.L., DOYLE D.J., *Protein turn-over and lysosomal function* : 59-66, Academic Press, New-York.
- SCHULDINER S. et KABACK H.R., 1975 - Membrane potential and active transport in membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 14 : 5451-5456.
- SCHWARTZ D., 1974 - Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion, Paris.
- SCHWENCKE J., 1977 - Characteristics and integration of the yeast vacuole with cellular function. *Physiol. Vég.*, 15 : 491-517.
- SCHWENCKE J. et DE ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1976 - The transport of S-adenosyl-L-methionine in isolated yeast vacuoles and spheroplasts. *Eur. J. Biochem.*, 65 : 49-60.
- SERRANO R., 1978 - Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.*, 22 : 51-63.
- SERRANO R., 1980 - Effects of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur. J. Biochem.*, 105 : 419-424.
- SENTENAC H., 1977 - Mesure des équilibres ioniques entre les parois squelettiques et le milieu. Etude de quelques problèmes posés par l'obtention et l'interprétation des résultats. *Mémoire de DEA de Physiologie Végétale, U.S.T.L., Montpellier*.
- SHIMMEN T. et TAZAWA M., 1977 - Control of membrane potential and excitability of *Chara* cells with ATP and  $Mg^{2+}$ . *J. Membrane Biol.*, 37 : 167-192.
- SHLATZ L. et MARINETTI G.V., 1972 - Calcium binding to the rat liver plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 290 : 70-83.
- SKULACHEV V.P., 1971 - Energy transformation in the respiratory chain. *Curr. Top. Bioenerg.*, 4 : 127-190.
- SKULACHEV V.P., 1977 - Transmembrane electrochemical  $H^+$  potential as a convertible energy source for the living cell. *F.E.B.S. Letters*, 74 : 1-9.

- SKULACHEV V.P., 1979 - Electrochemical  $H^+$  potential : generation, transmission, utilization and buffering.  
in LEE C.P., SCHATZ G. et ERNST L., *Membrane Bioenergetics*  
: 373-392, Addison-Wesley Publish. Co Inc.
- SLATER E.C.,
- SLATER E.C., 1966 - Oxidative phosphorylation.  
in FLORKIN M. et STOTZ E.H., *Comprehensive Biochemistry*,  
14, : 327-396, Elsevier Pub. Comp., Amsterdam, London, New-York.
- SLAYMAN C.L. et GRADMAN D., 1975 - Electrogenic proton transport in the plasma membrane of *Neurospora*.  
*Biophys. J.*, 15 : 968-971.
- SLAYMAN C.L., LONG W.S. et LU C.Y.H., 1973 - The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*.  
*J. Membrane Biol.*, 14 : 305-338.
- SLAYMAN C.W. et SLAYMAN C.L., 1975 - Energy coupling in the plasma membrane of *Neurospora* ATP-dependent proton transport and proton-dependent sugar co-transport.  
in KABACK H.R., NEURATH H., RADDA G.K., SCHWYER R. et WILEY W.R., *Molecular aspects of membrane phenomena* : 233-248, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SLAYMAN C.L. et SLAYMAN C.W., 1974 - Depolarization of the plasma membrane of *Neurospora* during active transport of glucose : Evidence for a proton-dependent co-transport system.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71 : 1135-1139.
- SLAYMAN C.W., 1973 - The genetic control of membrane transport.  
*Curr. Top. Membr. Transport*, 4 : 1-174.
- SMITH F.A. et RAVEN J.A., 1979 - Intracellular pH and its regulation  
*Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30 : 289-311.
- SMITH F.A. et WALKER N.A., 1976 - Chloride transport in *Chara corallina* and the electrochemical potential difference for hydrogen ions.  
*J. Exptl. Bot.* 27 : 451-459.
- SMITH F.A. et WALKER N.A., 1978 - Entry of methylammonium and ammonium ions into *Chara* internodal cells.  
*J. Exptl. Bot.*, 29 : 107-120.

- SMITH R.H., 1953 - The phosphatides of the latex of *Hevea brasiliensis* :  
I. Biochemical changes.  
*Biochem. J.*, 56 :240-248.
- SOUTHORN W.A., 1961 - Microscopy of *Hevea* latex.  
*Proc. Nat. Rubb. Conf.*, Kuala Lumpur, 1960, : 766-776.
- SOUTHORN W.A., 1964 - A complex sub-cellular component of wide spread  
occurence in plant latices.  
*J. Exptl. Bot.*, 15 : 616-621.
- SPANSWICK R.M., 1980 - Biophysical control of electrogenicity in the  
characeae in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J. et DAINITY J., *Plant  
membrane transport : current conceptual Issues* : 305-313,  
Elsevier : North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New-  
York, Oxford.
- SPANSWICK R.M. et MILLER A.G., 1977 - Measurements of the cytoplasmic pH  
of *Nitella translucens*. Comparison of values obtained by  
microelectrode and weak acid methods.  
*Plant. Physiol.*, 59 : 664-666.
- SPURR A.R., 1969 - A low-viscosity epoxy resin embedding medium for  
electron microscopy.  
*J. Ultrastructure Res.*, 26 : 31-43.
- STEIN W.D., 1967 - The movement of molecules across cell membranes.  
*Academic Press. Inc.*, New York, San Francisco, Londres.
- STEIN W.D., 1975 - An algorithm for writing down flux equations for car-  
rier kinetics and its application to co-transport.  
*J. Theoret. Biol.*, 62 : 467-478.
- STEIN W.D. et HONIG B., 1977 - Models for the active transport of cations.  
The steady state analysis.  
*Mol. Cell. Biochem.*, 15 : 27-44.
- STEIN W.D., et LIEB W.R., 1973 - A necessary simplification of the kinetics  
of carrier transport.  
*Isr. J. Biochem.*, 11 : 325-339.
- STRITTMATER P. et VELICK S.F., 1957 - The purification and properties  
of microsomal cytochrome reductase.  
*J. Biol. Chem.*, 228 : 785-799.
- SUSANI M., ZIMNIAK P., FESSL F. et RUIS H., 1976 - Localization of cata-  
lase A in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae* : Evidence  
for the vacuolar nature of isolated "yeast peroxysomes".  
*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357 : 961-970.

- SWEET G.D., SOMERS J.M. et KAY W.W., 1979 - Purification and properties of a citrate-binding transport component, the C protein of *Salmonella typhimurium*.  
*Can. J. Biochem.*, 57 : 710-715.
- SZE H. et HODGES T.K., 1976 - Characterization of passive ion transport in plasma membrane vesicles of oat roots.  
*Plant Physiol.*, 58 : 304-308.
- TATA S.J., BOYCE A.N., ARCHER B.L. et AUDLEY B.G., 1976 - Lysozymes : major components of the sedimentable phase of *Hevea brasiliensis* latex.  
*J. Rubb. Res. Inst. Malaysia*, 24 : 233-236.
- TOLL T.L., HOWARD B.D., 1978 - Role of  $Mg^{2+}$  ATPase and a pH gradient in the storage of catecholamines in synaptic vesicles.  
*Biochemistry*, 17 : 2517-2523.
- TOLL T.L., GUNDERSON C.B., HOWARD B.D., 1977 - Energy utilization in the uptake of catecholamines by synaptic vesicles and adrenal chromaffin granules.  
*Brain Res.*, 136 : 59-66.
- TONNELAT J., 1973 - Biophysique. Vol. 1, Energétique, Cinétique, Isotopes.  
*Masson et Cie, Paris*.
- TRETON B., LE DALL M.T. et HESLOT H., 1978 - Excretion of citric and isocitric acids by the yeast *Saccharomyces lipolytica*.  
*Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6 : 67-77.
- TUPY J., 1969 - Nucleic acids in latex and the production of rubber in *Hevea brasiliensis*.  
*J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21 : 468-476.
- URECH K., DURR M., BOLLER T., WIEMKEN A., et SCHWENCKE J., 1978 - Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Arch. Microbiologie*, 116 : 275-278.
- VAN BEL A.J.E. et VAN ERVEN A.J., 1979 - A model for proton and potassium co-transport during the uptake of glutamine and sucrose by tomato internode disks.  
*Planta*, 145 : 77-82.
- VAN DER WILDEN W. et MATILE P., 1978 - Isolation and characterization of yeast tonoplast fragments.  
*Biochem. Physiol. Pflanzen*, 173 : 285-294.

- VAN DER WILDEN W., MATILE P., SCHELLENBERG M., MEYER J., et WIEMKEN A.,  
1973 - Vacuolar membranes : Isolation from yeast cells.  
*Z. Naturforsch.*, 28 : 416-421.
- VILLIERS T.A., 1971 - Lysosomal activities of the vacuole in damaged  
and recovering plant cells.  
*Nature*, 233 : 57-58.
- WADDELL W.J. et BATES R.G., 1969 - Intracellular pH.  
*Physiol. Rev.*, 49 : 285-329.
- WADDELL W.J. et BUTLER T.C., 1959 - Calculation of intracellular pH from  
the distribution of 5,5-dimethyl-2,4-oxazol-idine-dione  
(D.M.O.) : Application to skeletal muscle of the dog.  
*J. Clin. Invest.*, 38 : 720-729.
- WAGNER G., 1979 - Content and vacuole/extravacuole distribution of  
neutral sugars, free amino-acids and anthocyanin in proto-  
plasts.  
*Plant Physiol.*, 64 : 88-93.
- WAGNER G.J., 1979 - Accumulation in higher plants : the role of the  
vacuole.  
*Plant Physiol.*, 63 suppl., : 63, s-5.
- WAGNER G.J. et SIEGELMAN H.W., 1975 - Large-scale isolation of intact  
vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of  
mature plant tissues.  
*Science*, 190 : 1298-1299.
- WALKER N.A. et SMITH F.A., 1975 - Intracellular pH in *Chara corallina*  
measured by D.M.O. distribution.  
*Plant Sci. Letters*, 4 : 125-132.
- WALKER N.A. et SMITH F.A., 1977 - The proton-ATPase of *Chara* cell mem-  
brane : its role in determining membrane P.D. and cytoplas-  
mic pH.  
*in THELLIER M., MONNIER A., DEMARTY M. et DAINITY J., International Workshop on transmembrane ionic exchange in plants*  
: 255-261, Editions du C.N.R.S. et Editions de l'Université  
de Rouen.
- WALKER N.A., BEILBY M.J. et SMITH F.A., 1979 - Amine uniport at the plas-  
malemma of Charophyte cells : I. Current-voltage curves,  
saturation, kinetics and effects of unstirred layers.  
*J. Membrane Biol.*, 49 : 21-55.

- WALKER N.A., SMITH F.A. et BEILBY M.J., 1979 - Amine uniport at the plasmalemma of Charophyte cells : II. Ratio of matter to charge transported and the permeability of free base.  
*J. Membrane Biol.*, 49 : 283-296.
- WERDAN K., HELDT H.W. et MILOVANCEV M., 1975 - The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO<sub>2</sub> fixation in the light and dark.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 396 : 276-292.
- WIEMKEN A., Eigenschaften der Hefevakuole.  
*Ph. D. Thesis, E.T.H., n° 4340, Zurich, Suisse.*
- WIEMKEN A., 1975 - Isolation of vacuoles from yeasts.  
*in PRESCOTT D.M., Methods in cell Biology, XII : 99-109, Academic Press Inc., Londres.*
- WIEMKEN A. et DURR M., 1974 - Characterization of amino-acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Arch. Microbiol.*, 101 : 45-57.
- WIEMKEN A. et NURSE E., 1973 - The vacuole as a compartment of amino-acid pools in yeast.  
*Proc. 3<sup>rd</sup> International Specialized Symposium on Yeasts, Helsinki, Finlande, part II : 331-347.*
- WIEMKEN A., SCHELLENBERG M. et URECH K., 1979 - Vacuoles : the sole compartments of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)?  
*Arch. Microbiol.*, 123 : 23-35.
- WIERSUM L.K., 1957 - Enkele latex problemen.  
*Vakbl. Biol.*, 37 : 17-25.
- WILBRANDT W. et ROSENBERG T., 1961 - The concept of carrier transport and its corollaries in pharmacology.  
*Pharmacol. Rev.*, 13 : 109-183.
- WILKERSON L.S. et EAGON R.G., 1972 - Transport of citric acid by *Aerobacter aerogenes*.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 149 : 209-221.
- WILKERSON L.S. et EAGON R.G., 1974 - Effect of sodium on the transport and utilization of citric acid by *Aerobacter* (*Enterobacter*) *aerogenes*.  
*J. Bacteriol.*, 120 : 121-124.



- WILLECKE K., GRIES E.M. et OEHR P., 1973 - Coupled transport of citrate and magnesium in *Bacillus subtilis*.  
*J. Biol. Chem.*, 248 : 807-814.
- WILLECKE K. et PARDEE A.B., 1971 - Inducible transport of citrate in a gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis*.  
*J. Biol. Chem.*, 246 : 1032-1040.
- WILLENBRINK J. et DOLL S., 1979 - Characteristics of the sucrose uptake system of vacuoles isolated from red beet tissue. Kinetics and specificity of sucrose uptake system.  
*Planta*, 147 : 159-162.
- WILLIAMS R.J.P., 1961 - Possible functions of chains of catalysts.  
*J. Theoret. Biol.*, 1 : 1-17.
- WILLIAMS R.J.P., 1975 - Protein connections between protons, electrons and ATP.  
in QUAGLIARIELLO E., PAPA S., PALMIERI F., SLATER E.C. et SILIPRANDI N., *Electron transfer chains and oxidative phosphorylation* : 417-422, North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- WILLIAMS R.J.P., 1978 - The multifarious coupling of energy transduction.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 505 : 1-44.
- WILLIAMSON F.A. et WYN-JONES R.G., 1972 - On the role of plasma membrane and tonoplast adenosine-triphosphatases on ion uptake.  
*Symp. on the use of isotopes and radiation in research on soil plant, relationships including application in forestry*, Vienne, 13-17 Décembre 1971, : 69-80, International Atomic Energy Agency and Food and Agriculture organization of the United States.
- WILLIAMSON J. et VIALE K.D., 1979 - Methodology for transport studies : Graphical and computer curve fitting methods for glutamate and aspartate efflux kinetics.  
in COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O., *Methods in Enzymology*, 56 : 252-278, Academic Press Inc., New York.
- WILLSKY G., 1979 - Characterization of the plasma membrane  $Mg^{2+}$ -ATPase from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.  
*J. Biol. Chem.*, 254 : 3326-3332.

ACADEMIE DE MONTPELLIER  
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

## THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques  
du Languedoc  
pour obtenir le grade de DOCTEUR D'ETAT - Mention SCIENCES

LE FONCTIONNEMENT  
DU TRANSPORTEUR TONOPLASTIQUE DU CITRATE  
DU LATEX D'HEVEA BRASILIENSIS :  
RELATIONS AVEC L'ACTIVITE ADENOSINE-TRIPHOSPHATASE  
MEMBRANAIRE

PAR

BERNARD MARIN

Soutenue le 2 Octobre 1981 devant la Commission d'Examen :

Jury : MM. C. LIORET, Université de Paris XI, Président  
J. D'AUZAC, U.S.T.L.,  
Mle D.C. GAUTHERON, Université de Lyon I,  
MM. C. GRIGNON, E.N.S.A.M.,  
E. KDMOR, Universität Bayreuth, R.F.A.,  
U. LUTTGE, Technische Hochschule Darmstadt, R.F.A.,  
Mme N. PARIS, U.S.T.L.

FASCICULE B

A N N E X E S

F I G U R E S

T A B L E A U X

E T P L A N C H E S

PARTIE I

A N N E X E I

ANNEXE 1 :

CALCUL DE LA DISTRIBUTION DU CITRATE  
EN SES DIFFERENTES FORMES  
EN FONCTION DU pH  
ET DE LA CONCENTRATION EN  $Mg^{2+}$   
DU MILIEU

L'acide citrique se dissocie en 4 formes de valence 0, -1, -2, et -3 que nous noterons  $RH_3$ ,  $RH_2$ ,  $RH$  et  $R$ . Les formes  $RM$  et  $RHM$  chélatent le magnésium. Les complexes qui en résultent s'écriront  $RHM$  et  $RM$ .

Par définition, on aura :

$$\frac{RH_2 \cdot H}{RH_3} = K_1 \quad (1)$$

$$\frac{RH \cdot H}{RH_2} = K_2 \quad (2)$$

$$\frac{R \cdot H}{RH} = K_3 \quad (3)$$

$$\frac{RH \cdot M}{RHM} = K_4 \quad (4)$$

$$\frac{R \cdot M}{RM} = K_5 \quad (5)$$

$$RH_3 + RH_2 + RH + R + RHM + RM = R_T \quad (6)$$

$$M + RHM + RM = M_T \quad (7)$$

où  $R_T$  représente la concentration totale en citrate ;  $M_T$ , la concentration totale en  $Mg^{2+}$  et  $M$ , la concentration de  $Mg^{2+}$  libre.

Selon la valeur du pH, la concentration de chaque forme pourra être calculée à partir soit de  $R$ , soit de  $RH$ , soit de  $RH_2$ , soit de  $RH_3$ . Mais, pour la gamme de pH employée, seuls les calculs de distribution à partir de  $R$  et de  $RH$  sont développés.

A) CALCUL DEVELOPPE A PARTIR DE LA FORME RH.

D'après (1),

$$\begin{aligned} RH_2 \cdot H &= K_1 \cdot RH_3 \\ \rightarrow RH_3 &= RH_2 \cdot \frac{H}{K_1} \end{aligned} \quad (8)$$

D'après (2),

$$\begin{aligned} RH \cdot H &= K_2 \cdot RH_2 \\ \rightarrow RH_2 &= RH \cdot \frac{H}{K_2} \end{aligned} \quad (9)$$

D'après (3),

$$\begin{aligned} R \cdot H &= K_3 \cdot RH \\ \rightarrow R &= \frac{K_3}{H} \cdot RH \end{aligned} \quad (10)$$

D'après (4),

$$\begin{aligned} RH \cdot M &= K_4 \cdot RHM \\ \rightarrow RHM &= RH \cdot \frac{M}{K_4} \end{aligned} \quad (11)$$

D'après (5),

$$\begin{aligned} R \cdot M &= K_5 \cdot RM \\ \rightarrow RM &= R \cdot \frac{M}{K_5} \end{aligned} \quad (12)$$

D'après (9), (8) s'écrit :

$$RH_3 = RH \cdot \frac{H}{K_2} \cdot \frac{H}{K_1} = RH \cdot \frac{H^2}{K_1 \cdot K_2} \quad (13)$$

D'après (10), (12) s'écrit :

$$RM = \frac{R}{K_5} \cdot M = \frac{K_3}{H} \cdot RH = \frac{M}{K_5}$$

$$RM = \frac{K_3}{K_5 \cdot H} \cdot M \cdot RH. \quad (14)$$

(7) peut alors s'écrire, à l'aide de (11) et (14) :

$$M_T = M + RH \cdot \frac{M}{K_4} + \frac{K_3}{K_5 \cdot H} \cdot M \cdot RH.$$

$$M_T = M \left[ 1 + \frac{RH}{K_4} + \frac{K_3 \cdot RH}{K_5 \cdot H} \right]$$

$$M_T = M \left[ 1 + RH \left( \frac{1}{K_4} + \frac{K_3}{K_5 \cdot H} \right) \right]$$

$$M = \frac{M_T}{1 + RH \left( \frac{1}{K_4} + \frac{K_3}{K_5 \cdot H} \right)} \quad (15)$$

On pose :

$$A_1 = \frac{1}{K_4} + \frac{K_3}{K_5 \cdot H}$$

$$A_1 = \frac{1}{K_4} + \frac{10^{pH-pK_3}}{K_5} \quad (16)$$

(15) s'écrit alors :

$$M = \frac{M_T}{1 + RH \cdot A_1} \quad (15')$$

Dès lors, (6) s'écrit à l'aide de (9), (10), (13), (11), (14) et (15').

$$R_T = RH \cdot \frac{H^2}{K_1 K_2} + RH \cdot \frac{H}{K_2} + RH + \frac{K_3}{H} \cdot RH + \left[ \frac{RH}{K_4} + \frac{K_3 \cdot RH}{K_5 \cdot H} \right] \left[ \frac{M_T}{1 + A_1 \cdot RH} \right] \quad (17)$$

$$R_T = RH. \left[ \frac{H^2}{K_1 K_2} + \frac{H}{K_2} + 1 + \frac{K_3}{H} + A_1. \left( \frac{M_T}{1 + A_1. RH} \right) \right] \quad (18)$$

On pose :

$$A_0 = \frac{H^2}{K_1 K_2} + \frac{H}{K_2} + 1 + \frac{K_3}{H} \quad (19)$$

$$A_0 = 10^{pK_1 + pK_2 - 2pH} + 10^{pK_2 - pH} + 1 + 10^{pH - pK_3} \quad (20)$$

(18) devient avec (19)

$$R_T = RH. \left[ A_0 + A_1. \left( \frac{M_T}{1 + A_1. RH} \right) \right] \quad (21)$$

$$RH. \left[ A_0 + A_1. \frac{M_T}{1 + A_1. RH} \right] = R_T$$

$$RH. A_0 (1 + RH. A_1) + RH. A_1. M_T = R_T (1 + RH. A_1).$$

Par commodité, on remplace RH par x.

$$\begin{aligned} x. A_0 (1 + x. A_1) + x. A_1. M_T &= R_T (1 + x. A_1) \\ x. A_0 + x^2. A_1. A_0 + x. A_1. M_T - R_T - x. R_T. A_1 &= 0 \\ x^2 (A_1. A_0) + x (A_0 + A_1. M_T - A_1. R_T) - R_T &= 0 \end{aligned}$$

$$x^2 + x. \left[ \frac{A_0 + A_1 (M_T - R_T)}{A_0. A_1} \right] - \frac{R_T}{A_0. A_1} = 0 \quad (22)$$

On a nécessairement :

- $A_0 > 0$ ,
- $A_1 > 0$ ,
- $R_T > 0$ .

Par conséquent :

$$\frac{R_T}{A_0. A_1} > 0 \rightarrow - \frac{R_T}{A_0. A_1} < 0$$



Donc, les deux racines de cette équation du second degré sont de signe opposé. Il faut la racine positive.

On remarque que :

$$\frac{A_0 + A_1 (M_T - R_T)}{A_0 \cdot A_1} = \frac{1}{A_1} + \frac{M_T - R_T}{A_0} \quad (23)$$

(22) peut s'écrire à l'aide de (23) :

$$x^2 + x \left[ \frac{1}{A_1} + \frac{1}{A_0} (M_T - R_T) \right] - \frac{R_T}{A_0 \cdot A_1} = 0 \quad (24)$$

avec comme racine :

$$x = \frac{- \left( \frac{1}{A_1} + \frac{M_T - R_T}{A_0} \right) \pm \sqrt{\left( \frac{1}{A_1} + \frac{M_T - R_T}{A_0} \right)^2 + 4 \frac{R_T}{A_0 \cdot A_1}}}{2} \quad (25)$$

On peut poser :

$$x = \frac{1}{A_1} + \frac{M_T - R_T}{A_0} \quad (26)$$

Avec (26), (25) s'écrit :

$$x = \frac{- x \pm \sqrt{x^2 + \frac{4 R_T}{A_0 \cdot A_1}}}{2} \quad (27)$$

Seule la racine positive est considérée :

$$x = \frac{- x + \sqrt{x^2 + \frac{4 R_T}{A_0 \cdot A_1}}}{2} \quad (28)$$

Il sera dès lors possible de calculer la concentration de chaque forme de citrate en reprenant les équations (13) pour  $RH_3$ , (9) pour  $RH_2$ , (10) pour  $R$ , (11) pour  $RHM$  et (14) pour  $RM$ .

B) CALCUL DEVELOPPE A PARTIR DES AUTRES FORMES.

Pour les calculs développés à partir des autres formes ( $R$ ,  $RH_2$  ou  $RH_3$ ), le raisonnement est identique. Par permutation circulaire, il est possible de retrouver les expressions de  $A_0$  et de  $A_1$  permettant le calcul des concentrations de  $R$ , de  $RH$ , de  $RH_2$ , de  $RH_3$ , de  $RHM$  et de  $RM$ .

---

|                 | Formule de calcul<br>à employer                                   |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| A <sub>0</sub>  | $10^{pH - pK_2 - pK_3} + 10^{pH - pK_2} + 1 + 10^{pK_1 - pH}$     |
| A <sub>1</sub>  | $\frac{10^{pH - pK_2}}{K_4} + \frac{10^{2pH - pK_2 - pK_3}}{K_5}$ |
| R               | $x \cdot 10^{2pH - pK_2 - pK_3}$                                  |
| RH              | $x \cdot 10^{pH - pK_2}$                                          |
| RH <sub>2</sub> | x                                                                 |
| RH <sub>3</sub> | $x \cdot 10^{pK_1 - pH}$                                          |
| M               | $\frac{M_T}{1 + x \cdot A_1}$                                     |
| RHM             | $x \cdot \frac{M}{K_4} \cdot 10^{pH - pK_2}$                      |
| RM              | $x \cdot \frac{10^{2pH - pK_2 - pK_3}}{K_5} \cdot M$              |

CALCUL DE LA DISTRIBUTION DES  
DIFFERENTES FORMES DE CITRATE A PARTIR  
DE RH<sub>2</sub>

(Valable pour pH ≤ 5,0)

|        | Formule de calcul<br>à employer                                |
|--------|----------------------------------------------------------------|
| $A_0$  | $10^{pH - pK_3} + 1 + 10^{pK_2 - pH} + 10^{pK_1 + pK_2 - 2pH}$ |
| $A_1$  | $\frac{1}{K_4} + \frac{10^{pH - pK_3}}{K_5}$                   |
| $R$    | $x \cdot 10^{pH - pK_3}$                                       |
| $RH$   | $x$                                                            |
| $RH_2$ | $x \cdot 10^{pK_2 - pH}$                                       |
| $RH_3$ | $x \cdot 10^{pK_1 + pK_2 - 2pH}$                               |
| $M$    | $\frac{M_T}{1 + x \cdot A_1}$                                  |
| $RHM$  | $x \cdot \frac{M}{K_4}$                                        |
| $RM$   | $x \cdot \frac{10^{pH - pK_3}}{K_5} M$                         |

CALCUL DE LA DISTRIBUTION DES  
DIFFERENTES FORMES DE CITRATE A PARTIR  
DE  $RH^{2-}$

(Valable pour  $4,0 < pH < 6,5$ )

|                 | Formule de calcul<br>à employer                                               |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| A <sub>0</sub>  | $1 + 10^{pK_3 - pH} + 10^{pK_2 + pK_3 - 2pH} + 10^{pK_1 + pK_2 + pK_3 - 3pH}$ |
| A <sub>1</sub>  | $\frac{10^{pK_3 - pH}}{K_4} + \frac{1}{K_5}$                                  |
| R               | x                                                                             |
| RH              | $x \cdot 10^{pK_3 - pH}$                                                      |
| RH <sub>2</sub> | $x \cdot 10^{pK_2 + pK_3 - 2pH}$                                              |
| RH <sub>3</sub> | $x \cdot 10^{pK_1 + pK_2 + pK_3 - 3pH}$                                       |
| M               | $\frac{M_T}{1 + x \cdot A_1}$                                                 |
| RHM             | $x \cdot \frac{M}{K_4} \cdot 10^{pK_3 - pH}$                                  |
| RM              | $x \cdot \frac{M}{K_5}$                                                       |

CALCUL DE LA DISTRIBUTION DES  
 DIFFERENTES FORMES DE CITRATE A PARTIR  
 DE R<sup>3-</sup>  
 (Valable pour pH > 6,5)

PARTIE II

A N N E X E 2

## ANNEXE 2

### PROCEDURE DE CALCUL UTILISE LORS DES SIMULATIONS

#### A) DEFINITION DES PARAMETRES EMPLOYES.

- Concentration extérieure de la forme perméante ( $RH^{2-}$ )

Elle correspond par définition à  $C_{ex}$ .  $C_{ex}$  est calculé à partir de la concentration totale du citrate dans le milieu, au pH désiré et en présence ou non de magnésium (cf Annexe 1 : Calcul de la distribution du citrate en ses différentes formes en fonction du pH et de la concentration en  $Mg^{2+}$  du milieu.)

- Concentration interne de la forme perméante ( $RH^{2-}$ )

Par définition, il s'agit de  $C_{in}$ . Elle est obtenue comme  $C_{ex}$ , en tenant compte du pH interne et de la quantité de magnésium présente dans le compartiment vésiculaire.

- Influx du citrate

$J_{in}$  est calculé d'après l'hypothèse d'un transport saturable :

$$J_{in} = \frac{J_{max}^{in} \cdot C_{ex}}{K_{max}^{in} + C_{ex}} \quad (1)$$

- Efflux du citrate

$J_{ex}$  est calculé de la même façon :

$$J_{ex} = \frac{J_{max}^{ex} \cdot C_{in}}{K_{max}^{in} + C_{in}} \quad (2)$$

- Flux des traceurs

Ils sont estimés à partir des valeurs de  $J_{in}$  et de  $J_{ex}$  et des activités spécifiques interne et externe, en considérant les relations :

$$J_{in}^x = s_{ex} - J_{in} \quad (3)$$

$$J_{ex}^x = s_{in} \cdot J_{ex} \quad (4)$$

- Contenus internes en citrate

$Q_{in}$  et  $Q_{in}^x$  sont obtenus, en écrivant :

$$Q_{in} = v \cdot C_{in} \quad (5)$$

$$Q_{in}^x = v \cdot C_{in}^x \quad (6)$$

B) CONDUITE DES CALCULS

Les conduites sont faits par itération. La procédure consiste à répéter les opérations ci-dessus, définies pour un intervalle de temps  $dt = 1$  mn.

Ainsi, par exemple, on a la situation de départ suivante, qui est celle la plus couramment rencontrée :

$$Q_{in} = 50 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$$

$$\rightarrow \text{soit } C_{in} = 5 \text{ mM}$$

$$\text{en considérant } v = 10 \text{ } \mu\text{l} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$$

Il n'y a pas de  $^{14}\text{C}$ -citrate dans le compartiment vésiculaire au temps  $t = 0$  mn. En conséquence,

$$Q_{ves}^x = 0$$

$$\text{pH}_{in} = 6,91$$

Comme nous l'avons indiqué dans l'Annexe 1, le calcul de la concentration de la forme perméante  $C_{in}$  se fait en considérant la



relation :

$$[\text{RH}^{2-}]_{\text{in}} = \left( \frac{-X + \sqrt{X^2 + 4 \frac{RT}{A_0 \cdot A_1}}}{2} \right) (10^{pK_2 + pK_3 - 2pH}) \quad (7)$$

valable lorsque le pH est supérieur ou égal à 6,5, avec :

$$X = \frac{1}{A_1} + \frac{M_T - R_T}{A_0}$$

$$A_1 = \frac{1}{K_5} + \frac{10^{pK_3 - pH}}{K_4}$$

$$A_0 = 1 + 10^{pK_3 - pH} + 10^{pK_2 - pK_3 - 2pH} + 10^{pK_1 + pK_2 + pK_3 - 3pH}$$

$R_T$  représentant la concentration totale en citrate ;  $M_T$ , la concentration totale en  $\text{Mg}^{2+}$  ;  $pK_1$ ,  $pK_2$  et  $pK_3$ , les valeurs de  $pK$  pour les trois fonctions carboxyliques de l'acide citrique ;  $K_4$  et  $K_5$ , les valeurs des constantes d'association du magnésium respectivement pour les formes RHM et RM.

On procédera alors comme indiqué dans le Tableau joint à cette annexe.

(A) → T = 0 MN

- $pH_{in}$
- $Mg^{2+}_{in}$
- $Q_{in} = f(\text{citrate total})$
- concentration de la forme perméante interne  $C_{in}$  :  
 $C_{in} = f(Q_{in}, pH_{in}, Mg^{2+}_{in})$
- $Q^*_{in} = 0$
- $S_{in} = \frac{Q^*_{in}}{Q_{in}} = 0$

(B) → T = T + DT

- $J^{in} = \frac{J^{in}_{max} \cdot C_{ex}}{K^{in}_{max} + C_{ex}}$  et  $J^{ex} = \frac{J^{in}_{max} \cdot C_{in}}{K^{ex}_{max} + C_{in}}$
- Quantité de citrate échangée :  $(J^{in} - J^{ex}) \cdot dt$
- Nouveau contenu :  $(Q_{in})_{nouveau} = (Q_{in})_{précédent} + (J^{in} - J^{ex}) \cdot dt$
- Nouvelle concentration de la forme perméante interne  $C_{in}$  :  
 $(C_{in})_{nouvelle} = f[(Q_{in})_{nouveau}, (pH_{in})_{nouveau}, (Mg^{2+}_{in})_{nouveau}]$
- Influx du traceur :  
 $S^{ex} \cdot J^{in} = J^{*in}$
- Efflux du traceur :  
 $S^{in} \cdot J^{ex} = J^{*ex}$
- Nouveau contenu en traceur :  
 $(Q^*_{in})_{nouveau} = (Q^*_{in})_{précédent} + (J^{*in} - J^{*ex}) \cdot dt$
- Nouvelle activité spécifique :  
 $S^{in} = \frac{Q^*_{in}}{Q_{in}}$

(C) → Nouvelle incrémentation de temps : retour à (B)

PROCEDURE DE CALCUL UTILISEE  
DANS LES SIMULATIONS

PARTIE III

FIGURES,  
TABLEAUX  
ET PLANCHES

activité MDH résiduelle du sédiment  
(en U.I. par fraction)

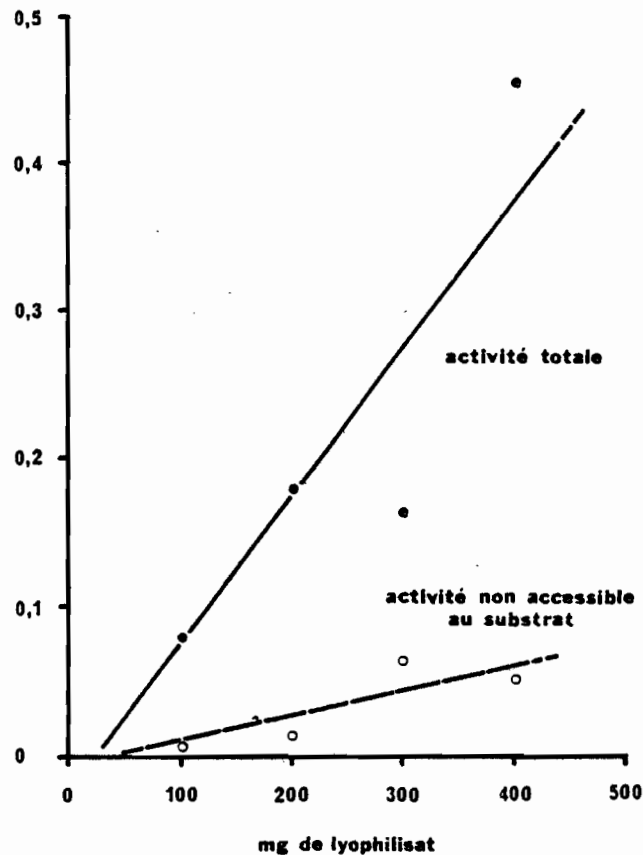


Figure 3.1

MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE DE VESICULATION :

EXISTENCE D'UNE ACTIVITE MALATE-DESHYDROGENASE

NON ACCESSIBLE AU SUBSTRAT FONCTION DE LA QUANTITE DE  
LYOPHILISAT MANIPULEE

Dans un volume constant de 3 ml constitué par un milieu de vésiculation 50 mM T.E.A., 10mM  $\beta$ -mercapto-éthanol, pH 7,5, on disperse une quantité de lyophilisat de plus en plus grande, variant de 100 à 400 mg, en présence d'activité malate-déshydrogénase (correspondant à 79,8 U.I.). L'homogénéisation est réalisée dans les conditions habituelles avec l'aide d'un Potter (4° C, 20 allers et retours [ = 20 A.R. ] ). La suspension, conservée dans la glace fondante, est centrifugée sur une couche de 8 ml de saccharose 0,3 M. Il est déposé 2,5ml de cette suspension sur chaque couche. La centrifugation est faite à 69.000 x g pendant 15 min. à 4° C. Le sédiment est repris par 2 ml de milieu initial, auquel on a ajouté du mannitol (0,3 M). La suspension qui en résulte est homogénéisée à l'aide d'un vortex avant d'être déposée sur 10 ml de saccharose 0,3 M, préparé dans le milieu de vésiculation (contenant 0,3M mannitol). Après une sédimentation faite dans les mêmes conditions, le culot final, repris par 1,25ml de tampon T.E.A. -mannitol et homogénéisé à l'aide encore du vortex, constituera une suspension membranaire à partir de laquelle les activités malate-déshydrogénase libre et totale seront déterminées.

espace lié à la diffusion du traceur  
dans le sédiment (en  $\mu\text{l}$ )

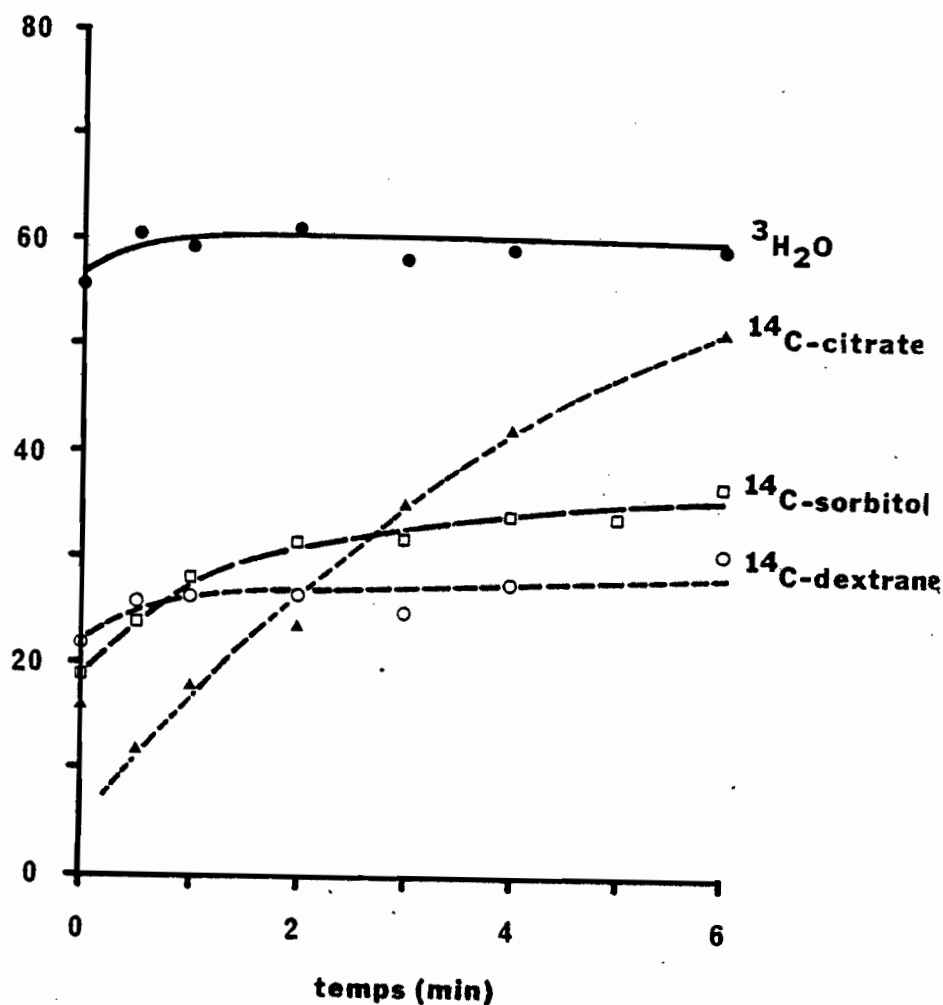


Figure 3.2

CINETIQUE DE DIFFUSION DE DIFFERENTES MOLECULES DANS  
LE SEDIMENT LUTOÏDIQUE

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées dans un milieu phosphate-mannitol, selon le protocole expérimental habituel (voir "matériel et méthodes"). Le sédiment, résultant d'un cycle de deux lavages et correspondant à 600mg de lyophilisat, est repris dans un volume final de 4ml de milieu d'incubation (dépourvu d'ATP-  $\text{Mg}^{2+}$ ).

L'incorporation se déroule sur 1,0ml de cette suspension vésiculaire mise en présence, soit d'eau tritiée (0,5  $\mu\text{Ci}$ ), soit de  $^{14}\text{C}$ -sorbitol (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), soit de  $^{14}\text{C}$ -dextrane (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), soit de  $^{14}\text{C}$ -citrate (0,1  $\mu\text{Ci}$ ). Elle a lieu à 0°C. Chaque prélèvement (0,1ml) est traité comme indiqué par ailleurs.

variation de la densité optique  
mesurée à 520 nm  
(en unité)

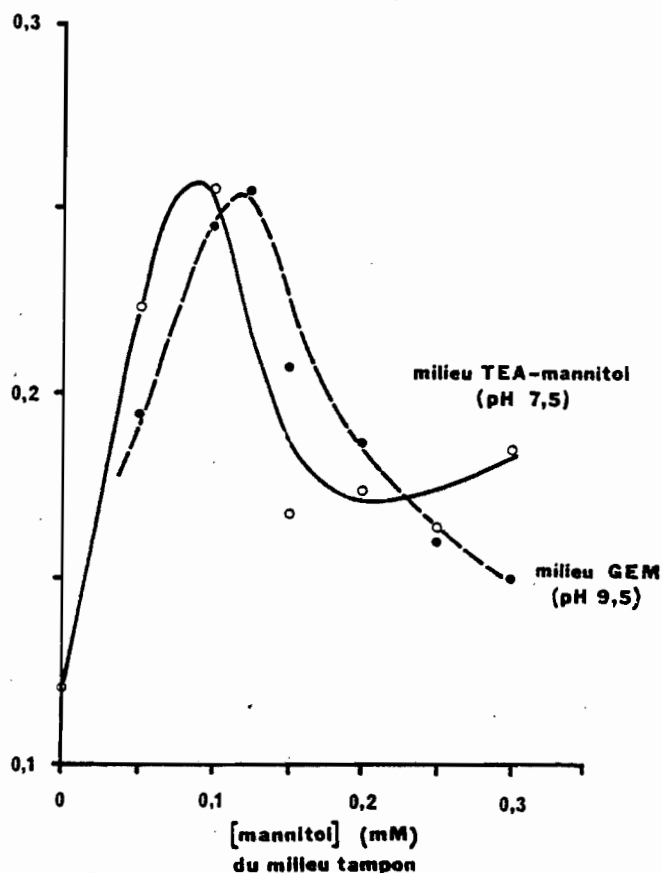


Figure 3.3

#### MISE EN EVIDENCE DE STRUCTURES OSMOSENSIBLES DANS UN SEDIMENT MEMBRANAIRE

120 mg de lyophilisat sont dispersés dans 20 ml de milieu T. E. A. - mannitol (20 mM T. E. A., 5 mM  $\beta$  - mercapto-éthanol, 300 mM mannitol, pH 7, 5). L'homogénéisation est assurée par une pottérisation faite dans les conditions habituelles (4°C, 25 A.R.). La suspension membranaire est centrifugée (39.000 x g, 10 min., 4°C) après avoir éliminé au préalable les agrégats (5.000 x g, 5 min., température ambiante). Le sédiment est repris par 6 ml de milieu initial.

L'analyse est effectuée sur 200  $\mu$ l de suspension membranaire, dispersée dans 2ml de milieu (T. E. A., pH 7, 5 ou G. E. M., pH 9, 5) contenant des concentrations croissantes en mannitol, dans une chambre thermostatée à 30°C. La longueur d'onde choisie est 520nm. La variation de la densité optique mesurée à cette longueur d'onde correspond à la différence observée entre les valeurs lues au bout de 30 sec. et de 270 sec. (après l'introduction des vésicules dans le milieu d'analyse).

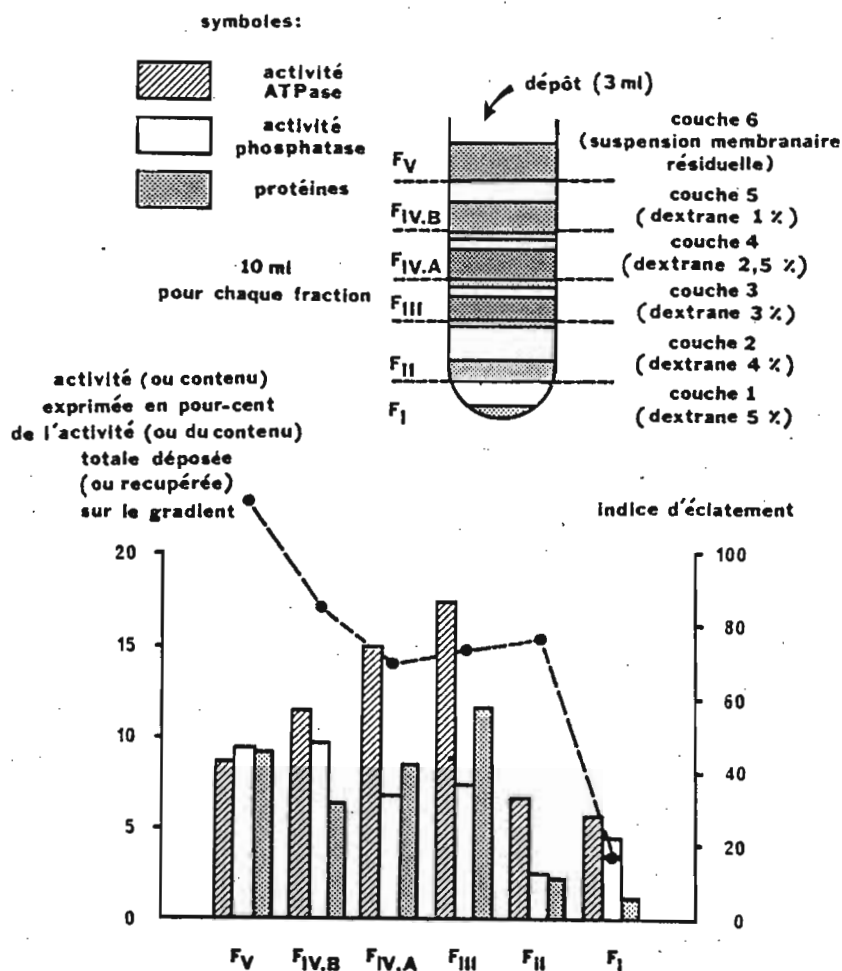


Figure 3.4

DISTRIBUTION DE LA POPULATION VESICULAIRE  
FORMEE DANS UN MILIEU PHOSPHATE-MANNITOL SUR UN GRADIENT  
DISCONTINU DE DEXTRANE

La suspension vésiculaire provient de la dispersion de 600 mg de lyophilisat dans 60 ml de milieu phosphate-mannitol (pH 6,0). L'homogénéisation est réalisée dans les conditions habituelles en chambre froide (25 A.R.). Elle est centrifugée à  $39.000 \times g$ , pendant 10 min. à 4°C. L'ensemble des sédiments est repris dans un volume final de 4 ml de milieu phosphate-mannitol (pH = 7,5) contenant 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>. La suspension qui en résulte est immédiatement centrifugée au travers d'un gradient discontinu de dextrane. Les conditions de centrifugation sont toujours les mêmes : 60 min. à  $69.000 \times g$  à 0°C, pour toutes les manipulations décrites.

Toutes les analyses se font sur les diverses fractions ainsi récoltées. L'indice d'éclatement est également déterminé (- • - - • -).

