

REFERENCES

- ¹ R. F. BEERS, JR. AND R. F. STEINER, *Nature* 179 (1957) 1076.
- ² D. FRENCH AND J. T. EDSALL, *Advances in Protein Chem.*, 2 (1945) 301.
- ³ H. FRAENKEL-CONRAT, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 307.
- ⁴ G. WIENER, E. L. DUGGAN AND F. W. ALLEN, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 163.
- ⁵ J. F. WALKER, *Formaldehyde*, 2nd ed., Reinhold Publishing Corp., New York, 1953, p. 382.
- ⁶ M. LEVY, *J. Biol. Chem.*, 99 (1933) 767.
- ⁷ R. J. L. ALLEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 858.
- ⁸ R. AMMON AND K. HINSBERG, *Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's*, 239 (1936) 207.
- ⁹ J. F. KOERNER AND R. L. SINSHEIMER, *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 1049.
- ¹⁰ R. M. BOCK, NAN-SING LING, S. A. MORELL AND S. H. LIPTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62 (1956) 253.
- ¹¹ E. BAUER, *Helv. Chim. Acta*, 24 (1941) 1018.
- ¹² D. O. JORDAN, in E. CHARGAFF AND J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 459.
- ¹³ J. J. FOX AND D. SHUGAR, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 369.
- ¹⁴ P. T. GILHAM AND H. G. KHORANA, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 6212.

Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 62-70

ÉTUDES CINÉTIQUES SUR LA GALACTOSIDE-PERMÉASE D'ESCHERICHIA COLI

A. KEPES

Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris (France)

Reçu le 12 Août, 1959)

SUMMARY

Kinetic studies on the galactoside-permease in E. coli

Galactoside-permease positive *E. coli* accumulates radioactive thiogalactosides in the intracellular space until a steady state is reached. Measurement of the steady state concentration level, of the affinity, and of the rate of turnover in the steady state makes possible the calculation of the activity of the mechanism of uptake and of the rate constant of passive exit. The entry mechanism is catalytic; it is coupled with metabolic energy donors. The energy consumption corresponds to the hydrolysis of one mole of ATP per mole of TMG flowing inward. Passive exit is not by free diffusion, but can be understood as a carrier diffusion.

A model is proposed which is compatible with the observed behaviour of the entry and exit parameters under various conditions.

INTRODUCTION

Un nombre sans cesse croissant de phénomènes de perméation sélective, de transport actif à travers des membranes biologiques pluricellulaires, de concentration ou

Abréviations utilisées: TMG, méthyl-thio- β -D-galactoside; TDG, galactosyl-thio- β -D-galactoside; TPG, phényl-thio- β -D-galactoside; DNP, 2,4-dinitrophénol; pCMB, p-chloro-mercurobenzoate; ATP, acide adénosine triphosphorique.

Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 70-84

d'extrusion de substances par des cellules ont été décrits. L'importance de ces phénomènes dans les régulations biologiques est évidente. Le mécanisme de tels phénomènes a fait l'objet de nombreuses spéculations, cependant les structures essentielles pour la sélectivité de la perméation ou pour le couplage énergétique, dans le cas de transport actif, n'ont jamais pu être identifiées.

Les perméases bactériennes décrites par RICKENBERG, COHEN, MONOD ET BUTTIN¹ offrent un sujet particulièrement favorable à l'étude d'un tel mécanisme. L'objet du présent travail, la galactoside-perméase, de par sa stéréospécificité, par sa synthèse inductible et par l'existence de mutants simples est particulièrement bien individualisée. Elle offre en outre des facilités techniques grâce à l'utilisation de thio-galactosides non métabolisables et radioactifs, et grâce au débit élevé de perméation qui permet de mesurer les besoins énergétiques du processus.

On sait¹ que la concentration de substrat intracellulaire en régime stationnaire obéit à la relation* :

$$G_{in} = Y \frac{G_{ex}}{K_m + G_{ex}} \quad (1)$$

qui pouvait résulter soit de l'adsorption des galactosides sur Y sites spécifiques ($\mu\text{moles/g}$) avec une constante d'affinité de $1/K_m$ soit d'un mécanisme d'entrée catalytique obéissant à la loi de Michaelis avec une constante K_m . La vitesse de cette réaction d'entrée

$$V_{in} = V_{in}^{\max} \frac{G_{ex}}{K_m + G_{ex}} \quad (2)$$

doit être compensée en régime stationnaire par une sortie passive proportionnelle au gradient de concentration**

$$V_{ex} = G_{in} k_{ex} \quad (3)$$

En régime stationnaire $V_{in} = V_{ex}$ donc

$$G_{in} = \frac{V_{in}^{\max}}{k_{ex}} \frac{G_{ex}}{K_m + G_{ex}} \quad (4)$$

Cette équation est formellement identique à (1) sauf que Y , la capacité à saturation n'est plus un paramètre intrinsèque du système mais un quotient V_{in}^{\max}/k_{ex} pouvant être variable.

Les premières études cinétiques ont permis d'éliminer l'hypothèse d'adsorption et d'étayer l'hypothèse d'un mécanisme catalytique².

L'étude des vitesses d'entrée, de renouvellement et de sortie dans des conditions variées peut alors mettre en évidence des variations indépendantes de ces processus, l'entrée catalysée et la sortie passive, et jeter quelque lumière sur leur nature.

La constatation d'une consommation accrue d'oxygène liée au fonctionnement de

Symboles utilisés: G , un β -galactoside ou β -thiogalactoside, substrat de la perméase ou sa concentration. G_{in} , G_{ex} , concentration dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. K_m , concentration de demi-saturation. Y , G_{in}^{\max} , concentration intracellulaire à l'équilibre pour une concentration externe saturante ou "capacité spécifique". V , vitesse de réaction; k , constante de vitesse de réaction. Les indices "in" et "ex" se réfèrent à des réactions d'entrée ou de sortie respectivement. $t_{1/2}$, temps de demi-équibration ou demi-échange.

** On néglige G_{ex} devant G_{in} . Ceci introduit une erreur de l'ordre de 1 % ou moins.

la perméase³ entraîne la question: la concentration des galactosides par la perméase est-elle un transport actif? ou en termes plus concrets; les galactosides accumulés sont-ils sous la même forme moléculaire que dans le milieu, l'énergie dépensée apparaît-elle sous forme de travail osmotique ou sous forme d'énergie de liaison avec un constituant cellulaire à définir? Rien ne permet à l'heure actuelle d'affirmer la seconde hypothèse. Par contre la contribution osmotique des galactosides intracellulaires⁴ est un fort argument en faveur du transport actif.

Enfin la pénétration passive des galactosides dans les cellules dépourvues de perméase pouvait offrir un modèle de perméation passive dont la comparaison avec le mécanisme passif de sortie des galactosides dans les cellules où la perméase fonctionne pouvait être fructueux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences rapportées ont été faites sauf indication contraire avec la souche ML308 à perméase constitutive et la souche ML3 dépourvue de perméase.

Les microbes sont cultivés en milieu minéral liquide avec du succinate de potassium ou du glucose comme source de carbone et agités à 34°. Ils sont récoltés par centrifugation au cours de la phase de croissance exponentielle et resuspendus à une densité de 200 µg/ml environ dans du milieu minéral, additionné de succinate de potassium à 4 g/l et de chloromycétine à 50 µg/ml. La suspension est agitée à la température de l'expérience au moins 15 min avant l'addition de substrat.

Les substrats utilisés ont été: Le méthylthio β -galactoside ou TMG; le β -D-thiogalactoside β -D-galactoside (thiodigalactoside) TDG; le phénylthio β -D-galactoside TPG; le lactose (glucose 6- β -D-galactoside).

Les thiogalactosides radioactifs ont été marqués par ³⁵S (TDG et TPG) ou par ¹⁴C dans le méthyle (TMG).

A des temps variables après l'addition du substrat radioactif à la suspension agitée des portions de 1 ml sont prélevées et filtrées sur filtres millipore. Préalablement le filtre mis en place est recouvert de 5-6 ml de milieu minéral à 0°. La suspension mélangée à ce volume est instantanément refroidie. Ce moment considéré comme le temps exact du prélèvement est défini à 2-3 sec près. La filtration est suivie de deux rinçages avec 2 ml de milieu glacé. Le milipore est ensuite séché et sa radioactivité est mesurée sans autre manipulation. La concentration intracellulaire de lactose a été mesurée, après élution à l'eau bouillante, par la méthode de SOMOGYI-NELSON.

La consommation d'oxygène a été mesurée par l'électrode à goutte de mercure à tension constante — 0.6 V contre l'électrode au calomel saturé.

Le dégagement de ¹⁴CO₂ a été mesuré après entraînement par air décarbonaté sur des microabsorbants de soude.

RÉSULTATS

Renouvellement

La Fig. 1 représente une expérience cinétique d'accumulation (A) et d'échange (B et C) en régime stationnaire du TMG à la concentration de $1 \cdot 10^{-3}$ M. Pour ces deux dernières (B et C) le TMG non radioactif est ajouté aux microbes au temps 0, et le TMG marqué après 30 et 160 min respectivement, sans changer la concentration

finale de TMG. On observe: (a) Que la totalité du TMG est échangeable, les plateaux des courbes A, B et C se rejoignent. (b) Que l'échange se fait à la même vitesse que l'équilibration initiale. La vitesse de la réaction d'entrée est donc pratiquement indépendante de la concentration intracellulaire.

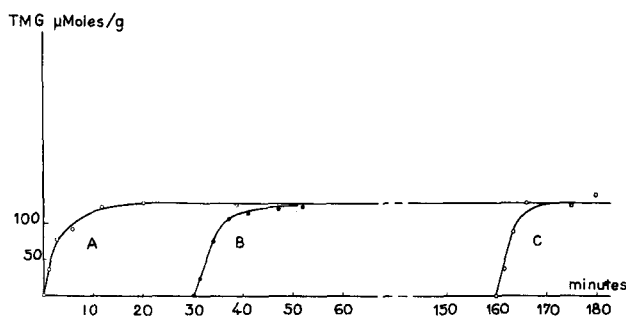


Fig. 1. Cinétique d'entrée du TMG (A) et cinétique d'échange en régime stationnaire (B et C) ML 308 suspendu dans un milieu minéral maltosé. Concentration de TMG 10^{-3} M partout température, 15° .

Détermination des paramètres

La Fig. 2 représente une expérience d'échange de TDG en régime stationnaire à deux concentrations différentes:

On voit que les pentes initiales sont proportionnelles aux concentrations atteintes à l'équilibre.