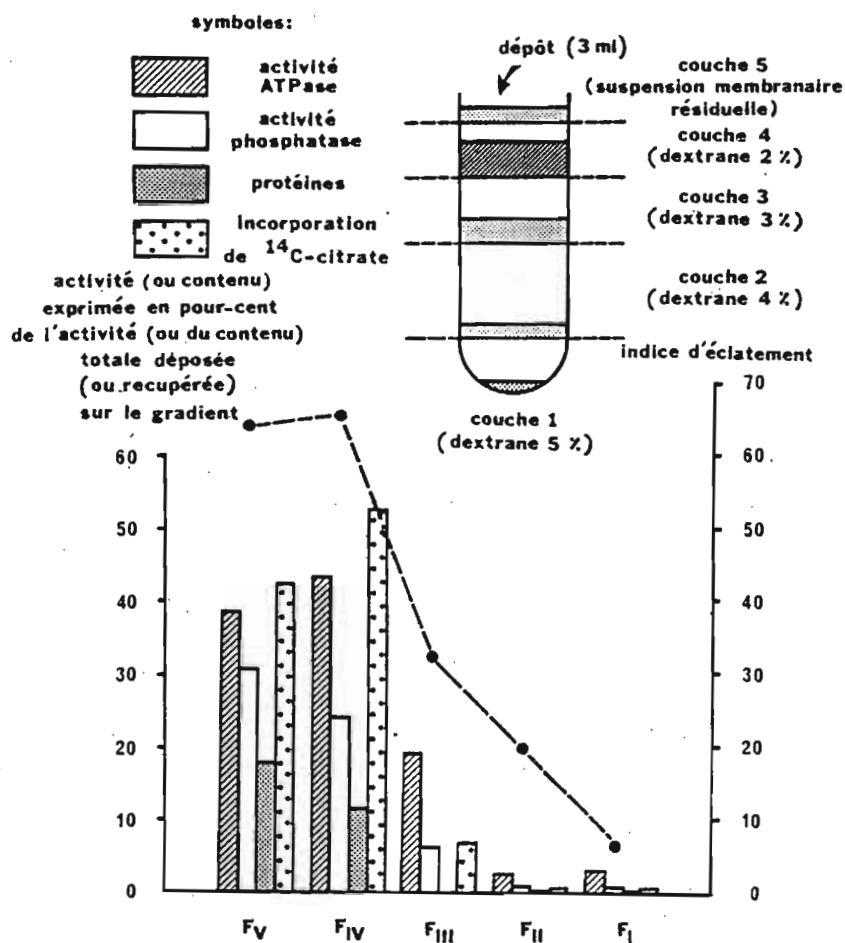


Figure 3.5

DISTRIBUTION DE LA POPULATION VESICULAIRE FORMEE  
DANS UN MILIEU PHOSPHATE-MANNITOL SUR UN GRADIENT  
DISCONTINU DE DEXTRANE

La suspension vésiculaire provient de la dispersion de 800 mg de lyophilisat dans 160 ml de tampon phosphats-mannitol (pH 6,0). L'homogénéisation est réalisée dans les conditions habituelles en chambre froide (25 A.R.). Elle est centrifugée à 39.000 x g, pendant 10 min. à 4°C. Au préalable, 4 ml de suspension initiale ont été prélevés pour effectuer les différents dosages. L'ensemble des sédiments est repris dans un volume final de 6 ml de milieu phosphate-mannitol (pH 7,5). La suspension qui en résulte est incubée 60 min. à 30°C avant qu'une aliquote de 3 ml soit déposée sur un gradient discontinu de dextrane pour être sédimentée. Après centrifugation chacune des bandes est prélevée ; le culot repris par 3 ml de tampon d'incubation.

Toutes les analyses se font sur les diverses fractions ainsi récoltées. L'indice d'éclatement est également déterminé ( - - - - )



radioactivité spécifique  
(dpm  $\times \mu\text{g}^{-1}$  prot.)

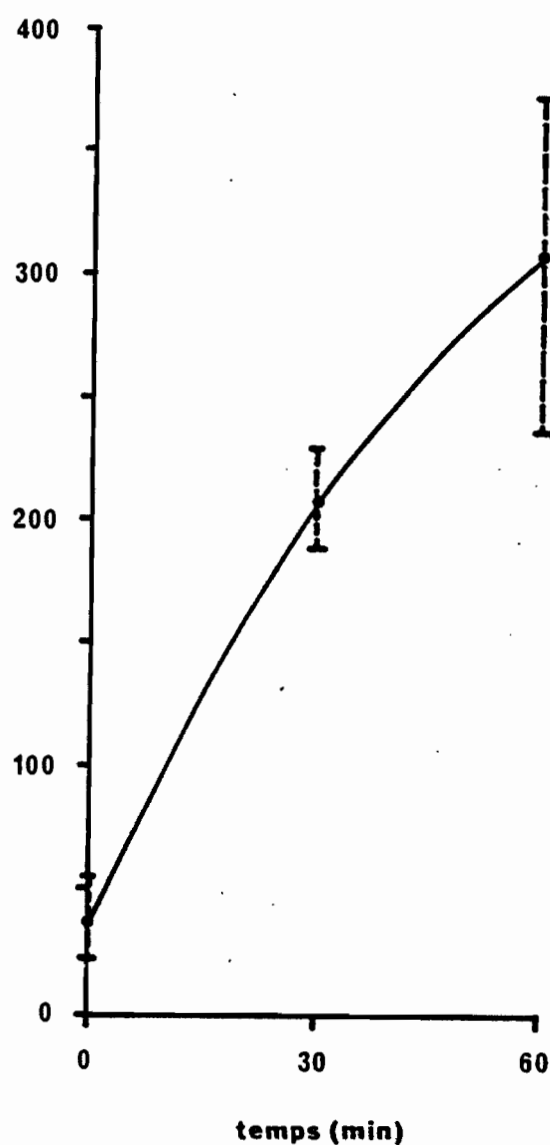
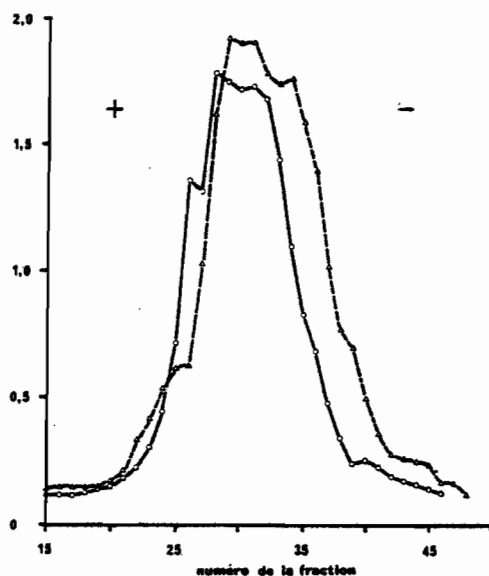


Figure 3.6

CAPACITE D'INCORPORATION DE  $^{14}\text{C}$ -CITRATE PAR DES VESICULES  
FORMEES DANS UN MILIEU PHOSPHATE-MANNITOL

La suspension membranaire est préparée selon le protocole indiqué dans la figure 3.5. Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%

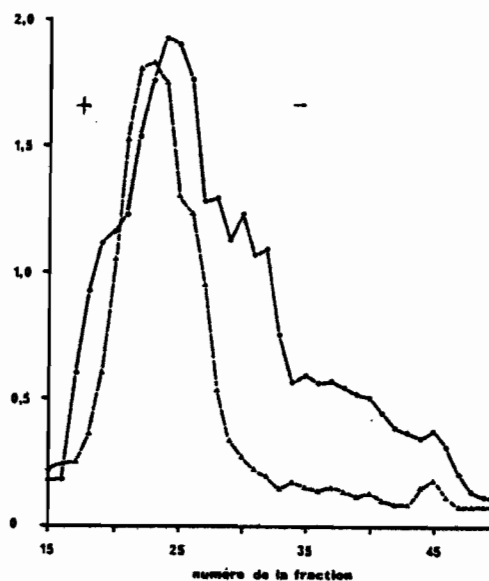
densité optique  
mesurée à 280 nm  
(en unité)



A

ELECTROPHORESE  
A pH 6,0

densité optique  
mesurée à 280 nm  
(en unité)



B

ELECTROPHORESE  
A pH 7,5

Figure 3.7

INFLUENCE DU pH SUR LA SEPARATION DES VESICULES  
PAR ELECTROPHORESE EN VEINE LIQUIDE

Chaque motif provient de la dispersion de 200 mg de lyophilisat dans 20 ml de milieu phosphate-mannitol, dont le pH est ajusté, soit à 6,0, soit à 7,5. L'homogénéisation est faite dans les conditions habituelles (voir "matériel et méthodes").

Après centrifugation ( $39.000 \times g$ , 15 mn.,  $4^{\circ}C$ ) et deux lavages, le sédiment est repris par quelques ml de tampon d'incubation, ajusté à pH 6,0 ou à pH 7,5. Le volume final est de 5 ml.

Pendant l'électrophorèse, le champ électrique est de  $87,5V \times cm^{-1}$  avec une intensité de 82 mA. La migration des vésicules formées, soit à pH 6,0 (-o-o-), soit à pH 7,5 (-Δ-Δ-), se fait à  $5^{\circ}C$ . Le tampon de la chambre d'électrophorèse est collecté dans 90 tubes. La vitesse du flux d'injection de la suspension membranaire est de 10 ml par heure. La densité optique du contenu de chaque tube est mesurée à 280 nm.

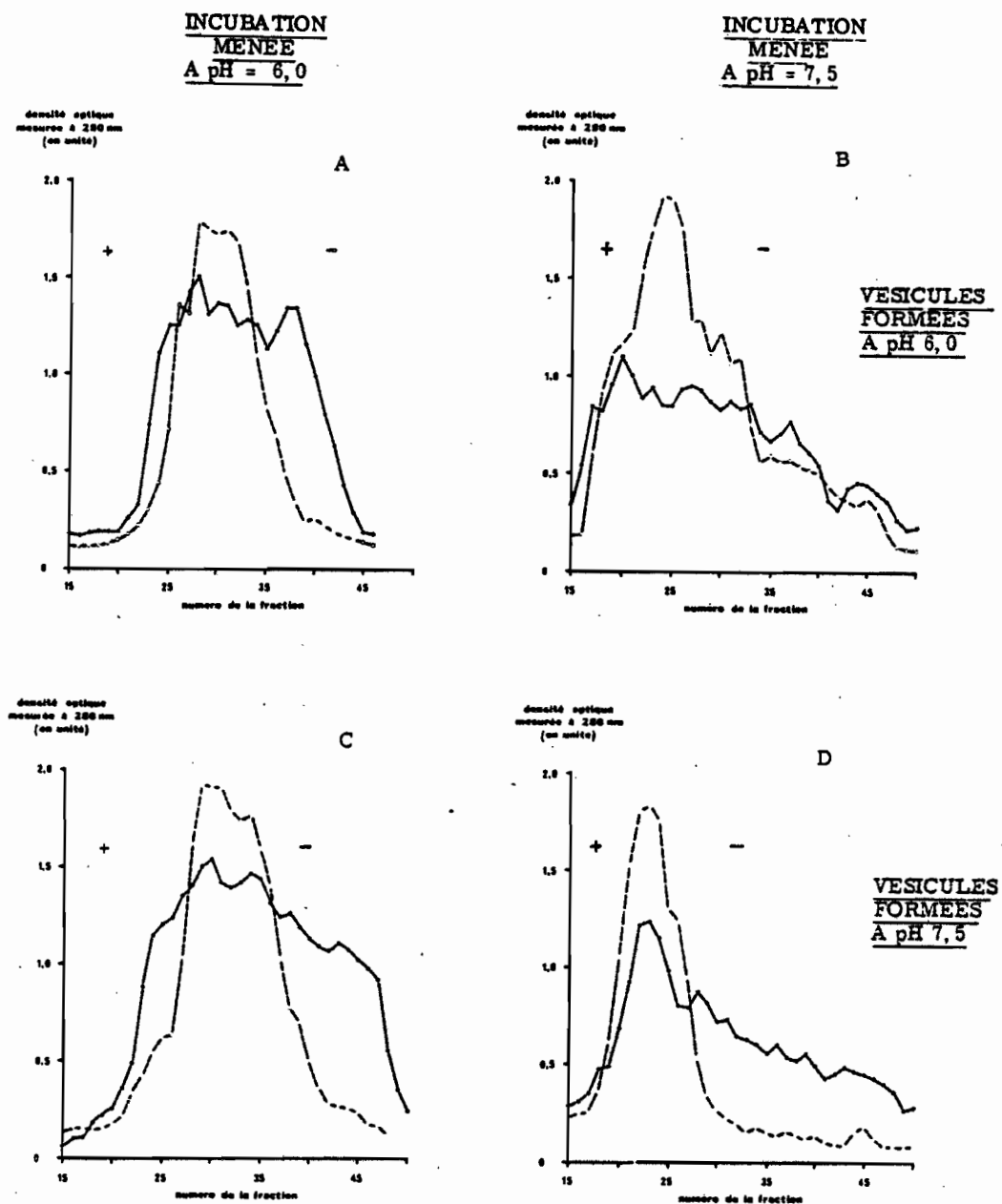


Figure 3.8

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION  
SUR LE COMPORTEMENT DES VESICULES LORS DE LEUR SEPARATION  
PAR ELECTROPHORESE EN VEINE LIQUIDE

La préparation des vésicules se fait comme indiqué dans la légende de la figure 3.7 et dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Avant d'être injectée dans la chambre d'électrophorèse, la suspension membranaire est incubée pendant 60 mn, soit 0°C (-o--o-), soit à 30°C (-●-●-).

Le tampon de la chambre d'électrophorèse est collecté de la même façon (cf. Figure 3.7).

La densité optique du contenu de chaque tube est mesurée à 280 nm.

| Type de traitement                         | Activité phosphatase acide présente dans le premier sédiment (= fraction F <sub>1</sub> ) |                 |                         |                            | Activité phosphatase acide présente dans le sédiment après deux lavages (= fraction F <sub>2</sub> ) |                 |                         |                            |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|----------------------------|
|                                            | Activité libre                                                                            | Activité totale | Activité non accessible | Indice d'éclatement (en %) | Activité libre                                                                                       | Activité totale | Activité non accessible | Indice d'éclatement (en %) |
| I = témoin                                 | 3,426                                                                                     | 6,952           | 3,526                   | 49,3                       | 0,834                                                                                                | 3,593           | 2,759                   | 23,2                       |
| II = en présence de 5 mM E.D.T.A.          | 2,040                                                                                     | 3,285           | 1,245                   | 62,1                       | 0,111                                                                                                | 1,063           | 0,952                   | 10,4                       |
| III = en présence de 100 mM KCl            | 2,331                                                                                     | 5,740           | 2,909                   | 49,3                       | 0,298                                                                                                | 1,658           | 1,360                   | 17,9                       |
| IV = en présence de 2 mM CaCl <sub>2</sub> | 3,317                                                                                     | 9,609           | 5,792                   | 39,7                       | 1,819                                                                                                | 7,526           | 5,707                   | 24,2                       |

Tableau 3.I

Influence de l'EDTA, du KCl et du CaCl<sub>2</sub>  
sur la rétention de l'activité phosphatase  
par un sédiment membranaire lutofidique

300 mg de lyophilisat sont homogénéisés dans 30 ml de l'un des quatre milieux de vésiculation suivants : I, 10 mM T.E.A. seul, pH 8,6 ; II, le même avec 5 mM E.D.T. ; III, le même avec 100 mM KCl ou IV, le même avec 2 mM CaCl<sub>2</sub>, dans les conditions utilisées habituellement (dispersion dans un Potter à la température de la chambre froide, 25 allers et retours du piston dans le corps de verre).

Les membranes sont récupérées par centrifugation (39.000 x g, 10 min., 4°C). Le premier sédiment est repris par quelques ml de milieu I. La suspension membranaire, qui en résulte, est amenée à un volume final de 5 ml. Une partie aliquote de 1 ml est conservée dans la glace fondante. Elle constitue la fraction F<sub>1</sub>. Les 4 ml restants sont dilués dans 40 ml de milieu I avant d'être centrifugés après avoir été homogénéisés à l'aide d'un Vertex. Après un second lavage, effectué dans les mêmes conditions, le sédiment final est repris par 5 ml de milieu I, la suspension homogénéisée formant la fraction F<sub>2</sub>.

Les activités phosphatase acide libre et totale sont mesurées selon le protocole habituel (15 min. à 30°C, en présence ou non de détergent). Elles sont exprimées en unités de densité optique mesurées à 400 nm et par minute.

|                                               |                                                                              |                                                                           |                    |                                                                           |                                           |                                                                           |                                  |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
|                                               | Activité<br>Malate - deshydrogénase<br>présente dans le sédiment membranaire |                                                                           |                    |                                                                           |                                           |                                                                           |                                  |
| Motif<br>expérimental                         | Activité<br>Libre                                                            |                                                                           | Activité<br>Totale |                                                                           | Activité<br>non accessible<br>au substrat |                                                                           | Indice<br>d'éclatement<br>(en %) |
|                                               | U.I.                                                                         | en % de<br>l'activité<br>présente<br>dans le milieu<br>de<br>vésiculation | U.I.               | en % de<br>l'activité<br>présente<br>dans le milieu<br>de<br>vésiculation | U.I.                                      | en % de<br>l'activité<br>présente<br>dans le milieu<br>de<br>vésiculation |                                  |
| Après une<br>première cen-<br>trifugation     | 0,955                                                                        | 1,194                                                                     | 1,129              | 1,411                                                                     | 0,174                                     | 0,217                                                                     | 84,6                             |
| Après une<br>seconde cen-<br>trifugation      | 0,148                                                                        | 0,185                                                                     | 0,230              | 0,287                                                                     | 0,082                                     | 0,103                                                                     | 64,3                             |
| Après une<br>troisième<br>centrifuga-<br>tion | 0,098                                                                        | 0,122                                                                     | 0,138              | 0,173                                                                     | 0,040                                     | 0,050                                                                     | 71,0                             |
| Après une<br>quatrième<br>centrifuga-<br>tion | 0,049                                                                        | 0,061                                                                     | 0,060              | 0,075                                                                     | 0,011                                     | 0,014                                                                     | 81,7                             |

Tableau 3. II

Influence du lavage sur l'activité malate déshydrogénase  
présente dans un sédiment membranaire

150 mg de lyophilisat sont dispersés dans 1,5 ml de tampon 20 mM T.E.A., 5 g-mercapto-éthanol et 300 mM mannitol, ajusté à pH 7,5 et contenant 100 µl d'une préparation enzymatique purifiée d'activité malate-déshydrogénase (correspondant à 80 U.D.). L'homogénéisation est faite dans les conditions habituelles (4°C, 25 A.R.). La suspension membranaire, qui en résulte, est centrifugée sur un gradient discontinu de saccharose réduit à une seule couche (10 % p./v.). préparé dans le tampon initial (40.000 x g, 15 min., 4°C). Le sédiment est repris par 1,2 ml de milieu de vésiculation.

Les vésicules ainsi récoltées pourront être lavées 1, 2 voire 3 fois dans les mêmes conditions. Les activités malate-déshydrogénase libre et totale résiduelles, présentes dans chacun de ces sédiments, seront estimées selon le protocole habituellement utilisé.

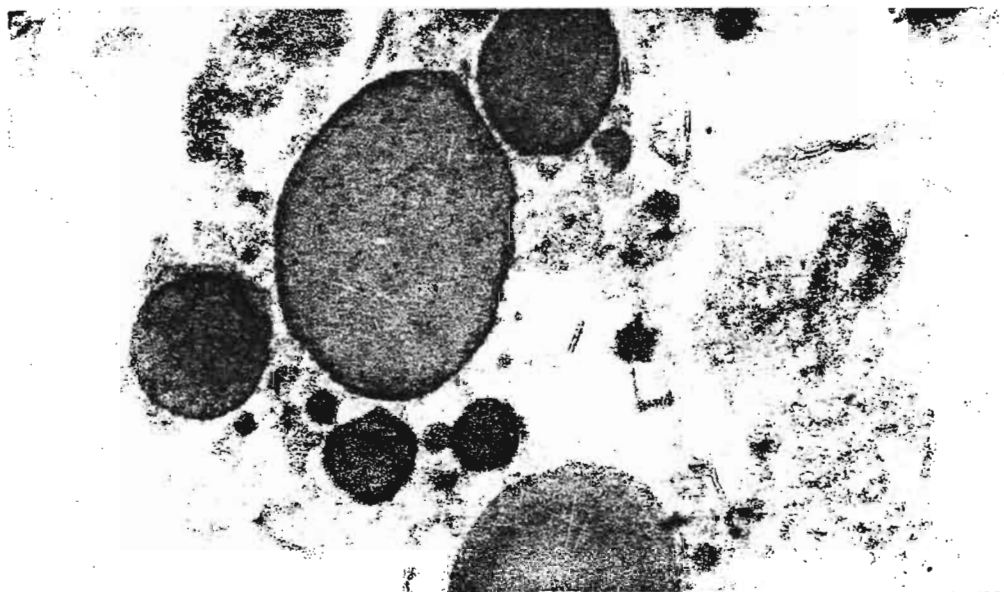


Planche 3.1

ASPECT MORPHOLOGIQUE D'UNE PREPARATION MEMBRANAIRE  
LUTOIDIQUE EFFECTUEE EN MILIEU PHOSPHATE - MANNITOL

(pH 7,5)

La préparation membranaire est réalisée dans les conditions habituelles décrites dans "Matériel et Méthodes". L'homogénéisation se fait dans un milieu phosphate-mannitol (pH 7,5).

La fixation est réalisée dans une solution de glutaraldéhyde, préparée à 4% (p./vol.) faite dans un milieu tamponné 0,2 M cacodylate de sodium, contenant 0,3 M mannitol et ajusté à pH 7,4.

La post-fixation se fait avec de l'acide osmique employé à 1-2% (p./vol.) dans un tampon veronal.

Les échantillons sont deshydratés à l'éthanol et inclus dans le mélange de Spurr (A. R. SPURR, 1969).

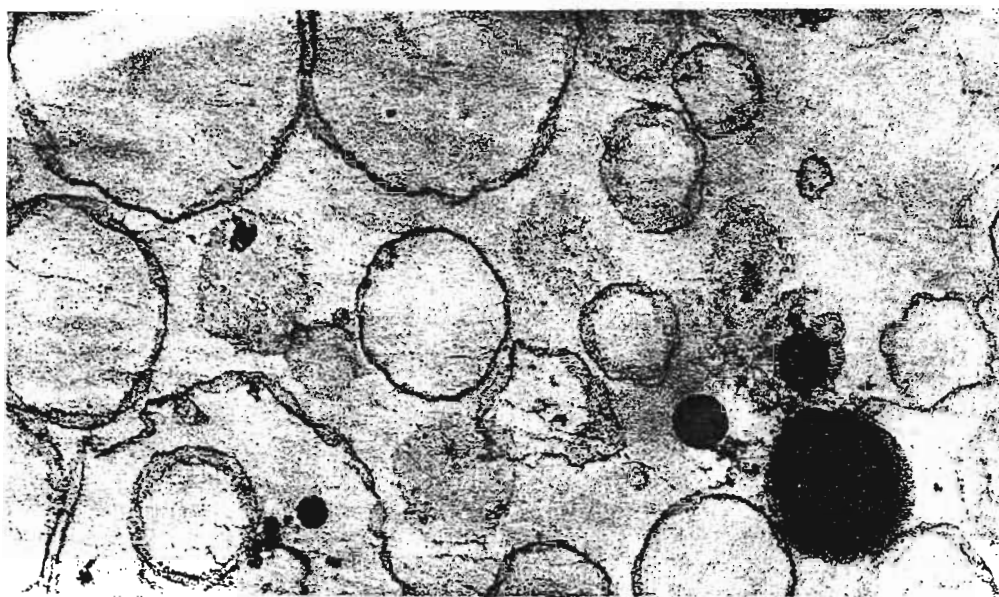


Planche 3. II

ASPECT MORPHOLOGIQUE D'UNE PREPARATION MEMBRANAIRE  
LUTOIDIQUE EFFECTUEE EN MILIEU G.E.M. (pH 9,5)

Cette fois, l'homogénéisation est réalisée dans un milieu G.E.M (pH 9,5). Par ailleurs, le traitement des échantillons est identique (cf. Planche 3. I).

Les micrographies A et B correspondent à deux préparations membranaires différentes effectuées toutefois selon le même protocole expérimental.

# incorporation de citrate

(nmol.  $\times$  mg<sup>-1</sup> prot.)

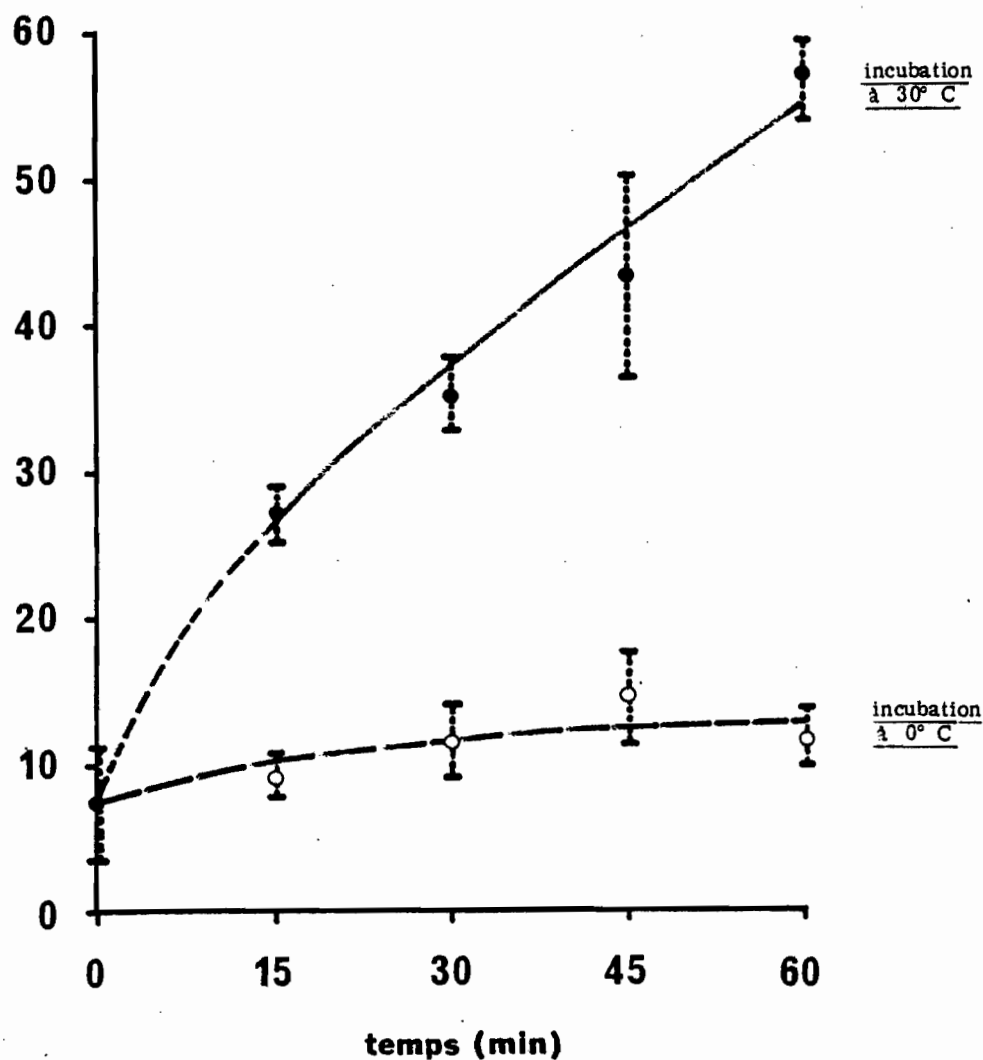


Figure 4.1

## CINETIQUE DE FIXATION DU CITRATE PAR LES VESICULES PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu phosphate-mannitol, selon le protocole décrit dans "matériel et méthodes". Pour l'incubation, à 4 ml de suspension homogénéisée, on ajoute 200  $\mu$ l de <sup>14</sup>C-citrate (5  $\mu$ Cl/ml). Une partie de l'incubat est conservée à 0° C ; l'autre, portée à 30° C, température employée dans toutes nos manipulations.

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.



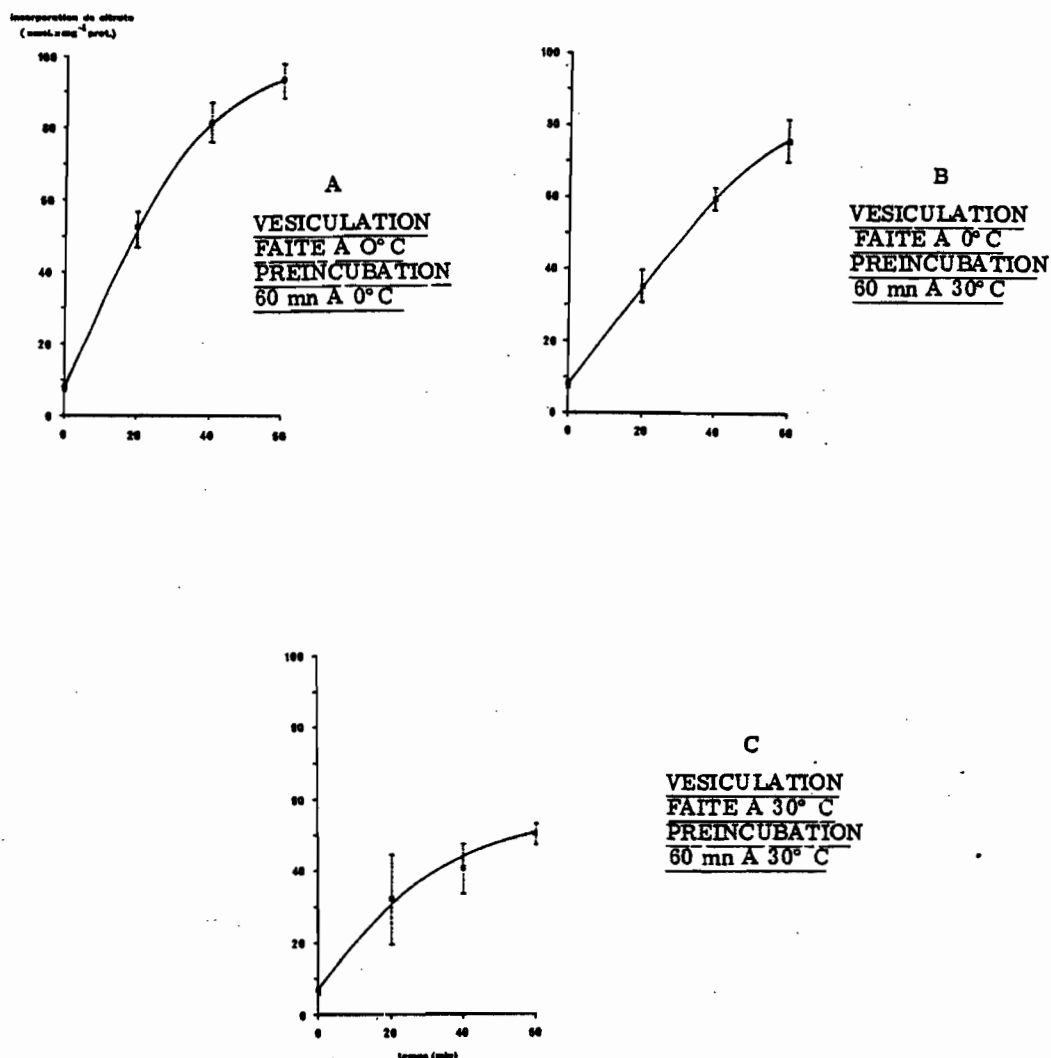


Figure 4.2

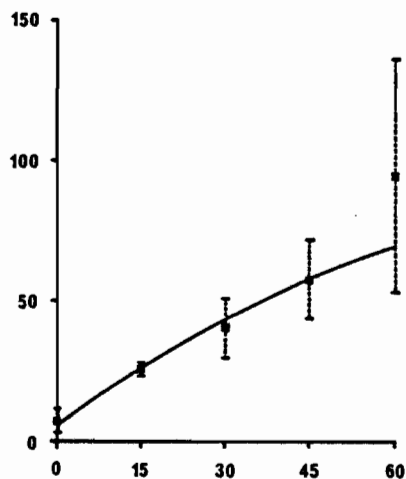
INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR L'INCORPORATION  
DE  $^{14}\text{C}$ -CITRATE PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Dans chaque motif, 900 mg de lyophilisat sont dispersés dans 90 ml de milieu citrate-phosphate (pH 6,0). La température de vésiculation est variable : soit 0°C, soit 30°C. L'homogénéisation est effectuée dans les conditions habituelles. Les vésicules sont sédimentées au cours d'une centrifugation faite comme indiqué ailleurs (voir "matériel et méthodes").

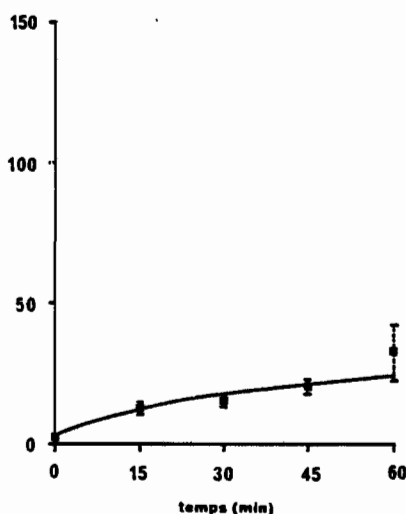
Chaque motif correspondra à 2 ml de suspension vésiculaire, qui sera incubée, soit à 0°C, soit à 30°C, pendant 60 min., avant l'addition de  $^{14}\text{C}$ -citrate. L'incorporation est conduite selon le protocole habituel (arrêt par dilution).

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

Incorporation de citrate  
(nmol. x mg<sup>-1</sup> prot.)



A  
TEMOIN:  
INCUBATION  
EN PRESENCE  
DE MANNITOL  
0,3 M



B  
CHOC OSMOTIQUE  
HYPOTONIQUE :  
INCUBATION EN  
ABSENCE DE  
MANNITOL 0,3 M

Figure 4.3

INFLUENCE DE L'OSMOLARITE DU MILIEU D'INCUBATION  
SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR LES VESICULES  
VACUO-LYSOSOMALES

Pour chaque motif, les vésicules sont préparées dans un milieu phosphate-mannitol, contenant 50 mM citrate, et ajusté à pH 6,0, par addition de KOH. Le sédiment final, résultant d'un cycle de deux lavages, est repris par 3 ml de milieu de même nature, contenant 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup> et une concentration différente en citrate, 5 mM, le tout étant ajusté à pH 7,5. Toutefois, dans un cas, le milieu sera dépourvu de mannitol. Un choc osmotique est alors développé.

L'incorporation du citrate est effectuée comme décrit par ailleurs (voir "matériel et méthodes").

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

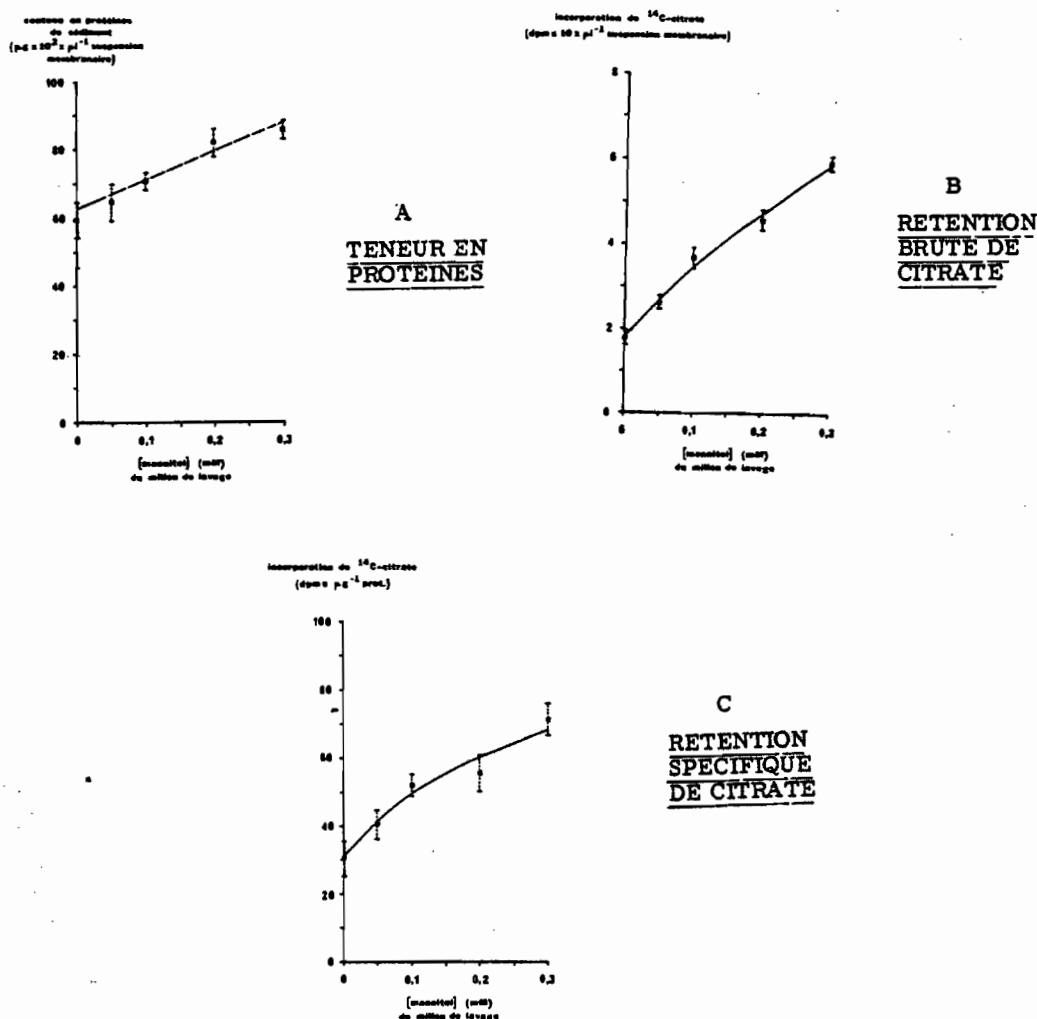


Figure 4.4

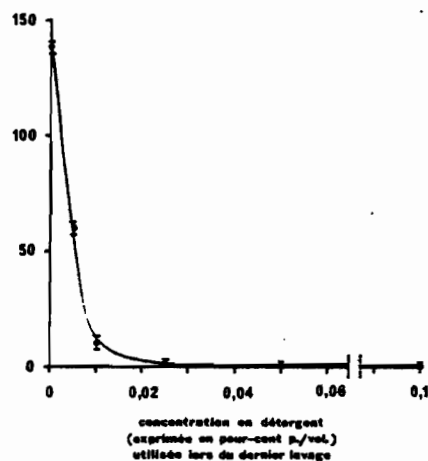
#### INFLUENCE DE L'OSMOLARITE DU MILIEU DE LAVAGE SUR LA RETENTION DE CITRATE PAR UN SEDIMENT MEMBRANAIRE

800 mg de lyophilisat sont dispersés dans 160 ml de milieu phosphate-mannitol (pH=6,0). L'homogénéisation est effectuée dans un Potter à la température de la glace fondante. Après un cycle de deux lavages faits avec le milieu initial, le sédiment est finalement repris par 2,6 ml de milieu d'incubation phosphate-mannitol (pH=7,5), contenant 5 mM ATP- $\text{Mg}^{2+}$ .

A 2,6 ml de suspension vésiculaire, sont ajoutés 130  $\mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -citrate (0,75  $\mu\text{Ci}$ ). Dès la mise en contact avec le radio-élément, 4 fractions aliquotes de 100  $\mu\text{l}$  sont prélevées, constituant le temps 0. Au bout de 60 min. d'incubation, 2ml sont prélevés. Chaque échantillon est lavé trois fois selon le protocole habituellement employé. Toutefois, pour le prélèvement fait au bout de 60 min. d'incorporation, juste avant la dernière centrifugation, la suspension vésiculaire lavée est répartie exactement en cinq tubes contenant un milieu de lavage modifié ayant une concentration en mannitol croissant de 0 à 300 mM. La centrifugation n'est effectuée qu'après 15 min. d'incubation à 15° C.

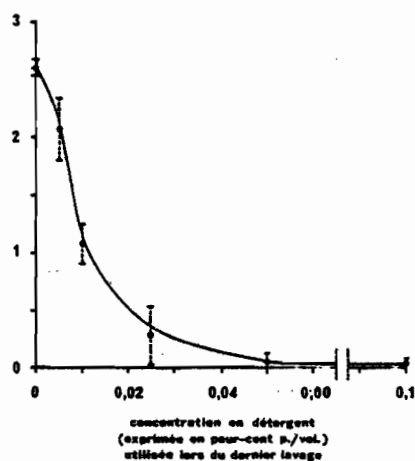
Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

radioactivité brute  
présente dans le sédiment  
(dpm x mg<sup>-1</sup> lyophilisat)



### A RETENTION DU CITRATE

contenu en protéines  
du sédiment  
(pg x mg<sup>-1</sup> lyophilisat)



### B CONTENU EN PROTEINES

Figure 4.5

## INFLUENCE DU TRITON X-100 SUR LA RETENTION DU CITRATE PAR UN SEDIMENT MEMBRANAIRE

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans les conditions décrites dans la légende de la figure 4.4.

La différence réside dans le fait qu'au cours du dernier lavage, est introduite une quantité de détergent croissante allant de 0 à 0,1 % (p./vol.).

Après un temps de réaction de l'ordre de 15 min., à la température du bain employée, la dernière centrifugation est effectuée. Le traitement des échantillons se fait comme indiqué dans "matériel et méthodes".

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

radioactivité spécifique  
(dpm x  $\mu\text{g}^{-1}$  prot.)

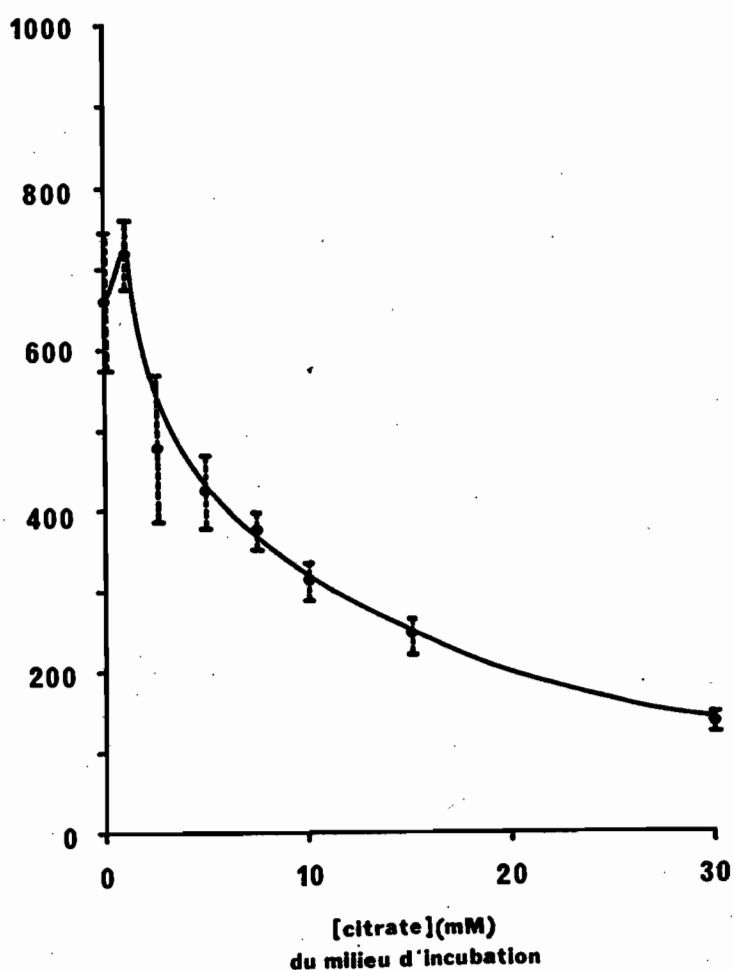


Figure 4.6

CINETIQUE D'INCORPORATION DU  $^{14}\text{C}$ -CITRATE  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES EN FONCTION  
DE LA CONCENTRATION EN CITRATE DU MILIEU D'INCUBATION  
RELATIONS ENTRE L'EVOLUTION DE LA RADIOACTIVITE SPECIFIQUE  
ET LA CONCENTRATION EN CITRATE DU MILIEU D'INCUBATION

Il s'agit d'une autre expression des résultats issus du cycle de manipulations dont le protocole expérimental est décrit dans la légende de la figure 4.7.

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

Figure 4.7

CINETIQUE D'INCORPORATION DU CITRATE PAR LES VESICULES  
VACUO-LYSOSOMALES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION  
EN CITRATE DU MILIEU D'INCUBATION :  
REPRESENTATION MICHAELIENNE

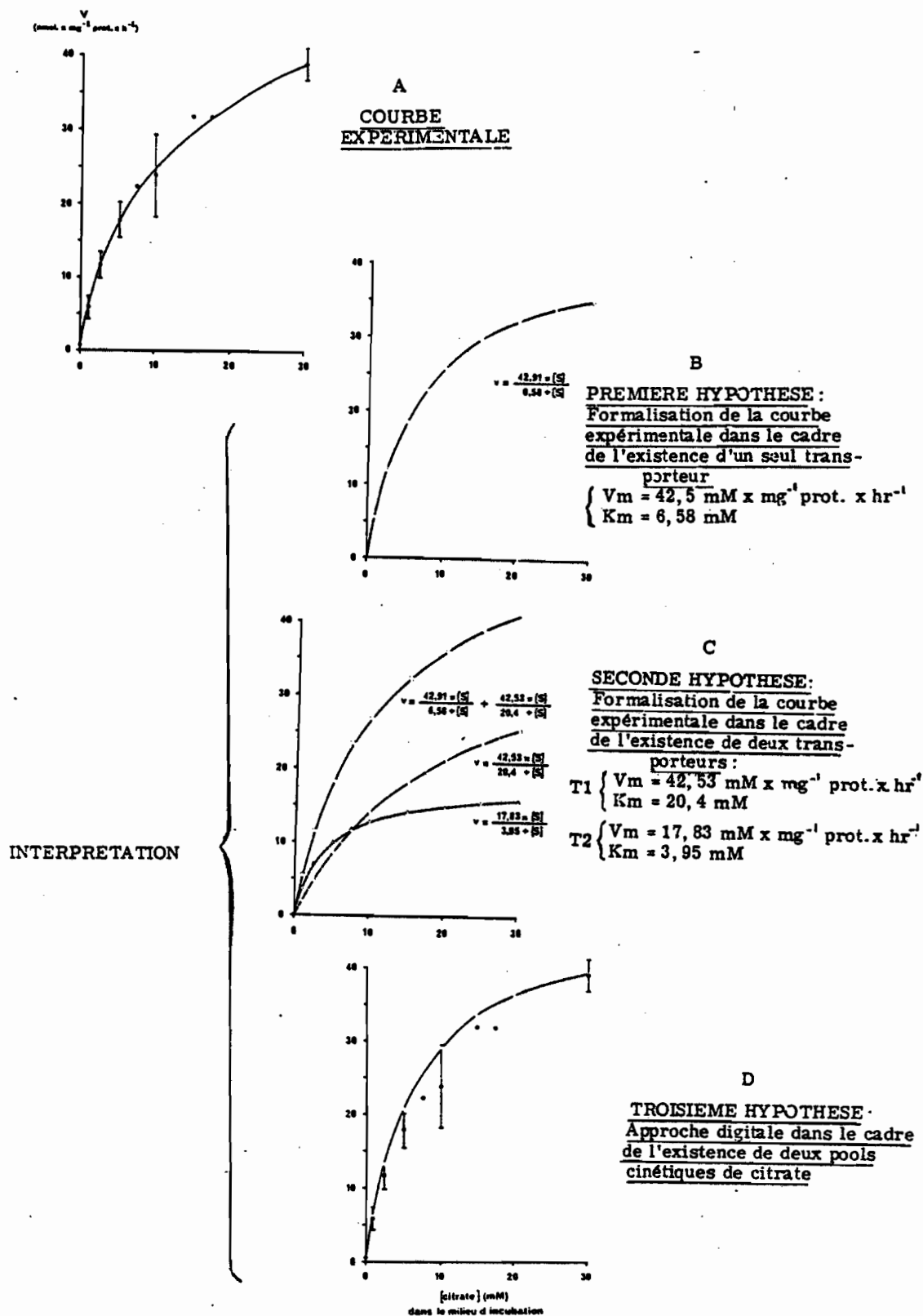
Pour chaque motif expérimental, à 0,25 ml de suspension vésiculaire (correspondant à 240 mg de lyophilisat et préparée comme indiqué par ailleurs dans "matériel et méthodes"), sont ajoutés exactement 0,25 ml de milieu d'incubation, contenant suffisamment d'acide citrique, pour avoir la concentration finale désirée.

L'incubation se fait en présence de 25  $\mu$ l de  $^{14}\text{C}$ -citrate, correspondant à 0,1  $\mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$ , pendant 60 min. à 30°C. L'échantillonnage et son traitement se font selon le protocole habituel.

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

Les courbes B, C et D représentent une interprétation de la courbe expérimentale.

Sur la courbe D, sont figurées les données expérimentales de la courbe A (●); le calcul résultant de l'approche digitale étant symbolisé différemment (-○-○-)



CINETIQUE D'INCORPORATION DU  $^{14}\text{C}$ -CITRATE  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES EN FONCTION  
DE LA CONCENTRATION EN CITRATE DU MILIEU D'INCUBATION :  
REPRESENTATION MICHAELIENNE  $V = f(S)$

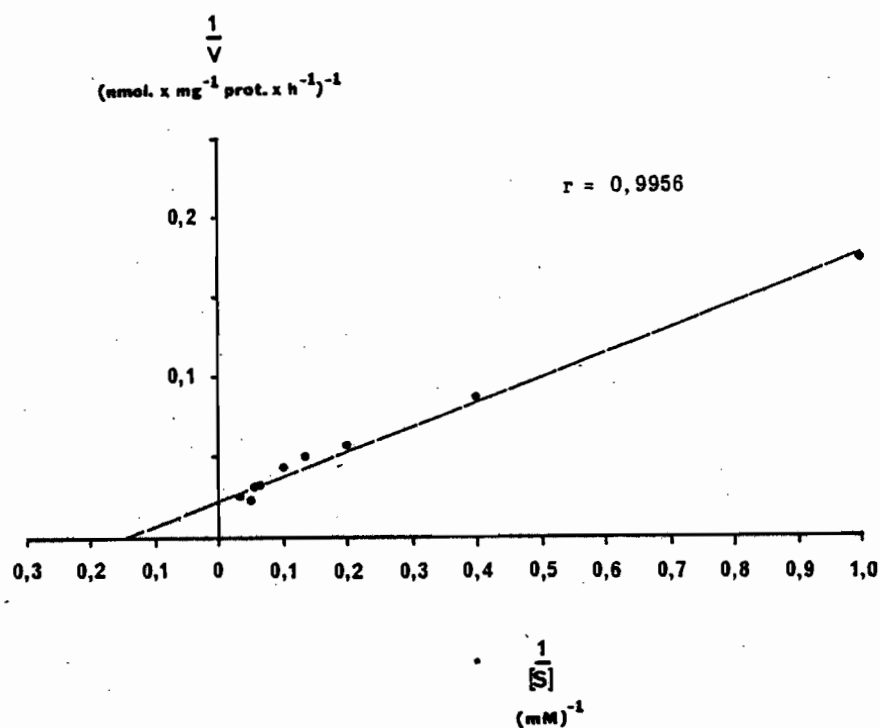


Figure 4.8

DETERMINATION DE LA CONSTANCE D'AFFINITE :

REPRESENTATION SELON LINEWEAVER ET BURK

$$\left[ \frac{1}{V} = f \left( \frac{1}{S} \right) \right]$$

Dans cette figure, les résultats décrits dans la figure 4.7 subissent une transformation graphique, qui permet d'estimer  $K_m$  et  $V_m$ . L'intervalle de confiance, assigné pour chaque valeur expérimentale, est déterminé pour un risque de 10%.



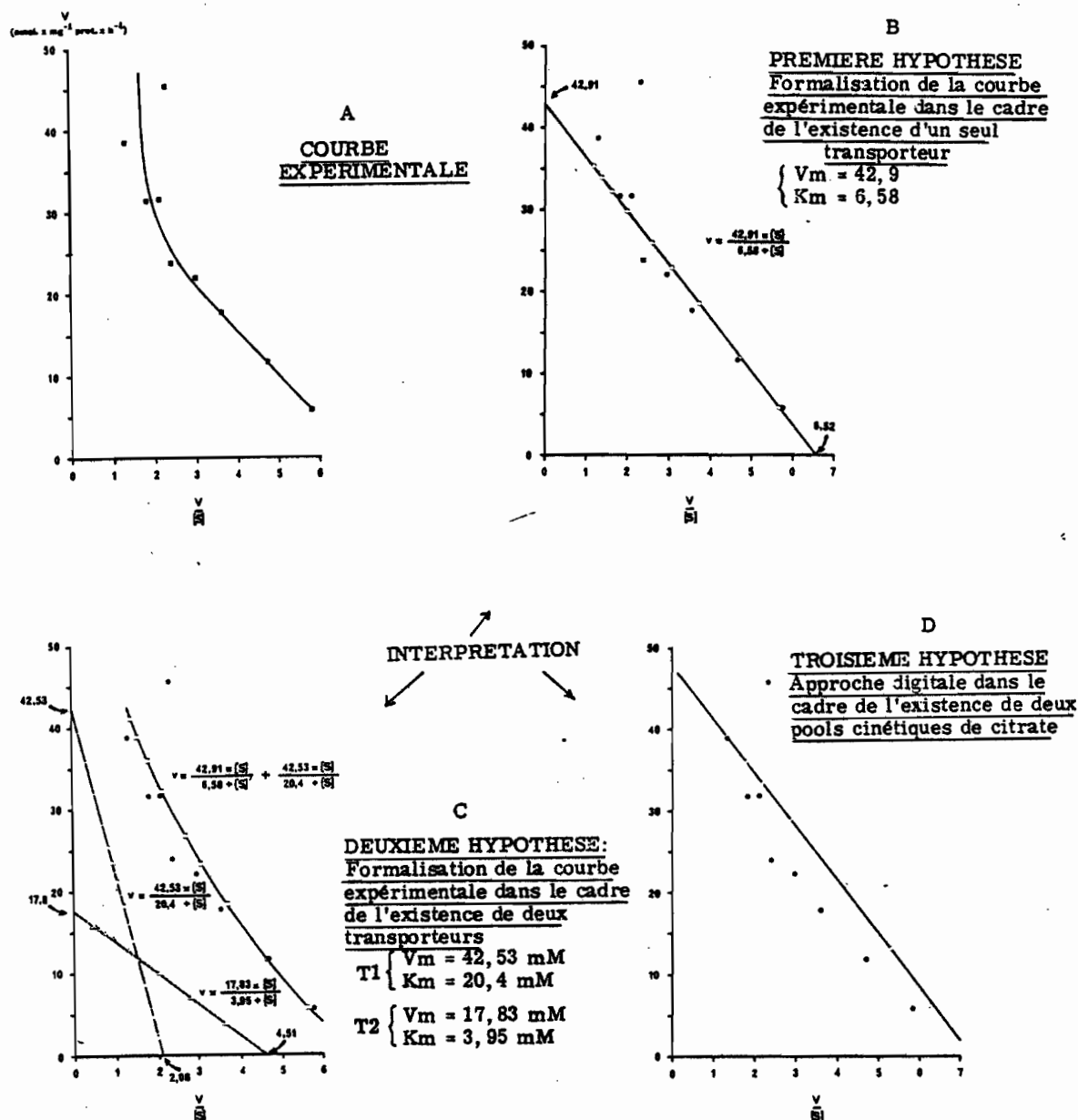


Figure 4.9

CINETIQUE D'INCORPORATION DU CITRATE PAR LES VESICULES

VACUO-LYSOSOMALES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION

EN CITRATE DU MILIEU D'INCUBATION :

REPRESENTATION SELON EADIE ET HOFSTEE

$$\left[ v = f\left(\frac{v}{S}\right) \right]$$

Dans cette figure, les résultats décrits dans la figure 4.7 subissent une nouvelle transformation graphique. Sur les courbes B, C et D, sont figurées les données expérimentales de la courbe A (\*), l'interprétation étant symbolisée différemment (—o— ; —□— ; —△—△— ; —○—○—).

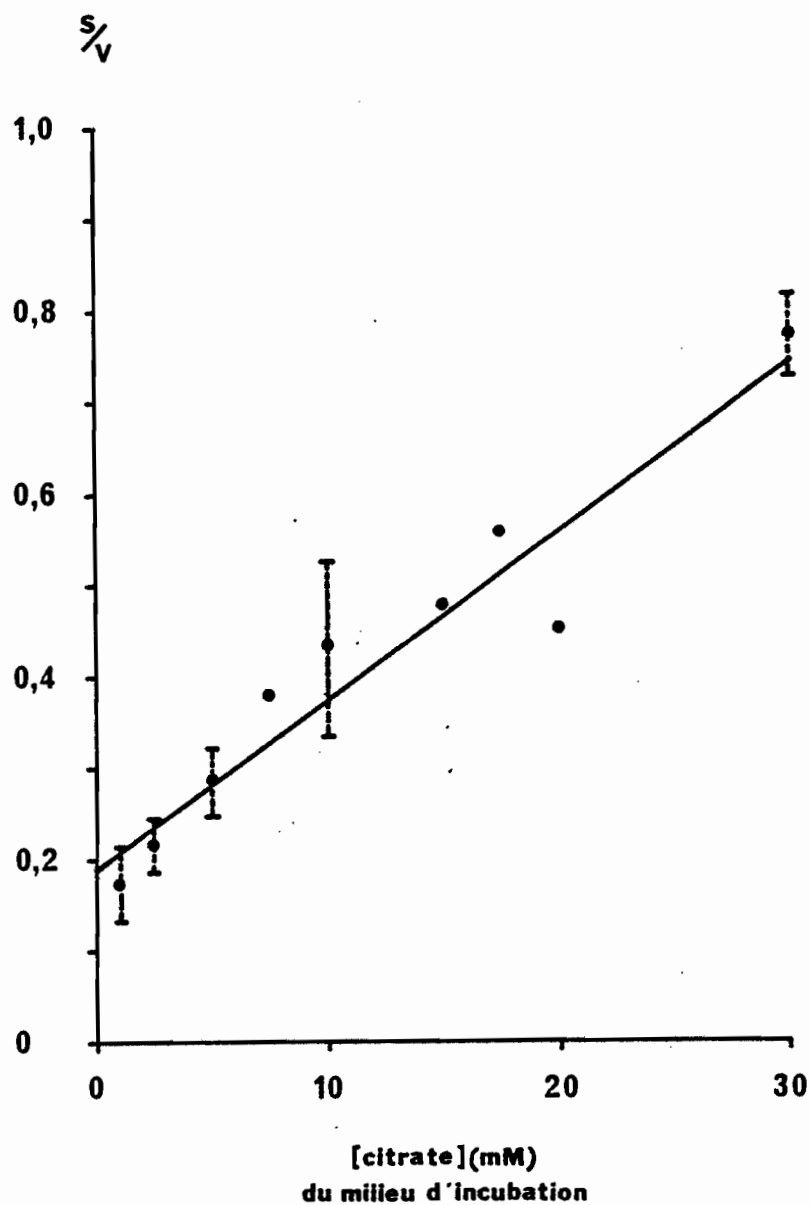


Figure 4.10

CINETIQUE D'INCORPORATION DU CITRATE PAR LES VESICULES

VACUO-LYSOSOMALES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION

EN CITRATE DU MILIEU D'INCUBATION :

REPRESENTATION SELON HANES

$$\left[ \frac{S}{V} = f(S) \right]$$

Dans cette figure, les résultats décrits dans la figure 4.7 subissent une nouvelle transformation graphique. Lorsque cela est possible, les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

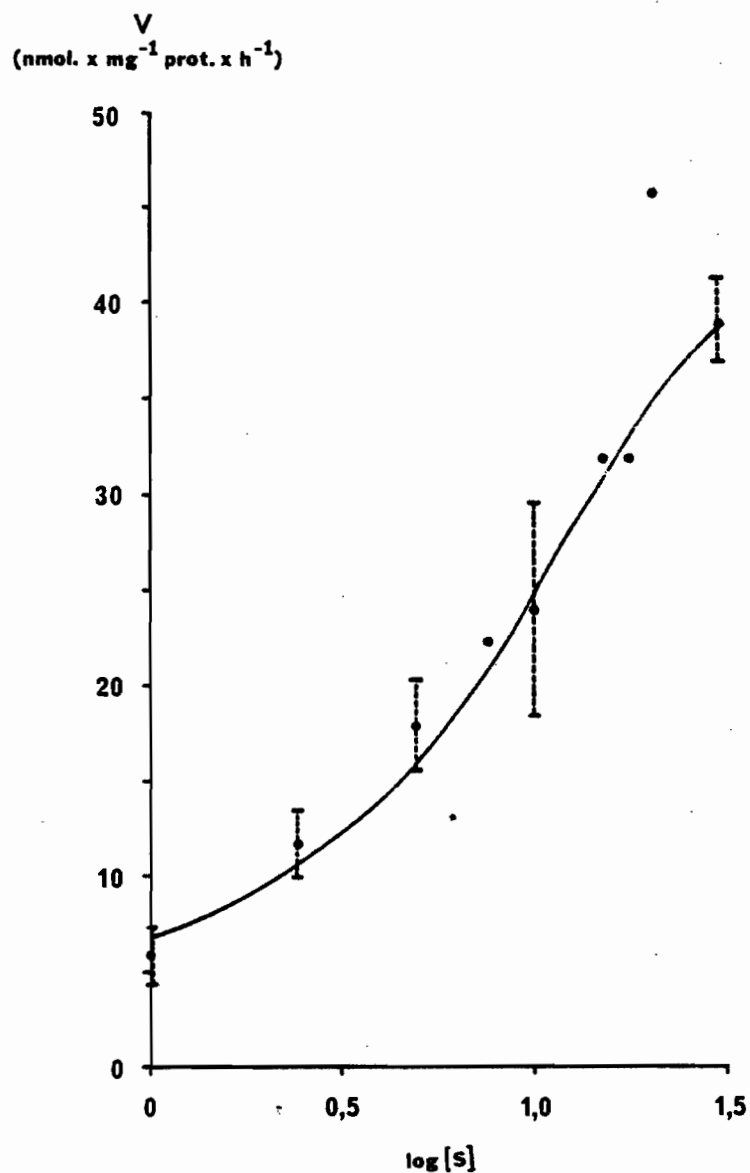


Figure 4.11

CINETIQUE D'INCORPORATION DU CITRATE  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES EN FONCTION  
DE LA CONCENTRATION EN CITRATE DU MILIEU D'INCUBATION :  
REPRESENTATION SELON F. KUHN

$$\{ V = f [ \log (S) ] \}$$

Dans cette figure, les résultats décrits dans la figure 4.7 subissent une nouvelle transformation graphique. Lorsque cela est possible, les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

Incorporation de  $^{14}\text{C}$ -citrate  
(nmol. $\times\text{mg}^{-1}$  prot.)

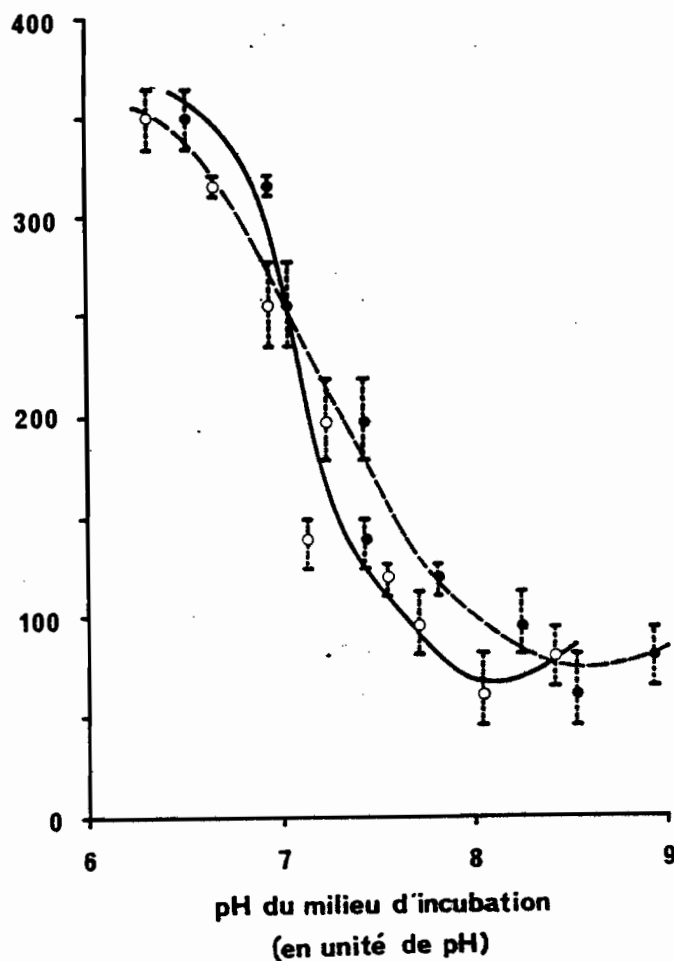


Figure 4.12

#### INFLUENCE DU pH DU MILIEU D'INCUBATION

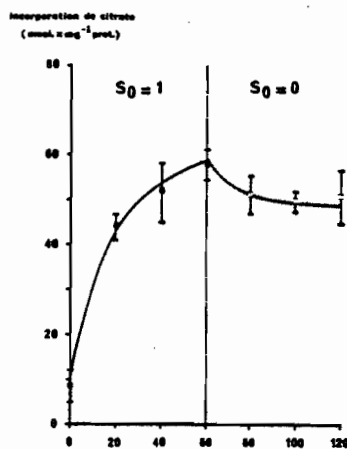
#### SUR L'INCORPORATION DU CITRATE PAR LES VESICULES

#### VACUO-LYSOSOMALES

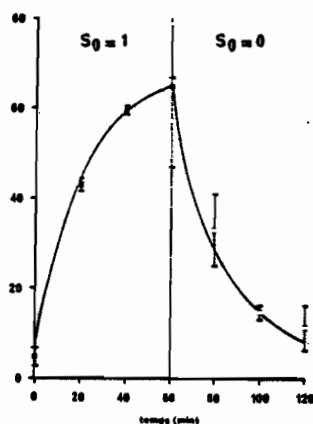
Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées dans un milieu phosphate-mannitol, selon le protocole expérimental habituel (voir "matériel et méthodes"). Le sédiment, résultant d'un cycle de deux lavages et correspondant à 200 mg de lyophilisat, est repris par 1 ml de milieu d'incubation, constitué par 100 mM H.E.P.E.S., 5 mM citrate, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM ATP, 300 mM mannitol et 5 mM  $\beta$ -mercapto-éthanol, et dont le pH varie de 6,12 à 9,05 (par addition de Tris).

L'incubation, faite sur 0,8 ml de suspension vésiculaire, débute avec l'addition de 20  $\mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -citrate (0,1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) et dure 60 min. à 30°C. L'échantillonnage se déroule comme indiqué par ailleurs. Toutefois, on prend soin de mesurer le pH pour chaque motif au début (-●-●-) et à la fin (-○-○-) de l'incorporation.

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.



A  
EXSORPTION  
FAITE A 0°C



B  
EXSORPTION  
FAITE A 30°C

Figure 4.13

#### INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DU MILIEU D'EXSORPTION SUR L'EFFLUX DU CITRATE

Dans chaque cas, les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu phosphate-mannitol selon le protocole expérimental habituel (voir "matériel et méthodes"). Le sédiment, résultant d'un cycle de deux lavages et correspondant, soit à 800 mg de lyophilisat (A), soit à 1380 mg de lyophilisat (B), est repris dans un volume final de 3,4 ml de milieu d'incubation contenant 5 mM ATP-Mg<sup>4+</sup>.

L'incorporation se déroule sur 3,2 ml de cette suspension vésiculaire mise en présence de 160  $\mu$ l de <sup>14</sup>C-citrate (0,1  $\mu$ Cl/ml). Une fois les différents prélèvements effectués, au terme d'une incubation de 60 min. à 30°C, deux fractions aliquotes de 1 ml sont lavées par 60 ml de milieu mannitol.

Ensuite, après le troisième lavage, le sédiment est repris par 2 ml de milieu de lavage. Les quatre motifs, correspondant au temps 60 min. sont alors prélevés et l'incubation se poursuit dans un milieu sans <sup>14</sup>C-citrate, soit à 0°C (A), soit à 30°C (B).

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%;

Incorporation de citrate  
(nmol  $\times$  mg<sup>-1</sup> prot.)

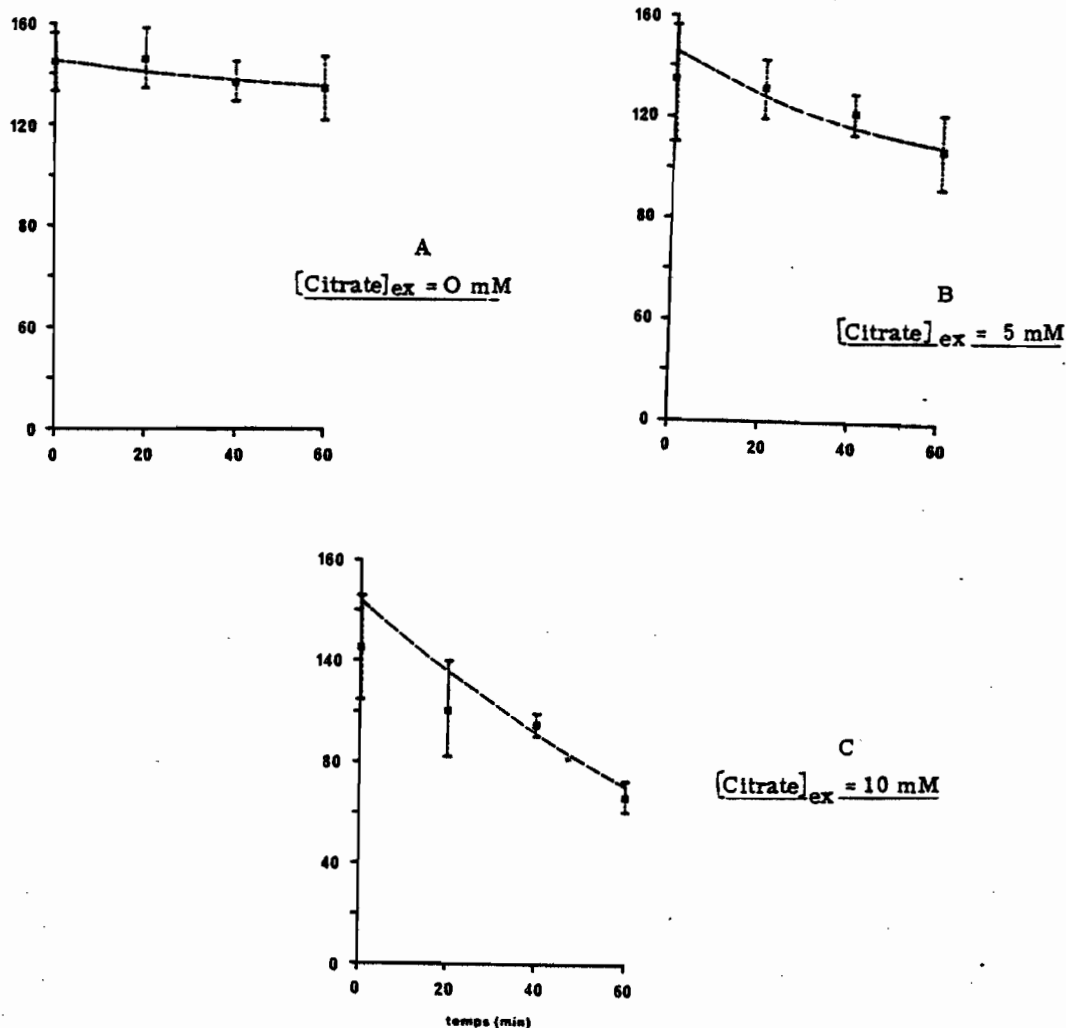


Figure 4.14

#### INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CITRATE DU MILIEU D'EXSORPTION SUR L'IMPORTANCE DE L'EFFLUX

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu phosphate-mannitol, selon le protocole expérimental habituel (voir "matériel et méthodes"). Le sédiment, résultant d'un cycle de deux lavages et correspondant à 1200 mg de lyophilisat, est repris dans un volume final de 5,6 ml de milieu d'incubation contenant 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>.

L'incorporation se déroule sur 5,6 ml de cette suspension vésiculaire mise en présence de 280  $\mu$ l de <sup>14</sup>C-citrate (0,1  $\mu$ Ci/ml). Une fois les différents prélèvements effectués (t<sub>0</sub> et t<sub>60</sub>), pour chacun des trois motifs, 0,8 ml de suspension incubée sont déposés sur une couche de 24 ml de dextrane T-70 préparé à 1,5 % (p./vol.) dans le milieu de vésiculation et centrifugés (39.000  $\times$  g, 10 min., 4°C). Chaque sédiment est repris par 0,8 ml de tampon de lavage. Comme pour chaque motif, il y aura deux tubes, l'exsorption pourra être suivie sur 1,6 ml de suspension vésiculaire, en présence de 0,5 ou 10 mM citrate. L'échantillonnage et son traitement se font comme indiqués par ailleurs.

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

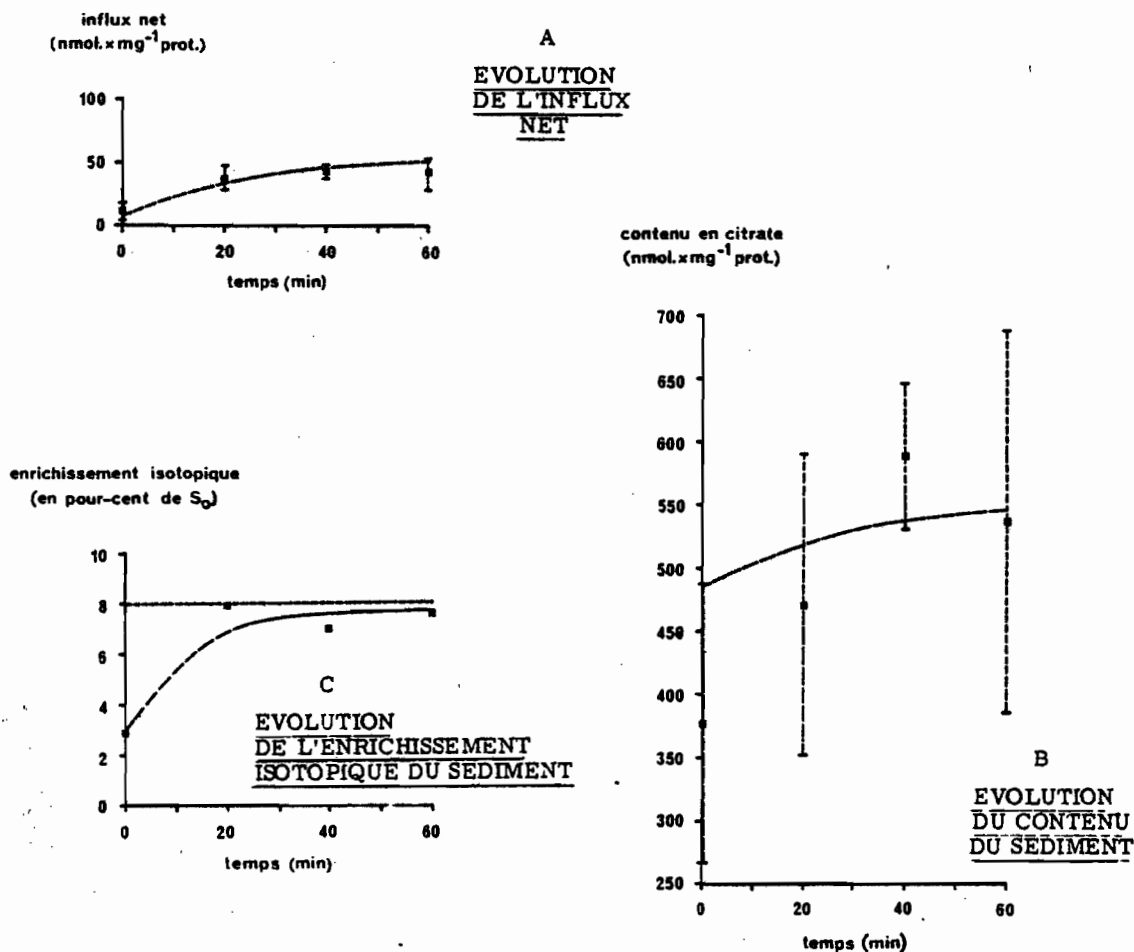


Figure 4.15

#### EVOLUTION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES AU COURS DE L'INCUBATION

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu phosphate-mannitol, selon le protocole expérimental habituel (voir "matériel et méthodes"). Le sédiment, résultant d'un cycle de deux lavages et correspondant à 800 mg de lyophilisat, est repris dans un volume final de 8 ml de milieu d'incubation contenant 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>.

Une partie de cette suspension (3,5 ml) est mise en incubation en présence de 175  $\mu$ l de <sup>14</sup>C-citrate (0,1  $\mu$ Ci/ml), ayant une activité spécifique initiale de 28,6  $\mu$ Ci/ $\mu$ M. Les prélèvements sont effectués et traités comme indiqué par ailleurs. L'arrêt de l'absorption se fait par centrifugation au travers d'une couche de dextrane T-70 tamponnée et préparée à 2% (p./vol.).

Le reste de la suspension (4,5 ml), diluée dans les mêmes proportions avec de l'eau distillée, permet d'estimer l'évolution de la quantité de citrate non radioactif, selon la méthode décrite par ailleurs. La partie aliquote de 1 ml prélevée au moment désiré est traitée de la même façon. Le sédiment obtenu est repris par 500  $\mu$ l d'eau distillée. Le dosage du citrate est fait sur une aliquote de 300  $\mu$ l ; celui des protéines sur 25  $\mu$ l.

Les résultats sont estimés avec un risque de 10%.

Figures 4.16 et 4.17

MODELISATION DES RESULTATS OBTENUS :

EVOLUTION DE L'INFLUX NET ET DU CONTENU EN CITRATE

DU COMPARTIMENT VESICULAIRE ET DES DEUX COMPARTIMENTS

CINETIQUES QUI LE COMPOSENT AU COURS DE L'INCUBATION

Les conditions initiales sont ainsi définies :

- un volume vésiculaire de  $10 \mu\text{l} \times \text{mg}^{-1} \text{prot.}$ ,
- un contenu vésiculaire en citrate total égal à  $500 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{prot.}$ ,
- un contenu vésiculaire en citrate libre (échangeable) égal à  $10 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{prot.}$ ,
- on attribue les valeurs suivantes aux différentes constantes d'équilibre :

- $K_2 = 0,05 \text{ mM}$
- $K_3 = 1,0204 \times 10^{-3} \text{ mM}$
- $K_m^m = 5 \text{ mM}$
- $K_m^{ex} = 10 \text{ mM}$

- On donne les valeurs suivantes aux flux maximum :

- $J_{max}^m = 5 \text{ nmol} \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{prot.}$
- $J_{max}^{ex} = 5 \text{ nmol.} \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

Le programme de calcul (cf. Annexe II) nous permet d'obtenir pour, soit le compartiment vésiculaire (Figure 4.16), soit les deux compartiments cinétiques qui le composent (Figure 4.17) :

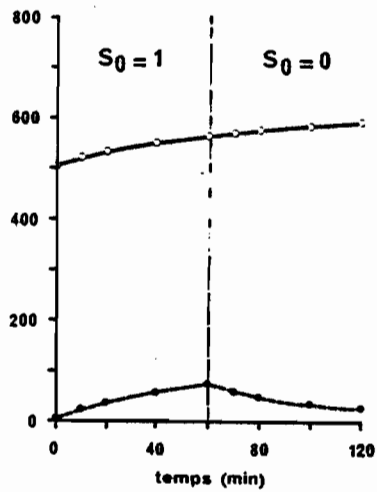
- 1) l'évolution du contenu total en citrate,
- 2) l'évolution de l'influx net de citrate,
- 3) l'évolution de l'enrichissement isotopique.

Selon la Figure, les symboles employés n'ont pas la même signification.

- pour la Figure 4.16, concernant le compartiment vésiculaire en son entier,
  - (-o-o-) pour le contenu total en citrate,
  - (-e--e-) pour l'influx net,
  - (-o-o-) pour l'incorporation de citrate, les résultats expérimentaux [estimés pour un risque de 10% étant représentés par (\*)].
  - (-o--o-) pour l'enrichissement isotopique,
- pour la Figure 4.17, concernant les deux compartiments cinétiques qui le composent,
  - (-o-o-) et (-e--e-), pour le contenu en citrate respectivement des compartiments  $C_1$  et  $C_2$ .
  - (-o--o-) et (-e--e-), pour l'influx net de citrate dans les deux compartiments.

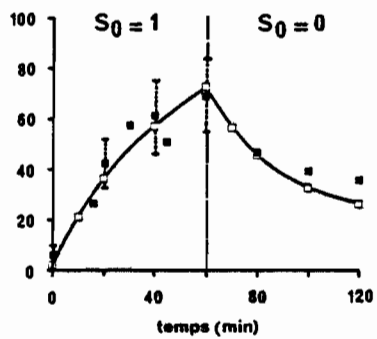


contenu en citrate  
(nmol. $\times$ mg<sup>-1</sup>prot.)



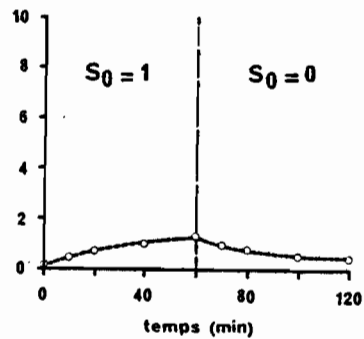
A  
EVOLUTION DU CONTENU  
EN CITRATE ET DE L'INFLUX  
NET DE CITRATE

influx net  
(nmol. $\times$ mg<sup>-1</sup>prot.)



B  
EVOLUTION DE  
L'INCORPORATION  
DE CITRATE

enrichissement isotopique  
(en pour-cent de S₀)



C  
EVOLUTION  
DE L'ENRICHISSEMENT  
ISOTOPIQUE

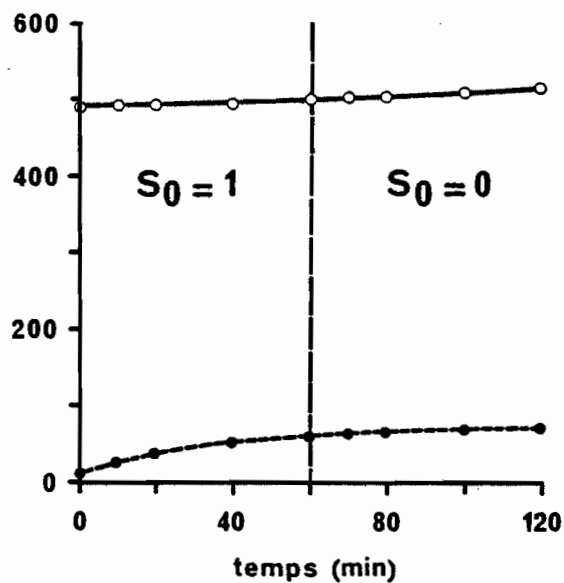
Figure 4.16

MODELISATION DES RESULTATS OBTENUS :

EVOLUTION DE L'INFLUX NET ET DU CONTENU EN CITRATE

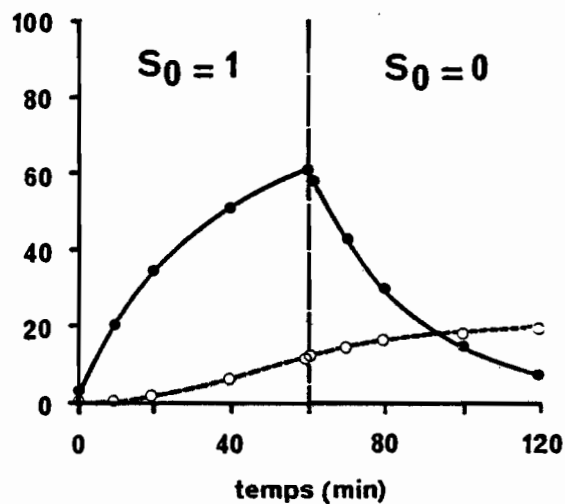
DU COMPARTIMENT VESICULAIRE AU COURS DE L'INCUBATION

contenu en citrate  
(nmol. $\times$ mg<sup>-1</sup>prot.)



A  
EVOLUTION  
DE LA QUANTITE  
TOTALE DE CITRATE  
DANS LES DEUX  
COMPARTIMENTS  
C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>

influx net  
(nmol. $\times$ mg<sup>-1</sup>prot.)



B  
EVOLUTION  
DE L'INFLUX NET  
DE CITRATE DANS LES  
DEUX COMPARTIMENTS  
C<sub>1</sub> ET C<sub>2</sub>

Figure 4.17

MODELISATION DES RESULTATS OBTENUS :

EVOLUTION DE L'INFLUX NET ET DU CONTENU EN CITRATE  
DES DEUX COMPARTIMENTS.

CINETIQUES DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES AU COURS  
DE L'INCUBATION

| Type                                                                                          | Figure | Relation<br>utilisée                                              | Observation                                                                                                                          | K <sub>M</sub><br>(mM) | V <sub>M</sub><br>(nmol. x mg <sup>-1</sup><br>prot. x hr <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| - Représentation des<br>doubles-inverses<br>(H. LINENKAVER et D. BURK,<br>1934).              | 4.8.   | $\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_M} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_M}$ | Importance exagérée des<br>valeurs obtenues dans la<br>gamme de concentration<br>élevée                                              | 6,58                   | 42,91                                                                     |
| - Représentation selon<br>EADIE et HOFSTEER<br>(G.S. EADIE, 1942 ;<br>S.H.J. HOFSTEER, 1952). | 4.9.   | $V = V_M - K_M \cdot \frac{V}{S}$                                 | Possibilité de l'existence<br>d'un second site de trans-<br>port.                                                                    | 7,76                   | 48,95                                                                     |
| - Représentation selon<br>HANES (C.S. HANES, 1932)                                            | 4.10.  | $\frac{S}{V} = \frac{K_M}{V_M} + \frac{S}{V_M}$                   | -                                                                                                                                    | 10,24                  | 53,92                                                                     |
| - Représentation de<br>F. KUHN (citée par<br>L. FENASSE, 1974)                                | 4.11.  | $V = ([log(x)]$                                                   | Imprécision de la détermi-<br>nation du point d'inflexion<br>de la courbe sigmoïde (don-<br>nant une estimation de K <sub>M</sub> ). | -                      | -                                                                         |
| - Représentation directe                                                                      | 4.7.   | $V = f(S)$                                                        | La saturation n'est pas<br>atteinte (d'où l'impossibi-<br>lité de déterminer K <sub>M</sub> )                                        | -                      | -                                                                         |

Tableau 4.I

DIFFERENTES VALEURS DE K<sub>M</sub> ET DE V<sub>M</sub> OBTENUES PAR LES  
DIFFERENTES TRANSFORMATIONS DE L'EQUATION DE MENTEN-  
MICHAELIS

Dans chaque cas, lorsque cela est possible, les valeurs de K<sub>M</sub> et de V<sub>M</sub> sont déterminées à partir des intersections de la droite de régression établie à partir de toutes les données expérimentales, en notre possession.

Figure 5.1

CINETIQUE D'ACCUMULATION DU  $\text{SCN}^-$ , DU  $\text{TPMP}^+$   
ET DU  $\text{TPP}^+$  PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées à pH = 6,0 et, incubées à pH = 7,5, à 25°. Le milieu de vésiculation et d'incubation est le type imperméant : un milieu de Tager constitué par 25 mM M.E.S., 25 mM H.E.P.E.S., 25 mM M.O.P.S. et 300 mM de mannitol, ajusté au pH désiré par addition de Tris-base.

Chaque ml. de milieu d'incubation contient aussi de l'eau tritiée (0,5  $\mu\text{Ci}$ ) et, soit du  $^{14}\text{C}$ - $\text{SCN}^-$  (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), soit du  $^{14}\text{C}$ - $\text{TPMP}^+$  (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), soit du  $^{14}\text{C}$ -dextrane (0,1  $\mu\text{Ci}$ ). Lorsque le  $\text{TPP}^+$  est utilisé, l'isotope employé étant le  $^3\text{H}$ - $\text{TPP}^+$  (0,5  $\mu\text{Ci}$ ), les espaces extra et intravésiculaires sont déterminés à partir du  $^{14}\text{C}$ -dextrane (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), chaque motif étant traité en parallèle de la même façon.

Au temps indiqué, une fraction aliquote de 1 ml est prélevée et préparée comme indiqué dans "matériel et méthodes".

Chaque valeur représente la moyenne de trois à quatre répétitions, correspondant à des manipulations faites sur des lyophilisats différents.

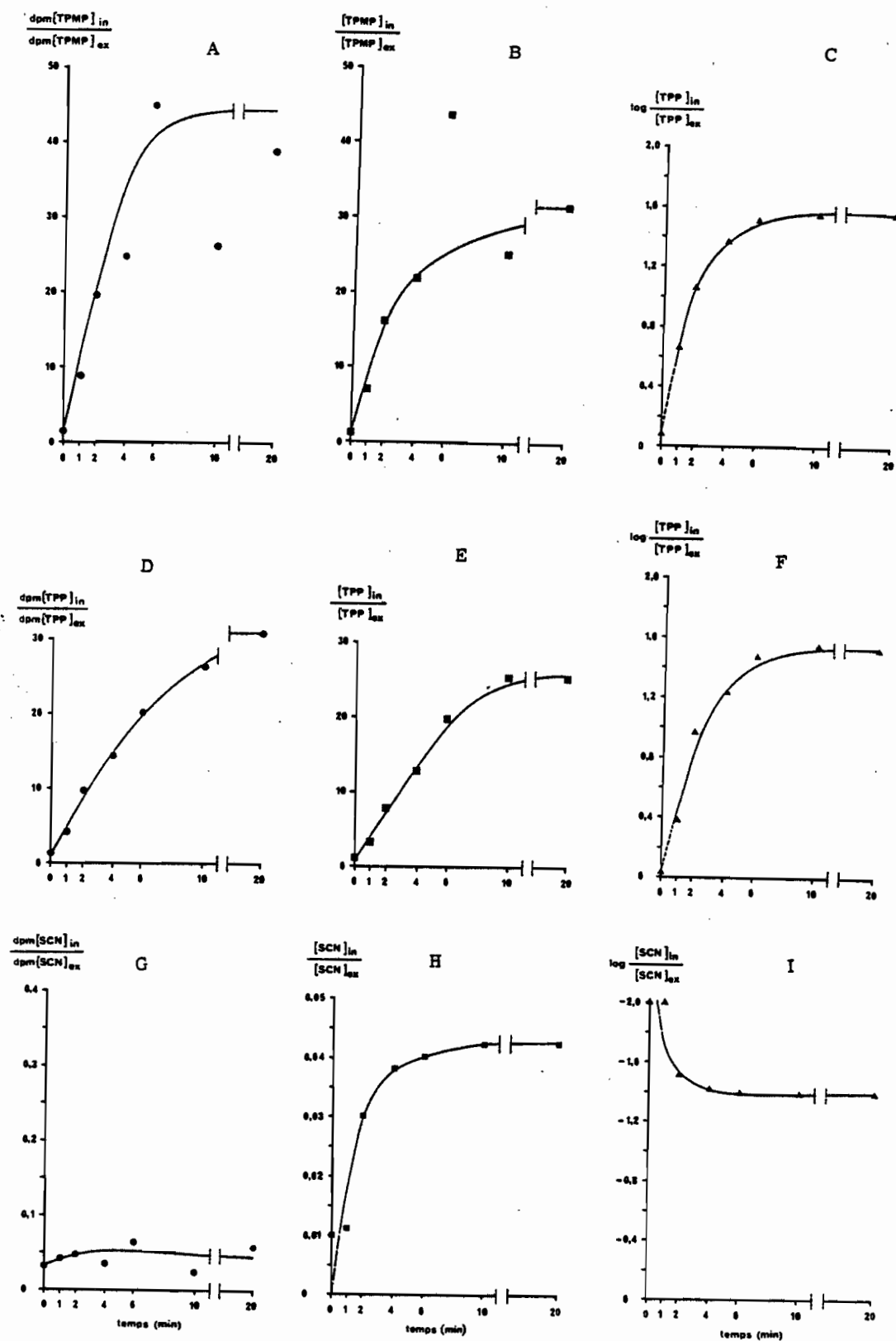


Figure 5.1

CINETIQUE D'ACCUMULATION DU  $SCN^-$ , DU  $TPMP^+$  ET  
DU  $TPP^+$  PAR LES VESICULES VACUO LYSOSOMALES

Figure 5.2

INFLUENCE DES CONDITIONS D'INCUBATION SUR LA RETENTION  
DES MOLECULES LIPOPHILES PAR LES VESICULES  
VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales, préparées dans les conditions habituelles, sont incubées à 25°C dans un milieu de Tager, ajusté à pH = 7,5, par addition de Tris-base, chaque ml de milieu d'incubation contient de l'eau tritiée (0,5  $\mu$ Ci) et, soit du  $^{14}$ C-TPMP<sup>+</sup> (0,1  $\mu$ Ci), soit du  $^{14}$ C-SCN<sup>-</sup> (0,1  $\mu$ Ci), soit du  $^{14}$ C-dextrane (0,1  $\mu$ Ci). Lorsque le  $^3$ H-TPP<sup>+</sup> est employé, l'eau tritiée, est omise du milieu, le  $^{14}$ C-dextrane constituant alors le marqueur.

Les vingt premières minutes constituent la phase d'incorporation. Les prélèvements sont effectués aux temps indiqués dans les figures 7.9 à 7.14. Chaque aliquote, correspondant à 0,3 ml de suspension, est déposée sur une couche de silicones résultant d'un mélange déterminé dans un rapport tel qu'il permet aux vésicules de la traverser, lors de la centrifugation (3 min. à vitesse maximale, 13.000 x g).

Au dernier prélèvement de la phase d'incorporation, fait après 20 min. d'incubation, le reste de la suspension est centrifugée et le sédiment, qui en résulte, est repris par le même volume, soit d'eau distillée (choc hypotonique), soit de milieu d'incubation (pour les deux motifs correspondant au choc thermique).

Les prélèvements se poursuivront encore pendant 40 min. dans les conditions spécifiques de chaque motif.

Chaque fraction prélevée sera traitée comme indiqué dans "matériel et méthodes".

Les symboles suivants sont employés : pour le choc osmotique, (-■--■-) pour le choc thermique, soit (-●--●-) correspondant à l'abaissement de la température (30°C → 0°C), soit (-○--○-) correspondant à l'élévation de température (30°C → 100°C).