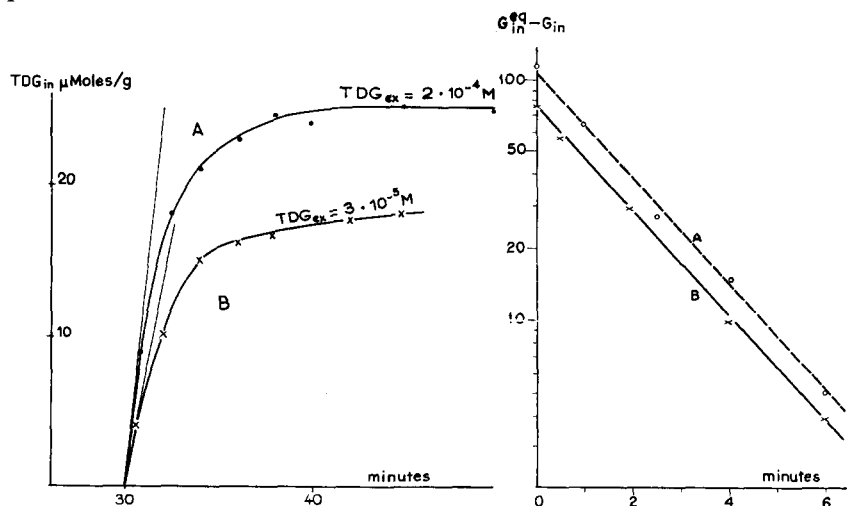


Fig. 2. A gauche cinétique d'échange du TDG. ML 308 dans milieu minéral maltosé, TDG $2 \cdot 10^{-4}$ M (A) et $3 \cdot 10^{-5}$ M (B); Température, 26° . A droite même expérience représentée selon l'équation (5).

La forme de ces courbes est exponentielle et représentée comme

$$\log (G_{in}^t - G_{in}^{\infty}) = f(t)$$

donne les droites de la Fig. 2b. De ces droites il est facile de déterminer $t_{1/2}$, le temps de demiéquilibration.

La vitesse initiale d'échange ou la pente à l'origine des courbes de la Fig. 2a

$$V_{\text{in}} = G_{\text{in}}^{\infty} \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (5)$$

En comparant l'équation (4) et l'équation (5), on trouve

$$k_{\text{ex}} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (6)$$

On voit donc que si la mesure des concentrations intracellulaires en régime stationnaire en fonction de la concentration extracellulaire de galactoside permet la détermination graphique de Y et de K_m une expérience cinétique permet la détermination de $t_{1/2}$ et par conséquent de k_{ex} . La vitesse d'entrée à saturation est donnée par:

$$V_{\text{in}}^{\text{max}} = Y k_{\text{ex}} \quad (7)$$

G_{ex} et K_m sont exprimés en moles/l, G_{in} et Y en $\mu\text{moles/g}$ de matière sèche microbienne.

Si on veut considérer le rapport des concentrations extra et intra cellulaires, il faut faire intervenir le volume disponible.

La limite supérieure du rapport de concentration est atteinte pour les faibles valeurs de G_{ex} et G_{in} , elle est égale à la tangente à l'origine de la courbe hyperbolique.

$$G_{\text{in}} = f(G_{\text{ex}}), \text{ equation (1)}$$

ce rapport est:

$$R = (Y/K_m) \times (\text{poids sec/volume disponible}) \quad (8)$$

Le Tableau I résume les paramètres ainsi définis pour TMG, TDG, TPG vis-à-vis de la perméase de ML 308 à 26°. On peut remarquer qu'aucun couple de paramètres fondamentaux ne présentent de corrélations évidentes. Le substrat ayant la plus forte affinité est le TDG, le substrat correspondant à la plus grande capacité est le TMG et le substrat dont la sortie est la plus rapide est le TPG. La vitesse de renouvellement du TPG est si rapide que seule une limite inférieure peut être évaluée. R est plus élevé pour TDG que pour les deux autres substrats (le rapport poids sec/volume a été évalué à 0.25).

Les valeurs de Y et les paramètres qui en découlent sont sujets à des variations importantes d'une culture à l'autre, selon les souches, et naturellement selon le degré

TABLEAU I
CARACTÉRISTIQUES DE LA GALACTOSIDE-PERMÉASE DE *E. coli* ML 308
POUR TROIS THIOGALACTOSIDES À 26°

Substrat	TMG	TDG	TPG
Constante de Michaelis K_m (moles/l)	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$
Capacité Y ($\mu\text{moles/g}$)	160	40	32
Temps de demiéquilibration $t_{1/2}$ (min)	0.75	1.35	< 0.25
Vitesse initiale maximum d'entrée en régime $V_{\text{in}}^{\text{max}}$	148	20.4	> 86
k_{ex} (ml/g/min)	0.82	0.59	> 2.7
Rapport de concentration maximum R	65	400	26

d'induction pour les souches inductibles, Les valeurs relatives de ces paramètres pour les trois substrats, les K_m et les $t_{1/2}$ par contre sont des caractéristiques du système. L'accumulation du lactose par la souche W2244 qui ne l'utilise pas, atteint 550 $\mu\text{moles/g}$ à $+4^\circ$ pour une concentration de $5 \cdot 10^{-3} M$ dans le milieu, soit 20 % de la matière sèche cellulaire.

La chromatographie sur papier a montré que le seul sucre réducteur détectable était le lactose.

Les besoins énergétiques

L'accumulation des galactosides étant inhibée par les inhibiteurs de la phosphorylation oxydative comme le 2,4-DNP ou l'azide de sodium, l'influence du fonctionnement de la galactoside-perméase sur la consommation d'oxygène a été mesuré par l'électrode à goutte de mercure. La chloromycétine a été omise au cours de ces expériences à cause de son interférence polarographique. De même a été omis le substrat carboné pour éviter que le faible accroissement de Q_{O_2} dû au fonctionnement de la perméase ne soit masqué par une respiration de base intense. Les fluctuations de ces mesures sont beaucoup plus importantes que pour la détermination de l'activité de la perméase.

Dès l'addition du thiogalactoside, la respiration s'accélère et reste constante ensuite pendant 30 à 40 min.

Si la concentration de thiogalactoside n'est pas saturante pour la perméase, une addition supplémentaire provoque une nouvelle augmentation du Q_{O_2} .

Le Q_{O_2} endogène, 5 à 10 $\mu\text{moles/g}$ de matière sèche par minute, est soustraite par convention pour la détermination du Q_{O_2} dû au fonctionnement de la perméase.