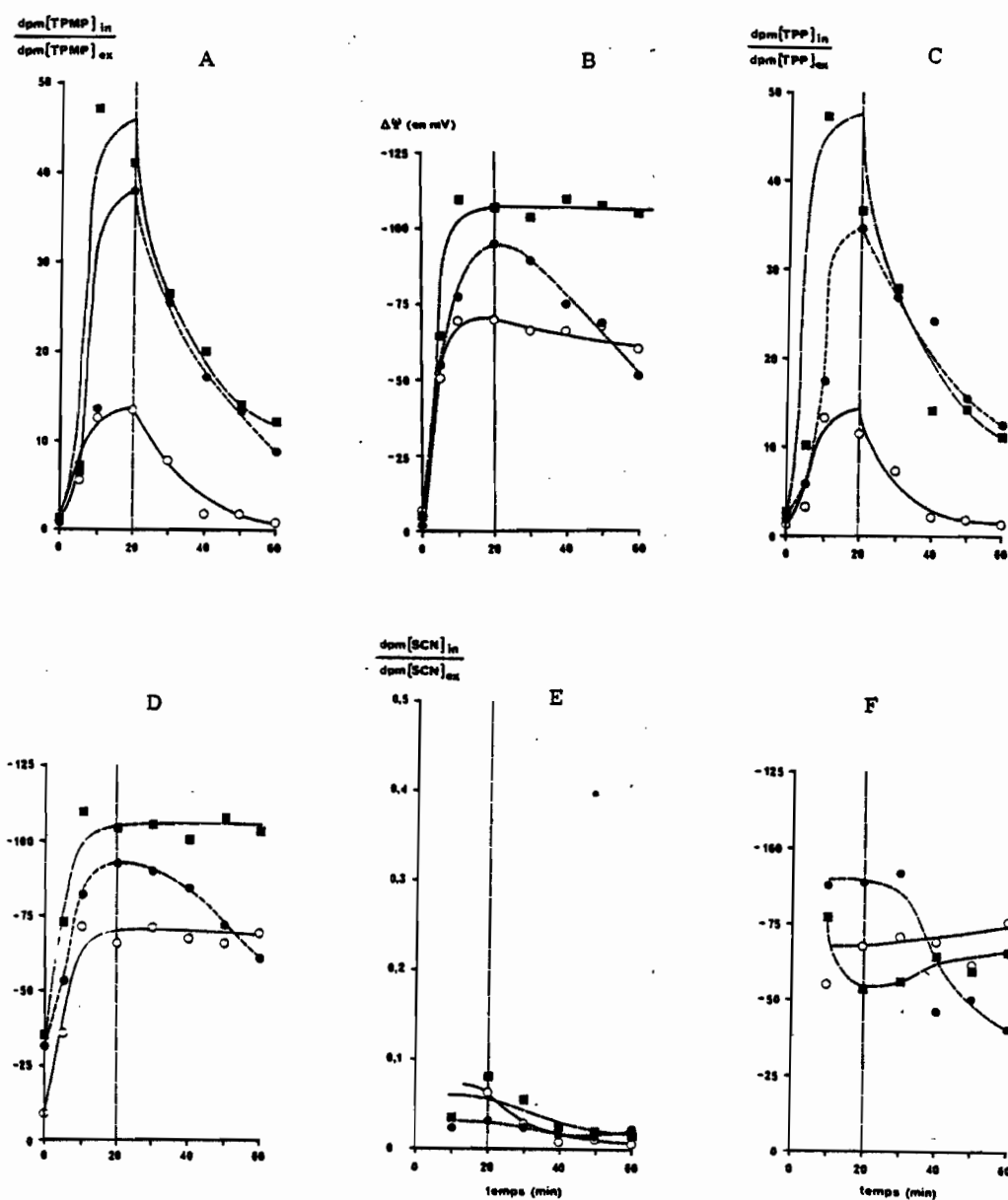


Figure 5.2

INFLUENCE DES CONDITIONS D'INCUBATION SUR LA  
RETENTION DES MOLECULES LIPOPHILES PAR LES  
VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

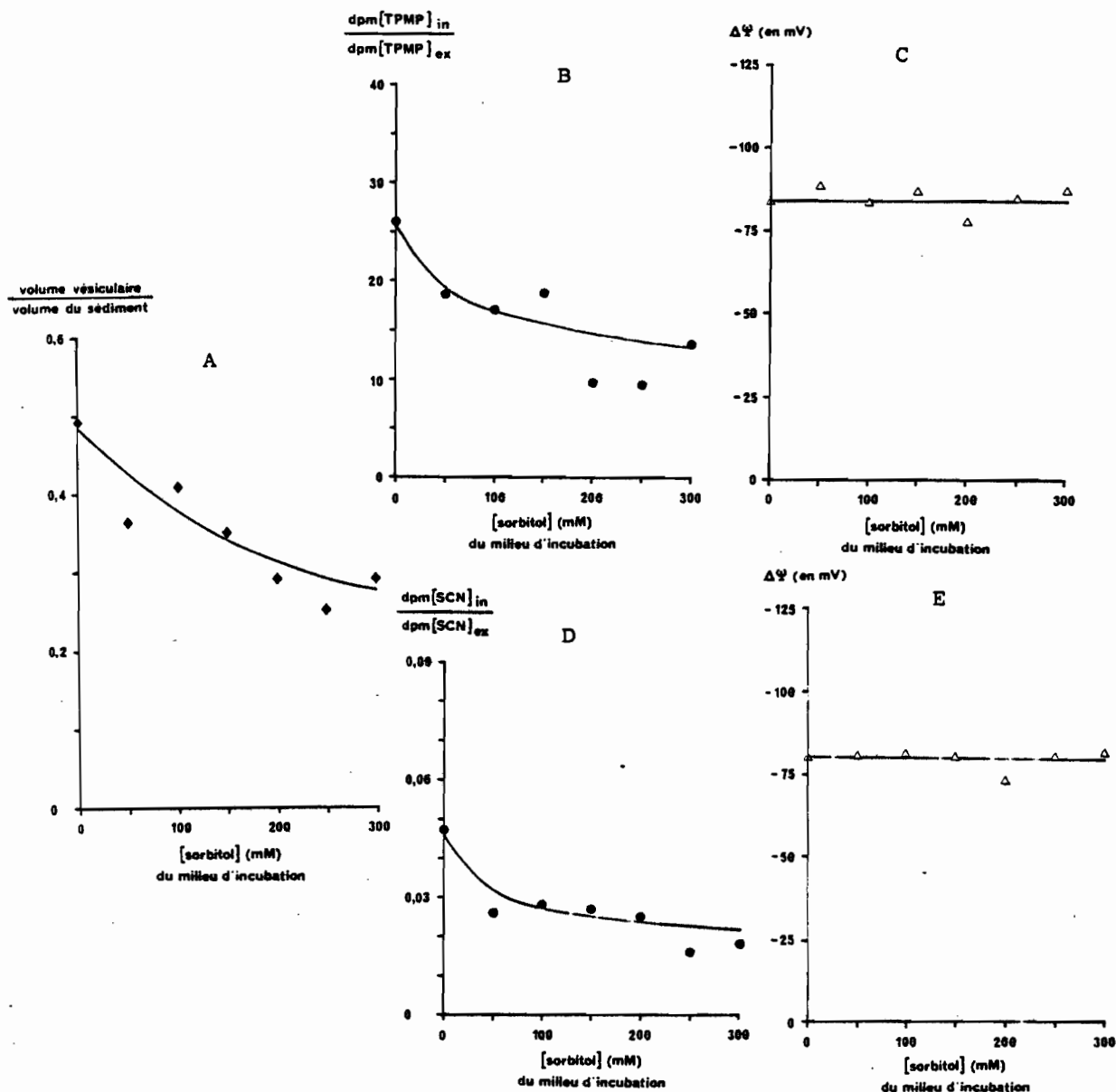


Figure 5.3

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SORBITOL DU MILIEU  
D'INCUBATION SUR LA RETENTION DE TPMP<sup>+</sup> OU DE SCN<sup>-</sup>  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales, préparées dans les conditions habituelles, sont incubées pendant vingt minutes à 25° C dans un milieu de Tager, ajusté à pH = 7,5 par addition de Tris-base, et contenant du sorbitol à une concentration allant de 0 à 300 mM, de façon à modifier l'osmolarité du milieu d'incorporation.

Selon la nature du motif, chacun étant traité parallèlement, chaque ml de suspension vésiculaire contiendra de l'eau tritiée (0,5  $\mu\text{Ci}$ ) et, soit du  $^{14}\text{C}$ -SCN<sup>-</sup> (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), soit du  $^{14}\text{C}$ -TPMP<sup>+</sup> (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), soit du  $^{14}\text{C}$ -dextrane (0,1  $\mu\text{Ci}$ ). La distribution de chaque traceur sera déterminée dans le sédiment et le surnageant, obtenus par centrifugation, selon la méthode décrite par ailleurs (voir Matériel et méthodes).

Chaque valeur représente la moyenne de trois manipulations faites sur le même lyophilisat.



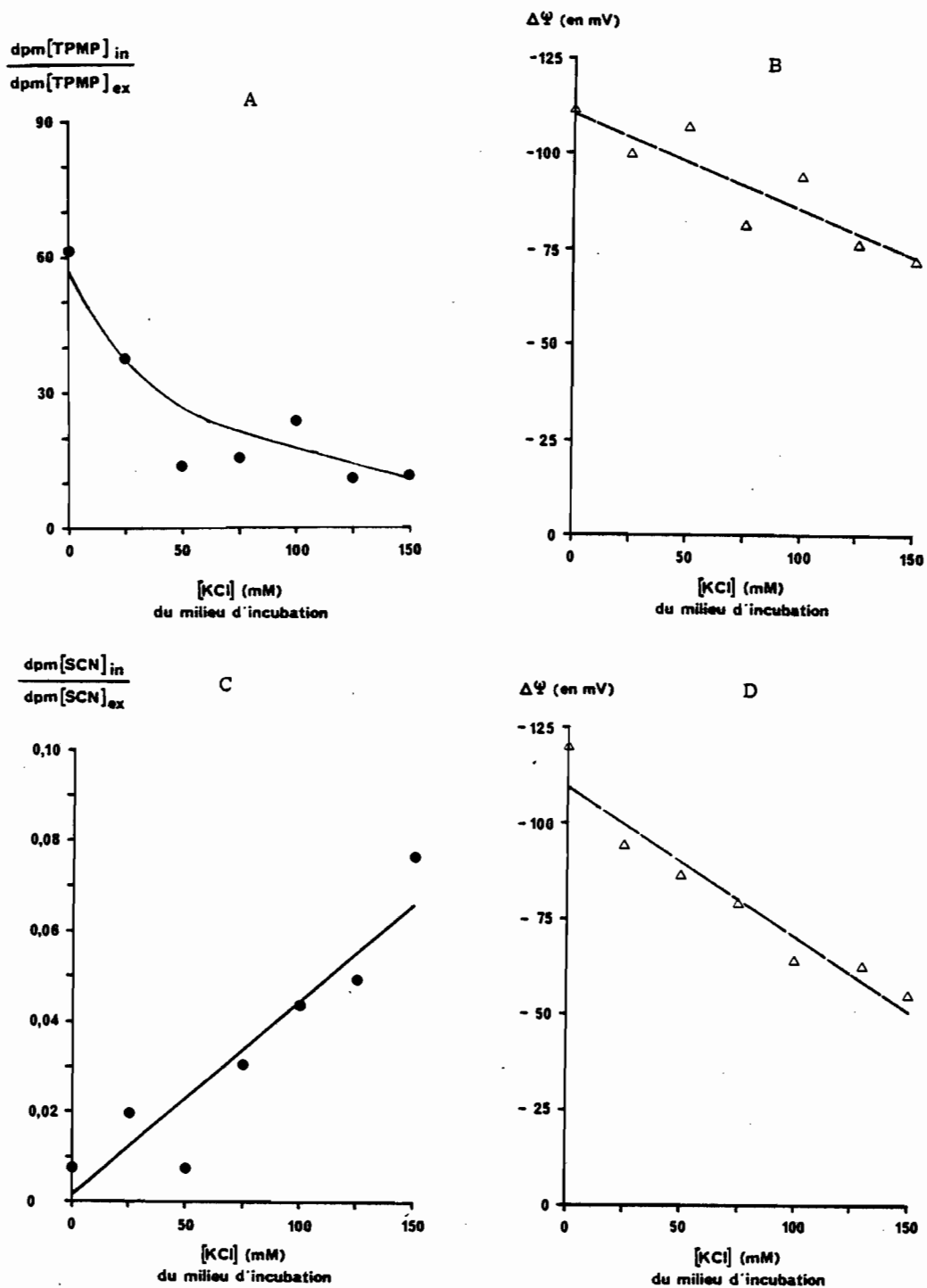


Figure 5.4

#### INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN KCl DU MILIEU

#### D'INCUBATION SUR LA RETENTION DE TPMP<sup>+</sup> OU DE SCN<sup>-</sup>

#### PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

La conduite de la manipulation est faite comme celle caractérisant l'effet du sorbitol sur l'accumulation des molécules lipophiles (TPMP<sup>+</sup>, SCN<sup>-</sup>) par les vésicules vacuo-lysosomales.

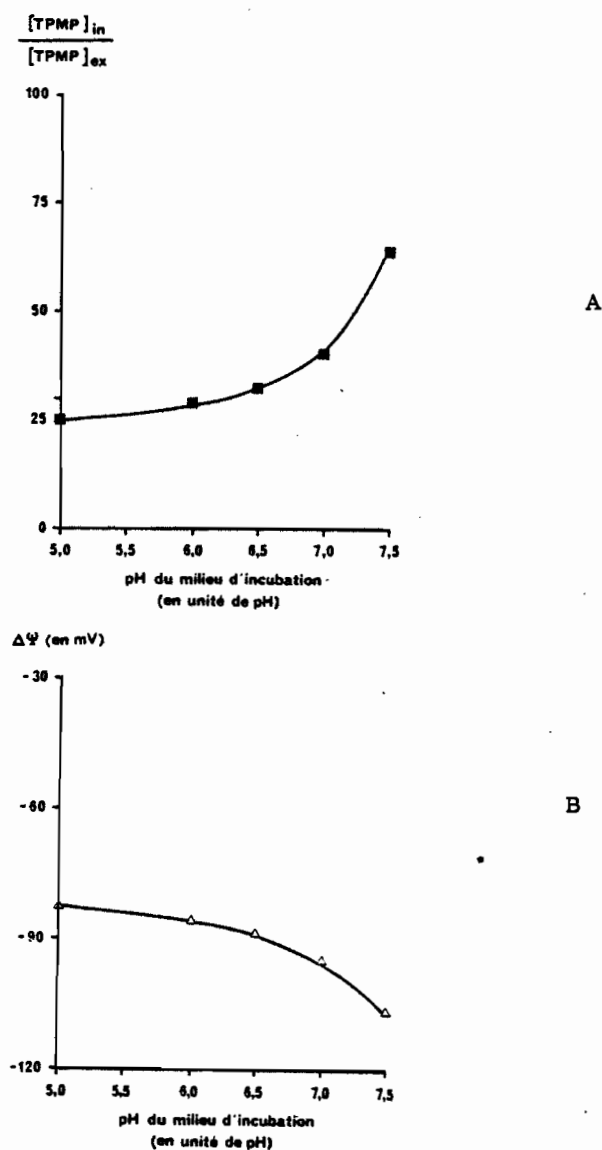


Figure 5.5

#### EFFET DU pH DU MILIEU D'INCUBATION SUR L'ACCUMULATION DU TPMP+ PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales, formées dans un milieu de Tager (pH 6,0), sont incubées à 25° C dans un milieu de même nature mais dont le pH est ajusté à la valeur désirée par addition, soit de Tris-base, soit d'un mélange en proportions de M.E.S. et d'H.E.P.E.S.M.

Chaque ml de suspension vésiculaire contient de l'eau tritiée (0,5  $\mu$ Ci) et, soit du  $^{14}$ C-dextrane (0,1  $\mu$ Ci), soit du  $^{14}$ C-TPMP+ (0,1  $\mu$ Ci). L'addition de molybdate d'ammonium (0,1 mM) et de  $SO_4 Mg$  (5 mM) est également effectuée.

Le premier prélèvement n'est opéré qu'au bout de 10 min. d'incubation à 25° C. Les échantillons sont traités comme indiqués dans "Matériel et méthodes".

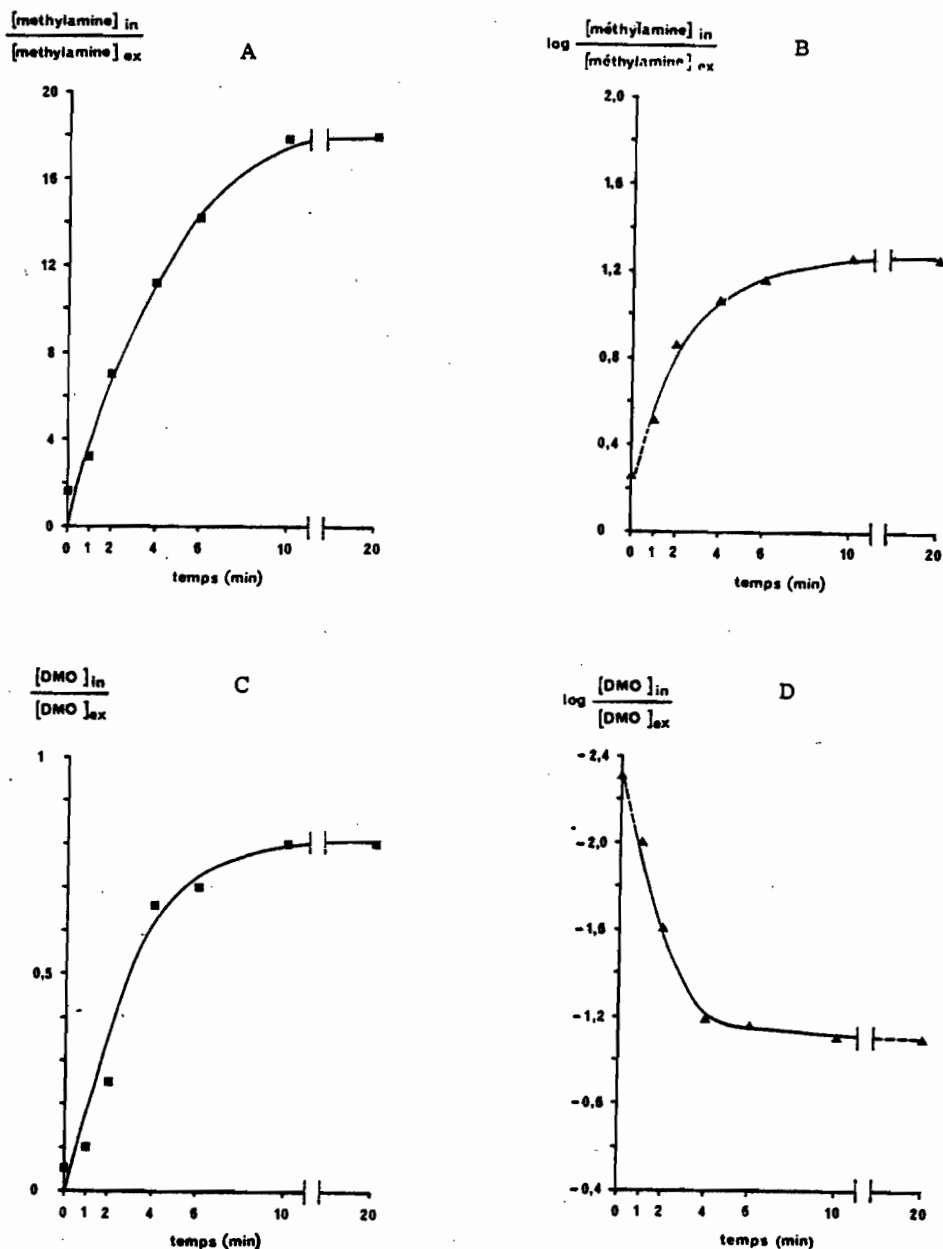


Figure 5.6.

#### CINETIQUE D'ACCUMULATION

#### DE LA METHYLAMINE ET DU D.M.O. PAR LES VESICULES

#### VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées à pH 6,0 et incubées à pH 7,5 à 25° C. Le milieu de vésiculation et d'incubation est de type imperméant: un milieu de Tager constitué par 25 mM M.E.S., 25 mM H.E.P.E.S., 25 mM M.O.P.S. et 300 mM mannitol, ajusté au pH désiré par addition de Tris-base.

Chaque ml de milieu d'incubation contient aussi de l'eau tritiée (0,5  $\mu\text{Ci}$ ) et, soit du  $^{14}\text{C}$ -D.M.O. (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), soit de la  $^{14}\text{C}$ -méthylamine (0,1  $\mu\text{Ci}$ ), soit du  $^{14}\text{C}$ -dextrane (0,1  $\mu\text{Ci}$ ).

Au temps indiqué, une fraction aliquote de 1 ml est prélevée et préparée comme indiqué dans "Matériel et méthodes".

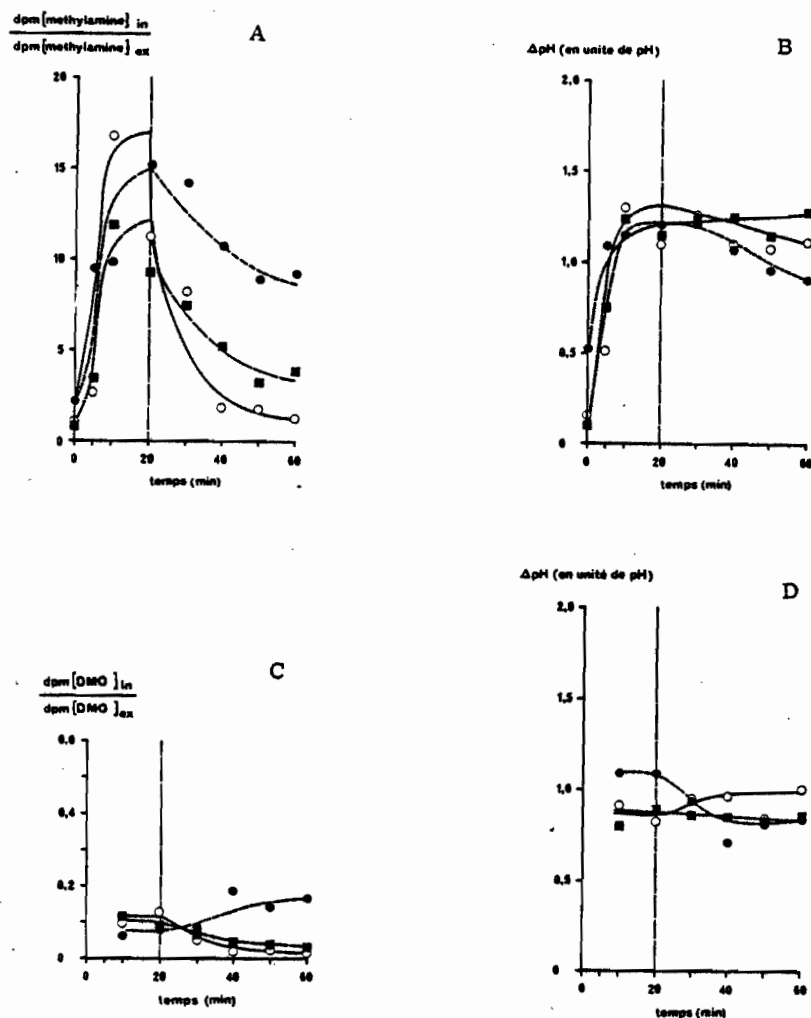


Figure 5.7

INFLUENCE DES CONDITIONS D'INCUBATION SUR LA RETENTION  
DES MOLECULES LIPOPHILES (EMPLOYEES POUR MESURER LE  $\Delta \text{pH}$ )  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est la manipulation complémentaire de celle décrite dans la Figure 5.2. Elle a été effectuée avec la même suspension vésiculaire, selon le même profil expérimental. Parallèlement, en supplément des motifs expérimentaux déjà décrits, s'ajoutent ceux contenant en plus de l'eau tritiée ( $0,5 \mu\text{Ci}$ ), soit de la  $^{14}\text{C}$ -méthylamine ( $0,1 \mu\text{Ci}$ ) soit du  $^{14}\text{C}$ -DMO ( $0,1 \mu\text{Ci}$ ), toujours dans un ml de milieu d'incubation.

Le déroulement de la manipulation est identique.

Les symboles suivants sont employés : pour le choc osmotique, (- ■ - - ■ -) ; pour le choc thermique, soit (- ● - - ● -) correspondant à l'abaissement de température ( $30^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$ ), soit (- ○ - - ○ -) correspondant à l'élévation de température ( $30^\circ\text{C} \rightarrow 100^\circ\text{C}$ ).

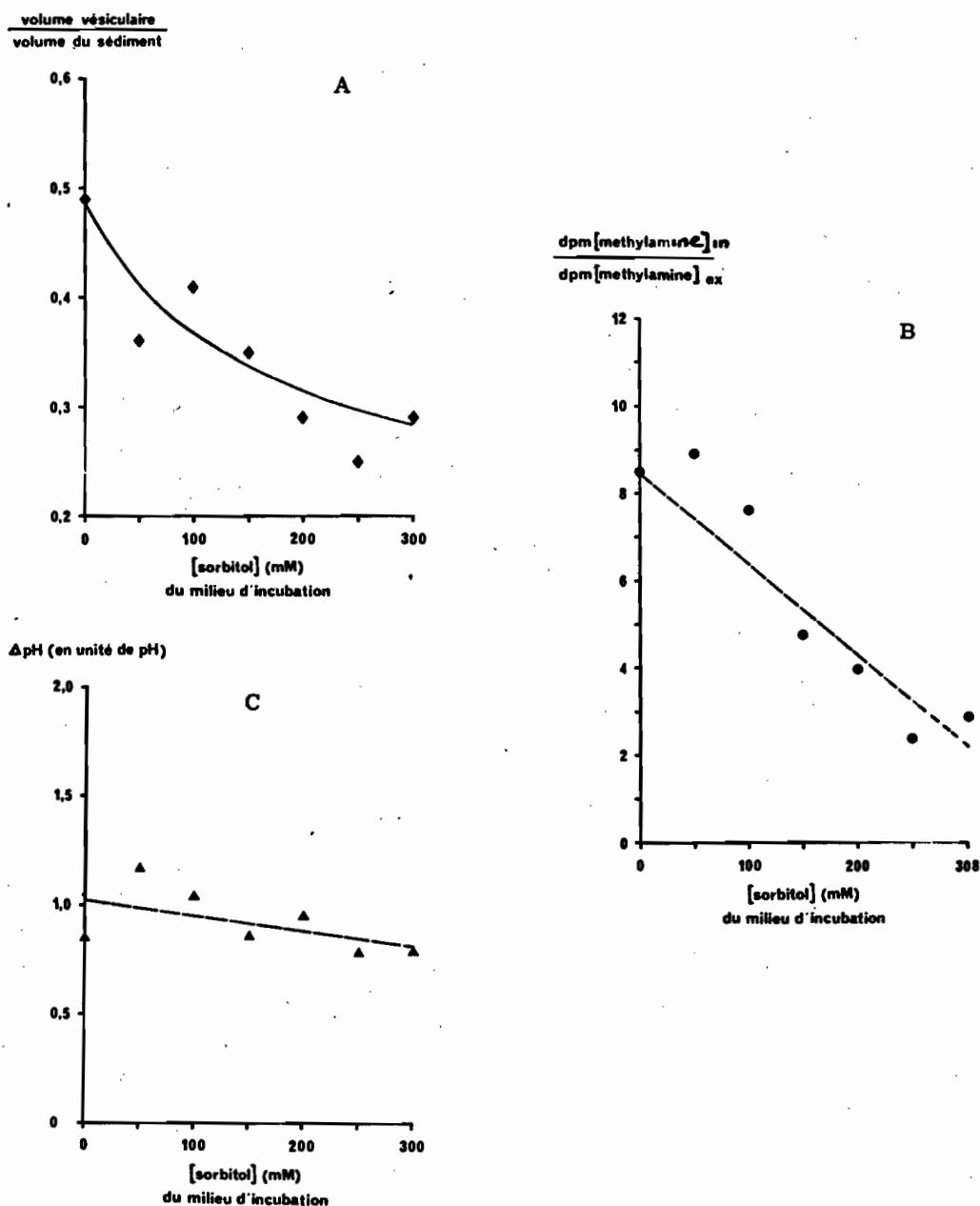


Figure 5.8

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SORBITOL DU MILIEU  
D'INCUBATION SUR LA RETENTION DE METHYLAMINE  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont incubées pendant 20 min. à 25° C dans un milieu de Tager, ajusté à pH = 7,5 par addition de Tris-base, et contenant du sorbitol à une concentration allant de 0 à 300 mM de façon à modifier l'osmolarité du milieu d'incubation.

Le milieu d'incubation contient aussi de l'eau tritiée (0,5  $\mu$ Ci) et, soit du  $^{14}$ C-dextrane (0,1  $\mu$ Ci), soit de la  $^{14}$ C-méthylamine (0,1  $\mu$ Ci).

La distribution de chaque traceur sera déterminée dans le sédiment et le surnageant, obtenus par centrifugation, selon la méthode décrite par ailleurs (voir "Matériel et méthodes").

Chaque valeur représente la moyenne de trois manipulations faites sur le même lyophilisat.

C'est l'ensemble complémentaire des manipulations dont rend compte la Figure 5.3.

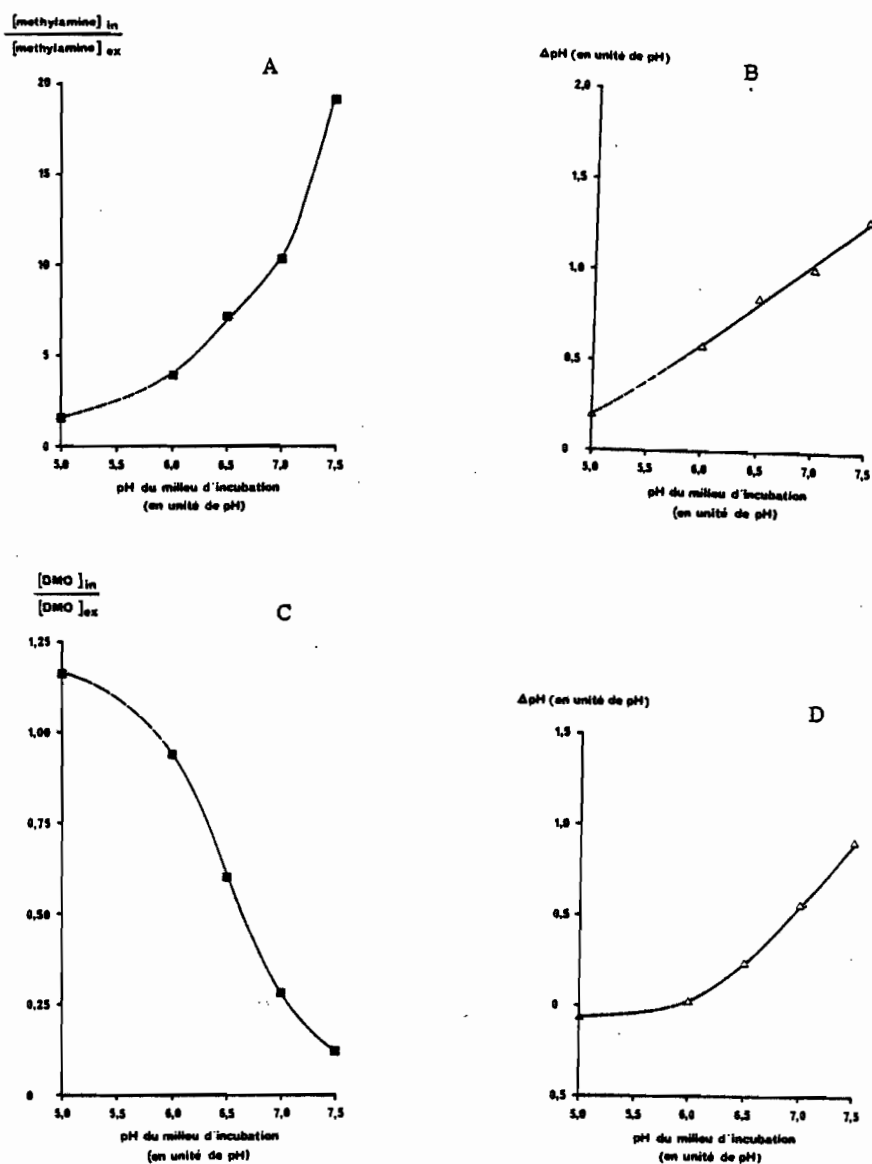


Figure 5.9

INFLUENCE DU pH DU MILIEU D'INCUBATION  
SUR LA DISTRIBUTION A L'EQUILIBRE DE LA METHYLAMINE  
ET DU D. M. O.

Les vésicules vacuo-lysosomales (formées à pH = 6,0) sont incubées pendant 10 min. à 25°C dans un milieu de Tager (300 mM mannitol, 25 mM M.E.S., 25 mM H.E.P.E.S., 25 mM M.O.P.S.) contenant suffisamment de Tris-base pour ajuster le pH à la valeur désirée se situant entre 5,0 et 7,5. On trouve aussi, dans chaque ml de suspension vésiculaire, de l'eau tritiée (0,5  $\mu$ Ci) et, soit du  $^{14}$ C-DMO (0,1  $\mu$ Ci), soit de la  $^{14}$ C-méthylamine (0,1  $\mu$ Ci), soit du  $^{14}$ C-dextrane (0,1  $\mu$ Ci).

Le temps choisi est jugé suffisant pour que l'équilibre transmembranaire soit atteint. Le moment venu, les vésicules sont sédimentées au cours d'une brève centrifugation (3 min., 13.000 x g). La distribution de chaque molécule entre les vésicules et l'espace extravésiculaire est estimée selon la méthode indiquée dans "matériel et méthodes".

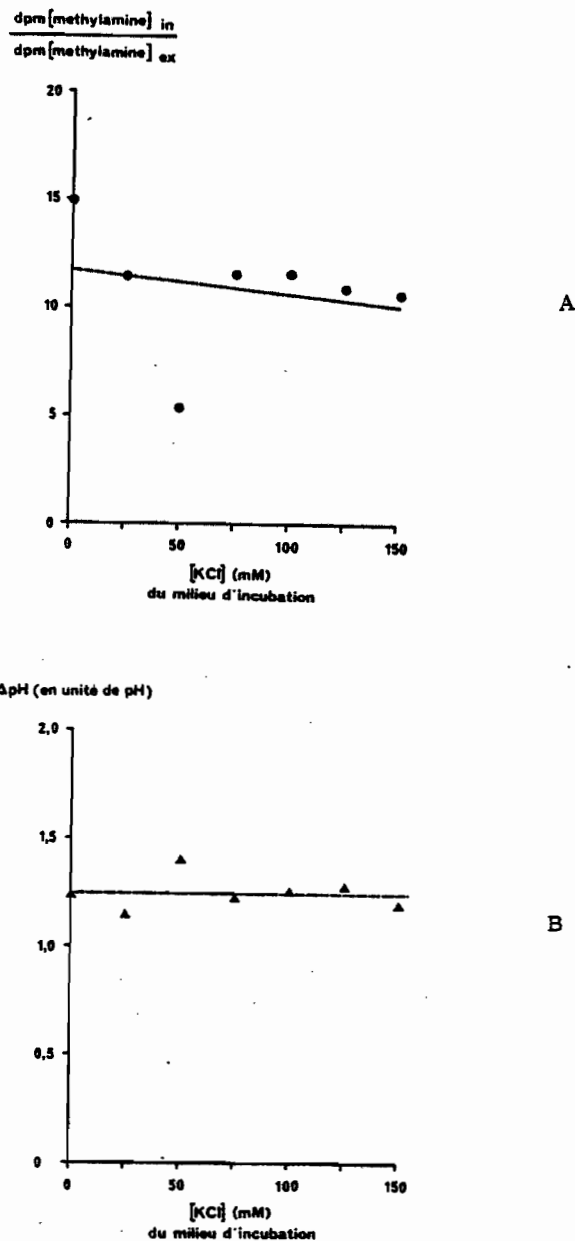


Figure 5.10

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN KCl DU MILIEU  
D'INCUBATION SUR LA RETENTION DE LA METHYLAMINE  
PAR DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est la manipulation complémentaire de celle décrite dans la Figure 5.4. Elle a été effectuée avec la même suspension vésiculaire, selon le même profil expérimental. Parallèlement, en supplément des motifs expérimentaux déjà décrits, s'ajoutent ceux contenant, en plus de l'eau tritiée (0,5  $\mu\text{Ci}$ ), de la  $^{14}\text{C}$ -méthylamine (0,1  $\mu\text{Ci}$ ) toujours dans un ml de milieu d'incubation.

Le déroulement de la manipulation est identique.

| Motif expérimental                                               | Variation du volume vésiculaire (en % par rapport au motif non traité) | Variation (en % par rapport au motif non traité) |                   |                  |                                                                                       |                   |                  |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|
|                                                                  |                                                                        | de la quantité accumulée de :                    |                   |                  | du potentiel transmembranaire (calculé à partir de la distribution à l'équilibre du : |                   |                  |
|                                                                  |                                                                        | TPP <sup>+</sup>                                 | TPMP <sup>+</sup> | SCN <sup>-</sup> | TPP <sup>+</sup>                                                                      | TPMP <sup>+</sup> | SCN <sup>-</sup> |
| Choc osmotique hypotonique                                       | - 57,2                                                                 | -68,9                                            | -70,7             | -81,2            | -0,2                                                                                  | -1,6              | -24,1            |
| Choc thermique par abaissement de la température (30°C → 0°C)    | + 9,2                                                                  | -64,2                                            | -77,4             | ?                | -33,6                                                                                 | -45,2             | ?                |
| Choc thermique par augmentation de la température (30°C → 100°C) | - 81,5                                                                 | -87,5                                            | -92,5             | -92,4            | + 5,5                                                                                 | +13,4             | +12,6            |

Tableau 5.1

INFLUENCE DES CONDITIONS D'INCUBATION  
SUR L'ACCUMULATION DU TPP<sup>+</sup>, DU TPMP<sup>+</sup> ET  
DU SCN<sup>-</sup> PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est le complément de la figure 5.2. Les variations observées sont exprimées en fonction des motifs non traités (correspondant à l'accumulation des molécules lipophiles au terme d'une incubation de 20 mn à 25°C).



| Motif<br>expérimental  | $\frac{[TPMP^+]_{in.}}{[TPMP^+]_{ex.}}$ |               | $\Delta\psi$<br>(calculé à partir de<br>la distribution<br>transmembranaire du $TPMP^+$<br>à l'équilibre)<br>(en mV) |              |
|------------------------|-----------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
|                        | $t_0$                                   | $t_{30}$      | $t_0$                                                                                                                | $t_{30}$     |
| Témoin                 | $36 \pm 16$                             | $40 \pm 12$   | $-90 \pm 11$                                                                                                         | $-95 \pm 8$  |
| + 50 mM<br>$NH_4Cl$    | $11 \pm 3$                              | $15 \pm 7$    | $-62 \pm 6$                                                                                                          | $-69 \pm 12$ |
| + 30 mM<br>$TPP^+$     | $1,3 \pm 0,2$                           | $1,4 \pm 0,5$ | $-6 \pm 1$                                                                                                           | $-6 \pm 1$   |
| + 50 mM<br>méthylamine | $13 \pm 1$                              | $22 \pm 2$    | $65 \pm 3$                                                                                                           | $77 \pm 10$  |

Tableau 5. II

INFLUENCE DE DIFFERENTES MOLECULES (CONNUES  
POUR DISSIPER SPECIFIQUEMENT SOIT LE  $\Delta pH$ , SOIT LE  
 $\Delta\psi$  SUR L'ACCUMULATION DU  $TPMP^+$  PAR LES  
VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales, préparées dans les conditions habituelles, sont incubées à 25°C dans un milieu de Tager, ajusté à pH 7,5 (par addition de Tris-base). Chaque ml de milieu d'incubation contient de l'eau tritiée (0,5  $\mu Ci$ ) et, soit du  $^{14}C$ - $TPMP^+$  (0,1  $\mu Ci$ ), soit de la  $^{14}C$ -méthylamine (0,1  $\mu Ci$ ), soit du  $^{14}C$ -dextrane (0,1  $\mu Ci$ ).

Selon la nature du motif considéré, une addition supplémentaire sera faite pour obtenir une concentration finale de, soit 30 mM pour le  $TPP^+$ , soit 50 mM pour le  $NH_4Cl$  et pour la méthylamine. Le méthanol constitue le solvant de ces molécules lipophiles. On ajoutera un même volume (20  $\mu l$ ) de méthanol dans tous les motifs.

Le premier prélèvement n'est effectué qu'au bout de 10 mn d'incubation ; le second, 30 mn plus tard.

Les échantillons sont traités comme dans "Matériel et Méthodes"

| Motif expérimental                            | $\Delta V$<br>(calculé à partir de la<br>distribution transmembranaire<br>à l'équilibre du TPMP <sup>+</sup> ) |           | $\Delta pH$<br>(calculé à partir de la<br>distribution transmembranaire<br>à l'équilibre de la<br>méthylamine)<br>(en unités de pH) |             |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                                               | $t_0$                                                                                                          | $t_{30}$  | $t_0$                                                                                                                               | $t_{30}$    |
|                                               |                                                                                                                |           |                                                                                                                                     |             |
| Témoin                                        | - 119 ± 2                                                                                                      | - 95 ± 4  | 1,41 ± 0,09                                                                                                                         | 1,35 ± 0,16 |
| + nigéricine<br>(10 µg x ml <sup>-1</sup> )   | - 126 ± 4                                                                                                      | 97 ± 7    | 1,39 ± 0,11                                                                                                                         | 1,25 ± 0,06 |
| nigéricine<br>(10 µg x ml <sup>-1</sup> )     |                                                                                                                |           |                                                                                                                                     |             |
| +<br>KCl (30 mM)                              | - 126 ± 6                                                                                                      | - 95 ± 16 | 1,42 ± 0,15                                                                                                                         | 0,62 ± 0,20 |
| + valinomycine<br>(10 µg x ml <sup>-1</sup> ) | - 126 ± 2                                                                                                      | -115 ± 6  | 1,39 ± 0,12                                                                                                                         | 1,31 ± 0,07 |
| valinomycine<br>(10 µg x ml <sup>-1</sup> )   |                                                                                                                |           |                                                                                                                                     |             |
| +<br>KCl (30 mM)                              | - 131 ± 6                                                                                                      | - 35 ± 7  | 1,42 ± 0,14                                                                                                                         | 1,35 ± 0,08 |
| FCCP<br>(1 mM)                                | - 122 ± 3                                                                                                      | - 29 ± 11 | 1,25 ± 0,42                                                                                                                         | 0,35 ± 0,08 |
| valinomycine<br>(10 µg x ml <sup>-1</sup> )   |                                                                                                                |           |                                                                                                                                     |             |
| +<br>KCl (30 mM)                              | - 118 ± 5                                                                                                      | - 14 ± 16 | 1,35 ± 0,16                                                                                                                         | 0,42 ± 0,25 |
| +<br>FCCP (1 mM)                              |                                                                                                                |           |                                                                                                                                     |             |

Tableau 5.III

EFFET DES IONOPHORES SUR L'ACCUMULATION DU TPMP<sup>+</sup>

ET DE LA METHYLAMINE PAR DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont incubées à 25°C dans un milieu de Tager, ajusté à pH 7,5 avec du Tris-base. Chaque ml de milieu d'incubation contient 0,1 mM molybdate d'ammonium, 5 mM SO<sub>4</sub> Mg, de l'eau tritiée (0,5 µCi) et, soit de la <sup>14</sup>C-méthylamine (0,1 µCi), soit du <sup>14</sup>C-TPMP<sup>+</sup> (0,1 µCi), soit du <sup>14</sup>C-dextrane (0,1 µCi). Le cas échéant les additions indiquées sont faites. Pour le motif témoin, elle se réduit à 20 µl de méthanol, solvant utilisé pour dissoudre chaque ionophore et le FCCP. Elles sont faites au moment du premier prélèvement.

Le premier prélèvement n'est effectué qu'au bout de 10 min. d'incubation, le second, trente minutes plus tard. Les échantillons sont traités comme indiqués dans "Matériel et Méthodes".

| N°<br>de<br>l'expérience | pH<br>du milieu<br>d'incubation | Accumulation du DMO |                |             | Accumulation de la méthylamine |               |             |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------|----------------|-------------|--------------------------------|---------------|-------------|
|                          |                                 | [DMO] in.           | ΔpH            | pH in.      | [méthyl] in.                   | ΔpH           | pH in.      |
|                          |                                 | [DMO] ex.           |                |             | [méthyl] ex.                   |               |             |
| 1                        | 7,50                            | 0,146               | - 0,836        | 6,40        | 17,78                          | 1,250         | 6,25        |
| 2                        | 7,50                            | 0,139               | - 0,857        | 6,36        | 17,78                          | 1,250         | 6,25        |
| 3                        | 7,50                            | 0,126               | - 0,900        | 6,26        | 12,59                          | 1,100         | 6,40        |
| 4                        | 7,50                            | 0,100               | - 1,000        | 5,98        | 28,80                          | 1,459         | 6,04        |
| m                        | 7,50                            | 0,128 ± 0,032       | -0,898 ± 0,116 | 6,25 ± 0,29 | 19,24 ± 6,98                   | 1,265 ± 0,235 | 6,24 ± 0,23 |

Tableau 5. IV

DETERMINATION DU pH INTRAVESICULAIRE A PARTIR DE LA  
DISTRIBUTION A L'EQUILIBRE DU DMO ET DE LA METHYLAMINE

Les vésicules vacuo-lysosomales sont incubées pendant 10 min. à 25°C dans un ml de milieu dont la composition est la suivante: 300 mM mannitol, 25 mM HEPES, 25 mM MES, 25 mM MOPS, ajusté à pH=7,5, par addition de Tris-base, de l'eau tritiée (0,5  $\mu$ Cl) et, soit du  $^{14}$ C-DMO (0,1  $\mu$ Cl), soit de la méthylamine (0,1  $\mu$ Cl), soit du  $^{14}$ C-dextrane (0,1  $\mu$ Cl).

Elles sont sédimentées (3 min., 13.000 x g) et la distribution de chaque molécule entre les vésicules et l'espace extra-vésiculaire est estimée selon la méthode indiquée dans " Matériel et Méthodes".

Le pH intra-vésiculaire est calculé à partir des relations indiquées dans le texte, respectivement (5.10) et (5.11), dérivées de la relation d'Henderson-Hasselbalch (R. IRVINE et al, 1960 ; W. J. ADDANKI et R. G. BATES, 1969 ; S. ADDANKI et al, 1968) en prenant 6,39 comme valeur pour le  $pK_a$  du D.M.O. et 10,6, pour celui de la méthylamine.

L'intervalle de confiance est déterminé en prenant comme valeur de t 3,182 pour un risque de 5% (D. SCHWARTZ, 1963).

| Motif<br>expérimental                                                      | Variation du<br>volume vésiculaire<br>(en % par rapport<br>au motif<br>non traité) | Variation<br>(en % par rapport au motif non traité) |        |                                                                                          |       |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|                                                                            |                                                                                    | de la quantité<br>accumulée<br>de :                 |        | du ΔpH<br>(calculé à partir de la<br>distribution transmembranaire<br>à l'équilibre de : |       |
|                                                                            |                                                                                    | Méthylamine                                         | DMO    | Méthylamine                                                                              | DMO   |
|                                                                            |                                                                                    |                                                     |        |                                                                                          |       |
| Choc osmotique<br>hypotonique                                              | - 57,2                                                                             | - 58,2                                              | - 67,5 | + 11,0                                                                                   | + 1,9 |
| Choc thermique<br>par abaissement<br>de la température:<br>(30°C → 0°C)    | + 9,2                                                                              | - 39,8                                              | +121,5 | - 24,9                                                                                   | +22,0 |
| Choc thermique<br>par augmentation<br>de la température:<br>(30°C → 100°C) | - 81,5                                                                             | - 88,6                                              | - 92,8 | + 2,4                                                                                    | -21,4 |

Tableau 5. V

INFLUENCE DES CONDITIONS D'INCUBATION SUR  
L'ACCUMULATION DE LA METHYLAMINE ET DU DMO  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est le complément de la figure 5.7. Les variations observées (correspondant aux motifs prélevés après 60 mn d'incubation) sont exprimées en fonction des motifs non traités (correspondant à l'accumulation des molécules lipophiles au terme d'une incubation de 20 mn à 25° C).

| Motif<br>experimental         | $\Delta pH$<br>(calculé à partir de la<br>distribution transmembranaire<br>à l'équilibre de<br>la méthylamine)<br>(en unités de pH) |             | $\Delta \Psi$<br>(calculé à partir de la<br>distribution transmembranaire<br>à l'équilibre du TPMP <sup>+</sup> )<br>(en mV) |           |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|                               | $t_0$                                                                                                                               | $t_{30}$    | $t_0$                                                                                                                        | $t_{30}$  |
| Témoin                        | 1,47 ± 0,47                                                                                                                         | 1,43 ± 0,15 | -109 ± 13                                                                                                                    | -110 ± 13 |
| + 50 mM<br>NH <sub>4</sub> Cl | 0,74 ± 0,96                                                                                                                         | 0,90 ± 0,69 | - 65 ± 45                                                                                                                    | - 48 ± 11 |
| + 30 mM<br>TPP                | 0,62 ± 0,10                                                                                                                         | 0,88 ± 0,44 | - 34 ± 5                                                                                                                     | - 40 ± 18 |
| + 50 mM<br>Méthylamine        | 0,96 ± 0,64                                                                                                                         | 0,99 ± 0,47 | - 68 ± 49                                                                                                                    | - 75 ± 46 |

Tableau 5. VI

INFLUENCE DE DIFFERENTES MOLECULES CONNUES

POUR DISSIPER SPECIFIQUEMENT, SOIT LE  $\Delta pH$ ,

SOIT LE  $\Delta \Psi$  SUR L'ACCUMULATION DU TPMP<sup>+</sup>

ET DE LA METHYLAMINE PAR LES VESICULES

VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales, préparées dans les conditions habituelles, sont incubées à 25 °C dans un milieu de Tager, ajusté à pH 7,5 (par addition de Tris-base). Chaque ml de milieu d'incubation contient de l'eau tritiée (0,5  $\mu$ Ci) et, soit du <sup>14</sup>C-TPMP<sup>+</sup> (0,1  $\mu$ Ci), soit de la <sup>14</sup>C-méthylamine (0,1  $\mu$ Ci), soit du <sup>14</sup>C-dextrane (0,1  $\mu$ Ci).

Selon le motif considéré, il est ajouté, soit du NH<sub>4</sub>Cl (50 mM final), soit du TPP<sup>+</sup> (30 mM final), soit de la méthylamine (50 mM final). Dans le témoin, le même volume de méthanol (20  $\mu$ l), qui est le solvant utilisé pour dissoudre ces molécules, est introduit.

Le premier prélèvement n'est effectué qu'au bout de 10 mn d'incubation ; le second, trente mn plus tard. Les échantillons sont traités comme indiqués dans "Matériel et Méthodes".

| Effet expérimental                     | ApH<br>(calculé à partir de la<br>distribution transmembranaire<br>de la méthylamine)<br>(en unités de pH) |                 |                                            | ΔV<br>(calculé à partir de la<br>distribution transmembranaire<br>du TPP)<br>(en mV) |                 |                               | Estimation de la force<br>motrice protonique<br>(en mV) |                 |                                                              |     |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|
|                                        | t <sub>0</sub>                                                                                             | t <sub>30</sub> | Variation<br>de ApH<br>(en unit.<br>de pH) | t <sub>0</sub>                                                                       | t <sub>30</sub> | Variation<br>de ΔV<br>(en mV) | t <sub>0</sub>                                          | t <sub>30</sub> | Variation<br>de la force<br>motrice<br>protonique<br>(en mV) |     |
|                                        |                                                                                                            |                 |                                            |                                                                                      |                 |                               |                                                         |                 |                                                              |     |
| Témoin                                 | 1,40                                                                                                       | 1,37            | -0,01                                      | -120                                                                                 | -103            | +17                           | -17                                                     | -21             | +16                                                          |     |
| Modification<br>de<br>ApH              | nigélicine<br>(80 µg x ml <sup>-1</sup> )<br>+ 30mM KCl                                                    | -               | 0,62                                       | -0,70                                                                                | -               | - 95                          | +25                                                     | -               | -58                                                          | -21 |
|                                        | 50 mM<br>NH <sub>4</sub> Cl                                                                                | -               | 0,66                                       | -0,74                                                                                | -               | - 40                          | +72                                                     | -               | - 9                                                          | +28 |
|                                        | 50 mM<br>méthylamine                                                                                       | -               | 0,83                                       | -0,57                                                                                | -               | - 75                          | +45                                                     | -               | -26                                                          | +11 |
|                                        | 1 mM<br>FCCP                                                                                               | -               | 0,35                                       | -1,05                                                                                | -               | - 29                          | +91                                                     | -               | - 8                                                          | +29 |
| Modification<br>de<br>ΔV               | valinomycine<br>(80 µg x ml <sup>-1</sup> )<br>+ 30mM KCl                                                  | -               | 1,35                                       | -0,05                                                                                | -               | - 35                          | +85                                                     | -               | +45                                                          | +82 |
|                                        | 30 mM<br>TPP <sup>+</sup>                                                                                  | -               | 0,08                                       | -0,52                                                                                | -               | - 40                          | +80                                                     | -               | +12                                                          | +47 |
| Modification<br>de deux<br>composantes | valinomycine<br>(80 µg x ml <sup>-1</sup> )<br>+ 30mM KCl<br>+ 1 mM FCCP                                   | -               | 0,35                                       | -1,05                                                                                | -               | - 29                          | +91                                                     | -               | - 8                                                          | +29 |

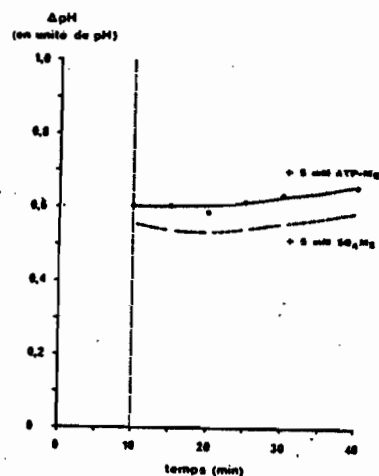
Tableau 5. VII

ESTIMATION DE LA FORCE MOTRICE PROTONIQUE DEVELOPPEE  
AU NIVEAU DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES DANS DIFFE-  
RENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

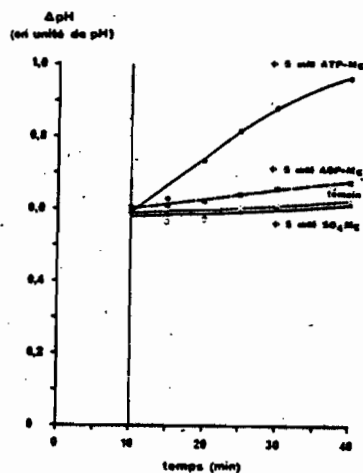
En reprenant la définition de P. MITCHELL (1968), la différence de potentiel électrochimique du proton (= force motrice protonique) est donnée par la relation :  $\Delta p = \frac{\Delta \mu_{H^+}}{F} = \Delta \psi - Z \cdot \Delta pH$

où  $\Delta \mu_{H^+}$  représente la différence de potentiel électrochimique du proton entre les deux milieux séparés par la membrane ; F, la constante de Faraday ; Z, le terme de conversion électrique (2,303. RT x F<sup>-1</sup>) et ΔpH, le gradient transmembranaire de pH.

Elle est calculée dans les différentes conditions expérimentales rencontrées, à partir des résultats obtenus.



A  
Lyophilisat  
Primot V



B  
Lyophilisat  
Primot XI

Figure 6.1

### INFLUENCE DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup> SUR L'ACIDIFICATION DU MILIEU INTERNE DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont formées dans un milieu de Tager (pH 6,0) à partir, soit du lyophilisat Primot V (A), soit du lyophilisat Primot XI (B). Elles sont incubées à 25°C pendant 40 mn dans un milieu comparable (ajusté à pH 7,5 par addition de Tris-base) contenant de l'eau tritiée (0,5  $\mu$ Ci) et, soit du <sup>14</sup>C-dextrane (0,1  $\mu$ Ci), soit de la <sup>14</sup>C-méthylamine (0,1  $\mu$ Ci).

Chaque ml de milieu réactionnel contient aussi 0,1 mM molybdate d'ammonium (utilisé pour inhiber totalement l'activité phosphatase acide résiduelle). Le cas échéant, il est ajouté, soit 5 mM SO<sub>4</sub> Mg (-▲-▲-), soit 5 mM ADP-Mg<sup>2+</sup> (-■-■-), soit 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup> (-●-●-), d's que la distribution transmembranaire de la méthylamine est à l'équilibre. Elle est supposée l'être au bout de 10 min. d'incubation.

Les échantillons sont prélevés et traités comme il est indiqué dans "Matériel et Méthodes".

accumulation de méthylamine  
(nmol. x mg<sup>-1</sup> prot.)

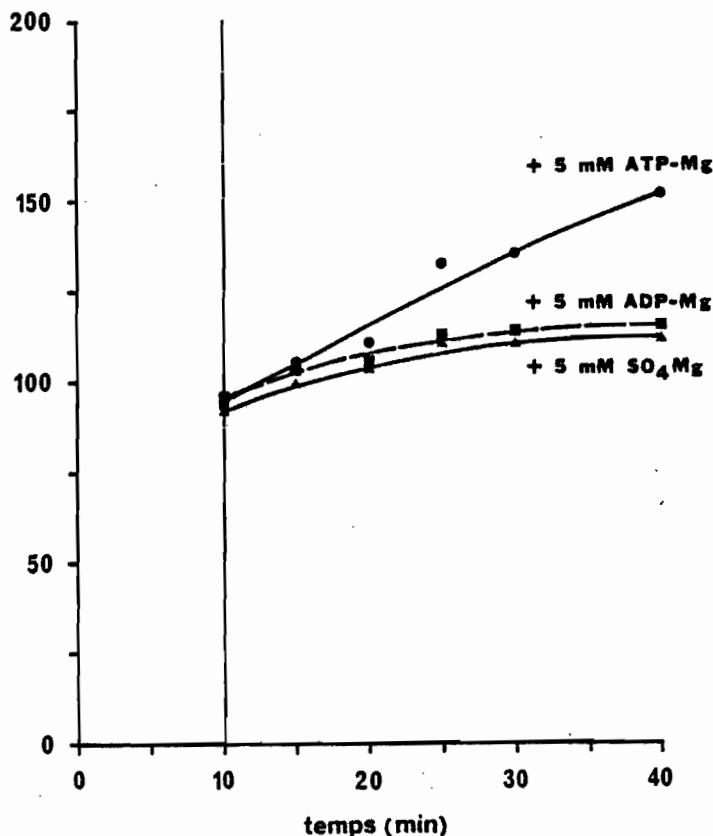


Figure 6.2

#### INFLUENCE DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup> SUR L'ACCUMULATION DE LA METHYLAMINE PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes").

Chaque ml de milieu d'incubation contient, en plus de 0,1 mM molybdate d'ammonium, utilisé pour inhiber totalement toute activité phosphatase acide résiduelle, et des additions potentielles fonction du motif considéré, de la <sup>14</sup>C-méthylamine (0,1 µCi).

La séquence des additions tient compte de l'indispensable préincubation de 10 min. Le cas échéant, il est ajouté, soit 5 mM So<sub>4</sub> Mg<sup>2+</sup> (-▲-▲-), soit 5 mM ADP-Mg<sup>2+</sup> (-■-■-), soit 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup> (-●-●-).

Au moment désiré, une fraction aliquote de 0,1 ml est prélevée. Son traitement est effectué selon la méthode employée pour suivre la cinétique d'incorporation de citrate par les vésicules vacuo-lysosomales.



accumulation de méthylamine  
(nmol.  $\times$  mg<sup>-1</sup> prot.)

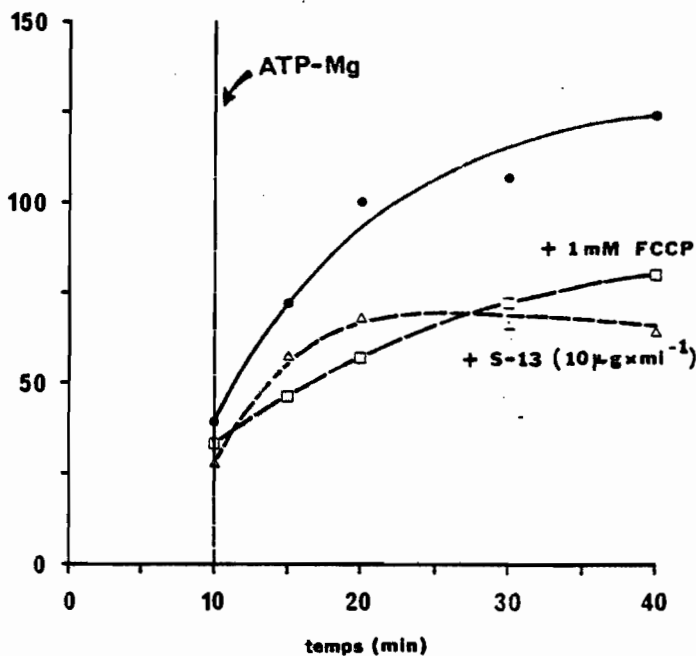


Figure 6.3

#### INFLUENCE DES INHIBITEURS DE L'ATPase SUR L'ACCUMULATION DE LA METHYLAMINE PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes").

Chaque ml de milieu d'incubation contient, en plus de 0,1 mM molybdate d'ammonium, utilisé pour inhiber totalement toute activité phosphatase acide résiduelle, et des additions potentielles fonction du motif considéré, de la <sup>14</sup>C-méthylamine (0,1 µCi). Au bout de 10 min. d'incubation, il est ajouté 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>. On adjoint aussi, soit 20 µl de méthanol dans le motif témoin (- • - • -), soit 20 µl d'une solution méthylque de FCCP (- □ - - □ -) ou de S-13 (- Δ - - Δ -).

Au moment désiré, une partie aliquote de 0,1 ml est prélevée. Son traitement est effectué selon la méthode habituelle employée pour suivre la cinétique d'incorporation du citrate par les vésicules vacuo-lysosomales.

$pH_{in}$  (en unité de pH)

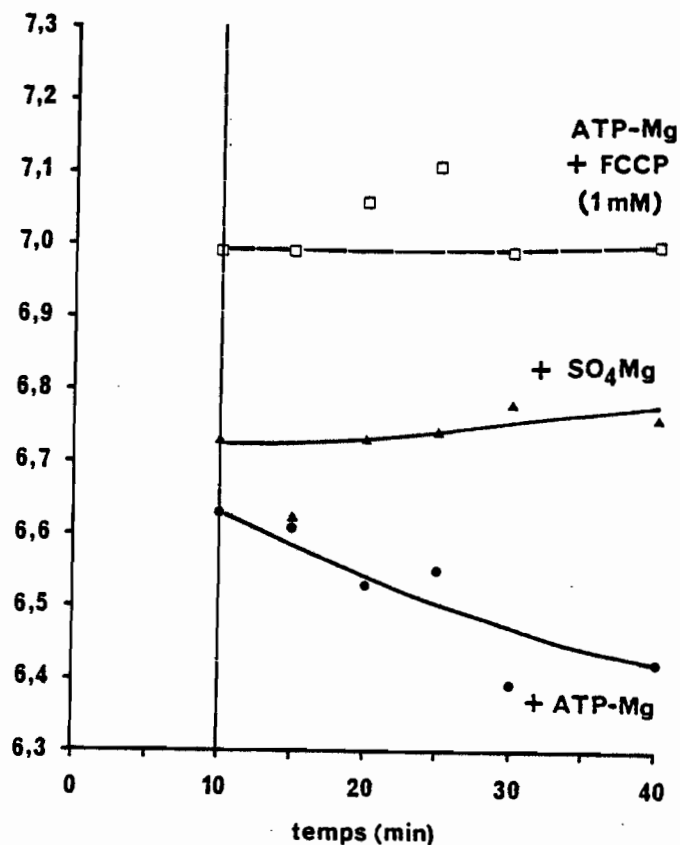


Figure 6.4

#### INFLUENCE DES INHIBITEURS DE L'ATPase SUR LE pH INTERNE

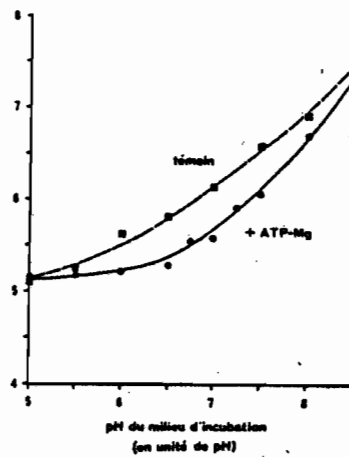
##### DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est une autre formulation des résultats obtenus, selon le protocole expérimental décrit dans la figure 6.1, avec une population vésiculaire formée à partir d'un autre lot de membranes lyophilisées.

Les additions se font au bout de 10 min. d'incubation à température ambiante.

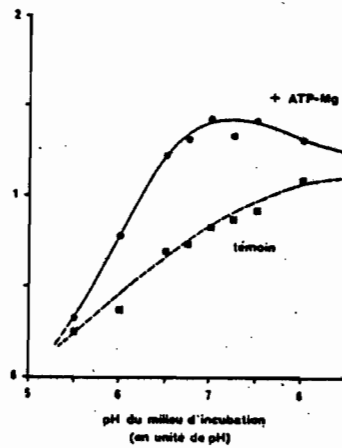
La distribution des différents traceurs (<sup>14</sup>C-dextrane, <sup>14</sup>C-méthylamine) est estimée par rapport à l'eau tritiée dans les espaces extra et intravésiculaires. Elle permet de calculer le pH intravésiculaire à partir du pH extra-vésiculaire.

pH<sub>in</sub> (en unité de pH)



A

ΔpH  
(en unité de pH)



B

Figure 6.5

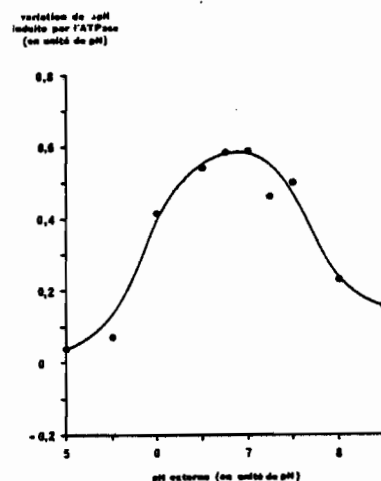
INFLUENCE DU pH DU MILIEU D'INCUBATION SUR L'ACIDIFICATION  
DU pH INTERNE DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES INDUITE  
PAR L'ATPase

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes"). Le pH du milieu de vésiculation est 6,0 alors que celui du milieu d'incubation varie de 5,0 à 8,5. Il est ajusté à la valeur désirée par addition de Tris-base. Le cas échéant, de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5 mM), tamponné au pH du motif, est ajouté (-●-●-). Pour le témoin, (-●- -●-):

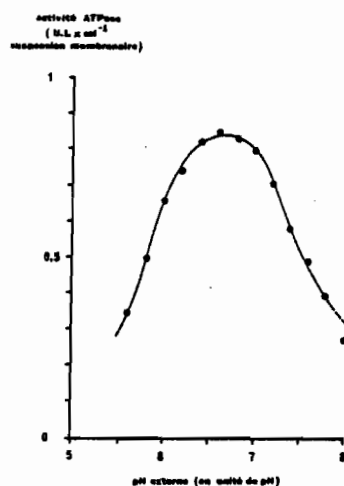
La manipulation se déroule comme celle décrite dans la Figure 6.1.

L'incubation dure 30 mn à 30°C, une fois l'addition du nucléotide faite.

Le pH intra-vésiculaire est estimé à partir de la distribution transmembranaire de la <sup>14</sup>C-méthylamine.



A



B

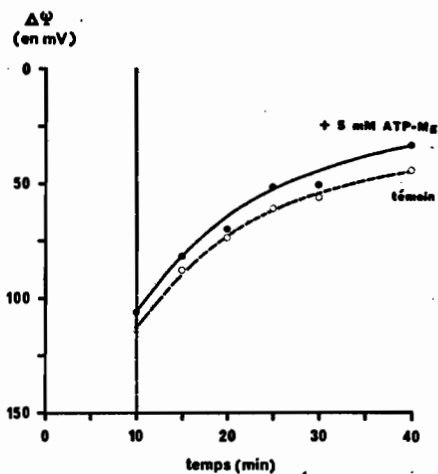
DEPENDANCE VIS-A-VIS  
DU pH EXTERNE DE L'ACTIVITE  
ATPase VACUO-LYSOSOMALE  
MEMBRANAIRE

Figure 6.6.

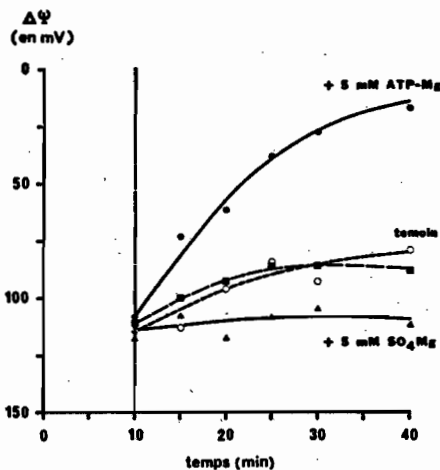
RELATION ENTRE LA VARIATION DE  $\Delta pH$  TRANSMEMBRANAIRE  
INDUITE PAR L'ATP- $\text{Mg}^{2+}$  ET L'ACTIVITE ATPase VESICULAIRE  
EN FONCTION DU pH EXTERNE

Il s'agit d'une autre expression des résultats décrits dans la Figure 6.5. (pour la variation de pH du milieu intra-vésiculaire induite par l'addition d' ATP- $\text{Mg}^{2+}$ ).

L'activité ATPase membranaire est déterminée dans les conditions expérimentales décrites dans la Figure 6.5. Elle est mesurée dans un milieu d'incubation où toute trace d'activité phosphatase acide résiduelle est inhibée par du molybdate d'ammonium (0,1 mM).



A  
Lyophilisat  
Primot V



B  
Lyophilisat  
Primot XI

Figure 6.7

#### INFLUENCE DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup> SUR LA DIFFERENCE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est la manipulation complémentaire de celle décrite dans la figure 6.1. Elle a été effectuée avec la même suspension membranaire, selon le même profil expérimental. Parallèlement, en supplément des motifs déjà décrits, s'ajoutent ceux contenant, en plus de l'eau tritiée (0,5  $\mu$ Ci), du <sup>14</sup>C-TPMP<sup>+</sup> (0,1  $\mu$ Ci).

Les additions se font au bout de 10 min. d'incubation : soit 5 mM  $\text{SO}_4 \text{Mg}$  (-  $\Delta$  -  $\Delta$  -), soit 5 mM ADP-Mg<sup>2+</sup> (-  $\blacksquare$  -  $\blacksquare$  -), soit 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup> (-  $\bullet$  -  $\bullet$  -). Dans le témoin, aucune addition est faite (-  $\circ$  -  $\circ$  -).

Le calcul du potentiel transmembranaire se fait à partir de la distribution transmembranaire de <sup>14</sup>C-TPMP<sup>+</sup> à l'équilibre (voir "Matériel et méthodes").

accumulation de TPP  
(dpm  $^3\text{H TPP} \times \mu\text{g}^{-1} \text{prot.}$ )

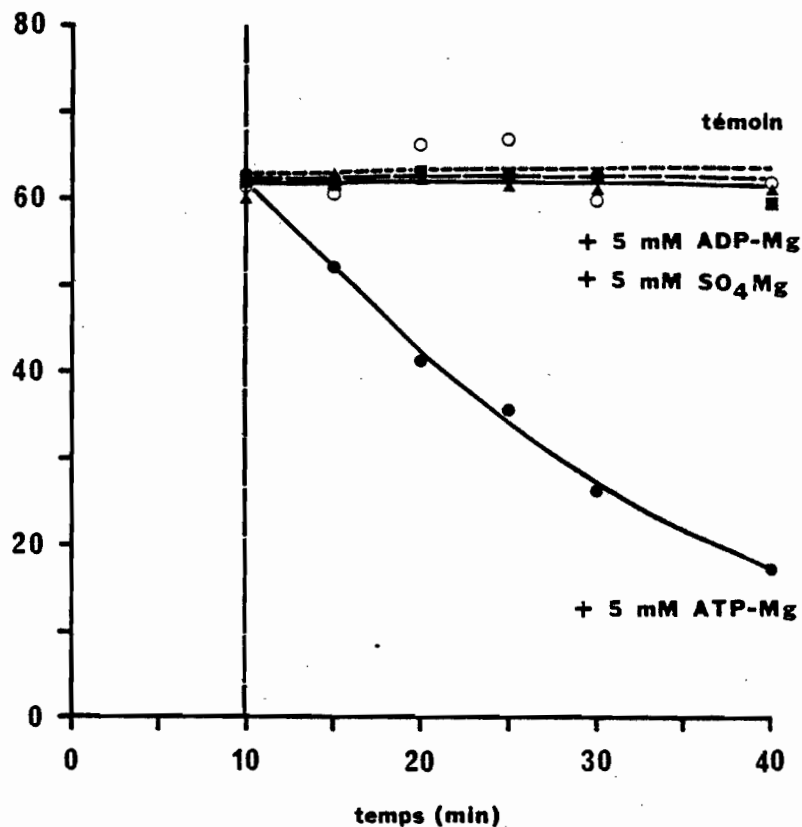


Figure 6.8.

INFLUENCE DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup> SUR L'ACCUMULATION DE TPP<sup>+</sup>  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes").

Chaque ml de milieu d'incubation contient, en plus de 0,1 mM molybdate d'ammonium, et des additions potentielles fonction du motif considéré (soit 5 mM  $\text{SO}_4 \text{Mg}^{2+}$  [-▲ -▲ -], soit 5 mM  $\text{ADP-Mg}^{2+}$  [-■ --■ -], soit 5 mM  $\text{ATP-Mg}^{2+}$  [-● -● -], le témoin étant [-○ --○ -] du  $^3\text{H-TPP}^+$  (0,1  $\mu\text{Ci}$ ).

Au moment désiré, tout au long de l'incubation, une partie aliquote de 0,1 ml est prélevée. Son traitement est effectué selon la méthode utilisée pour suivre l'accumulation du citrate par de telles structures.

accumulation de TPP  
(dpm  $^3\text{H TPP} \times \mu\text{g}^{-1} \text{prot.}$ )

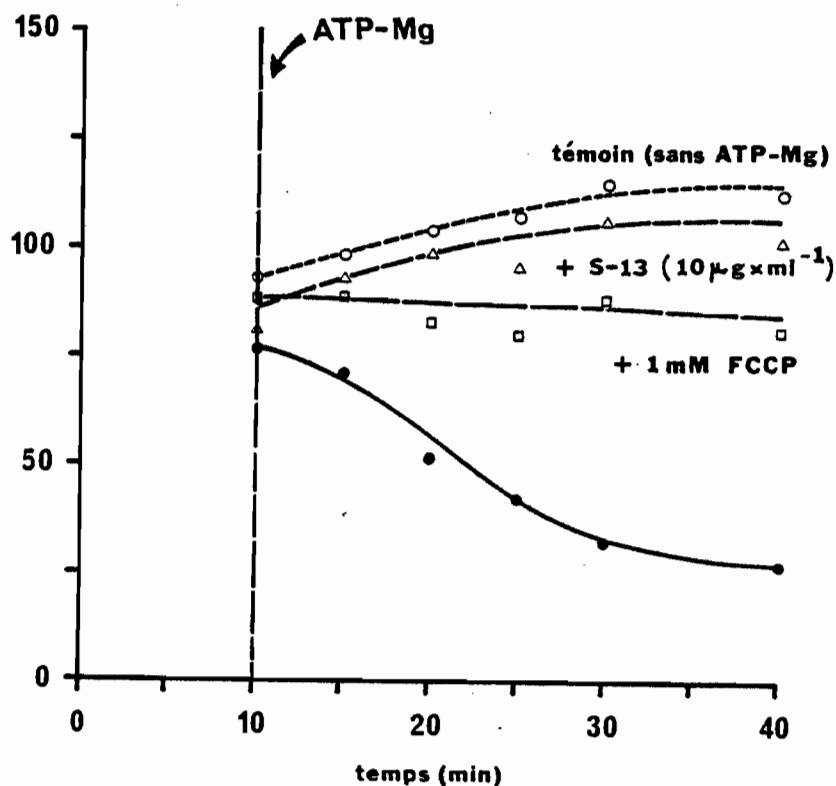


Figure 6.9.

#### INFLUENCE DES INHIBITEURS DE L'ATPase

#### SUR L'ACCUMULATION DE TPP<sup>+</sup> PAR LES VESICULES

#### VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole habituel (voir "Matériel et méthodes").

Chaque ml de milieu d'incubation contient, en plus du molybdate d'ammonium (0,1 mM), et des additions potentielles fonction du motif considéré (en plus de l'ATP-Mg<sup>2+</sup>, à la concentration normalement utilisée [5 mM] [-●-●-], soit du FCCP [1 mM] [-□-□-], soit du S-13 [20 μg x ml<sup>-1</sup>] [-Δ-Δ-], le témoin en étant dépourvu mais contenant 20 μl de méthanol, le solvant utilisé pour dissoudre les inhibiteurs de l'ATPase), du 3H-TPP<sup>+</sup> (0,1 μCi).

Au moment désiré, au cours de l'incubation, une partie aliquote de 0,1 ml est prélevée. Son traitement est effectué selon la méthode utilisée pour suivre l'accumulation du citrate par de telles structures.

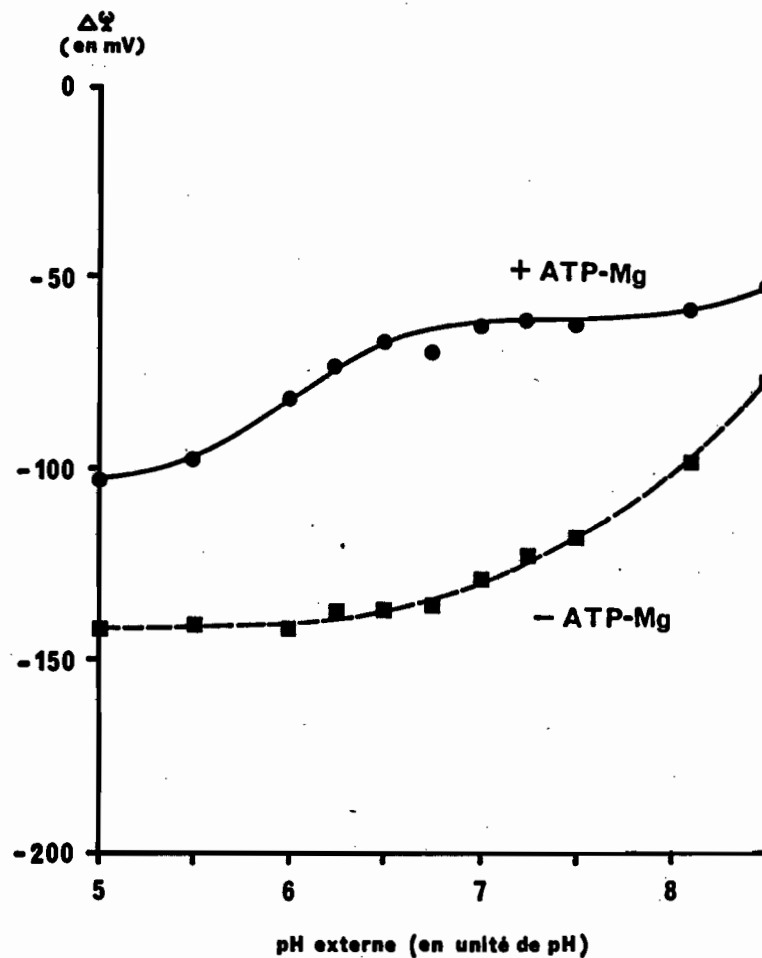


Figure 6.10

INFLUENCE DU pH DU MILIEU D'INCUBATION  
SUR LA DIFFERENCE DE POTENTIEL MEMBRANAIRE  
DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES.

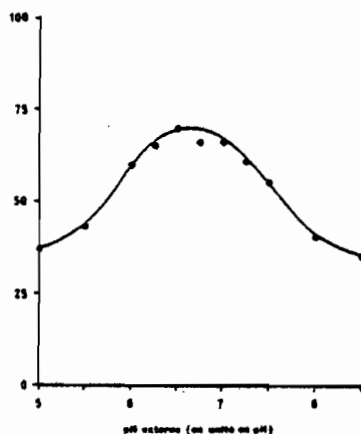
C'est la manipulation complémentaire de celle décrite dans la figure 6.5. Elle a été effectuée avec la même suspension vésiculaire, selon le même profil expérimental. Parallèlement, en supplément des motifs expérimentaux déjà décrits, s'ajoutent ceux contenant, en plus de l'eau tritiée (0,5  $\mu\text{Ci}$ ), du  $^{14}\text{C}$ -TPMP<sup>+</sup> (0,1  $\mu\text{Ci}$ ).

Le déroulement de la manipulation est identique. Les additions se font au bout de 10 min. d'incubation : soit de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (-●-●-), soit le volume équivalent de tampon dans le témoin (-■-■-).

Le calcul du potentiel transmembranaire se fait à partir de la distribution transmembranaire de  $^{14}\text{C}$ -TPMP<sup>+</sup> à l'équilibre (voir "Matériel et méthodes").

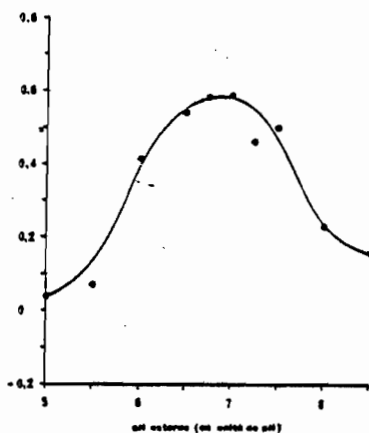


variation de  $\Delta\psi$   
induite par l'ATPase  
(en mV)



A  
DEPOLARISATION  
DE LA MEMBRANE  
INDUITE PAR L'ATPase

variation de  $\Delta pH$   
induite par l'ATPase  
(en unité de pH)



B  
ACIDIFICATION  
DU MILIEU INTERNE  
INDUITE  
PAR L'ATPase

Figure 6.11

DEPENDANCE DE L'ACIDIFICATION DU MILIEU INTERNE  
ET DE LA VARIATION DE LA DIFFERENCE DE POTENTIEL  
MEMBRANAIRE VIS-A-VIS DU FONCTIONNEMENT DE L'ACTIVITE  
ATPase VACUO-LYSOSOMALE MEMBRANAIRE

C'est la récapitulation des résultats décrits dans les figures 6.5, 6.6 et 6.10 où est montré l'effet de l'addition de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> sur la différence de potentiel membranaire et sur le gradient transmembranaire de pH développés au niveau de la membrane vésiculaire vacuo-lysosomale

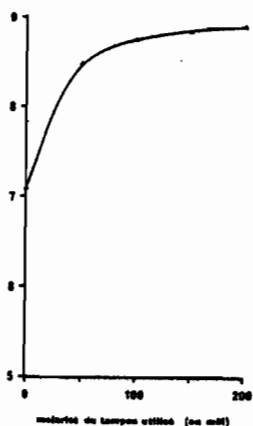
|   |                                  |   |                |
|---|----------------------------------|---|----------------|
|   |                                  |   |                |
| : | :                                | : | :              |
| : | Motif                            | : | Dépolarisation |
| : | expérimental                     | : | de la          |
| : |                                  | : | membrane       |
| : |                                  | : | (en mV)        |
| : |                                  | : |                |
| : | Témoin                           | : | 34,0           |
| : |                                  | : |                |
| : | + 5 mM <sub>2</sub> <sup>+</sup> | : | 90,4           |
| : | ATP-Mg                           | : |                |
| : |                                  | : |                |
| : | + 5 mM                           | : |                |
| : | ADP-Mg <sup>2+</sup>             | : | 24,0           |
| : |                                  | : |                |
| : | + 5 mM                           | : |                |
| : | So <sub>4</sub> Mg               | : | 8,0            |
| : |                                  | : |                |

Tableau 6.1

INFLUENCE DE L'ATP-Mg<sup>1+</sup> SUR LA DEPOLARISATION DES  
VESICULES (OU L'ACTIVITE ATPase EST FONCTIONNELLE

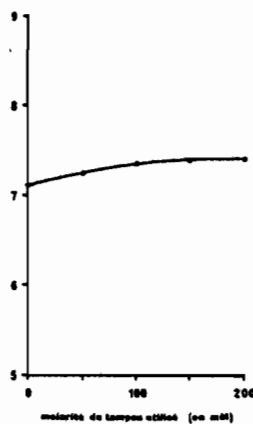
C'est une autre formulation des résultats décrits dans la Figure 6.7 (courbe B). Elle rend compte de la variation de la différence de potentiel transmembranaire observée au bout de 40 mn d'incubation à 25°C.

pH de la suspension membranaire  
(en unité de pH)



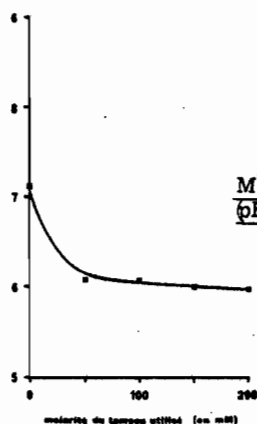
A  
milieu  
Tris - M.E.S  
(pH = 9,18)

pH de la suspension membranaire  
(en unité de pH)



B  
milieu  
H.E.P.E.S-Tris  
(pH = 7,45)

pH de la suspension membranaire  
(en unité de pH)



C  
milieu  
M.E.S. Tris  
(pH = 5,79)

Figure 7.1

### POUVOIR TAMPON DE LA SUSPENSION MEMBRANAIRE

### PREPAREE A PARTIR D'UN LYOPHILISAT DE MEMBRANES

### VACUO-LYSOSOMALES

On disperse 20 mg de lyophilisat respectivement dans, soit 2 ml d'eau distillée, soit 2 ml de l'un des trois milieux de vésiculation employés dans une gamme de concentration, allant de 0 à 200 mM, et ajustés au pH indiqué (par addition de Tris, dans la plupart des cas).

L'homogénéisation est effectuée dans les conditions habituelles.

Le pH de la suspension membranaire ainsi préparée est alors mesuré.

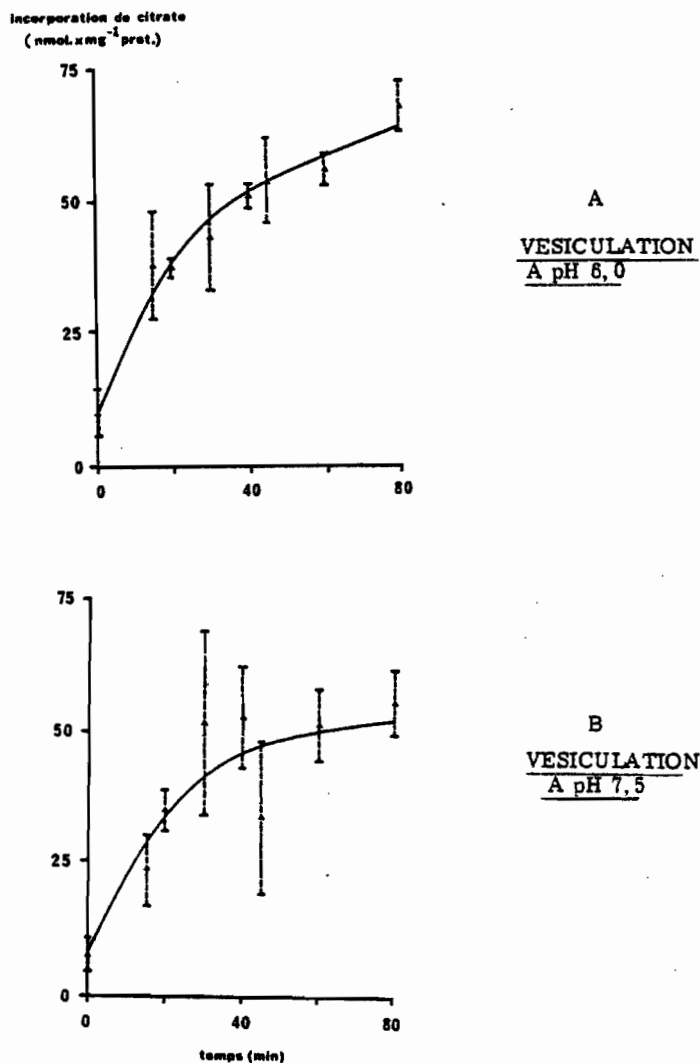


Figure 7.2

#### INFLUENCE DU pH DU MILIEU DE VESICULATION

( PHOSPHATE-MANNITOL, 6,0 ou 7,5) SUR L'INCORPORATION

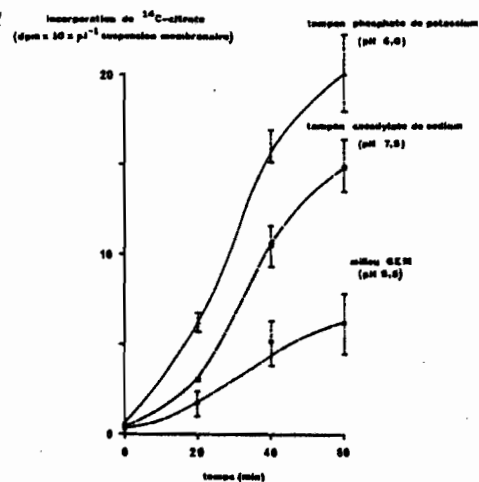
DE CITRATE PAR DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées dans un milieu phosphate-mannitol, soit à pH = 6,0, soit à pH = 7,5, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes"). Après un cycle de deux lavages, le sédiment est repris par un volume final de 3,6 ml de milieu d'incubation de même nature, pH = 7,5.

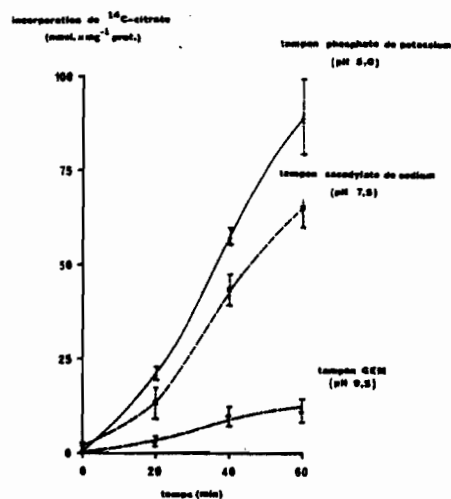
L'incorporation se déroule sur 3,6 ml de cette suspension vésiculaire mise en présence de 180 µl de <sup>14</sup>C-citrate (0,1 µCi/ml). Au moment désiré, tout au long de l'incubation faite à 30° C, les prélèvements sont effectués.

Leur traitement est réalisé comme décrit par ailleurs (arrêt par lavage dans un milieu refroidi, ...).

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.



A  
RADIOACTIVITE  
BRUTE  
INCORPOREE



B  
RADIOACTIVITE  
SPECIFIQUE  
INCORPOREE

Figure 7.3

INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU DE VESICULATION  
ET DE SON pH SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR  
LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées dans un milieu dont la nature et le pH sont différents. Il s'agit, soit du milieu phosphate-mannitol (pH = 6,0), soit du milieu cacodylate de sodium (pH = 7,5), soit du milieu G.E.M. (pH 9,5).

Après un cycle de deux lavages, le sédiment est repris par 2 ml de milieu d'incubation habituel (pH = 7,5).

L'incorporation se déroule sur 1,8 ml de cette suspension vésiculaire mise en présence de 90  $\mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -citrate (0,1  $\mu\text{Ci/ml}$ ). Au moment désiré, tout au long de l'incubation, faite à 30° C, les prélèvements (0,1 ml) sont effectués. Leur traitement est réalisé comme décrit dans "Matériel et méthodes".

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

Incorporation de  $^{14}\text{C}$ -citrate  
(nmol.  $\times \text{mg}^{-1}$  prot.)

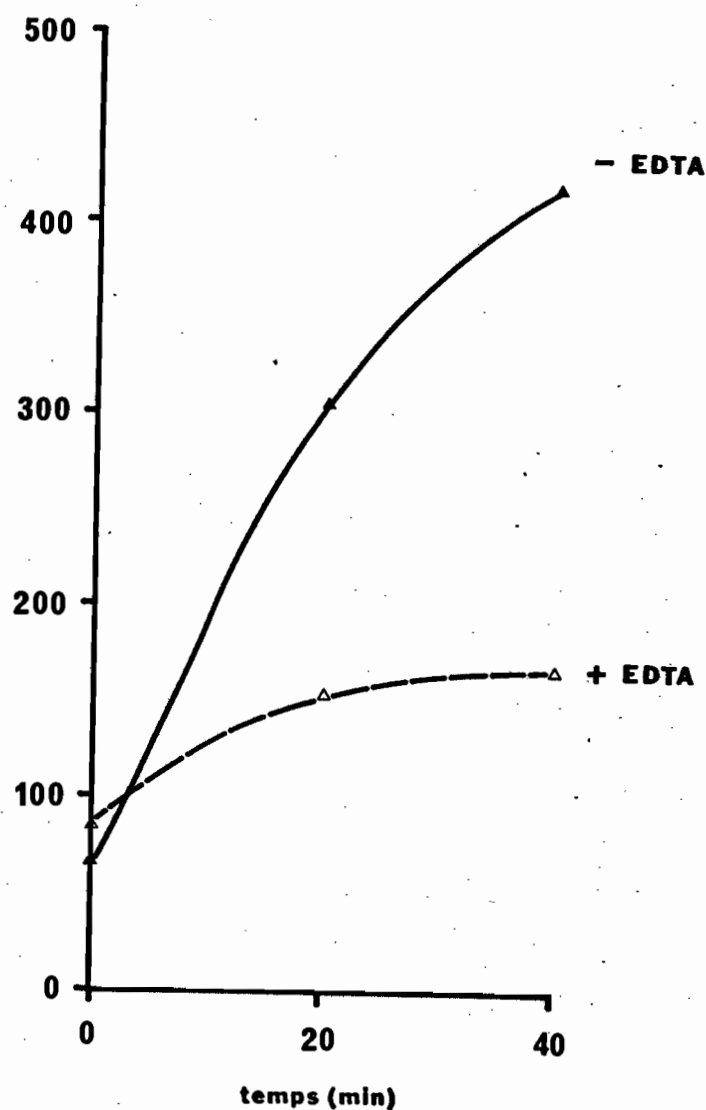


Figure 7.4

INFLUENCE DE L'E.D.T.A SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR  
LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu phosphate-mannitol, selon le protocole habituel (voir "Matériel et Méthodes").

La différence entre les deux motifs réside dans le fait que l'incubation a eu lieu en présence ou non de 10 mM E.D.T.A.

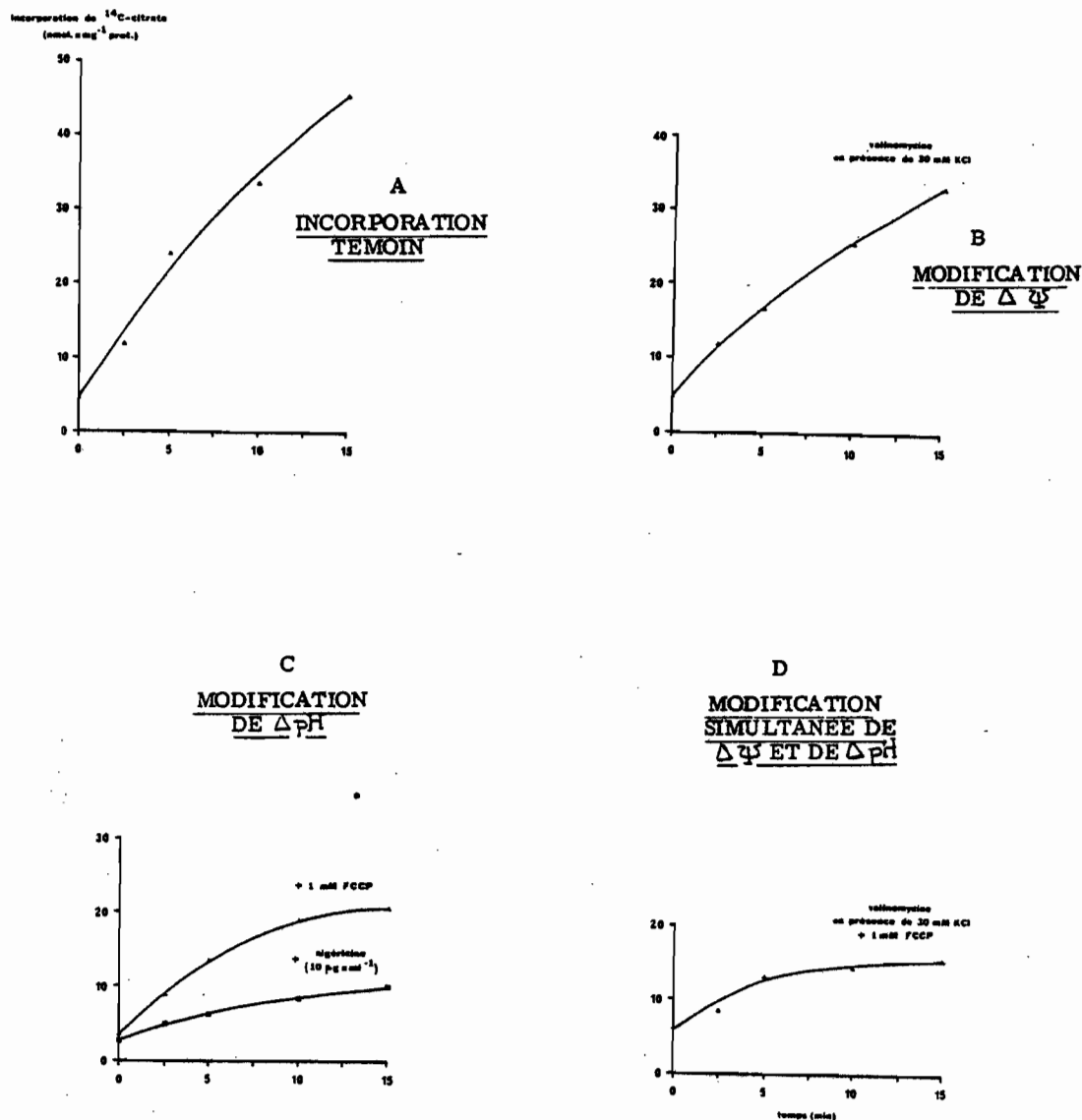


Figure 7.5

#### INFLUENCE DES DIFFERENTS IONOPHORES SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes"). Après un cycle de deux lavages, le sédiment est repris par 2,5 ml de milieu d'incubation (avec 5mM ATP-MG<sup>2+</sup>), dont la composition varie en fonction de la nature du motif considéré (un milieu de Tager, ajusté à pH 7,5, contenant, soit 1 mM FCCP [ -  $\Delta$  -  $\Delta$  - ], soit de la nigéricine [ 10  $\mu g \cdot ml^{-1}$  ] [ -  $\square$  -  $\square$  - ], soit de la talinomycine [ 10  $\mu g \cdot ml^{-1}$  ] en présence de 30 mM KCl, ...). Dans tous les motifs, la même quantité de méthanol est introduite. C'est le solvant utilisé pour dissoudre les ionophores.