Tous les Q_{O_2} ont été extrapolés à concentration saturante de substrat, en prenant les K_m déterminés pour la perméase. Leur moyenne pour TMG est de 8.9 $\mu\text{moles d'oxygène}$ avec une erreur standard $\pm 3 \mu\text{moles/g/min}$ pour 16 déterminations. La valeur pour TPG est de $15.0 \pm 3.4 \mu\text{moles/g/min}$ sur 12 déterminations.

Les souches dépourvues de perméase, ML 30 non induit ou ML 3, ne présentent aucun accroissement de leur Q_{O_2} par addition de thiogalactoside.

Le parallélisme de l'"extra-oxygène" avec le fonctionnement de la perméase est donc à la fois qualitatif et quantitatif. Pour exclure la possibilité qu'une impureté présente dans le substrat soit la cause de cette consommation d'oxygène, nous avons examiné le dégagement de CO_2 pour savoir s'il provenait du substrat ou des microbes.

Ce dégagement de $^{14}CO_2$ d'une suspension lavée de microbes, cultivés sur $[^{14}C]$ -fructose a été mesuré en l'absence et en présence de TMG et de TPG non radioactifs. Comme le montre la Fig. 3 le dégagement de $^{14}CO_2$ s'est accru d'un facteur de 1.75 par addition de TMG $2 \cdot 10^{-3} M$, et d'un facteur de 2.5 par addition de TPG $10^{-3} M$ (nous n'avons pas déterminé les valeurs absolues des Q_{CO_2}). Ces augmentations sont du même ordre que celles du Q_{O_2} pour les deux mêmes substrats.

Ces expériences montrent que le fonctionnement de la galactoside-perméase stimule les oxydations cellulaires. Il semble que cette stimulation soit en corrélation avec les besoins énergétiques du transport de galactoside. D'autre part, ces besoins semblent proportionnels à la vitesse de renouvellement, ils ne cessent pas, une fois le régime stationnaire atteint.

Cependant il n'était pas exclu, qu'une partie de l'échange en régime stationnaire put se faire sans faire appel à l'énergie métabolique. Un léger excès de consommation

d'oxygène, limité à la première minute des mesures, a pu échapper à l'observation.

Une expérience cinétique avec 2,4-dinitrophénol comme inhibiteur permet de trancher ce problème. La Fig. 4 représente une telle expérience. On voit que 5 min après l'addition du DNP l'échange représente encore 62 % de celui observé avant

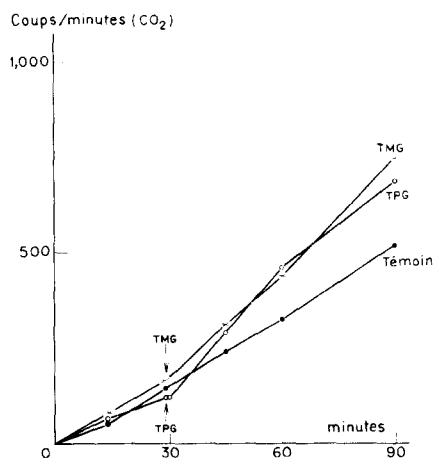


Fig. 3. Dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ en fonction du temps. ML 308 cultivée sur $[^{14}\text{C}]$ fructose lavé et suspendu dans un milieu minéral sans source de carbone extérieure. Température, 21° . TMG $2 \cdot 10^{-3} M$, TPG $10^{-3} M$.

l'addition de l'inhibiteur, alors qu'après le même temps d'action du DNP la vitesse d'entrée est réduite à 28 % du témoin. Si on considère que la source d'énergie résiduelle est la même dans les deux expériences, c'est-à-dire suffisante pour assurer 28 % de la vitesse initiale on arrive à la conclusion qu'une fraction de l'ordre de 34 % de l'échange en régime stationnaire peut se faire sans nouvel apport d'énergie métabolique. Si on transpose ce résultat au TMG dans les conditions des mesures respirométriques, on trouve un rapport $\text{TMG}/\text{O} = 60/(17.8 \pm 6) = 3.8 \pm 1.3$. Si on considère que V_{in} du TMG est plutôt surévalué dans les conditions des expériences respirométriques en carence carbonée, on doit assigner au rapport TMG/O la valeur la plus probable de 3 qui pourrait refléter l'utilisation des liaisons pyrophosphate de haute énergie dans le processus de transport.

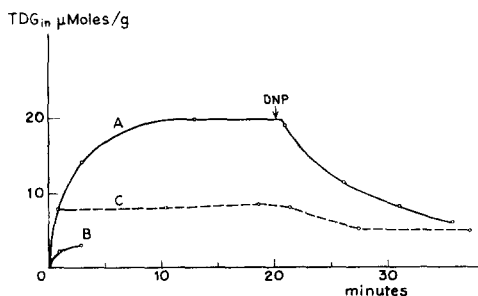


Fig. 4. Cinétique d'entrée du TDG et sortie après addition de DNP $2 \cdot 10^{-3} M$ (A). Cinétique d'entrée du TDG 5 min après l'addition de DNP (B.) Echange en 1 min dans des conditions identiques à A (C) ML 308 dans milieu minéral succinate. TDG $10^{-4} M$; Température, 26° .

Coefficient de température

La Fig. 5 représente deux expériences de renouvellement, de TMG d'une part, de TDG d'autre part à trois températures 34° , 24° et 14° . Il est frappant de voir que si la vitesse d'entrée des deux substrats varie, avec un Q_{10} de l'ordre de 2, la concentration atteinte en régime stationnaire est pratiquement indépendante de la température pour TDG, tandis qu'elle varie pour TMG en sens inverse de la température.