L'incorporation de citrate se déroule dans les conditions explicitées par ailleurs. L'arrêt se fait par centrifugation sur une couche de dextrane T-70 à 1,5% (p./vol.) (39.000 x g, 10 mn, 4°C).

Incorporation de  $^{14}\text{C}$ -citrate  
(nmol.  $\times \text{mg}^{-1}$  prot.)

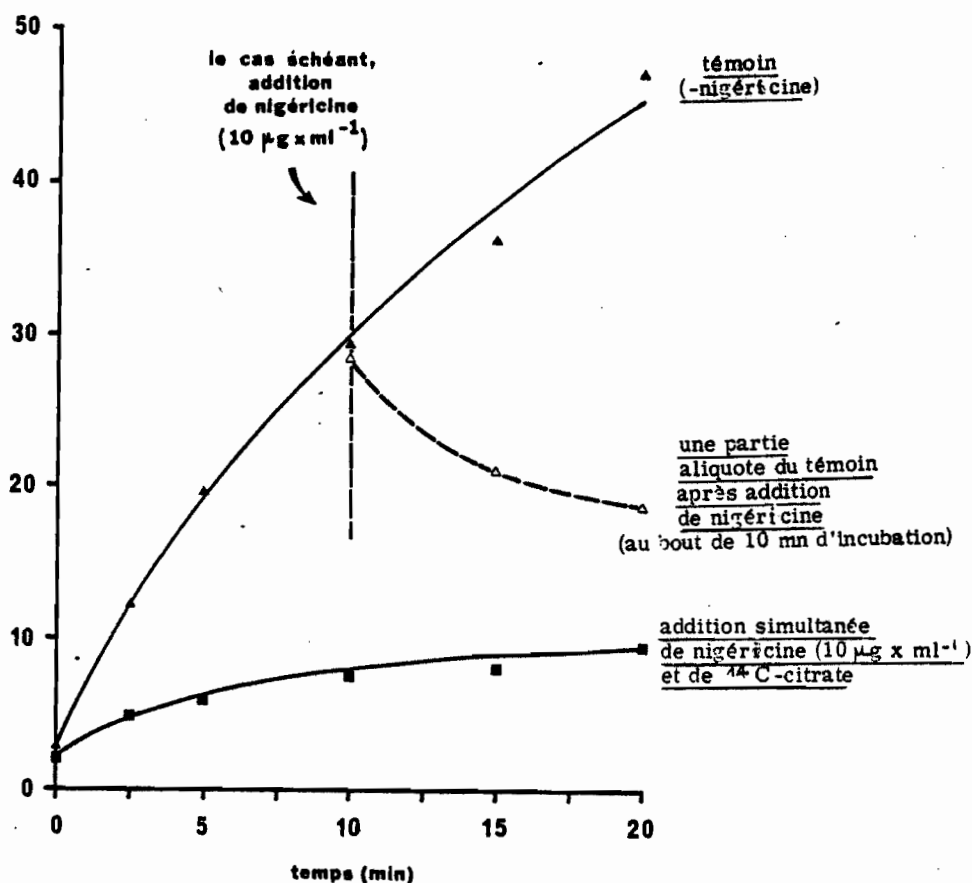


Figure 7.6

#### INFLUENCE DE LA NIGÉRICINE SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR DES VÉSICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes"). Après un cycle de deux lavages, le sédiment est repris par 3 ml de milieu d'incubation, dont la composition varie en fonction du motif considéré.

La nigéricine est introduite sous la forme d'une solution méthylique  $20 \mu\text{l}$  pour avoir une concentration finale de  $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ . Cette addition est faite, soit en même temps que le  $^{14}\text{C}$ -citrate, soit au bout de 10 min. d'incubation dans une partie aliquote du témoin.

L'incorporation de citrate se déroule dans les conditions expérimentales explicitées par ailleurs. L'arrêt se fait par centrifugation sur une couche de dextrane T-70 à 1,5% ( $39.000 \times g$ , 10 min.,  $4^\circ\text{C}$ ).



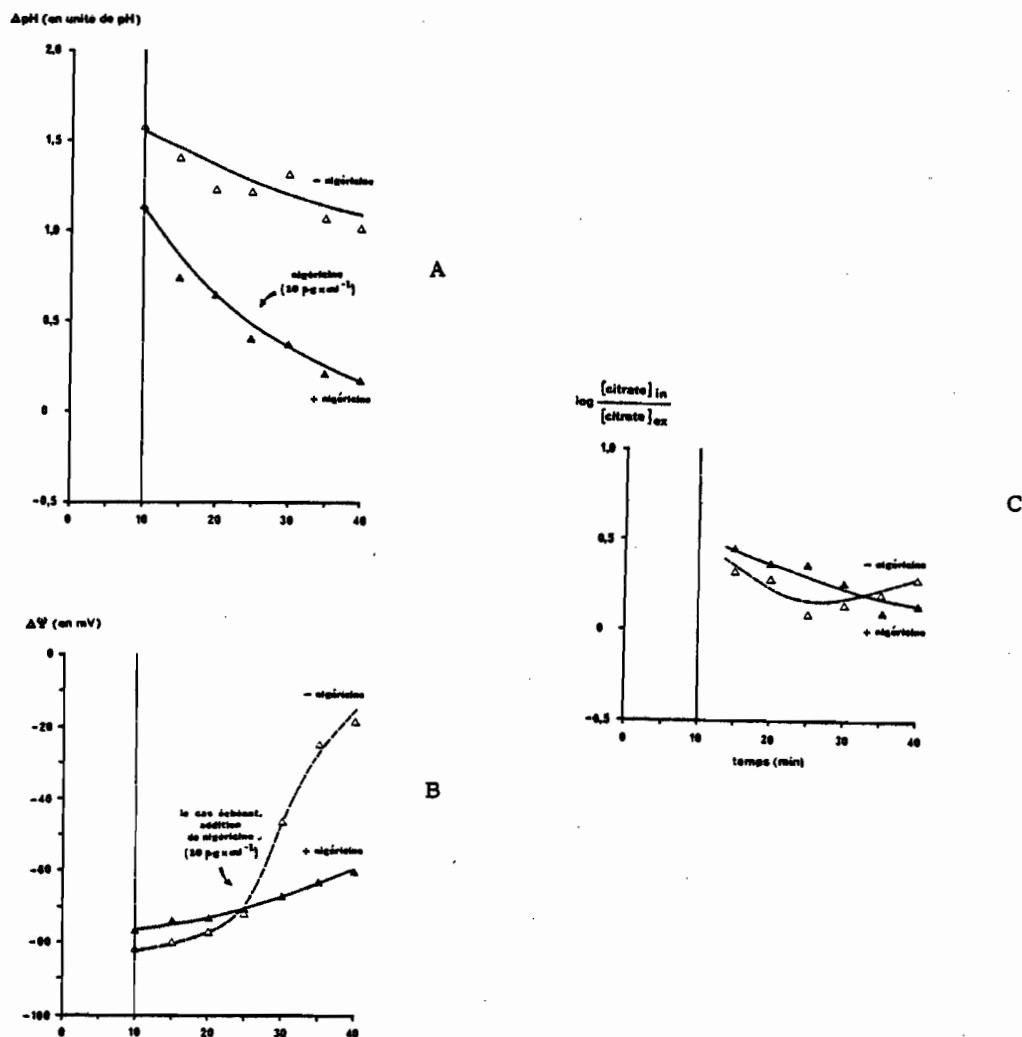


Figure 7.7

**EFFET DE LA NIGERICINE SUR LA FORCE MOTRICE**  
**PROTONIQUE ET SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR DES**  
**VESICULES VACUO-LYSOSOMALES FORMEES EN MILIEU MANNITOL**  
**ET INCUBEES EN MILIEU KCl**

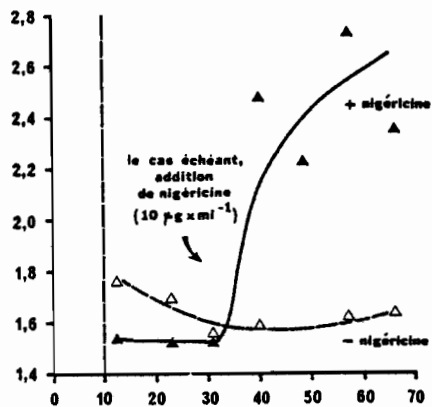
Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées dans un milieu de Tager, pH 7,5, dont la molarité des molécules tampons passent de 25mM à 5 mM. Elles sont incubées dans un milieu de Tager, pH 7,5, dont l'agent osmotique est constitué par 185 mM KCl.

En plus des constituants habituels, chaque ml de milieu d'incubation contient de l'eau tritiée (0,5  $\mu Ci$ ) et, soit du  $^{14}C$ -dextrane (0,1  $\mu Ci$ ), soit de la  $^{14}C$ -méthylamine (0,1  $\mu Ci$ ), soit du  $^{14}C$ -TPMP+ (0,1  $\mu Ci$ ). Le molybdate d'ammonium (0,1 mM) est utilisé pour inhiber toute trace d'activité phosphatase acide résiduelle.

Après une incubation de 10 mn, le premier prélèvement est effectué (300  $\mu l$ ). Son traitement se déroule comme indiqué par ailleurs (voir "Matériel et méthodes"). Vingt min. après, la nigericine (10  $\mu g \times ml^{-1}$ ) est introduite dans le milieu d'incubation. Parallèlement, 10  $\mu l$  de méthanol sont ajoutés dans le motif témoin.

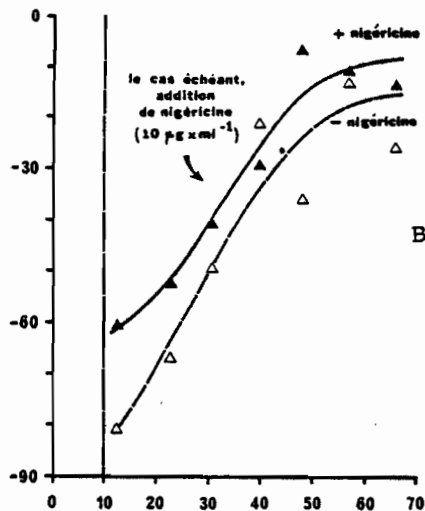
Pour l'incorporation du  $^{14}C$ -citrate, le motif contient, en plus de l'eau tritiée (2,5  $\mu Ci$ ), du  $^{14}C$ -citrate (0,5  $\mu Ci$ ). Le rapport  $^{14}C/3 H$  est conservé à la valeur optimale de 0,2.

$\Delta pH$  (en unité de pH)



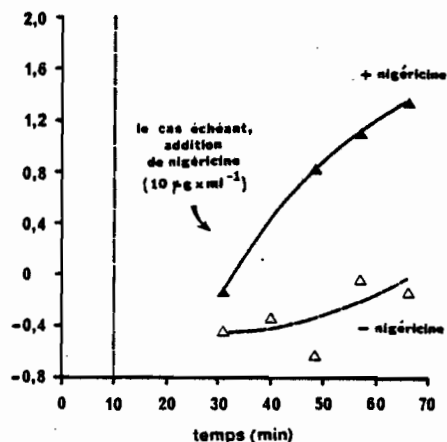
A

$\Delta \Psi$  (en mV)



B

$\log \frac{[\text{citrate}]_{\text{in}}}{[\text{citrate}]_{\text{ex}}}$



C

Figure 7.8

EFFET DE LA NIGERICINE SUR LA FORCE MOTRICE  
PROTONIQUE ET SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR DES  
VESICULES VACUO-LYSOSOMALES FORMEES EN MILIEU KCl  
ET INCUBEES EN MILIEU MANNITOL

Dans cette manipulation, les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées dans un milieu de Tager, pH = 7,5, contenant 185 mM KCl. La molarité des molécules tampons passe de 25 mM à 5 mM. Elles sont incubées dans le milieu de Tager habituel.

Par ailleurs, la conduite de la manipulation est identique à celle indiquée dans la légende de la Figure 7.7

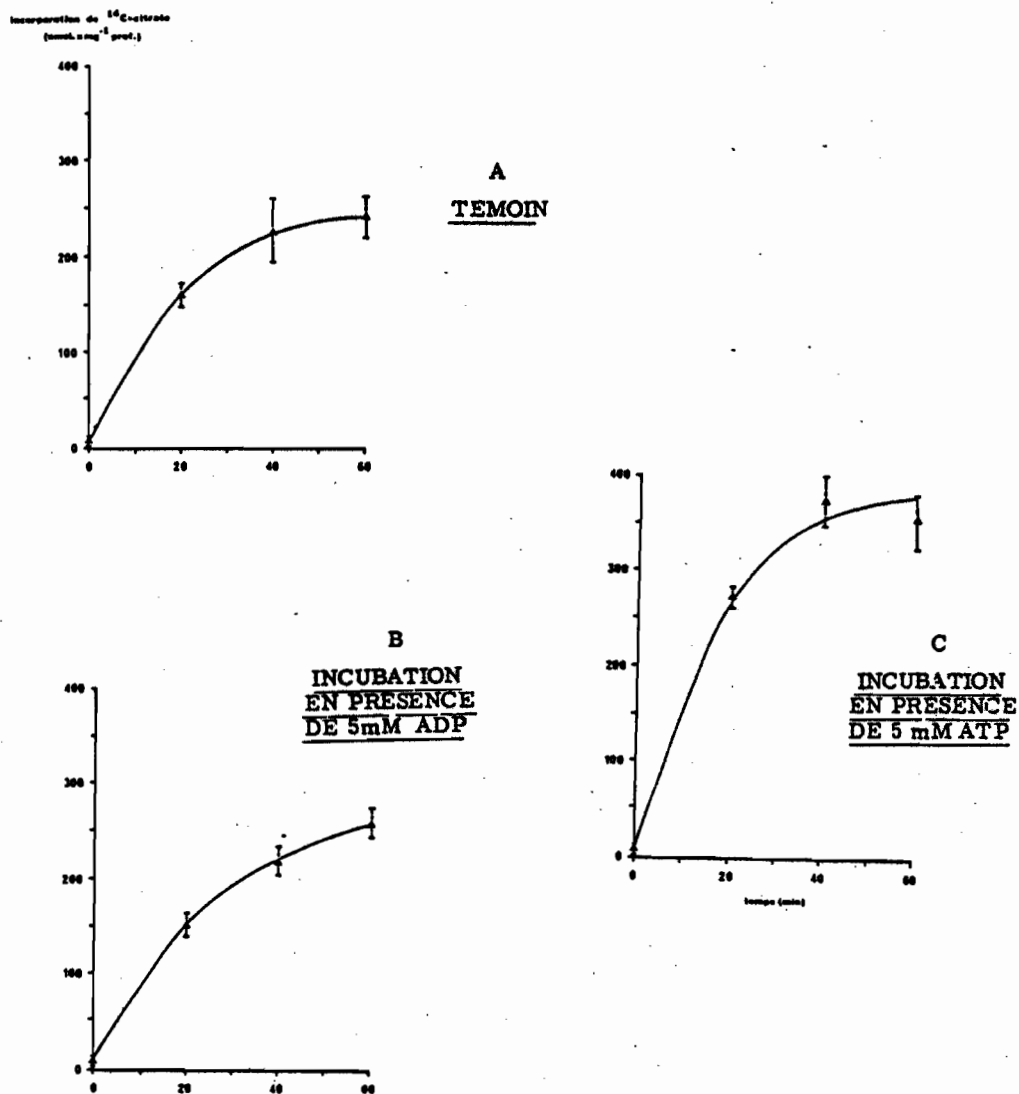


Figure 7.9

INFLUENCE DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup> SUR L'INCORPORATION  
DE CITRATE PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu phosphate-mannitol, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes"). Après un cycle de deux lavages, le sédiment est repris par 1,7 ml de milieu d'incubation, dont la composition varie en fonction du motif considéré.

L'incorporation se déroule sur 1,7 ml de suspension vésiculaire en présence de 85  $\mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -citrate (0,1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ). Selon la nature du motif considéré, elle aura lieu en présence, soit de 5 mM ADP-Mg<sup>2+</sup>, soit de 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>. Les prélèvements et leur traitement se feront comme décrits par ailleurs.

Les résultats sont exprimés avec un risque de 10%.

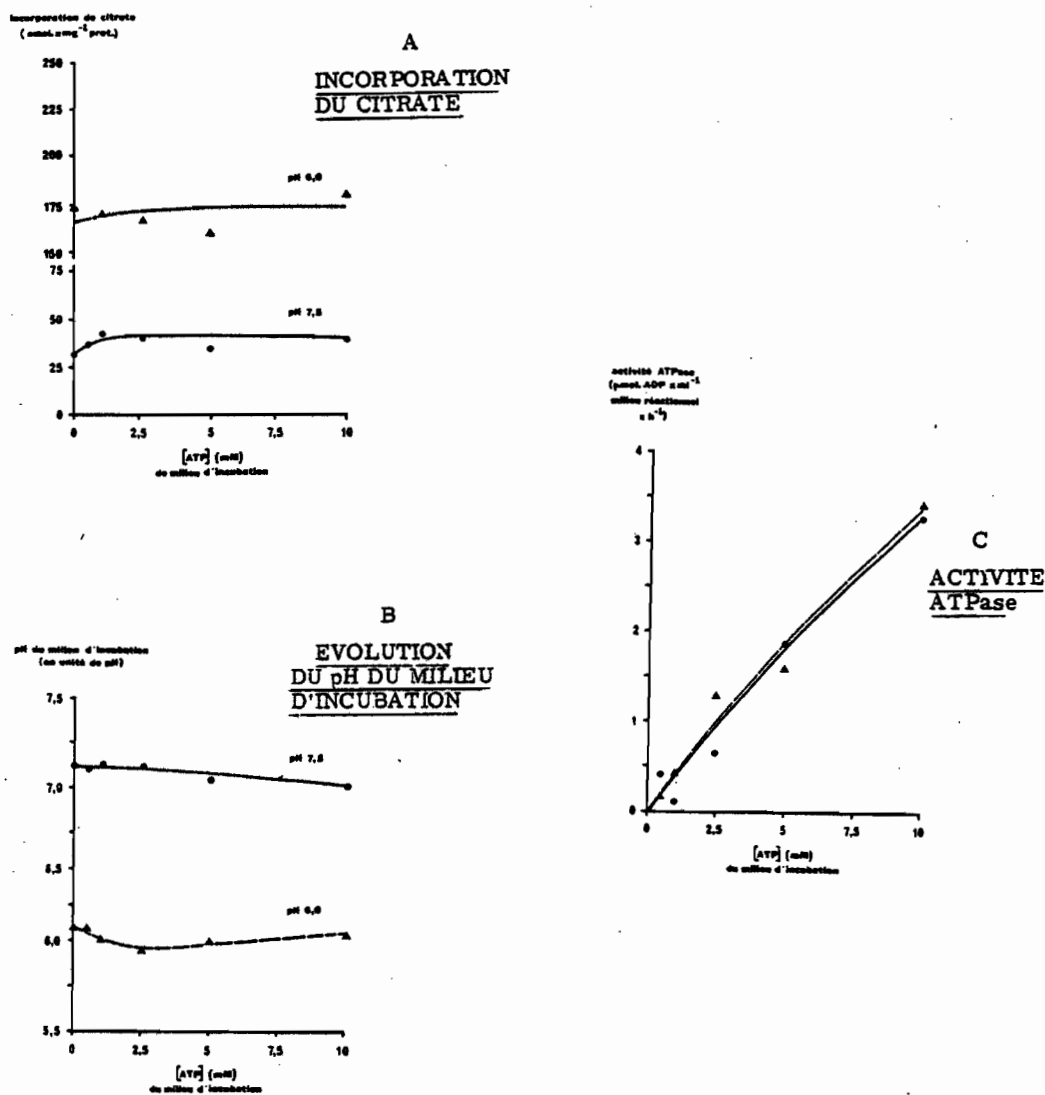


Figure 7.10

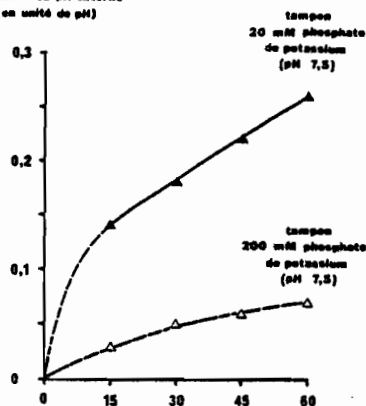
**INFLUENCE DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup> SUR L'INCORPORATION DU CITRATE  
PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES A pH 6,0 ET A pH 7,5**

C'est une manipulation dont le protocole expérimental est comparable à celui décrit dans la légende de la Figure 7.9. Le milieu phosphate-mannitol (dont la molarité est portée à 100 mM) est ajusté soit à pH 6,0 (-▲-▲-), soit à pH 7,5 (-●-●-) (par addition de KOH).

L'incorporation de citrate est effectuée en présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup>, dans une gamme de concentration allant à 0 à 10 mM (courbe A). Parallèlement, l'activité ATPase est dosée (courbe C). Le pH du milieu est également mesuré (courbe B). Le temps choisi pour l'incubation (qui se déroule à 30°C) est 60 mn.

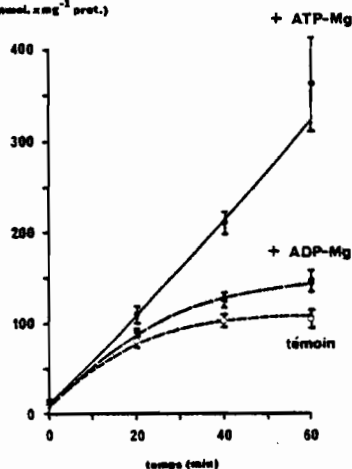
Les méthodes utilisées sont décrites par ailleurs (cf. "Matériel et méthodes").

variations du pH externe  
(en unité de pH)



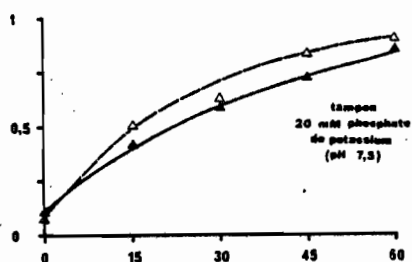
### A IMPORTANCE DE L'ACIDIFICATION DU MILIEU D'INCUBATION

incorporation de  $^{14}\text{C}$ -citrate  
(nmol.  $\text{mg}^{-1}$  prot.)



### C INCORPORATION DE CITRATE PAR DES VESICULES DANS UN MILIEU 200 mM PHOSPHATE DE K

activité ATPase  
( $\mu\text{mol. ADP} \times \text{ml}^{-1}$   
milieu réactionnel  
 $\times 30 \text{ min}^{-1}$ )



### B INFLUENCE DE LA MOLARITÉ DU PHOSPHATE SUR L'ATPase

Figure 7.11

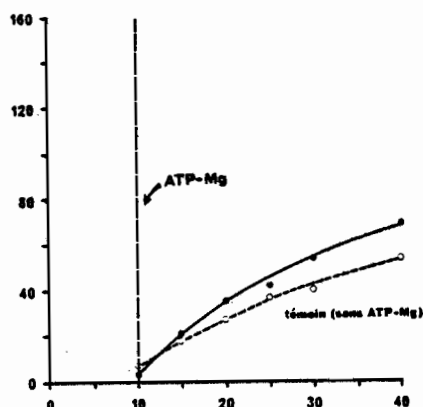
## IMPORTANCE DU POUVOIR TAMPON DU MILIEU D'INCUBATION SUR L'INCORPORATION DU CITRATE PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est une manipulation dont le protocole expérimental est comparable à celui décrit dans la légende de la Figure 7.9. Toutefois, le milieu d'incubation (phosphate-mannitol) a une molarité différente : 200 mM au lieu de 20 mM.

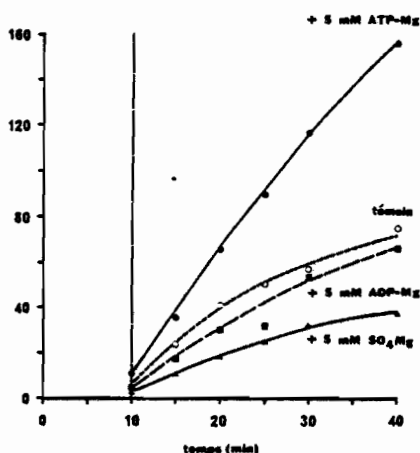
L'incorporation se déroule de la même façon. Les prélèvements et leur traitement se feront comme décrits par ailleurs. Il est précisé que l'absorption est stoppée par centrifugation sur couche de dextrane T-70 à 1,5% (p/vol), le reste étant conservé tel quel.

Parallèlement, l'activité ATPase est estimée selon la méthode décrite dans le Chapitre II (courbe B). Le pH du milieu d'incubation est mesuré au cours de l'incorporation et sa variation (dans le sens d'une acidification) est représentée dans la courbe A.

incorporation de citrate  
(nmol.  $\times$  mg<sup>-1</sup> prot.)



A  
Lyophilisat  
Primot V



B  
Lyophilisat  
Primot XI

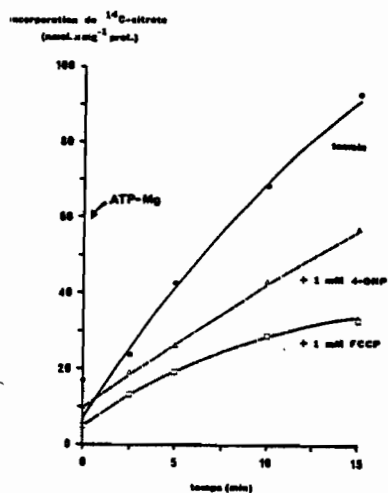
Figure 7.12

EFFET DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup> SUR L'INCORPORATION DE CITRATE  
PAR DES VESICULES PROVENANT DE LYOPHILISATS MEMBRANAIRES  
DIFFERENTS

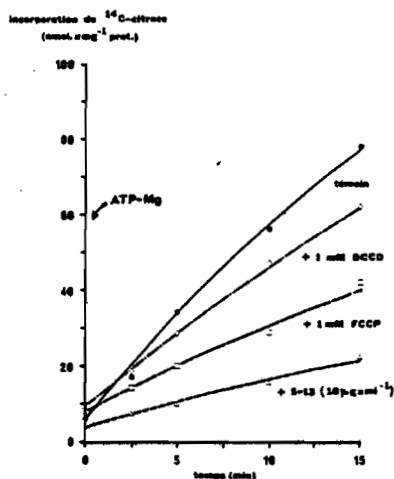
C'est le complément de la manipulation décrite par les Figures 6.1 (relatif au  $\Delta$ pH) et 6.7 (relatif au  $\Delta$  $\Psi$ ) où il est suggéré un fonctionnement particulier de l'activité ATPase en tant que pompe à protons.

Mais, dans ces motifs expérimentaux, l'accumulation du citrate par les vésicules vacuo-lysosomales, préparées et incubées dans un milieu de Tager, est réalisée selon le protocole expérimental habituel (voir "matériel et méthodes").

Les additions se font au bout de 10 mn. d'incubation : soit 5 mM SO<sub>4</sub> Mg (-▲-▲-), soit 5 mM ADP-Mg<sup>2+</sup>(-■--■-), soit 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>(-●--●-). Dans le témoin, aucune addition n'est faite (-○--○-).



A  
EFFET  
DE DECOUPLANT  
(4-DNP)



B  
EFFET  
D'INHIBITEURS  
DE L'ACTIVITE  
ATPase  
(DCCD, FCCP ET  
S-r3)

Figure 7.13

INFLUENCE DES DECOUPLANTS ET DES INHIBITEURS DE L'ATPase  
SUR L'INCORPORATION DE CITRATE PAR LES VESICULES  
VACUO-LYSOSOMALES

Les vésicules vacuo-lysosomales sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes").

Le protocole expérimental employé est identique à celui décrit dans la légende de la Figure 6.9. Il faut remarquer qu'il s'agit là d'une manipulation différente faite sur un autre lyophilisat.

L'incorporation se fait dans les conditions habituelles. Les prélèvements et leur traitement sont identiques. Il est précisé que l'absorption est stoppée par dilution dans un milieu refroidi et par centrifugation immédiate.

| Type<br>du<br>milieu               | Molécule<br>tampon               | Composition                                                                                                                                                                  | pH         |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Témoin<br>(phosphate-<br>mannitol) | Phosphate de<br>potassium        | 50 mM phosphate<br>de potassium<br>300 mM mannitol,<br>5 mM p-mercapto-<br>éthanol.                                                                                          | 6,0 ou 7,5 |
| Cacodylate<br>de sodium            | Cacodylate<br>de sodium          | même composition<br>que le milieu<br>phosphate-mannitol<br>(le phosphate de<br>potassium est rem-<br>placé par du caco-<br>dylate de sodium<br>à la même concentra-<br>tion. | 7,5        |
| Tager                              | M.E.S.<br>M.O.P.S.<br>M.E.P.E.S. | 25 mM M.E.S.<br>25 mM M.O.P.S.<br>25 mM M.E.P.E.S.<br>300 mM mannitol<br>5 mM β-mercapto-<br>éthanol.                                                                        | 6,0 ou 7,5 |
| G.E.M.                             | Glycine                          | 20 mM glycocholate<br>10 mM E.D.T.A.<br>300 mM mannitol,<br>5 mM β-mercapto-<br>éthanol.                                                                                     | 9,5        |

Tableau 7.I

COMPOSITION DES DIFFERENTS MILIEUX DE VESICULATION  
EMPLOYES



|                                                                                   |                                         |                                          |                                |                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Motif expérimental                                                                |                                         | Variation de la force motrice protonique |                                | Inhibition de l'incorporation de citrate (en % du motif témoin) |
| Nature de l'addition                                                              | Effet espéré                            | compos. élect. (en mV)                   | compos. osmoti. (en un. de pH) |                                                                 |
| Témoin                                                                            | -                                       | 24                                       | 0,06                           | -                                                               |
| Valinomycine (10 µg x ml <sup>-1</sup> ) en présence de KCl (30 mM)               | modification de ΔΨ                      | 96                                       | 0,07                           | 30,2                                                            |
| FCCP (1 mM)                                                                       | modification de ΔpH                     | 93                                       | 0,90                           | 59,1                                                            |
| Nigéricine (10 µg x ml <sup>-1</sup> )                                            | modification de ΔpH                     | 31                                       | 0,80                           | 81,0                                                            |
| FCCP (1 mM) + valinomycine (10 µg x ml <sup>-1</sup> ) en présence de KCl (30 mM) | modification simultanée de ΔpH et de ΔΨ | 104                                      | 0,93                           | 77,6                                                            |

Tableau 7. II

#### INFLUENCE DES IONOPHORES SUR L'INCORPORATION

#### DU CITRATE PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Dans ce tableau, sont récapitulés les résultats décrits dans le tableau 5. III et dans la figure 7. 5.; la variation de la composante électrique de la force motrice protonique correspond à une dépolarisation ; celle du gradient transmembranaire de pH (composante osmotique), à une acidification. L'inhibition de l'incorporation de citrate est calculée à partir des valeurs obtenues au bout de 15 mn d'incubation à 25° C.

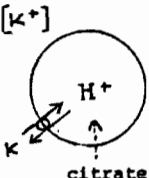
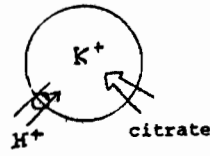
|                              |                                                      |                                                                                                                |                                                                                       |
|------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                              |                                                      | Effet de l'addition<br>de nigéricine ( $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) dans le milieu<br>d'incubation |                                                                                       |
| Motif<br>expérimental        |                                                      | le KCl<br>est présent<br>dans le milieu<br>extra-vésiculaire                                                   | le KCl<br>est présent<br>dans le milieu<br>intra-vésiculaire                          |
|                              | du potentiel<br>transmembranaire<br>( $\Delta\psi$ ) | Il empêche<br>la dépolarisation de la<br>membrane vésiculaire.                                                 | Peu d'effet.                                                                          |
| Evolution                    | du gradient<br>de pH<br>( $\Delta\text{pH}$ )        | Peu d'effet.                                                                                                   | forte<br>acidification<br>interne.                                                    |
|                              | de l'accumulation<br>du citrate.                     | Peu d'effet.                                                                                                   | Forte accumulation                                                                    |
| Représentation<br>graphique. |                                                      |                              |  |

Tableau 7. III

EFFET DE LA NIGERICINE SUR L'EVOLUTION DE LA FORCE  
MOTRICE PROTONIQUE ET SUR L'AMPLITUDE DE L'ACCUMU-  
LATION DU CITRATE PAR DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES  
PREPAREES A pH 7,5 EN PRESENCE OU NON DE POTASSIUM

Ce tableau récapitule les résultats décrits dans les figures  
7.7 et 7.8 (courbes A, B et C).

| Motif<br>expérimental                               | Inhibition<br>de l'incorporation<br>de citrate<br>par les vésicules<br>(en % du motif témoin) | Inhibition<br>de l'activité<br>ATPase<br>lutoidique<br>(en % du motif témoin) |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Témoin                                              | 100                                                                                           | 100                                                                           |
| + DCCD<br>(1 mM)                                    | 27,1                                                                                          | 46,0                                                                          |
| + FCCP<br>(1 mM)                                    | de 52,8 à 62,7                                                                                | 46,0                                                                          |
| + S-13<br>(10 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) | 73,9                                                                                          | de 70 à 80                                                                    |
| + 2,4 - DNP<br>(1 mM)                               | 37,9                                                                                          | 21,0                                                                          |

Tableau 7.IV

ACTION DES INHIBITEURS DE L'ATPase SUR L'INCORPORATION  
DE CITRATE PAR LES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est la récapitulation des résultats décrits dans les figures 7.13 (courbes A et B) pour l'incorporation de citrate et dans la figure 6.9 pour l'activité ATPase lutoidique.

| Motif<br>expérimental  | $\Delta pH$<br>(en unités de pH) | $\Delta \Psi$<br>(en mV) | Force<br>motrice protonique<br>(en mV) |
|------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------------|
| Témoin                 | 1,554                            | - 107                    | - 15                                   |
| + 50 mM<br>$NH_4Cl$    | 0,658                            | - 85                     | - 46                                   |
| + 30 mM<br>$TPP^+$     | 1,030                            | - 34                     | + 27                                   |
| + 50 mM<br>Méthylamine | 0,828                            | - 91                     | - 42                                   |

Tableau 7. V

EFFET DE DIFFERENTS CONDITIONNEMENTS SUR  
L'AMPLITUDE DE LA FORCE MOTRICE PROTONIQUE  
DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

C'est le complément des manipulations décrites dans les tableaux 5. II et 5. VI. Tout comme dans ces expérimentations, les vésicules vacuo-lysosomales sont incubées à 25°C dans un milieu de Tager contenant 0,1 mM molybdate d'ammonium, 5 mM  $SO_4 Mg$ , de l'eau tritiée (0,5  $\mu Ci$ ) et, soit du  $^{14}C$ -dextrane (0,1  $\mu Ci$ ), soit du  $^{14}C$ -TPMP<sup>+</sup> (0,1  $\mu Ci$ ), soit de la  $^{14}C$ -méthylamine (0,1  $\mu Ci$ ).

Selon le motif, une addition supplémentaire est effectuée : soit 50 mM  $NH_4 Cl$ , soit 30 mM  $TPP^+$ , soit 50 mM méthylamine. Ces molécules sont généralement contenues dans 20  $\mu l$  de méthanol. C'est la quantité qui sera ajoutée dans le motif témoin.

Le premier prélèvement ne sera fait qu'au bout de 10 min d'incubation

C'est juste avant ce prélèvement que l'ATPase- $Mg^{2+}$  (5mM) est ajouté au milieu. Le second est réalisé trente mn plus tard.

Les échantillons sont traités comme indiqués dans " Matériel et Méthodes".

| Motif<br>expérimental         | Variation<br>du gradient<br>transmembranaire<br>de pH<br>(en unités de pH) | Variation<br>du potentiel<br>transmembranaire<br>(en mV) | Variation<br>de la force<br>motrice protonique<br>(en mV) |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Témoin                        | 0,422                                                                      | + 15                                                     | 40                                                        |
| + 50 mM<br>NH <sub>4</sub> Cl | 0,034                                                                      | + 15                                                     | 13                                                        |
| + 30 mM<br>TPP <sup>+</sup>   | 0,321                                                                      | + 11                                                     | 30                                                        |
| + 50 mM<br>Méthylamine        | 0,017                                                                      | + 17                                                     | 16                                                        |

Tableau 7. VI

EFFET DE L'ATP-Mg<sup>2+</sup> SUR L'AMPLITUDE

DE LA FORCE MOTRICE PROTONIQUE DE VESICULES

VACUO-LYSOSOMALES DANS DIFFERENTS CONDITIONNEMENTS

Ce tableau rend compte de l'effet de l'addition de 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>. C'est le complément de la manipulation décrite dans la légende du tableau 7. V. La variation du gradient transmembranaire de pH, induite par la présence du nucléotide dans le milieu d'incubation, est calculée à partir des valeurs obtenues pour le motif témoin (Cf. tableau 7. V) et pour le motif ATP-Mg<sup>2+</sup>, 30 mn après son addition.

| Motif<br>expérimental       | sans ATP - $Mg^{2+}$                                                     |                                                          | avec ATP - $Mg^{2+}$                                                     |                                                          |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                             | $\Delta \log \frac{(\text{citrate})_{in. 30}}{(\text{citrate})_{ex. 0}}$ | Variation<br>exprimée en %<br>(par rapport au<br>témoin) | $\Delta \log \frac{(\text{citrate})_{in. 30}}{(\text{citrate})_{ex. 0}}$ | Variation<br>exprimée en %<br>(par rapport au<br>témoin) |
| Témoin                      | 1,41                                                                     | -                                                        | 1,67                                                                     | -                                                        |
| + 50 mM<br>$NH_4Cl$         | 0,21                                                                     | - 85,1                                                   | 0,34                                                                     | - 79,6                                                   |
| + 30 mM<br>TPP <sup>+</sup> | 1,39                                                                     | - 1,4                                                    | 1,00                                                                     | - 40,1                                                   |
| + 50 mM<br>Méthylamine      | 0,75                                                                     | - 46,8                                                   | 0,19                                                                     | - 88,6                                                   |

Tableau 7. VII

CAPACITE D'ACCUMULATION DU CITRATE PAR LES

VESICULES VACUO-LYSOSOMALES DANS DIFFERENTS

CONDITIONNEMENTS EN PRESENCE OU NON D'ATP- $Mg^{2+}$

Ce tableau rend compte du motif où le  $^{14}C$ -citrate est ajouté au milieu d'incubation. C'est le complément des manipulations décrites dans les tableaux 7. V et 7. VI. La capacité de transfert du citrate par les vésicules vacuo-lysosomales est caractérisé par la variation du logarithme décimal du rapport d'accumulation  $(= \log \frac{(\text{citrate})_{in. 30}}{(\text{citrate})_{ex. 0}})$  prouvée entre le temps 0 (moment où le  $^{14}C$ -citrate est introduit dans le milieu d'incubation) et le temps 30 mn.

Figure 8.1

REPARTITION DES DIFFERENTES FORMES DE L'ACIDE CITRIQUE  
EN PRESENCE OU NON DE MAGNESIUM EN FONCTION DU pH  
DU MILIEU

La connaissance des différents pH de l'acide citrique et des deux constantes d'affinité pour le  $Mg^{2+}$  (R. M. C. DAWSON et al, 1969) permet de calculer la répartition de ses différentes formes en présence ou non de magnésium en fonction du pH du milieu (cf. Annexe 1). On se place dans la situation où la concentration du milieu en citrate est de 50 mM, celle en  $Mg^{2+}$  total étant nulle ou égale à 50 mM. On a employé les symboles (-●-●-) pour les formes libres et (-□-□-) pour les formes fixant le  $Mg^{2+}$ .

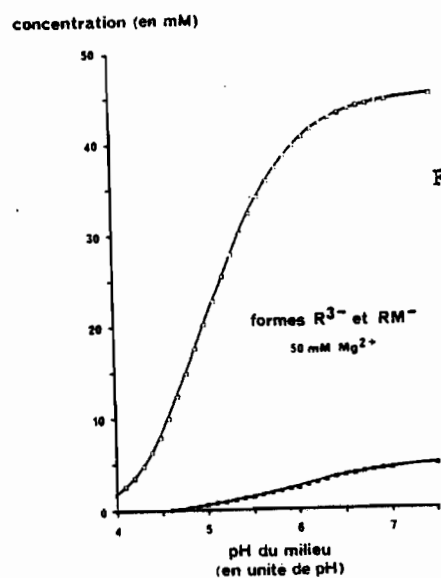
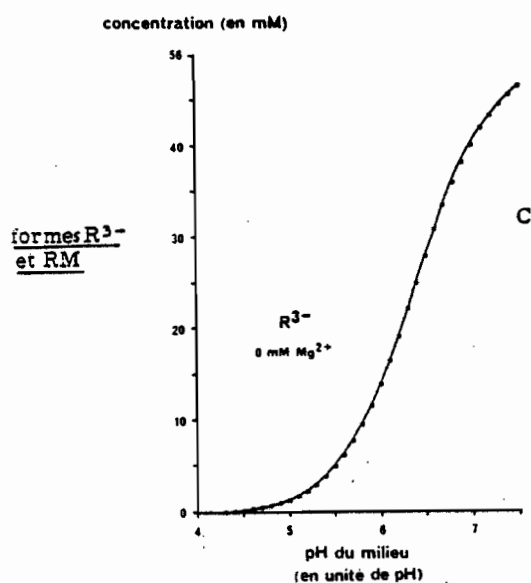
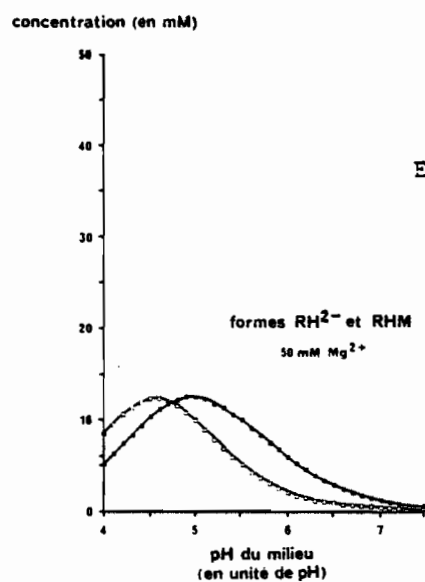
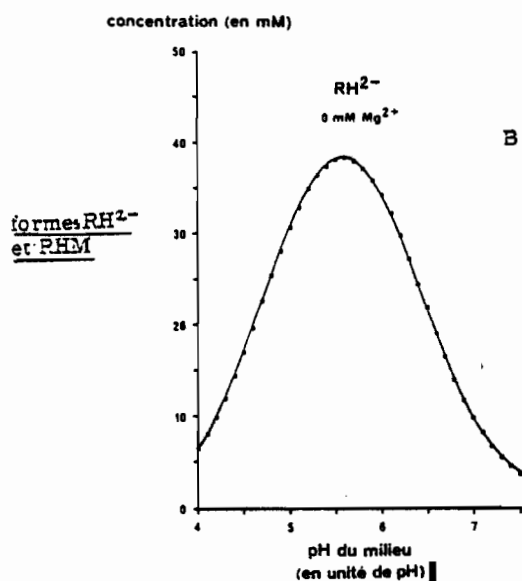
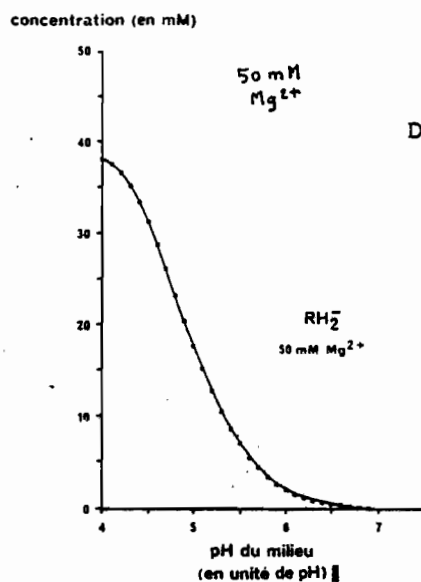
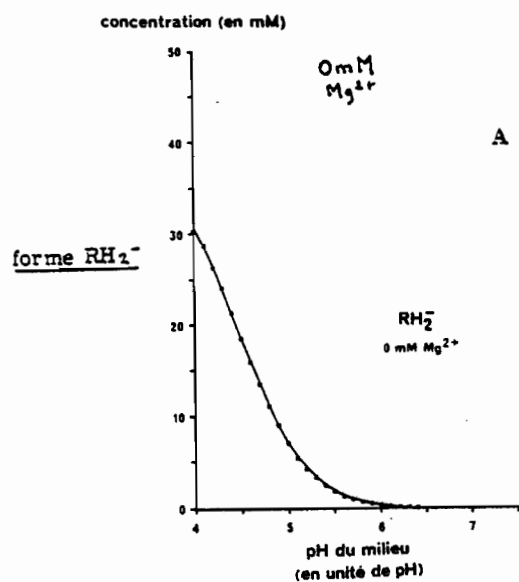


Figure 8.1



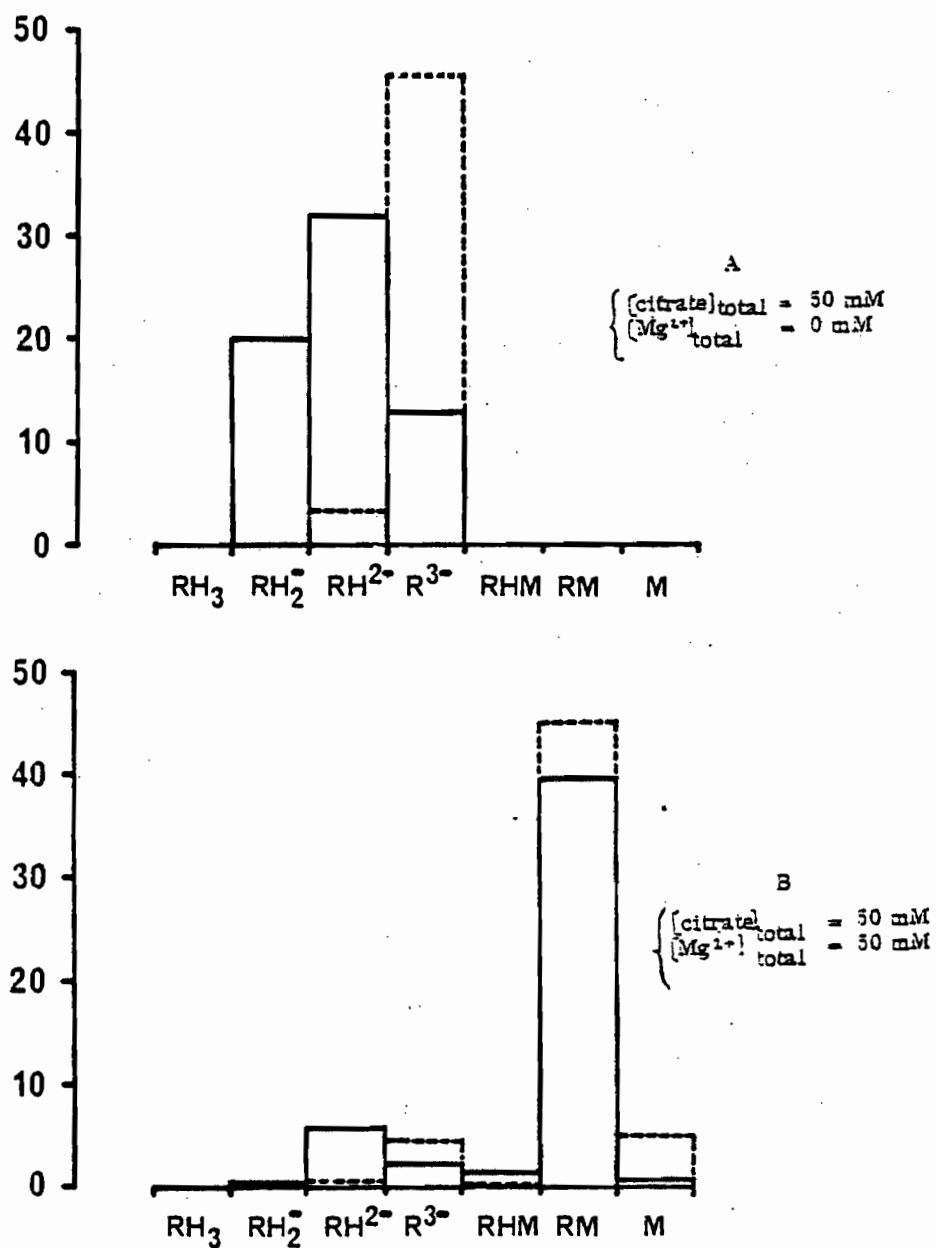


Figure 8.2

# DISTRIBUTION DE L'ACIDE CITRIQUE EN SES DIFFERENTES FORMES

A pH 6,0 ET A pH 7,5 EN PRESENCE OU NON DE Mg<sup>2+</sup>

La distribution de l'acide citrique en ses différentes formes est déterminée à partir du programme de calcul contenu dans l'annexe I. Différentes situations sont envisagées : pour une concentration totale de citrate (50 mM, représentative de celle des lutoïdes in vivo, l'influence du magnésium [0 mM (histogramme A) ou 50 mM (histogramme B)] est caractérisée à pH 6,0 (□) et à pH 7,5 (▨).

activité ATPase  
( U.I. x ml<sup>-1</sup>  
suspension membranaire)

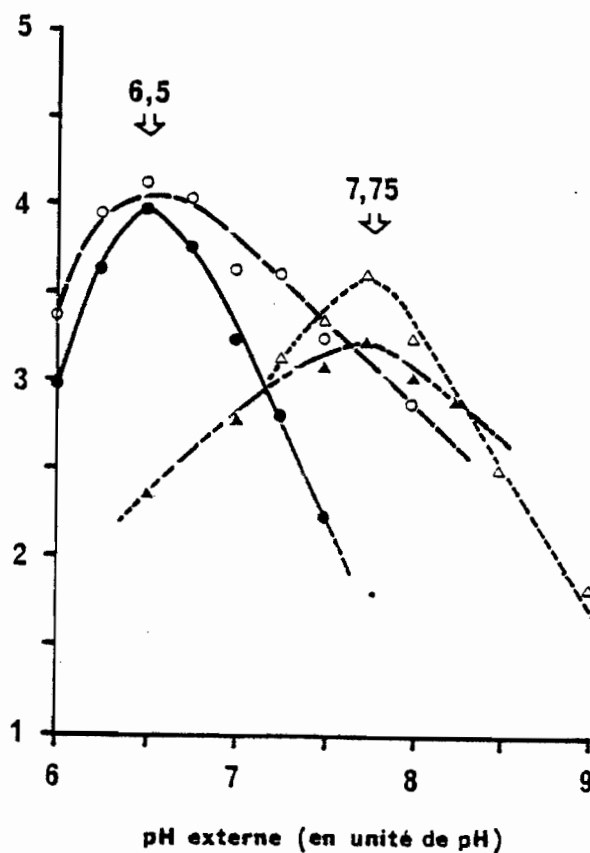
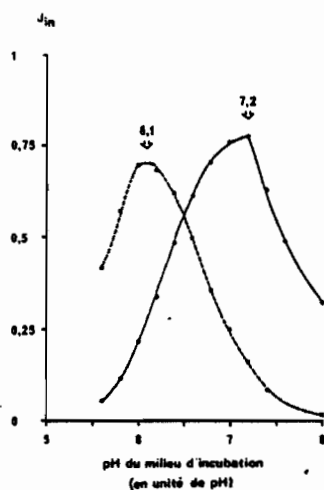


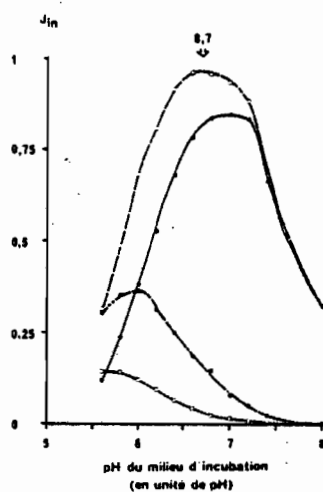
Figure 8.3

INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE ATPase  
MEMBRANAIRE VACUO-LYSOSOMALE

Les résultats décrits dans la figure 8.3 sont comparés à ceux publiés par J.D'AUZAC (1977). L'optimum de l'activité ATPase est fonction du milieu utilisé. Il est de l'ordre de 6,5 pour le milieu de Tager (-●-●-) et pour le milieu phosphate de potassium (-○-○-). Par contre, il est de l'ordre de 7,75 pour les milieux plus alcalins [ Tris-maléate (-△-△-) ou Tris-HCl (-▲-▲-) ].