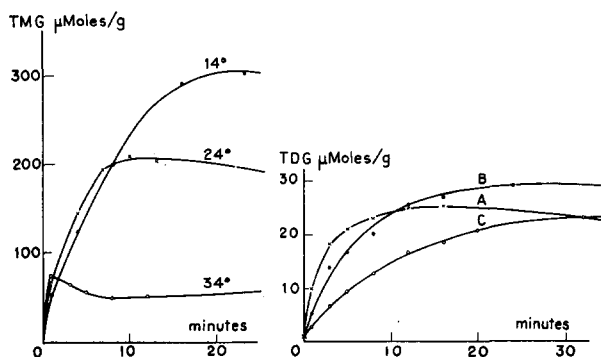


Fig. 5. Cinétique d'échange du TMG (10^{-3} M) et du TDG (10^{-4} M) à 3 températures différentes. ML 308 dans milieu minéral succinate.

On peut en déduire que la constante de vitesse de sortie a pour TDG un Q_{10} à peu près égal à celui de la vitesse d'entrée, alors que la sortie de TMG a un Q_{10} de l'ordre de 4.

Inhibiteurs

On a vu que sous l'action du 2,4-DNP, et il en est de même pour l'azide de sodium, l'accumulation des thiogalactosides est inhibée. Si l'inhibiteur est additionné après l'accumulation, la concentration intracellulaire baisse lentement. Ces agents agissent apparemment par inhibition du couplage énergétique et non pas directement sur le catalyseur spécifique. Les réserves cellulaires en composés pyrophosphoriques riches en énergie ainsi que la possibilité d'échanges avec conservation d'énergie peuvent expliquer la lenteur de l'effet observé. Un inhibiteur direct du mécanisme catalysant l'entrée devrait provoquer une sortie exponentielle ayant la même constante de temps que l'échange en régime stationnaire.

Le *p*-chloromercuribenzoate (*p*CMB) est un inhibiteur des groupements SH et à ce titre il inhibe de nombreux enzymes métaboliques. Cependant sous son action la vitesse de renouvellement des galactosides par la perméase décroît immédiatement et exponentiellement.

L'inactivation par le *p*CMB est irréversible et totale après un temps d'action suffisante. La vitesse d'inactivation dépend de la concentration de *p*CMB, mais pour une même concentration de l'inhibiteur, elle varie selon qu'un thiogalactoside est présent ou absent. La présence d'un thiogalactoside exerce un effet protecteur à peu près compétitif. Cette protection par le substrat spécifique qui ne réagit pas directement avec le *p*CMB suggère que l'action de ce dernier s'exerce directement sur la molécule porteuse des sites spécifiques, c'est-à-dire, la perméase proprement dite.

La Fig. 6 représente une expérience d'inhibition de la perméase par le *p*CMB

à la concentration de $10^{-4} M$. Le substrat est le TDG à la concentration de $10^{-4} M$. On voit la décroissance exponentielle de la vitesse de renouvellement qui contraste avec la lenteur et l'allure quasi linéaire de la sortie du TDG. Au moment où la vitesse de renouvellement est tombée à une valeur négligeable, la sortie de TDG est environ cinq fois plus lente que l'échange en régime stationnaire.

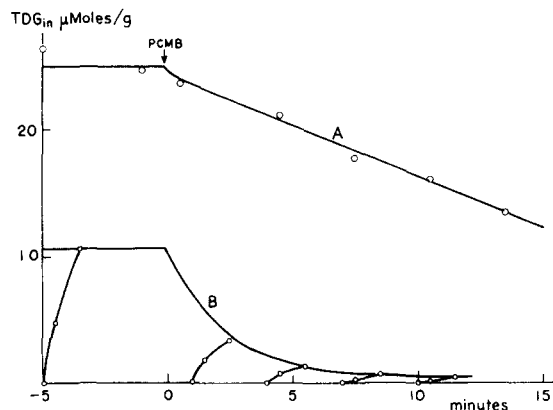


Fig. 6. Cinétique de sortie du TDG en équilibre, par addition de $pCMB$ $10^{-4} M$ (A) Echange après 45 sec et 90 sec dans les mêmes conditions (B) ML 308 milieu minéral succinate TDG $10^{-4} M$; Température, 26° .

Compétitions

On a vu au premier paragraphe que le niveau stationnaire est proportionnel à la vitesse de renouvellement pour un substrat donné à une température déterminée, et l'équation (4) montre que le coefficient de proportionnalité est $1/k_{ex}$.

La Fig. 7 représente, selon la méthode de LINEWEAVER ET BURK l'inhibition de la vitesse d'entrée et du niveau stationnaire de TMG par TDG à concentrations variables. La Fig. 8 représente dans les mêmes conditions l'inhibition de la vitesse d'entrée et du niveau stationnaire du TDG par TMG.

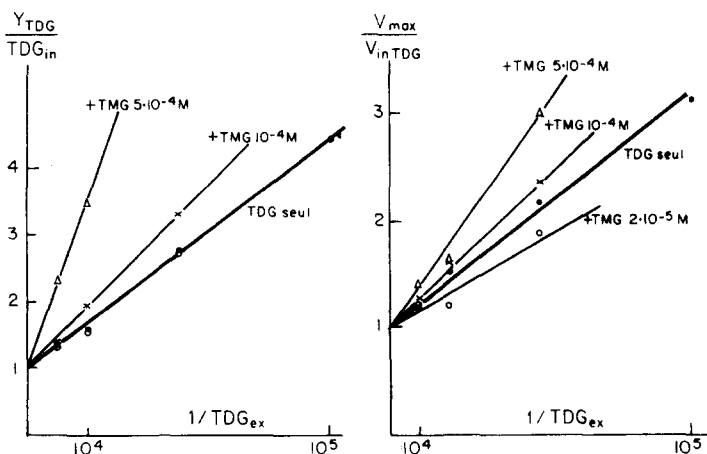


Fig. 7. Représentation selon LINEWEAVER ET BURK des concentrations intracellulaires en régime stationnaire (à gauche) et des vitesses d'entrée (à droite) de TDG en l'absence et en présence de TMG; Température, 26° .

On voit que le TMG inhibe davantage le niveau stationnaire que la vitesse d'entrée du TDG et inversement TDG inhibe davantage la vitesse d'entrée du TMG que son niveau d'équilibre.

Ceci implique que le coefficient de proportionnalité entre niveau d'équilibre et vitesse d'entrée: $1/k_{ex}$ de chaque substrat est modifié par la présence de l'autre

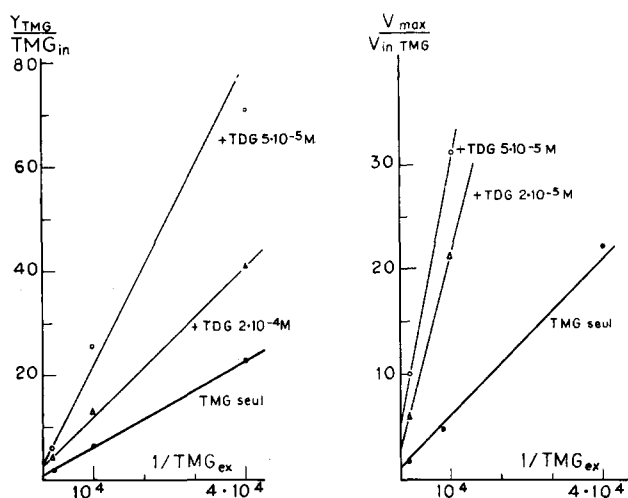


Fig. 8. Représentation selon LINEWEAVER ET BURK des concentrations intracellulaires en régime stationnaire (à gauche) et des vitesses d'entrée de TMG en l'absence et en présence de TDG; Température, 26°.

substrat en compétition. L'accélération du renouvellement du TDG en présence de TMG mesurée directement confirme cette interférence.

Une autre anomalie apparaît à l'examen des courbes de la Fig. 7. C'est aux très faibles concentrations de TMG que la vitesse de renouvellement du TDG n'est pas inhibée, mais au contraire, stimulée. Nous essayerons dans la discussion de donner une interprétation de ce phénomène.

Une autre inhibition atypique, celle exercée par le glucose sur la galactoside-perméase a été observée par HORECKER⁶. L'addition du glucose déprime le niveau d'accumulation des thiogalactosides. Une étude cinétique a montré que le glucose intervient essentiellement pour accélérer la sortie du thiogalactoside, son effet sur la vitesse d'entrée est faible ou nul.

Perméation passive dans les souches dépourvues de perméase

ML 3 dépourvue de galactoside-perméase ne concentre pas les galactosides, et la méthode expérimentale a dû être légèrement modifiée: des suspensions environ 10 fois plus concentrées ont été employées avec des prises d'essai de 0.1 ml de sorte que la contamination est diminuée d'un facteur de 10. Elle peut être estimée à moins de 10 % du plateau final.

La Fig. 9 montre la cinétique d'entrée du TMG à 3 concentrations différentes. Trois faits peuvent être déduits de cette expérience. Premièrement, le niveau final de concentration intracellulaire est proportionnel à la concentration dans le milieu.

Ensuite le temps d'équilibration est de l'ordre de 10 fois plus long que celui observé avec la perméase. Enfin, la concentration finale à l'équilibre correspond à un volume disponible de l'ordre de $1 \mu\text{l}/\text{mg}$ de cellules sèches, nettement plus faible que l'espace aqueux habituellement admis: environ $4 \mu\text{l}$.

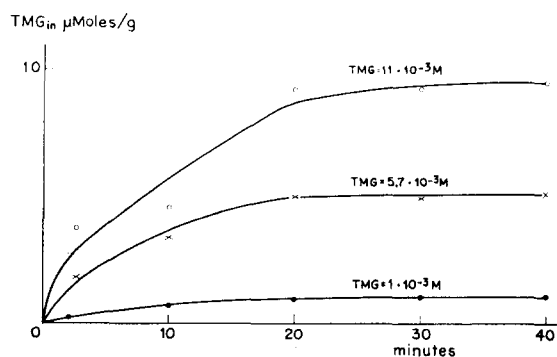


Fig. 9. Cinétique d'entrée du TMG dans la souche sans perméase ML3 à trois concentrations différentes; Température, 26° .

Comme on pouvait le prévoir par la proportionnalité des concentrations extra et intracellulaires, l'entrée d'un galactoside chez ML 3 n'est pas inhibé par la compétition d'un autre galactoside, de même il n'y a pas de déplacement après l'établissement de l'équilibre. Cependant le galactoside intracellulaire est échangeable contre le galactoside dans le milieu sensiblement à la même vitesse que l'entrée initiale.

Les inhibiteurs du métabolisme comme le DNP ainsi que le $p\text{CMB}$ sont sans effet sur la perméation du TMG comme le montre la Fig. 10. Cette même figure montre que l'addition du glucose diminue rapidement et considérablement le niveau intracellulaire de galactoside. Il s'agit là d'une véritable expulsion active qui est parallèle à l'effet du glucose sur les galactosides activement accumulés dans les souches à galactoside-perméase.