A  
EN ABSENCE  
DE MAGNÉSIUM



B  
EN PRESENCE  
DE MAGNÉSIUM  
(50 mM)

Figure 8. 4

#### TENTATIVE DE MISE EN EVIDENCE DE LA FORME TRANSPORTEE

On considère que le flux de citrate ( $J_{in}$ ) dépend à la fois de la concentration externe de la forme transportée et du fonctionnement de la pompe-à-protons. En conséquence, il variera comme ses composantes en fonction du pH du milieu externe.

Les variations de la concentration des différentes formes de citrate (Figure 8.1) et de l'activité ATPase (Figure 6.6, courbe B) en fonction du pH sont normalisées (la valeur maximale devenant égale à l'unité). A chaque valeur de pH, correspondra une valeur pour la forme de citrate considérée et une autre pour l'activité ATPase. Leur produit donnera  $J_{in}$ .

$J_{in}$  est ainsi calculé pour les formes  $RH^{-1}$  (-■--■-),  $RHM$  (-□---□-),  $R$  (-●---●-) et  $RM$  (-○--○-), en présence ou non de magnésium.

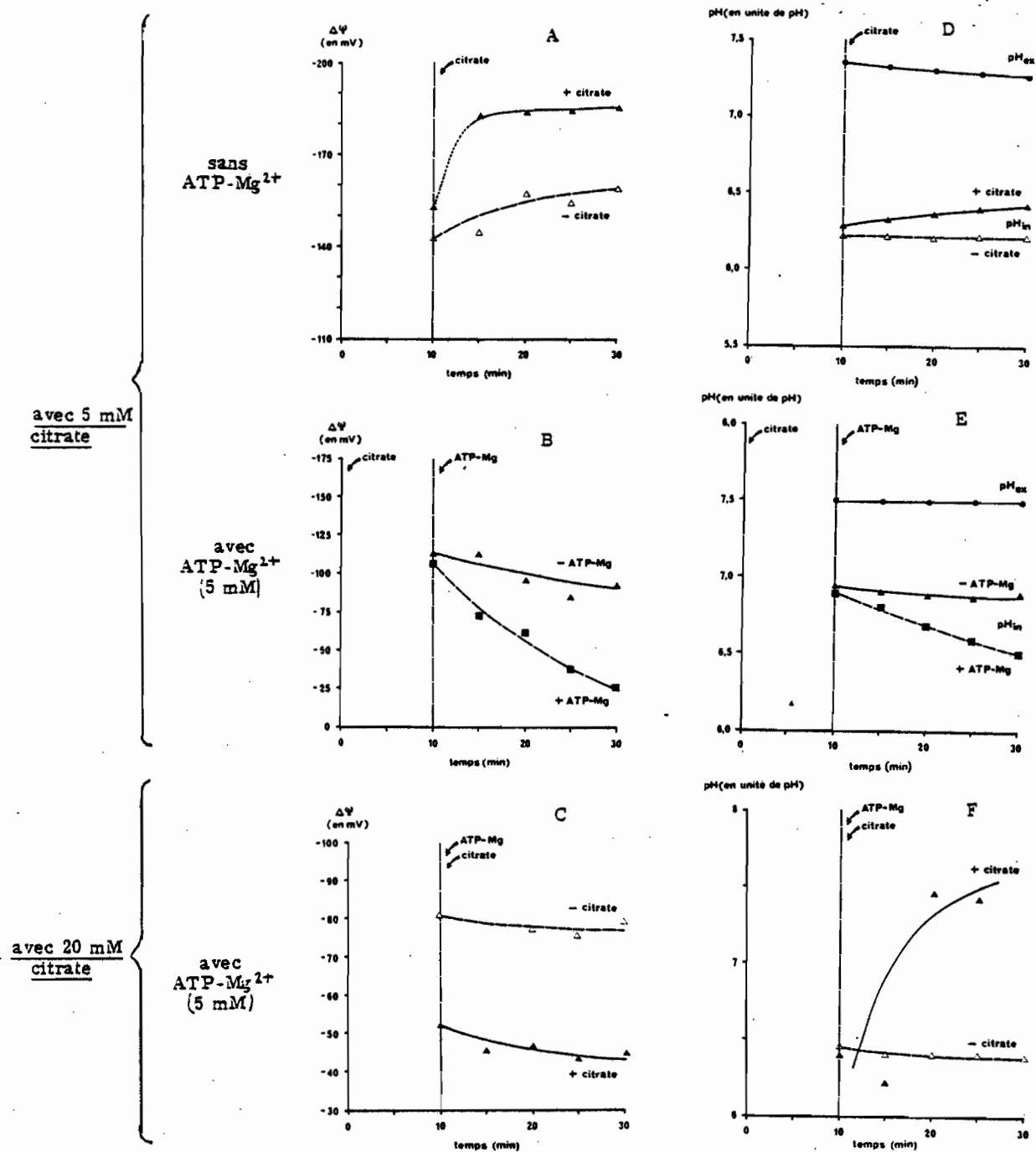


Figure 8.5

### MISE EN EVIDENCE DE L'ELECTROGENICITE DU TRANSPORT DU CITRATE ET DE LA POMPE-A-PROTONS

Le potentiel membranaire et le gradient de pH sont calculés respectivement à partir de la distribution transmembranaire du <sup>14</sup>C-TPMP et de la <sup>14</sup>C-méthylamine à l'équilibre, mesurée dans les conditions habituelles.

La différence réside dans la composition du milieu d'incubation. Les additions sont généralement faites après 10 mn d'incubation à température ambiante. C'est toujours le cas pour l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5mM). Ce n'est pas vrai pour le citrate : il peut être ajouté dès le démarrage de l'incubation (courbes B et E). La concentration finale de citrate est 5 mM sauf dans deux cas (courbes C et F). Elle passe de 5 mM à 20 mM.

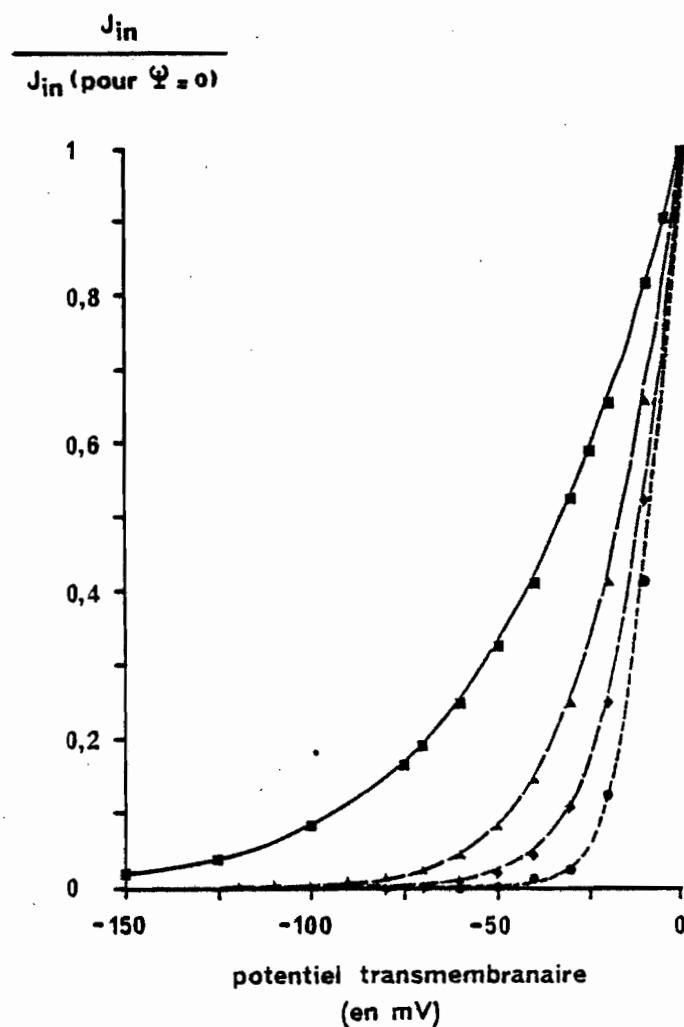


Figure 8.6

INFLUENCE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE SUR L'INFLUX  
D'ANIONS DE VALENCE DIFFERENTE

Dans le cadre de l'hypothèse d'un flux diffusionnel, l'influx d'un anion (dont la valence varie de -1 à -4) est calculé pour un potentiel transmembranaire évoluant de -150 à 0 mV et pour une situation où les concentrations interne et externe sont égales à 0,36 mM.

Les symboles suivants sont employés : (-■-■-) pour  $Z = -1$  ; (-▲-▲-) pour -2 ; (-◆-◆-) pour -3 et (-●-●-) pour -4.

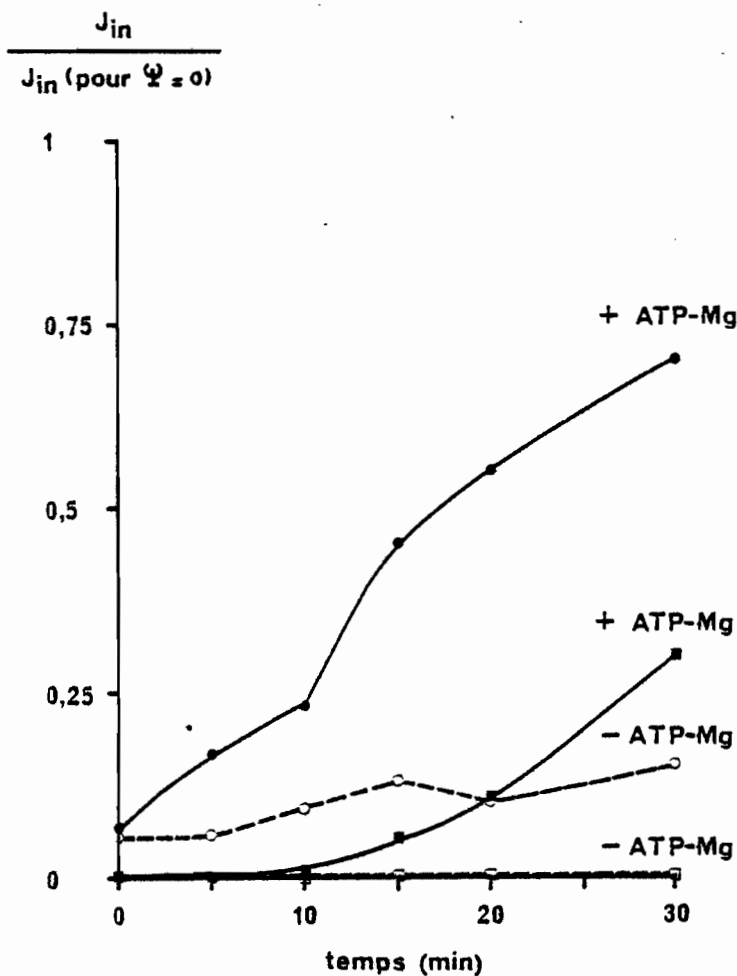


Figure 8.7

ESTIMATION DE  $J_{in} / J_{in}^{max}$  A PARTIR DE LA VARIATION  
DU POTENTIEL MEMBRANAIRE OBSERVEE LORS DU FONCTIONNEMENT  
DE LA POMPE-A-PROTONS

Les données théoriques de la figure 8.6 sont exploitées pour prévoir l'influx possible de citrate à partir de l'évolution du potentiel transmembranaire observée pendant une incubation en présence ou non d'ATP-Mg<sup>2+</sup> (cf. Figure 6, 7, courbe B). Deux situations sont envisagées : le transport du citrate correspond au flux net, soit d'une charge négative [ en absence (-o--o-) ou en présence (-•-•-) d'ATP-Mg<sup>2+</sup> ], soit de trois charges négatives [ en absence (-□--□-) ou en présence (-■--■-) de nucléotide .

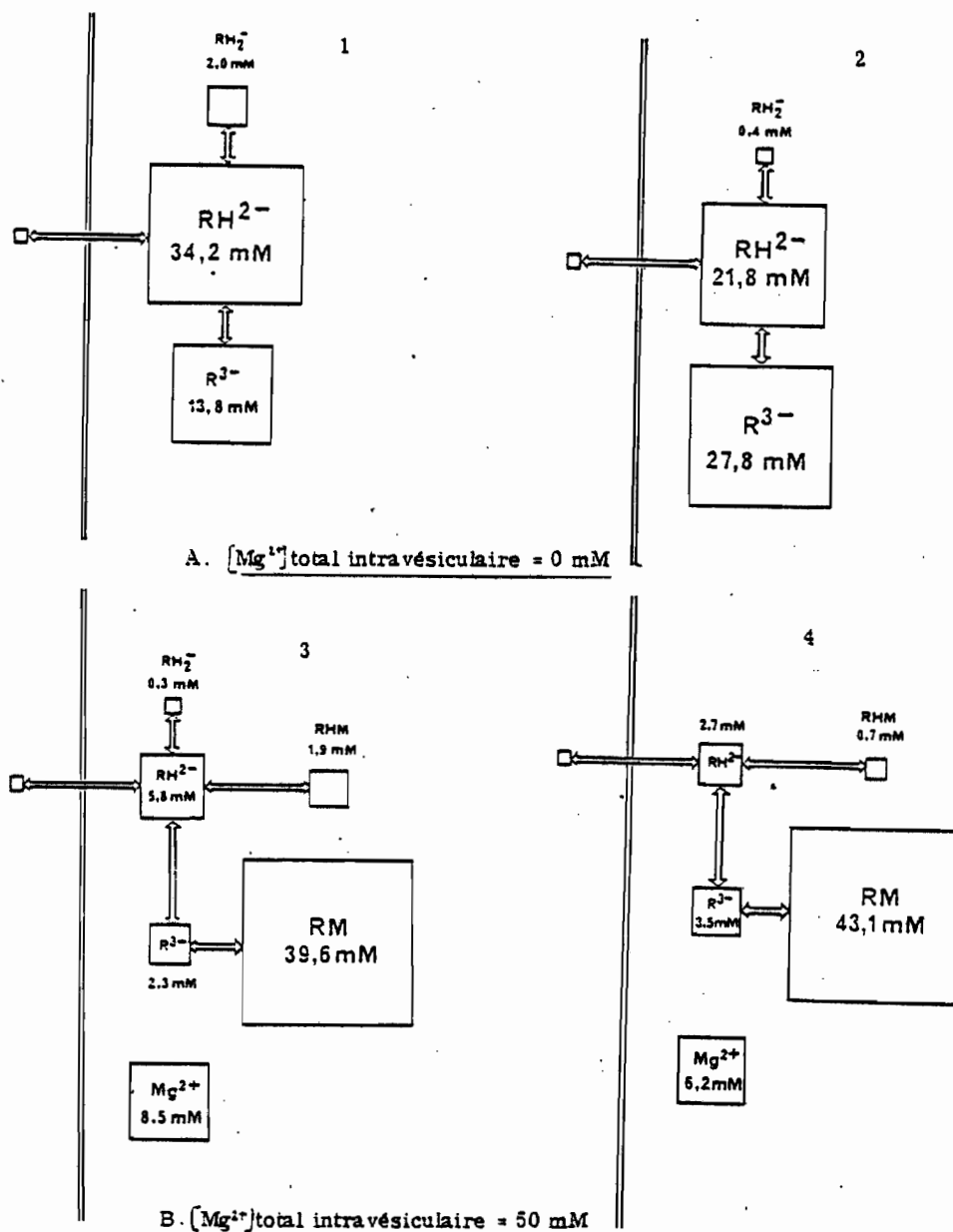


Figure 3.8

INFLUENCE DU MAGNESIUM INTRAVESICULAIRE SUR LA DISTRIBUTION  
DU CITRATE EN SES DIFFERENTES FORMES A pH ACIDE

Le calcul est effectué dans les conditions où les concentrations extra et intralutoidiques sont respectivement égales à 5 et 50 mM. Le pH intravesiculaire est, soit 6,0 (situations 1 et 3) soit 6,5 (situation 2 et 4). La concentration en  $Mg^{2+}$  total intravesiculaire est, soit nulle (A), soit 50 mM (B). Au pH externe envisagé (7, 5), la concentration de la forme perméante  $RH_2^-$  est 0,365 mM

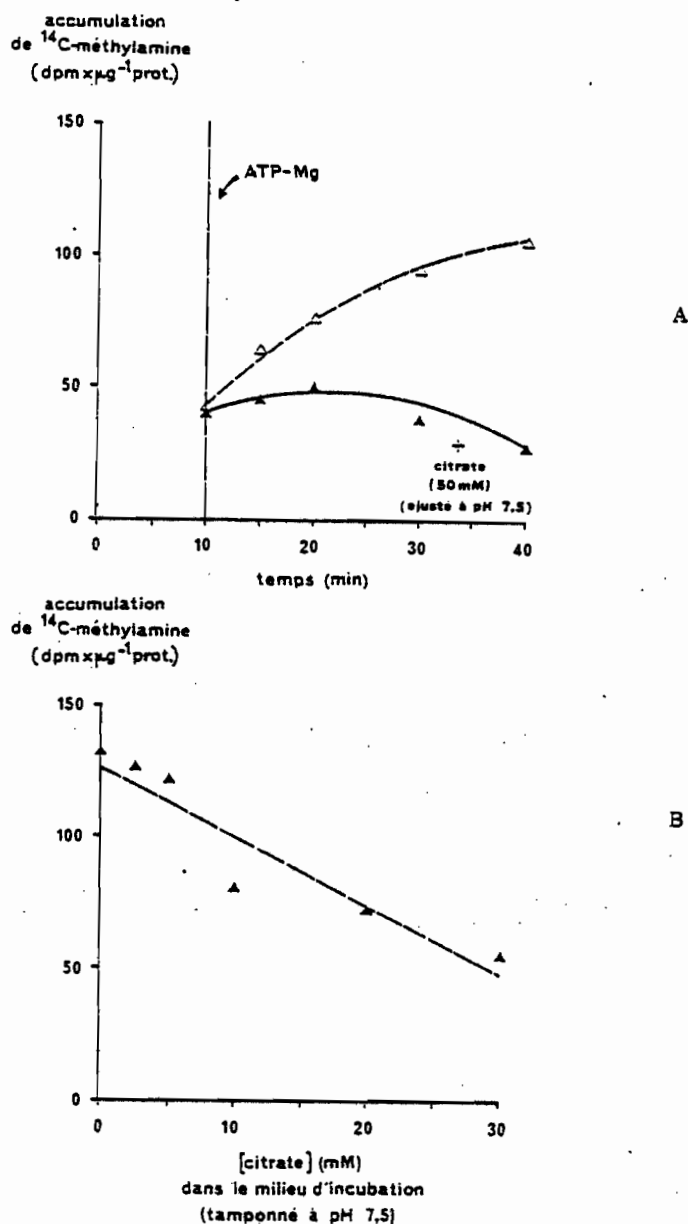


Figure 8.9

#### INFLUENCE DE FORTES CONCENTRATIONS DE CITRATE DANS LE MILIEU D'INCUBATION SUR LE pH INTERNE DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

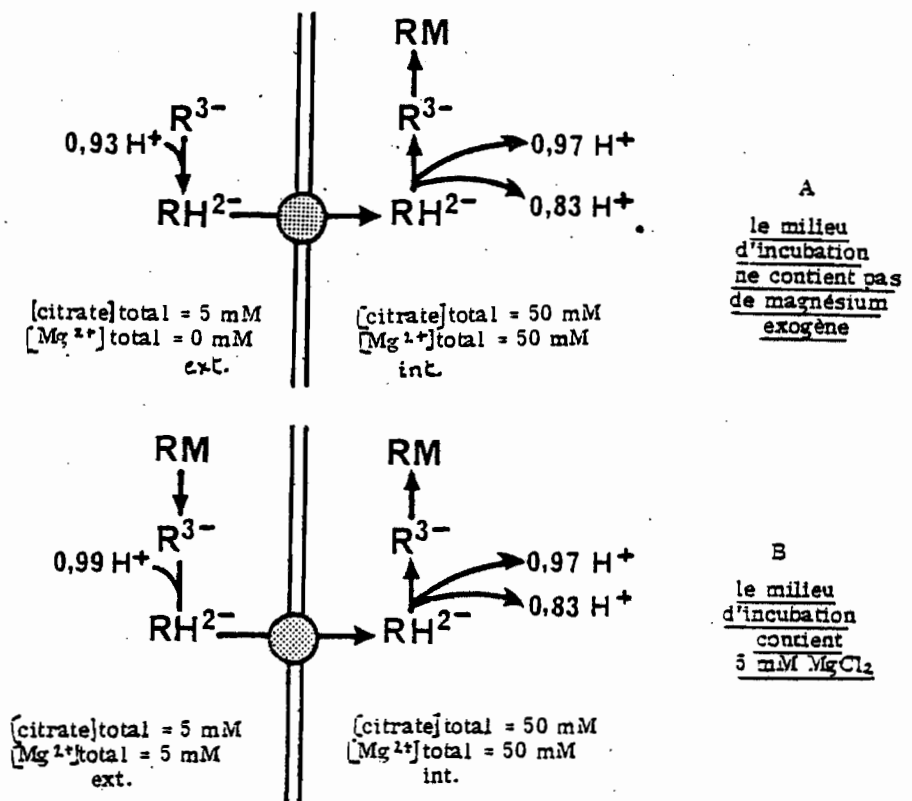
Les vésicules sont préparées et incubées dans un milieu de Tager, selon le protocole expérimental habituel (voir "Matériel et méthodes").

La conduite de la manipulation est comparée à celle décrite dans la légende des figures 6.1 et 6.7. Dans tous les cas, les additions se font au bout de 10 mn d'incubation à température ambiante : en plus de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5mM), du citrate (tamponné au pH du milieu) peut être ajouté. La concentration finale sera égale à 50 mM (courbe A). Mais elle peut varier dans une gamme de concentration allant de 0 à 30 m (courbe B).

En ce qui concerne l'effet cinétique du citrate (courbe A), au moment désiré, une fraction aliquote de 0,1 ml est prélevée. Son traitement est effectué selon la méthode habituelle employée pour suivre la cinétique d'incorporation du citrate par les vésicules vacuo-lysosomales (arrêt par sédimentation sur couche de dextrane à 1,5%).

Dans le second cas, tous les prélèvements se font au bout de 30 mn d'incubation.





Bilan : si le transport de la forme perméante est assuré par un uniport,

- alcalinisation du milieu externe
- acidification du milieu interne

Figure 8.10

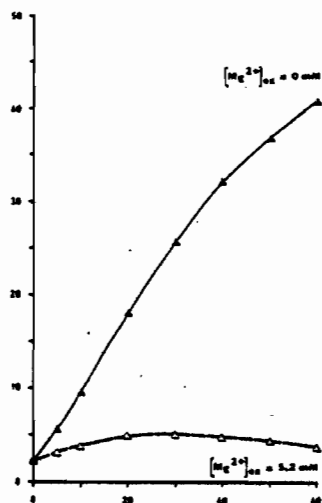
### BILAN DU MOUVEMENT DES PROTONS ASSOCIE AU TRANSPORT DU CITRATE

Dans le cadre de l'hypothèse où seule la forme  $RH^{2-}$  est perméante, il est possible de calculer les mouvements de protons associés au transfert d'une molécule de citrate du milieu dans le compartiment vésiculaire (par suite du déplacement des équilibres entre les différentes formes de l'acide citrique). Quatre situations sont considérées :  $[Mg^{2+}]_{ext. total}$  est égal à :

soit 0, soit 5 mM, pour un pH intravésiculaire égal 1, soit 6,0, soit 6,9.

Le nombre de protons engagés dans ce processus est indiqué dans le schéma au niveau de l'équilibre  $R^{3-} \rightarrow RH^{2-}$ .

quantité de protons  
fixés par le citrate intravésiculaire  
( $\text{neq. H}^+ \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ )

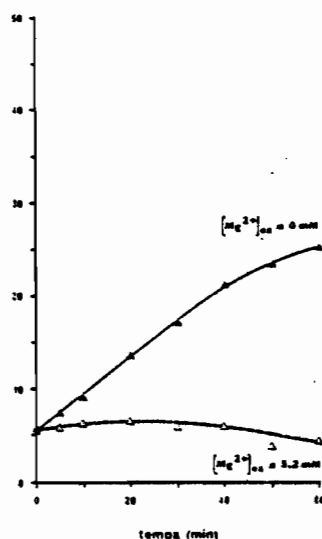


A

Contenu vésiculaire

initial:

$\left\{ \begin{array}{l} \text{Mg}^{2+} = 25 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \\ \text{citrate} = 25 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \end{array} \right.$



B

contenu vésiculaire

initial

$\left\{ \begin{array}{l} \text{Mg}^{2+} = 100 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \\ \text{citrate} = 100 \text{ nmol.} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \end{array} \right.$

Figure 8.11

INFLUENCE DU MAGNESIUM LIBRE EXTERNE ET DU CONTENU  
VESICULAIRE INITIAL SUR L'AMPLITUDE DE LA FIXATION DE PROTONS  
PAR LE CITRATE INTRA-VESICULAIRE

Dans le cadre de l'hypothèse du fonctionnement du transporteur du citrate selon un mécanisme antiport  $\text{RH}^{3-}/\text{H}^+$ , en absence de flux couplé de  $\text{Mg}^{2+}$ , le programme de calcul (cf. Annexe III) permet de prévoir les cinétiques d'incorporation et d'accumulation du citrate par des vésicules vacuolysomiales, dont le contenu en citrate et en  $\text{Mg}^{2+}$  est égal, soit à 25 nmol.  $\times \text{mg}^{-1}$  prot. (figures 8.13 et 8.14, courbes A et B), soit à 100 nmol.  $\times \text{mg}^{-1}$  prot. (Figures 8.13 et 8.14, courbes D et E). Deux cas particuliers sont envisagés : la concentration externe du magnésium libre est, soit nulle ( $- \Delta - - \Delta -$ ), soit 5,2 mM ( $- \circ - - \circ -$ ). Par ailleurs, la pompe-à-protons fonctionne. Dès lors, il est possible de connaître la distribution du citrate accumulé en ses différentes formes, à la valeur du pH existant à tout moment de l'incubation (figures 8.13 et 8.14, courbes C et F). On pourra faire le bilan des protons fixés par le citrate intravésiculaire. Il en résultera les courbes A et B de cette figure.

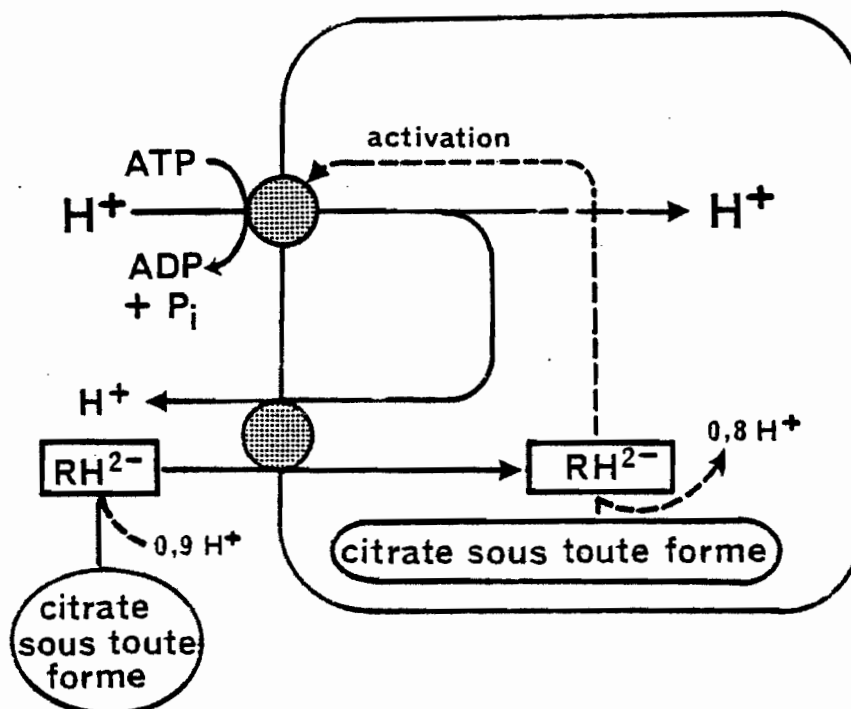


Figure 8.12

NECESSITE DE L'EFFLUX DE H<sup>+</sup> POUR EXPLIQUER L'ALCANISATION  
DU MILIEU INTERNE ET L'ACIDIFICATION DU MILIEU EXTERNE  
LORS DU TRANSPORT DU CITRATE

Cette figure récapitule les faits expérimentaux exposés dans la partie E du paragraphe IV et les conclusions qu'ils entraînent, suite aux conséquences du mouvement des protons associé au transport du citrate (par suite du déplacement des équilibres entre les différentes formes de l'acide citrique, dans le cadre d'un fonctionnement uniport du transporteur, cf. Figure 8.10)

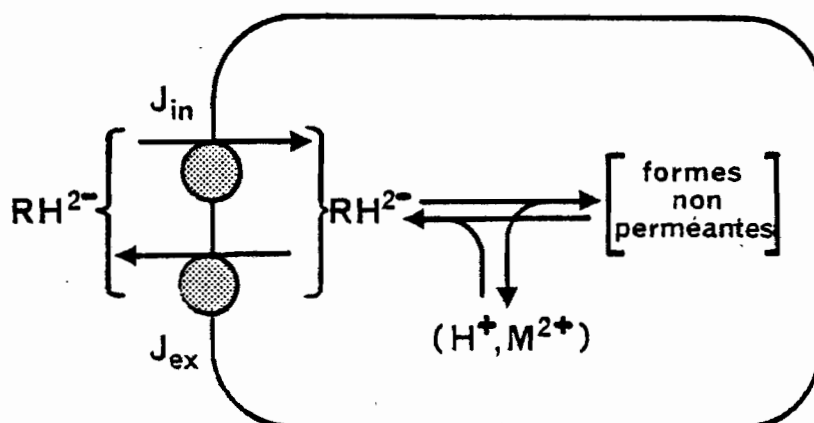


Figure 8.13

#### EXISTENCE D'UNE COMPARTIMENTATION DU CITRATE

##### INTRA-VESICULAIRE

Cette figure récapitule les faits expérimentaux exposés dans la partie F du paragraphe IV et les conclusions qu'ils amènent (cf. Figures 4.15 et 4.17). Dans le schéma, on ne présume pas du mécanisme de fonctionnement du transporteur du citrate. On en arrive à la conclusion qu'au niveau du compartiment vésiculaire, il existe deux compartiments cinétiques, l'un formé par la forme perméante  $RH^{2-}$ , l'autre contenant toutes les autres formes de l'acide citrique (supposées non perméantes).

Figures 8.14, 8.15 et 8.16

### COMPARAISON DES DEUX HYPOTHESES DE TRAVAIL

Il existe deux hypothèses de travail :

1) il s'agit d'un simple rééquilibrage des différentes formes de citrate entre les compartiments extra et intravésiculaires dû au gradient transmembranaire de pH.

2) le transporteur fonctionne selon un antiport  $RH^{1-}/H^{+}$

Dans le premier cas,  $K_m^{in} = K_m^{ex}$  et dans le second,  $K_m^{in} = K_m^{ex} \cdot 10^{\Delta pH}$

Dans la mesure où le milieu contient de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (5mM), la pompe à protons fonctionne. Cette concentration en substrat de l'ATPase correspond à une concentration en Mg<sup>2+</sup> libre de l'ordre de 0,9348 mM.

Par ailleurs, un flux de Mg<sup>2+</sup> peut être couplé à celui de RH<sup>1-</sup>

Toutes ces possibilités sont considérées et le programme de calcul nous permet d'obtenir :

- 1) la cinétique d'incorporation du citrate,
- 2) la cinétique d'accumulation du citrate,
- 3) la distribution intravésiculaire du citrate en ses différentes formes.
- 4) la quantité de protons fixée par le citrate intravésiculaire.

Les conditions initiales sont les suivantes:

- un volume vésiculaire de 10  $\mu$ l x mg<sup>-1</sup> prot.,
- un contenu vésiculaire en citrate et en Mg<sup>2+</sup> de 25 nmol. x mg<sup>-1</sup> prot.,
- un pH interne initial de 6,91, susceptible d'être modifié ou non.
- un pH externe constant de 7,3,
- les valeurs de  $J_{max}^{in}$  et de  $J_{max}^{ex}$  sont égales à 15 nmol. x mg<sup>-1</sup> prot. x mn<sup>-1</sup>,
- les valeurs de  $K_m^{in}$  et de  $K_m^{ex}$  sont à déterminer :
  - soit  $K_m^{in} = K_m^{ex} = K_m = 0,3624$  mM
  - soit  $K_m^{in}$  et  $K_m^{ex}$  sont différents l'un de l'autre,
 
$$\begin{cases} K_m^{in} = 0,3624 \text{ mM} \\ K_m^{ex} = 1,4103 \text{ mM} \end{cases}$$

Il en résultera les différentes simulations contenues dans les figures 8.14, 8.15, et 8.16 rendant compte du bien fondé relatif des deux hypothèses énoncées, dans les différentes situations évoquées initialement (fonctionnement de la pompe-à-protons, flux couplé de Mg<sup>2+</sup>, ...).

Pour les courbes C, D, G et H, les symboles suivants sont employés :  
 (- - - -) pour RH<sup>2-</sup>, (- - - -) pour RH<sup>1-</sup>, (- - - -) pour RHM, (- - - -) pour R et (- - - -) pour RM.

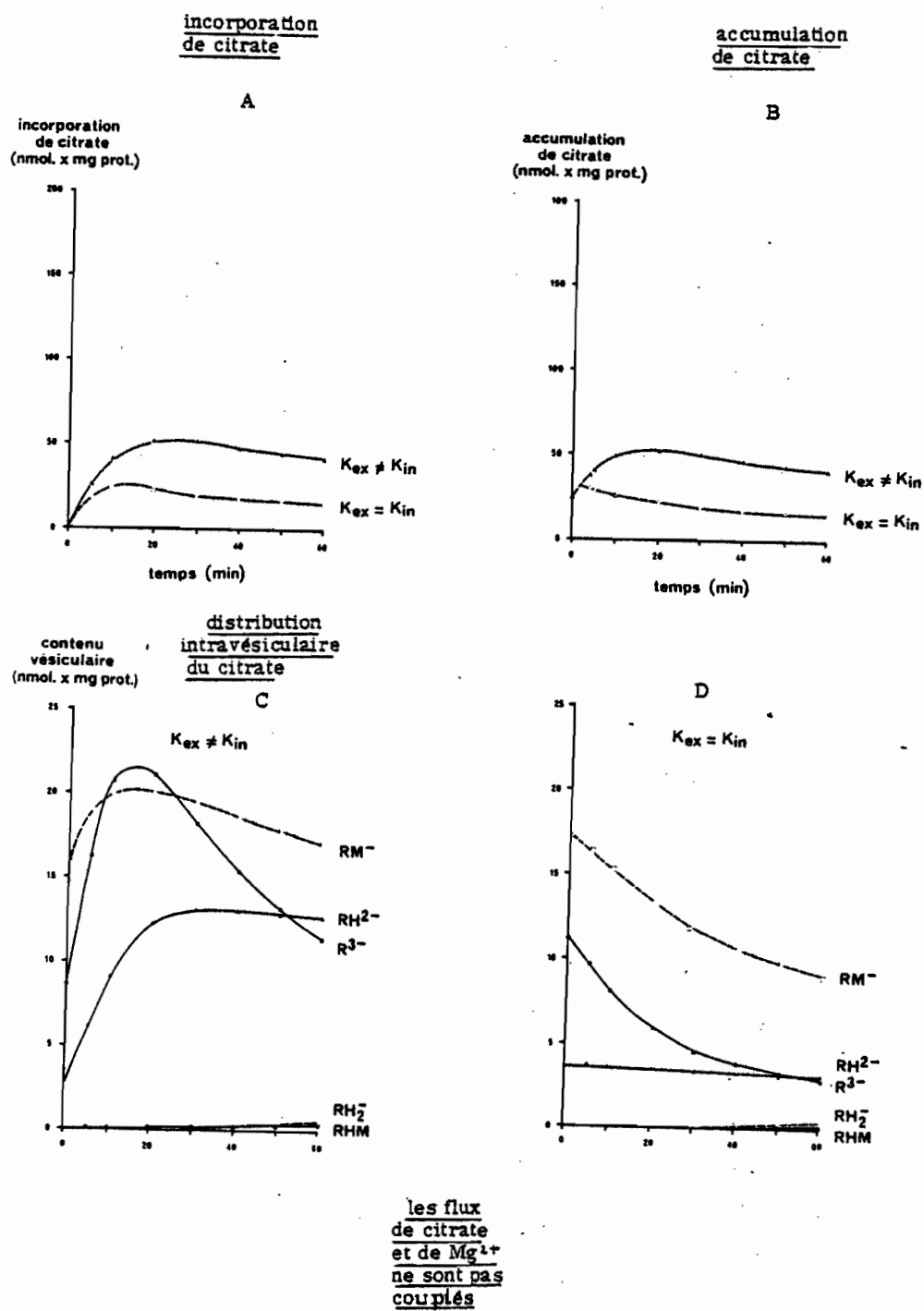
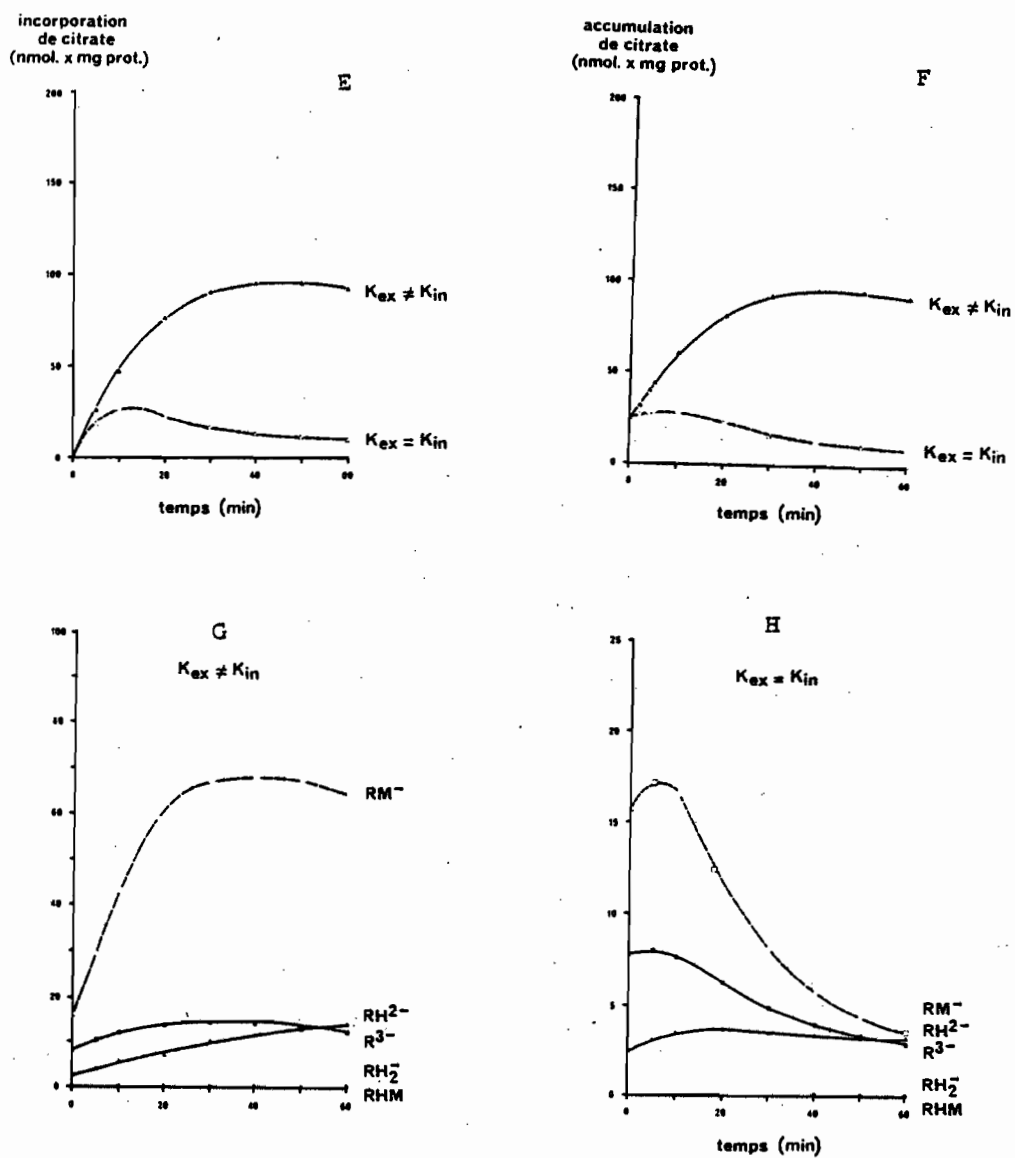


Figure 8.14

COMPARAISON DES DEUX HYPOTHESES DE TRAVAIL :

A) LA POMPE -A- PROTONS FONCTIONNE



les flux  
de citrate  
et de  $Mg^{2+}$   
sont couplés

Figure 8.14

COMPARAISON DES DEUX HYPOTHESES DE TRAVAIL :