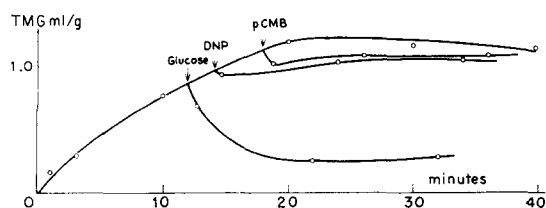


Fig. 10. Cinétique d'entrée du TMG dans la souche sans perméase ML3 (A). Déplacement par addition de glucose $2 \cdot 10^{-2} M$ (B). Effet de DNP $2 \cdot 10^{-3} M$ (C) et du $p\text{CMB}$ $10^{-4} M$ (D).

DISCUSSION

Il se dégage de l'ensemble des résultats que l'accumulation spécifique de galactoside ne peut être due à l'adsorption sur des sites intracellulaires spécifiques. Il suffit de considérer le Tableau I, qui montre combien est variable la capacité d'accumulation à saturation pour différents substrats, ou encore la Fig. 5 montrant que pour un même substrat la capacité varie largement avec la température. On peut donc affirmer

que l'action de la perméase est catalytique et, de plus, que les sites catalytiques spécifiques, gouvernant le phénomène, sont essentiellement accessibles au substrat extracellulaire et largement indépendants de la concentration intracellulaire. C'est pour un site accessible de l'extérieur qu'entrent en compétition les différents galactosides, puisque c'est leur concentration extracellulaire qui régit la compétition. Cette accessibilité de l'extérieur impose à ces sites catalytiques un rôle dans le transport du galactoside du dehors en dedans.

La nature possible d'un catalyseur de transport est jusqu'à nouvel ordre du domaine de la pure spéculation. On peut cependant inférer dans le cas de la galactoside-perméase, que la catalyse est du type enzymatique, étant donné le couplage énergétique. En effet l'utilisation de l'énergie métabolique implique la rupture d'une liaison riche en énergie qui n'a lieu qu'en présence de galactoside.

L'accélération respiratoire provoquée par le galactoside en présence de la perméase peut être la manifestation du contrôle respiratoire décrite par LARDY⁷ chez les mitochondries, qui est relevé par l'addition d'ADP, accepteur de phosphate. Il suffirait de supposer que l'action de la perméase aboutit directement ou indirectement à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP avec apparition d'une molécule d'ADP ce qui lèverait l'inhibition respiratoire. Le nombre de molécules de TMG transportées par atome d'oxygène consommé est parfaitement compatible avec l'utilisation de l'ATP ou d'un composé qui dérive de l'ATP molécule à molécule pour le transport d'une molécule de TMG.

Le travail thermodynamique pour le transport d'une mole de TDG dont le rapport de concentration est de l'ordre de 400, est de $\Delta F = 3600$ cal/mole donc l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP est largement suffisante.

Des unités énergétiques plus petites que l'ATP seraient plus économiques mais si une molécule d'ATP devait donner plus d'une de ces molécules donatrices d'énergie, le rapport TMG/O devrait être au moins égal à 6 ce qui est incompatible avec nos résultats.

L'hypothèse de transport actif est pratiquement inévitable en présence des données actuelles du problème. La contribution osmotique des galactosides intracellulaires ne peut s'expliquer en dehors de cette hypothèse qu'en supposant les galactosides intracellulaires chimiquement modifiés. Or la seule forme modifiée, le dérivé acétylé des thiogalactosides, qui s'observe dans les conditions où la perméase est fonctionnelle, représente une faible fraction des galactosides accumulés. Cette fraction varie considérablement d'un substrat à l'autre. Ce dérivé n'est pas détectable quand la perméase fonctionne en l'absence de source carbone. En tout état de cause les molécules de galactoside ayant subi un ou plusieurs cycles d'entrée et de sortie des cellules sont chimiquement inchangées, alors que le dérivé acétylé ne redonne jamais une quantité détectable du galactoside initial dans ces conditions.

Le modèle qui sans complications inutiles semble rendre compte de toutes nos observations est schématisé Fig. 11. Il représente la perméase comme un enzyme P qui agissant sur une molécule donatrice d'énergie $R \sim T$ et une molécule de galactoside G_{ex} activerait cette dernière. Cette activation pourrait être matérialisée par la combinaison du galactoside avec T , une molécule ou radical transporteur; GT ayant des caractéristiques physicochimiques lui permettant le passage de la barrière qui empêche la traversée du galactoside natif. La réaction $R \sim T + G \rightarrow GT + R$ serait pratiquement irréversible, et c'est sa vitesse qui est l'étape limitante pour

l'ensemble du phénomène. Cette vitesse elle-même dépend essentiellement de la concentration de G_{ex} , et non de celle de $R \sim T$ supposé toujours en excès. Il suffirait que cette molécule GT à l'intérieur de la cellule se désactive spontanément, ou se dissocie de son transporteur (il n'est pas nécessaire de postuler un second enzyme).

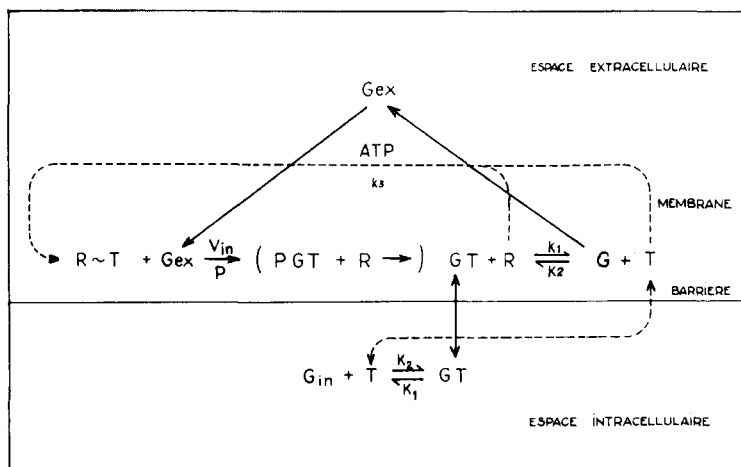


Fig. 11. Modèle de mécanisme proposé.