A) LA POMPE-A-PROTONS FONCTIONNE

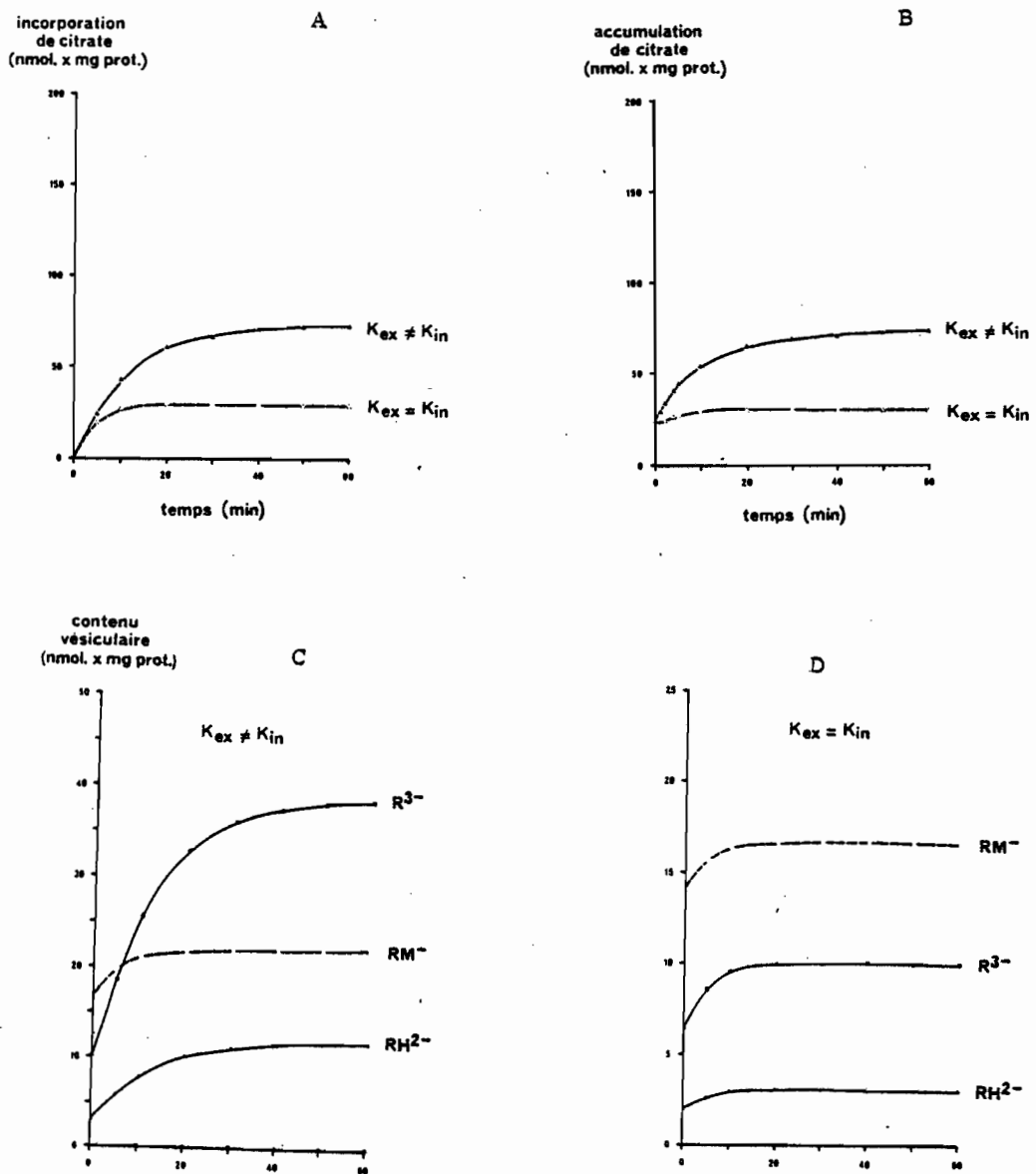
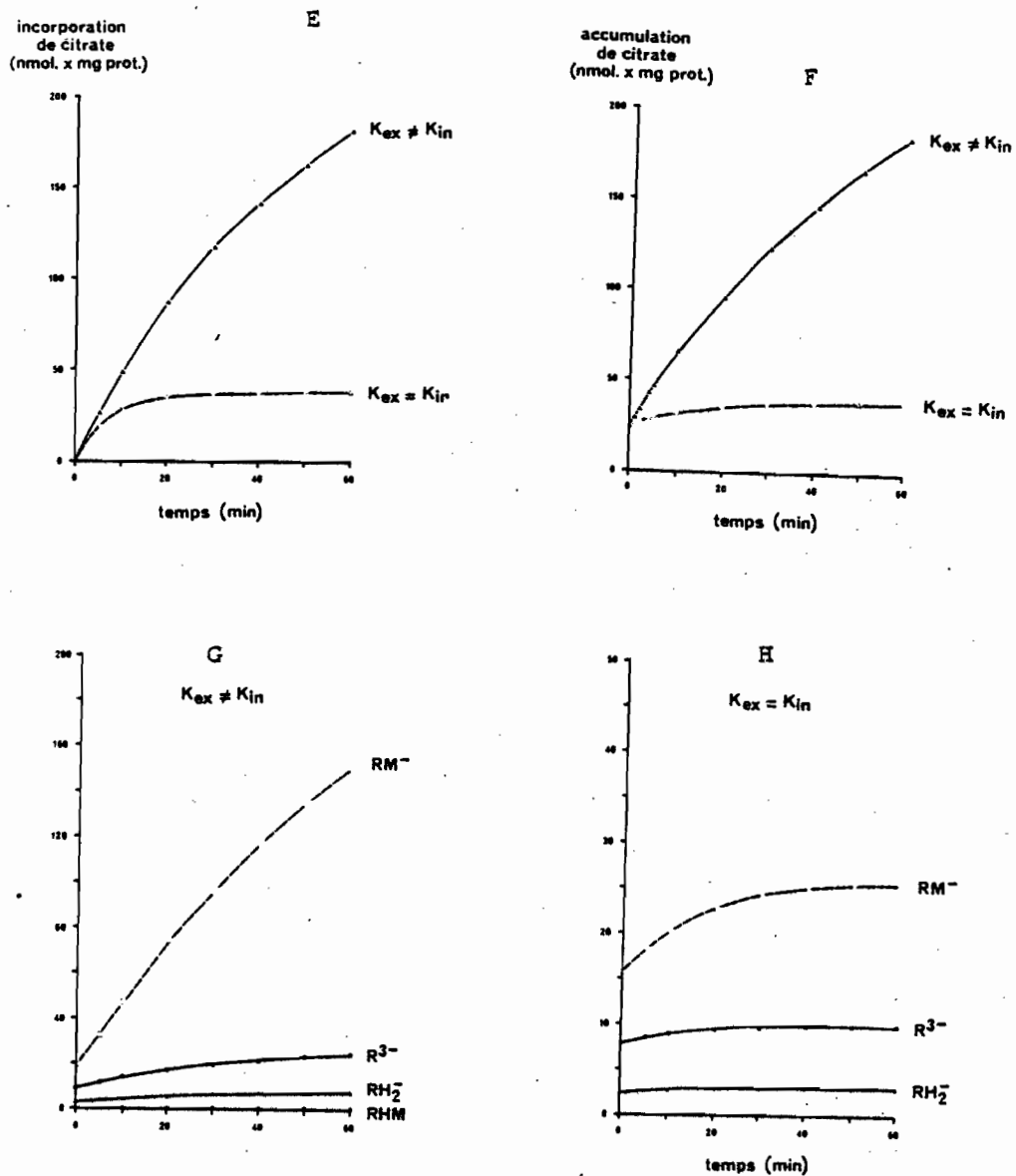


Figure 8.15

COMPARAISON DES DEUX HYPOTHESES DE TRAVAIL :

B) LE pH INTERNE EST CONSTANT





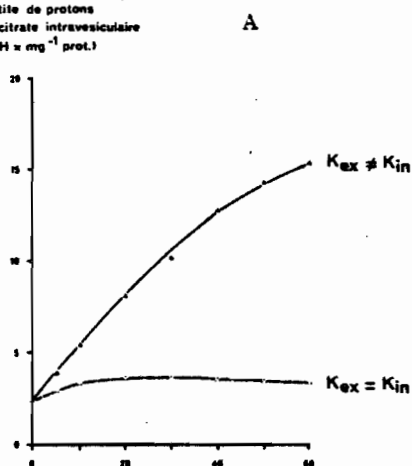
les flux  
de citrate  
et de  $Mg^{2+}$   
sont couplés

Figure 8.15

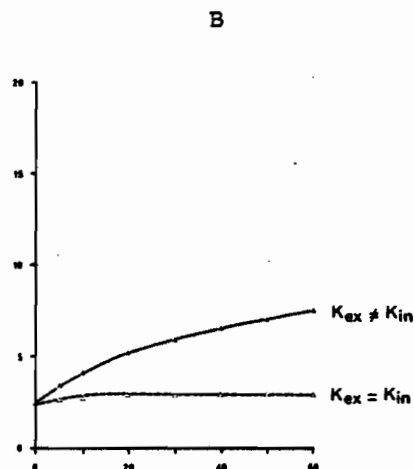
COMPARAISON DES DEUX HYPOTHESES DE TRAVAIL :

B) LE pH INTERNE EST CONSTANT

quantité de protons  
fixée par le citrate intravesiculaire  
( $\text{neq. H}^+ \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ )

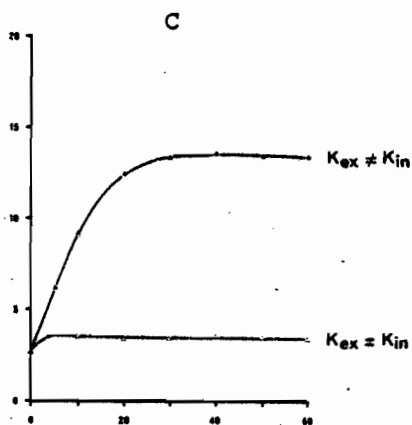


LA POMPE  
A PROTONS  
FONCTIONNE

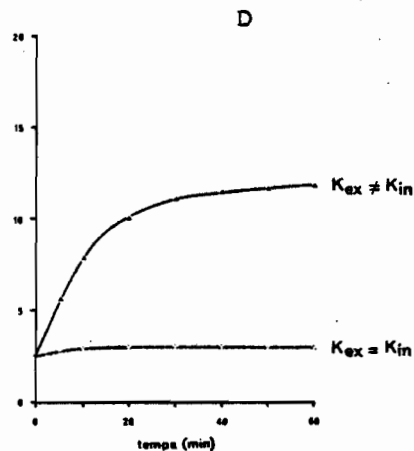


LE pH INTERNE  
RESTE CONSTANT

Les flux de citrate  
et de  $\text{Mg}^{2+}$  sont  
couplés



LA POMPE  
A PROTONS  
FONCTIONNE



LE pH INTERNE  
RESTE CONSTANT

Les flux de citrate  
et de  $\text{Mg}^{2+}$  ne sont  
pas couplés

Figure 8. 16

COMPARAISON DES DEUX HYPOTHESES DE TRAVAIL :

AMPLITUDE DE LA FIXATION DE PROTONS PAR LE

CITRATE INTRAVESICULAIRE

*La figure 8.17 a été supprimée.*

$\text{pH}_{\text{in}}$  (en unité de pH)

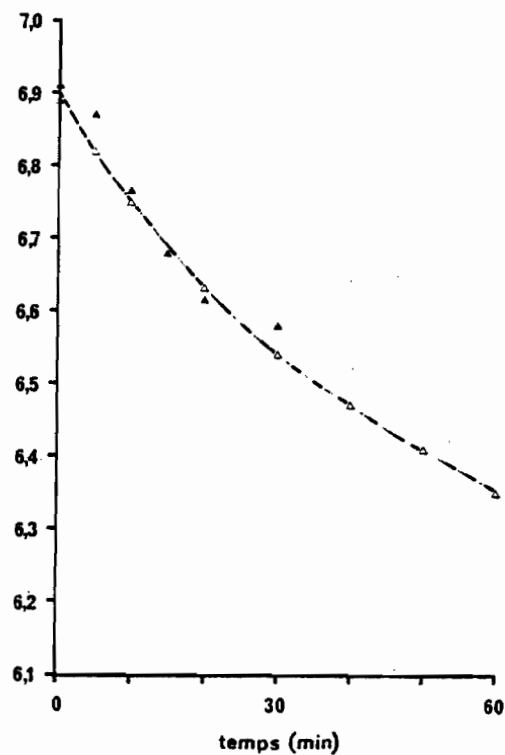


Figure 8.18

FORMALISATION EMPIRIQUE DE LA VARIATION

DU  $\text{pH}$  INTRAVESICULAIRE EN FONCTION DU TEMPS

La courbe empirique trouvée, correspondant à la relation (8.8) est ajustée aux valeurs expérimentales du  $\text{pH}$  interne, calculées à partir de la distribution transmembranaire de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine (▲).

Figures 19. et 20

INFLUENCE DU MAGNESIUM EXTERNE LIBRE ET DU CONTENU VESICULAIRE  
INITIAL SUR LE FONCTIONNEMENT DU TRANSPORTEUR DU CITRATE  
 ( SELON UN ANTIPOORT  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^+$  ET EN ABSENCE DE FLUX COUPLE DE  $\text{Mg}^{2+}$  )

Les conditions initiales sont les suivantes :

- un volume vésiculaire de  $10 \mu\text{l} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ,
- un contenu vésiculaire en citrate et en  $\text{Mg}^{2+}$ , variant de 2,5 à 50 nmol.  $\times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$
- un pH interne initial de 6,91
- le milieu vésiculaire s'acidifie grâce au fonctionnement de la pompe-à-protons
- un pH externe constant de 7,5
- les valeurs de  $K_{\text{m}}^{\text{in}}$  et de  $K_{\text{m}}^{\text{ex}}$  sont différentes :

$$\begin{cases} K_{\text{m}}^{\text{ex}} = 0,3624 \text{ mM} \\ K_{\text{m}}^{\text{in}} = 1,4103 \text{ mM} \end{cases}$$

- les valeurs de  $J_{\text{m}}$  ( $J_{\text{max}}^{\text{ex}} = J_{\text{max}}^{\text{in}}$ ) sont différentes dans les trois cas considérés :

- pour  $[\text{citrate}]_{\text{in}} = 2,5 \text{ mM}$ ,  $J_{\text{m}} = 9 \text{ nmol} \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$
- pour  $[\text{citrate}]_{\text{in}} = 10 \text{ mM}$ ,  $J_{\text{m}} = 6 \text{ nmol} \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$
- pour  $[\text{citrate}]_{\text{in}} = 50 \text{ mM}$ ,  $J_{\text{m}} = 4 \text{ nmol} \times \text{mn}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$

Le programme de calcul nous permet d'obtenir :

- 1) la cinétique d'incorporation du citrate
- 2) la cinétique d'accumulation du citrate
- 3) la distribution intravésiculaire du citrate en ses différentes formes
- 4) la quantité de protons fixée par le citrate intravésiculaire

Il travaille avec l'hypothèse que le transporteur du citrate fonctionne selon un antiport  $\text{RH}^{2-}/\text{H}^+$  et que le flux de citrate n'est pas associé avec un flux couplé de  $\text{Mg}^{2+}$ . Deux situations sont considérées :  $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{ex}}$  libre est égale soit à 0 mM, soit à 5,2 mM.

Pour les courbes C, F et I, les symboles suivants sont employés : (- - - -) pour  $\text{RH}^{2-}$ , (-▲-▲-) pour  $\text{RH}^{2-}$ , (-△-△-) pour  $\text{RHM}$ , (-■-■-) pour R et (-○-○-) pour RM.

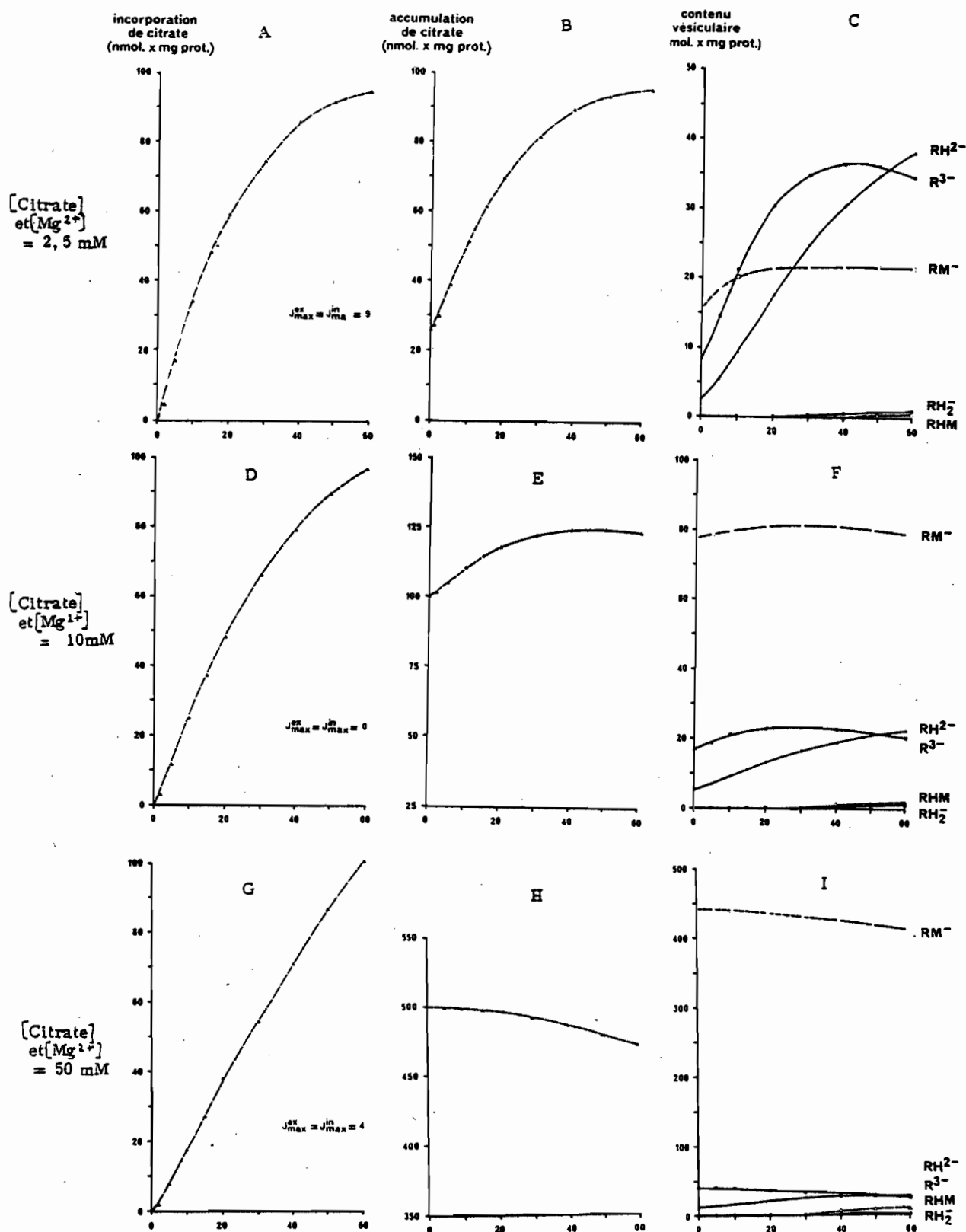


Figure 8.19

INFLUENCE DU MAGNESIUM EXTERNE LIBRE ET DU CONTENU  
VESICULAIRE INITIAL SUR LE FONCTIONNEMENT DU TRANSPORTEUR  
DU CITRATE (SELON UN ANTIPOORT  $RH^{2-}/H^{+}$  ET EN ABSENCE DE  
FLUX COUPLE DE  $Mg^{2+}$ ) A)  $[Mg^{2+}]_{ex. \text{ LIBRE}} = 0 \text{ mM}$

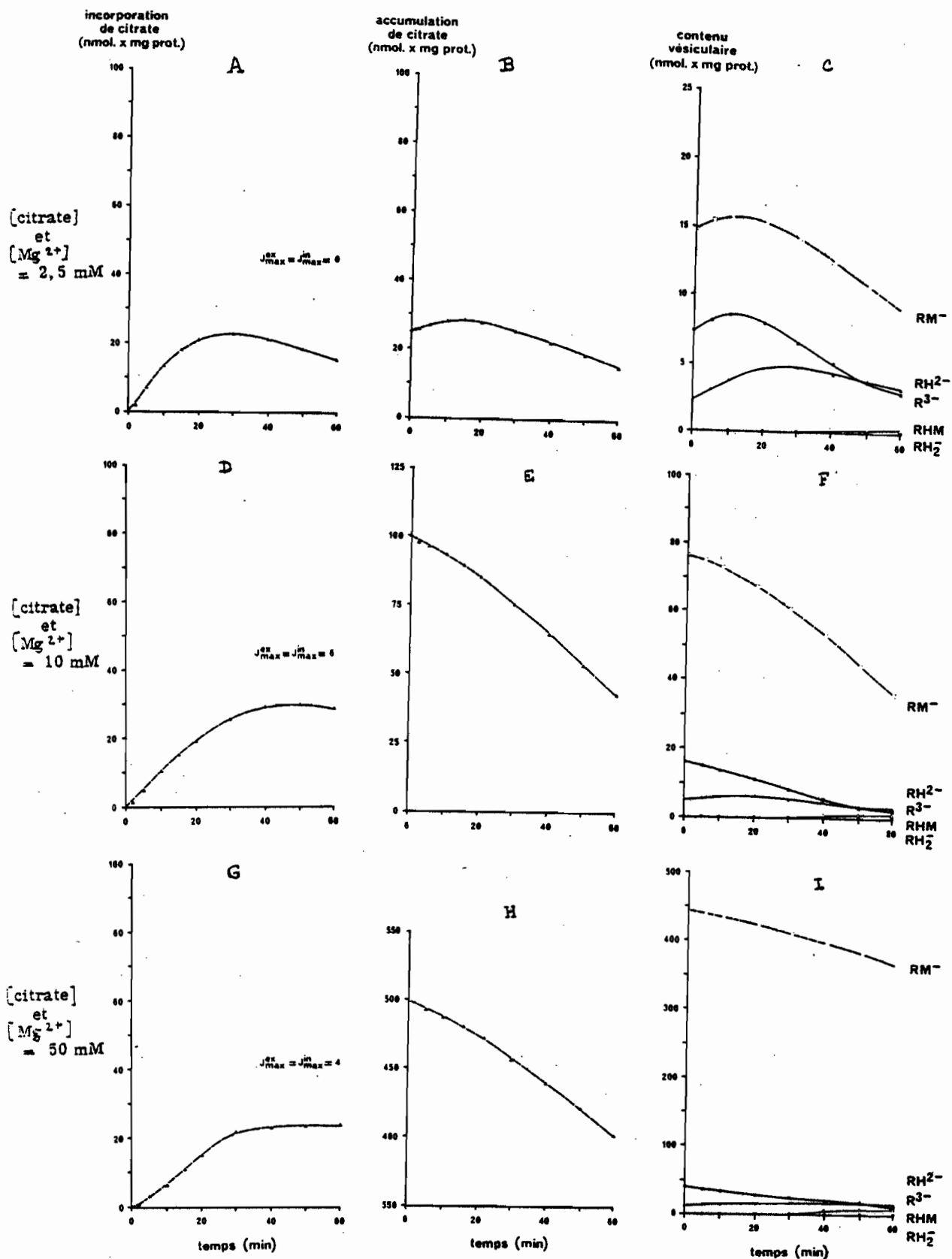


Figure 8. 20

INFLUENCE DU MAGNESIUM EXTERNE LIBRE ET DU CONTENU  
VESICULAIRE INITIAL SUR LE FONCTIONNEMENT DU TRANSPORTEUR  
DU CITRATE (SELON UN ANTIPOORT  $RH^{2-}/H^+$  ET EN ABSENCE DE FLUX  
COUPLE DE  $Mg^{2+}$ ) B)  $[Mg^{2+}]_{ex. LIBRE} = 5.2 \text{ mM}$

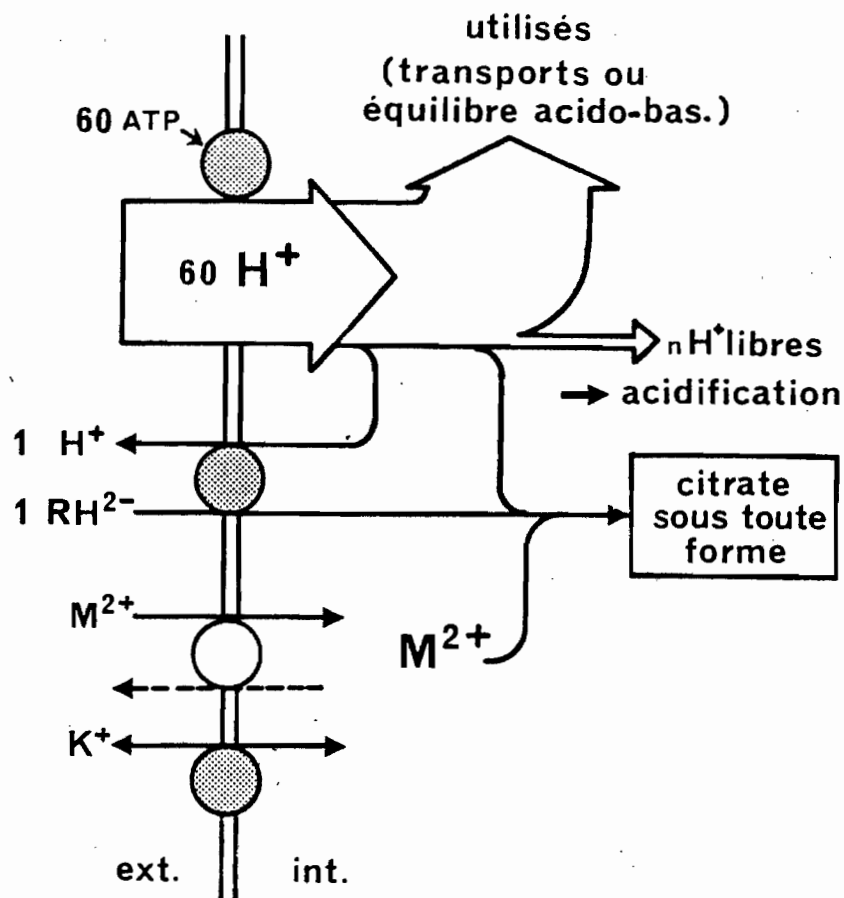


Figure 8.21

#### SCHEMA DU FONCTIONNEMENT DU TRANSPORTEUR

#### DU CITRATE SELON UN MECANISME ANTIPORT RH<sup>2-</sup>/H<sup>+</sup>

Ce schéma rend compte de tous les résultats expérimentaux exposés dans le paragraphe IV. Les pompes électrogéniques (affectant le potentiel transmembranaire) sont figurées en ombré.

Le magnésium pénètre dans le compartiment vésiculaire grâce au fonctionnement d'un transporteur (dans un flux couplé au citrate ?).

Mais, il n'est pas électrogène. L'efflux est peu probable. La compensation de charge pourrait impliquer un mouvement de H<sup>+</sup> ou de K<sup>+</sup>.



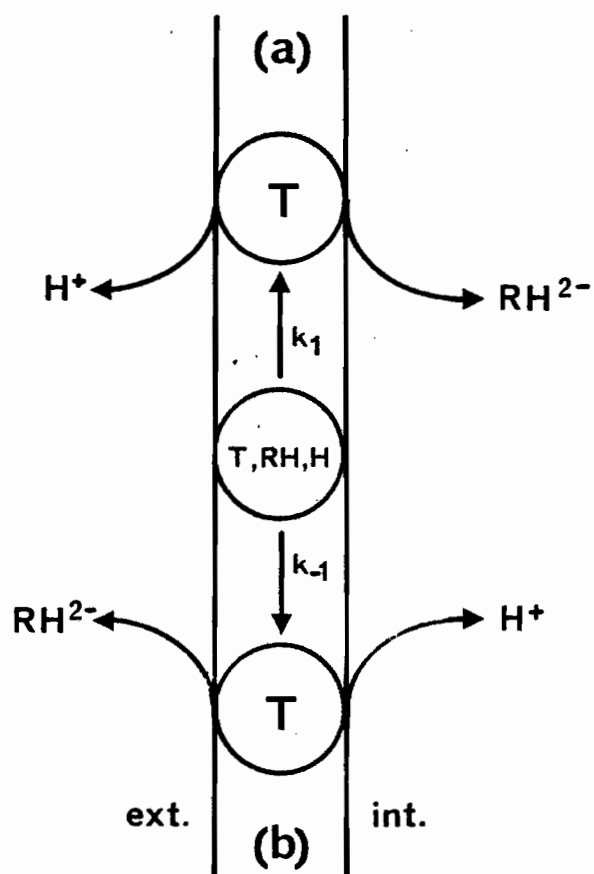


Figure 8.22

#### DIFFERENTS ETATS DU COMPLEXE TRANSPORTEUR

Ce schéma matérialise les trois états dans lequel se trouve le transporteur dans la phase intra-membranaire [ $\bar{T}^-$ , (a) et (b)].

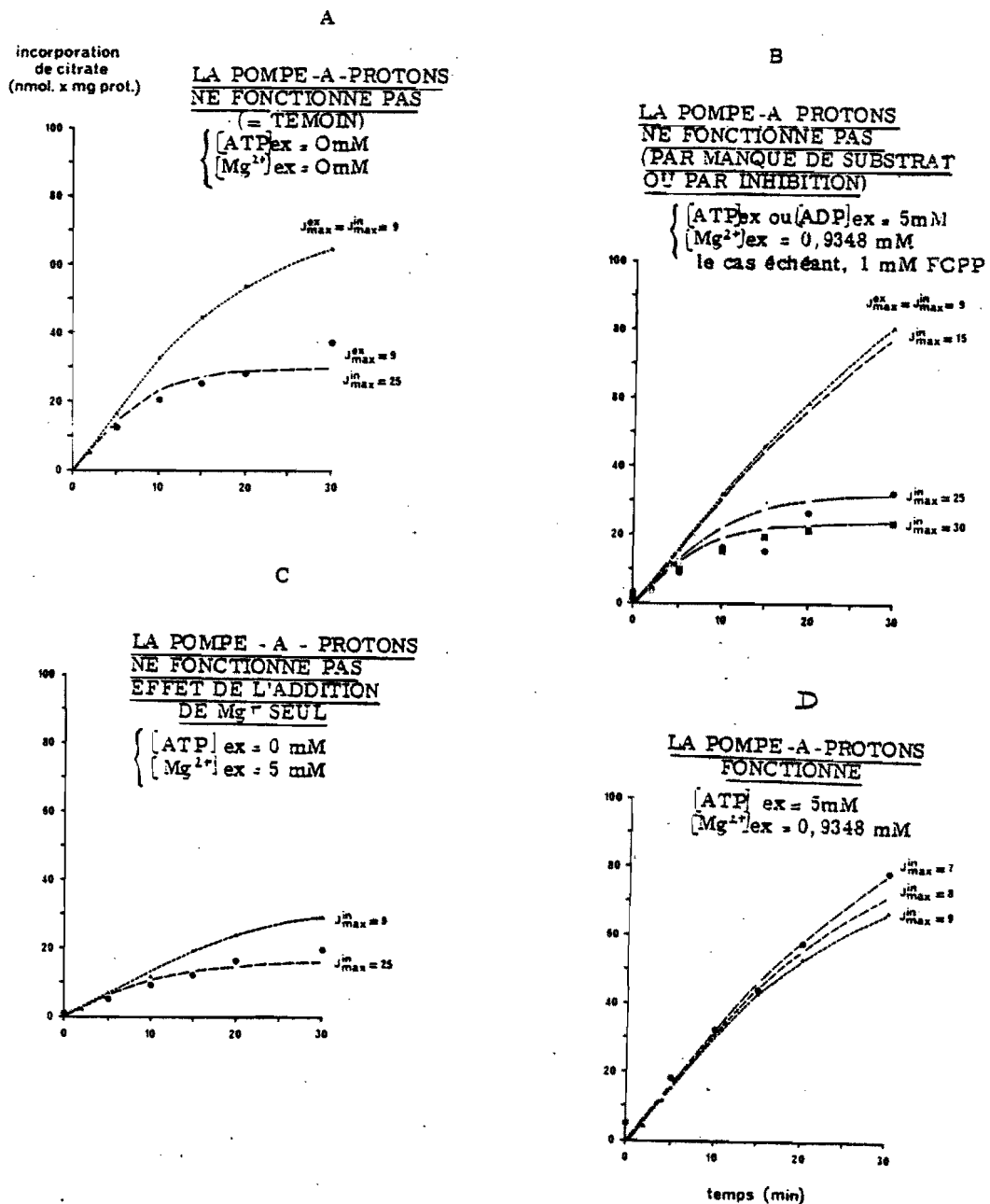


Figure 8 23

**INFLUENCE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE SUR**  
**L'INCORPORATION DE CITRATE DANS L'HYPOTHESE**  
**D'UNE MODIFICATION DU FLUX MAXIMUM**

Dans le cadre de l'hypothèse du fonctionnement du transporteur du citrate selon un mécanisme antiport  $RH^{2-}/H^+$  et en absence de couplage avec un flux de  $Mg^{2+}$ , les simulations sont effectuées en reprenant les conditions initiales décrites dans la légende des Figures 14, 15 et 16. Toutefois, la pompe à protons ne fonctionne pas dans les motifs A, B et C. Le pH interne est 8,91. Les autres conditions sont portées directement sur les courbes.  $J_m$  est exprimé en  $\text{nmol.} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  prot.

Par ailleurs, les symboles suivants sont employés : (•) pour les valeurs expérimentales obtenues (cf. Figure 7.12, courbe B) et (■) pour le motif (5 mM ATP- $Mg^{2+}$ + 1 mM FCPP) (courbe B) correspondant à des résultats non présentés dans ce travail (B. MARIN et al, 1981).

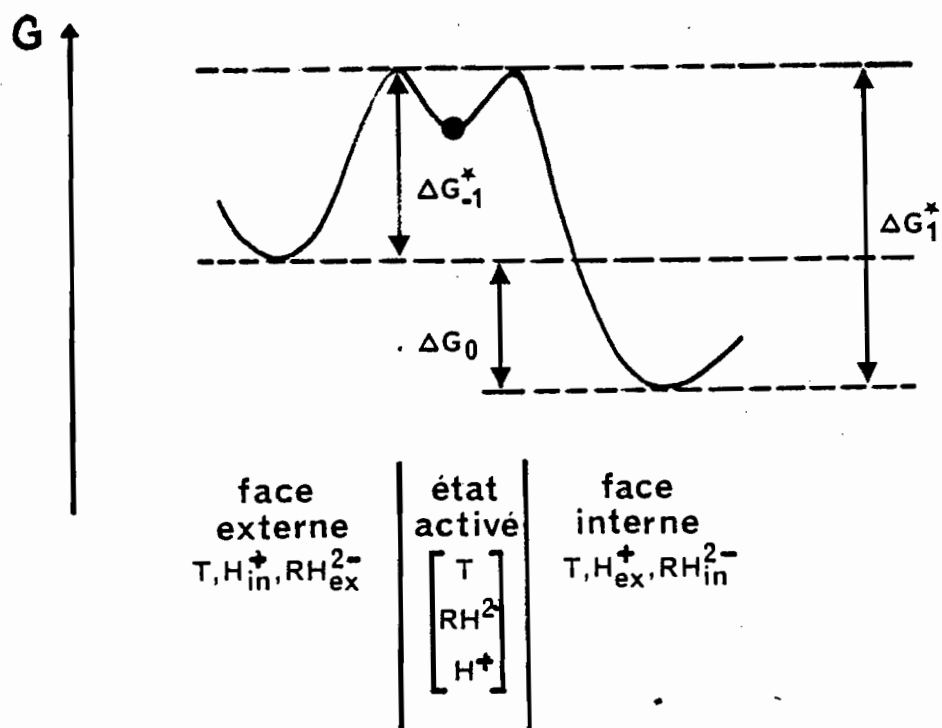


Figure 8.24

VARIATIONS D'ENTHALPIES LIBRES STANDARDS ASSOCIEES

A LA DISSOCIATION DE LA FORME ACTIVEE DU TRANSPORTEUR

Ce schéma matérialise les variations d'enthalpies libres standards correspondant à la dissociation des formes activées du transporteur  $\bar{T}^+$ ,  $\Delta G_{-1}^*$  sur la face externe,  $\Delta G_1^*$  sur la face interne.

incorporation de citrate  
(exprimée en pour-cent  
de la valeur maximale)

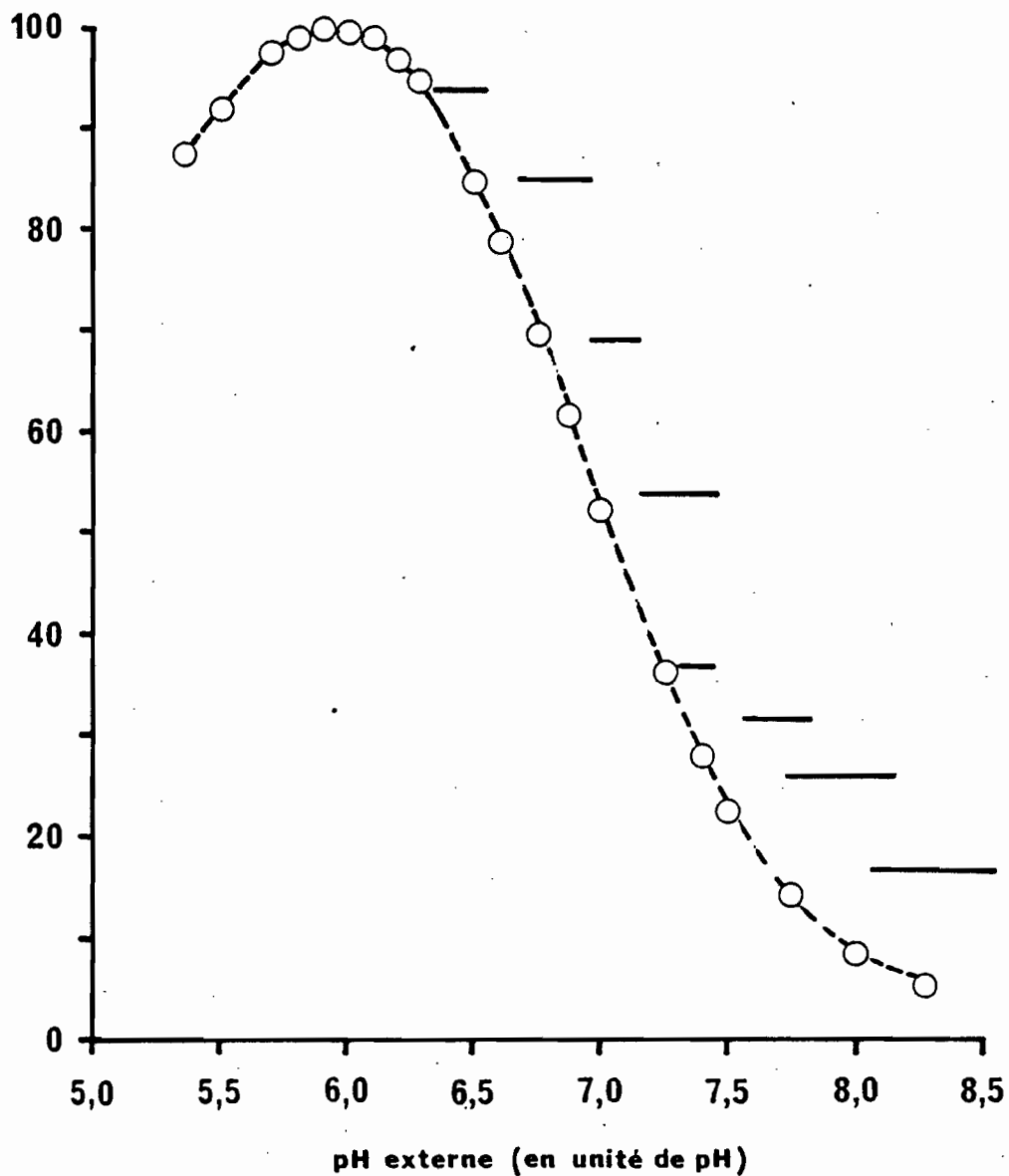


Figure 8.25

INFLUENCE DU pH EXTERNE SUR L'INCORPORATION DU  
CITRATE COMPARAISON ENTRE LA COURBE PREVUE PAR  
LE MODELE ET LES DONNEES EXPERIMENTALES

|                                                   | Compartment<br>lutoïdique<br>(isolé fraîchement du latex) |                        |                                              |                                                                      | Compartment<br>vésiculaire vacuo-lysosomal<br>(engendré à partir de<br>membranes lutoïdiques lyophilisées) |                  |                                              |  |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------|--|
|                                                   | [C]in<br>(en mM)                                          | [C]ex<br>(en mM)       | Potentiel<br>de Nernst<br>calculé<br>(en mV) | Origine<br>des données                                               | [C]in<br>(en mM)                                                                                           | [C]ex<br>(en mM) | Potentiel<br>de Nernst<br>calculé<br>(en mV) |  |
| K <sup>+</sup>                                    | 112,8<br>104                                              | 93,3<br>122            | - 4,8<br>+ 4,1                               | M. COUPE (1977)<br>D. RIBAILLIER (72)                                | -                                                                                                          | -                |                                              |  |
| Mg <sup>2+</sup>                                  | 64,3<br>33,1                                              | 17,8<br>1,19           | -16,5<br>-42,8                               | M. COUPE (1977)<br>D. RIBAILLIER (72)                                | 5                                                                                                          | 0,01 à 0,05      | -59,2 à -79,9                                |  |
| H <sup>+</sup>                                    | -                                                         | -                      | - 30 à - 60                                  | Valeur<br>statistique                                                | -                                                                                                          | -                |                                              |  |
| Ca <sup>2+</sup>                                  | 1,34                                                      | 0,56                   | -11,2                                        | M. COUPE (1977)                                                      | -                                                                                                          | -                |                                              |  |
| Na <sup>+</sup>                                   | Pas de<br>traces                                          | Pas de<br>traces       |                                              | M. COUPE (1977)                                                      | -                                                                                                          | -                |                                              |  |
| PO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>acido-<br>soluble | 40<br>65<br>50                                            | 15,5<br>5,4<br>10 à 15 | +24,4<br>+64,0<br>+ 31 à + 41,4              | D. RIBAILLIER (72)<br>M. COUPE (1977)<br>J.L. JACOB (comm.<br>pers.) | 10 à 15                                                                                                    | 0,2 à 0,3        | +90,2 à +114,0                               |  |
| Acide<br>malique                                  | 10 à 20                                                   | 8 à 20                 | A la valence<br>près, de :<br>+17,8 à +23,6  | J.L. JACOB (comm.<br>pers.)                                          |                                                                                                            |                  |                                              |  |
| Acide<br>citrique                                 | 30 à 60                                                   | 1,5                    | A la valence<br>près, de :<br>+ 77 à + 94,8  | J.L. JACOB (comm.<br>pers.)                                          | 5                                                                                                          | 5                | A la valence<br>près, de :<br>- 60 à - 90    |  |

Tableau 8.I

# COMPARTIMENTATION IONIQUE DES LUTOIDES ET DES VESICULES VACUO-LYSOSOMALES

Le potentiel de Nernst est calculé à partir des activités  
externe et interne de chaque ion j, et la température de 25°C, selon  
la relation :

$$E_{nj} = E_{in} - E_{ex} = \frac{RT}{Z_j F} \ln \frac{a_j^{ex}}{a_j^{in}} = \frac{59,2}{Z_j} \log \frac{a_j^{ex}}{a_j^{in}} \text{ (en mV)}$$

En supposant que la distribution transmembranaire est à l'équilibre.  
Dans cette approximation, la concentration est identifiée à l'activité  
(le coefficient d'activité étant supposé égal à l'unité). Le terme Z<sub>j</sub>  
représente la valence de l'ion considéré.

| Concentration du milieu<br>d'incubation en citrate<br>(mM)                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |               |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Concentration<br>du milieu<br>d'incubation<br>en ATP-Mg <sup>2+</sup><br>(mM) | 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 30-50                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |               |
|                                                                               | Effet sur ΔV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Effet sur ΔpH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Effet sur ΔV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Effet sur ΔpH |
| 0                                                                             | - Hyperpolarisation<br>au plus de 25 mV<br>au bout de 20 mn<br>à 30°C<br>(Fig. 8.5, courbe<br>A)<br>- Possibilité d'une<br>dépolarisation du<br>même ordre de<br>grandeur (25 mV)<br>(Fig. 6.7, courbes<br>A et B)<br>mais elle n'est<br>pas spécifique de<br>l'addition du ci-<br>trate : elle est<br>observée sur le<br>motif témoin<br>(Fig. 6.7, courbes<br>A et B) | - pH ex est cons-<br>tant si le pou-<br>voir tampon du<br>milieu d'incuba-<br>tion est suffi-<br>sant<br>(Fig. 8.5,<br>courbes D et E)<br>- Acidification du<br>milieu d'incuba-<br>tion si ce pou-<br>voir tampon est<br>insuffisant.<br>- pH in peut deve-<br>nir légèrement<br>alcalin (en mi-<br>lieu phosphate)<br>- pH in est norma-<br>lement constant<br>(Fig. 6.1, cour-<br>bes A et B, Fig.<br>6.2.) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |               |
| 5                                                                             | - Dépolarisation de<br>l'ordre de -90 mV<br>(Fig. 6.7, courbe<br>B) excédant celle<br>du témoin de 65mV<br>(même ordre de<br>grandeur que la<br>dépolarisation in-<br>duite par l'addi-<br>tion d'ATP-Mg <sup>2+</sup> )<br>(Comparaison avec<br>la Fig. 6.10).                                                                                                         | - Acidification du<br>milieu d'incuba-<br>tion si son pou-<br>voir tampon est<br>insuffisant<br>(Fig. 7.11, cour-<br>be A).<br>- Acidification du<br>milieu intra-<br>vésiculaire<br>(Fig. 6.1., cour-<br>be B, et Fig.<br>6.2.) estimée<br>de l'ordre de<br>0,3 à 0,5 unités<br>de pH (Fig. 6.1,<br>courbe B).                                                                                                | - Dépolarisation<br>instantanée de<br>l'ordre de -30<br>à -50 mV<br>(Fig. 8.5, cour-<br>be C).<br>- Alcalinisation du<br>milieu intra-<br>vésiculaire<br>(Fig. 8.5, cour-<br>be F) estimée à<br>1 unité de pH<br>- Alcalinisation du<br>milieu interne<br>fonction de la<br>concentration ex-<br>terne (Fig. 8.9,<br>courbes A et B). |               |

Tableau 8. II

CARACTERE ELECTROGENE DU TRANSPORT  
DU CITRATE

Ce tableau a pour but de récapituler les différentes observations démontrant le caractère électrogène du transport du citrate.

| Paramètres                                                           | Conditions                                                       |                  | Conditions dans les vésicules :  |                                                |                                            |                                                              |                                              |  |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--|
|                                                                      | dans le milieu<br>d'incubation                                   | (1)<br>Optimales | (2)                              | (3)                                            | (4)                                        | (5)                                                          | (6)                                          |  |
|                                                                      |                                                                  |                  | l'ATPase<br>ne fonctionne<br>pas | Idem à (1)<br>sauf que<br>$\Delta V = -100$ mV | Idem à (1)<br>sauf que<br>$\Delta \mu = 0$ | Idem à (1)<br>sauf que<br>l'antiport<br>ne fonctionne<br>pas | Idem à (1)<br>sauf que<br>mais<br>(Mg)in = 0 |  |
| pH                                                                   | 7,5                                                              | 6,0              | 6,9                              | 6,0                                            | 7,5                                        | 6,0                                                          | 6,0                                          |  |
| $\Delta V$                                                           | 0                                                                | -10 mV           | -100 mV                          | -100 mV                                        | -10 mV                                     | -10 mV                                                       | -10 mV                                       |  |
| [citrate]                                                            | 5 mM                                                             | 2,5 mM           | 2,5 mM                           | 2,5 mM                                         | 2,5 mM                                     | 2,5 mM                                                       | 2,5 mM                                       |  |
| [Mg <sup>2+</sup> ] libre                                            | 0                                                                | 2,5 mM           | 2,5 mM                           | 2,5 mM                                         | 2,5 mM                                     | 2,5 mM                                                       | 0 mM                                         |  |
|                                                                      | ou 0,9348 mM lorsque<br>5 mM ATP-Mg <sup>2+</sup><br>est ajouté. |                  |                                  |                                                |                                            |                                                              |                                              |  |
| 1) Hypothèse d'un flux non couplé avec le flux de Mg <sup>2+</sup> . |                                                                  |                  |                                  |                                                |                                            |                                                              |                                              |  |
| $\bar{Z} = -1$                                                       | -                                                                | 95,3             | 2,7                              | 3,7                                            | 42,2                                       | 5,4                                                          | 75,0                                         |  |
| $\bar{Z} = -3$                                                       | -                                                                | 43,1             | 0                                | 0                                              | 22,1                                       | 2,1                                                          | 27,6                                         |  |
| 2) Hypothèse d'un flux couplé avec le flux de Mg <sup>2+</sup> .     |                                                                  |                  |                                  |                                                |                                            |                                                              |                                              |  |
| $\bar{Z} = -1$                                                       | -                                                                | 399,6            | 0                                | 1,8                                            | 114,3                                      | 2,7                                                          | 291,3                                        |  |
| $\bar{Z} = -3$                                                       | -                                                                | 72,6             | 0                                | 0                                              | 21,0                                       | 0,9                                                          | 32,4                                         |  |

Tableau 8. III

CAPACITE D'ACCUMULATION DU CITRATE

PAR UN COMPARTIMENT VESICULAIRE VACUOLAIRE