L'existence éphémère et en quantités catalytiques de la molécule activée expliquerait qu'on n'ait pu la mettre en évidence.

Il y a cependant deux faits qui tendent à montrer l'existence d'un complexe activé du substrat. Le premier est la possibilité d'échange avec conservation d'énergie, plus exactement la différence des degrés d'inhibition par une même dose de DNP de l'entrée et du renouvellement du TDG (Fig. 4). Cet échange peut avoir lieu au niveau du complexe activé lié ou non à l'enzyme. Le second argument peut être tiré du phénomène paradoxal de l'accélération de l'entrée du TDG en présence d'une très faible concentration de TMG (Fig. 7). Comme on sait que l'activation du TMG se fait 8 fois plus rapidement que celle du TDG (Tableau I) il suffit que le TDG en large excès puisse déplacer le TMG activé de son complexe pour pouvoir bénéficier en partie de sa vitesse d'activation, et surcompenser la compétition au niveau de la perméase.

Le mécanisme de sortie passive sous l'influence du gradient de concentration ne poserait pas de problème spécial en soi. Cependant la différence des constantes k_{ex} des souches avec ou sans perméase, l'augmentation de k_{ex} en présence de glucose, son abaissement par les inhibiteurs de l'entrée, le changement de k_{ex} du TDG quand il est en compétition avec TMG semblent exclure une sortie par simple diffusion. On ne voit en effet pas de raison plausible pour que la barrière de perméabilité modifie ses caractéristiques physiques de telle sorte que la diffusion du TDG soit accélérée, sans que soit changée celle du TMG.

Notre hypothèse est que la sortie des galactosides s'effectue par un processus de "diffusion facilitée"; c'est-à-dire à l'état complexe avec un transporteur qui rend franchissable la barrière de diffusion. Ce complexe serait dissociable et libérerait le galactoside natif à l'extérieur de la barrière. Dans la Fig. 13, ce complexe est représenté comme identique à GT qui permet l'entrée. Pour cela on suppose que la réaction $GT \rightleftharpoons G + T$ est réversible et spontanée et qu'elle peut avoir lieu sur la face externe

de la barrière, aussi bien que sur la face interne. L'équilibre serait de loin en faveur de la dissociation. Cette réaction réversible représente un mécanisme de sortie passive, sous la dépendance du gradient de concentration.

L'état stationnaire est caractérisé par le fait que tous les intermédiaires sont à concentration stable.

Sur la face externe:

$$\frac{d(GT)}{dt} = V_{in} + k_2 G_{ex} T - k_1 GT = 0 \quad (9)$$

Dans l'espace intracellulaire:

$$\frac{d(GT)}{dt} = k_1 GT - k_2 G_{in} T = 0 \quad (10)$$

d'où

$$GT = \frac{k_1}{k_2} G_{in} T \quad (11)$$

substitué dans (9)

$$V_{in} + k_2 G_{ex} T - k_2 G_{in} T = 0 \text{ on } G_{in} = G_{ex} + \frac{V_{in}}{k_2 T} \quad (12)$$

Si on considère que G_{ex} est négligeable devant G_{in} et que

$$V_{in} = V_{in}^{\max} \frac{G_{ex}}{K_m + G_{ex}}$$

on a:

$$G_{in} = \frac{V_{in}^{\max}}{k_2 T} \frac{G_{ex}}{K_m + G_{ex}} \quad (13)$$

formellement identique à l'équation (4), avec $k_{ex} = k_2 T_{in}$.

La constante de sortie est donc une constante de transport proportionnel au gradient dans la mesure où T_{in} est lui-même constant.

La constance de ce niveau de concentration de T doit être ajusté en régime stationnaire. Au début de l'équilibration T_{in} apparaît dans l'espace intracellulaire en quantité stœchiométrique avec G_{in} , en régime stationnaire par contre sa concentration doit être très inférieure à G_{in} pour expliquer la lenteur de la sortie en cas d'inhibition de la perméase.

En outre pour expliquer la stimulation de la sortie du TDG par TMG et la constance de k_{ex} pour un substrat donné il faut que T_{in} dépende plus de la nature du substrat que du degré de saturation de la perméase. Un des mécanismes possible d'un tel ajustement consiste à supposer que la quantité totale de T , la somme de $R \sim T$, GT et T libre est limitée.

Quand la perméase ne fonctionne pas, tout est sous la forme $R \sim T$.

En régime stationnaire $R \sim T$ est régénéré à partir de R et de T libre avec une vitesse égale à V_{in}

$$R \times T \times k_3 = V_{in} \quad (16)$$

Dans des conditions:

$$R = T + GT$$

or d'après (11) et (13)

$$GT = \frac{V_{in}}{k_1}$$

substitué dans (16) on a

$$T \left(T + \frac{V_{in}}{k_1} \right) = \frac{V_{in}}{k_3}$$

si

$$\text{si } T \ll \frac{V_{in}}{k_1}, \text{ ou } T \ll GT, \text{ on a: } T = \frac{k_1}{k_3}$$

T est ainsi constant pour un substrat donné quel que soit l'activité de la perméase, par contre il varie avec la nature du substrat puisque k_1 , est la constante de vitesse de dissociation de GT . Si l'affinité de T est plus forte pour TDG que pour TMG, le niveau de T libre sera plus bas pour le premier que pour le second. Il s'ensuit que la vitesse de sortie de TDG sera accélérée en présence de TMG. Ce même mécanisme expliquerait la sortie lente en cas d'inhibition de la perméase (Fig. 6) car dans ce cas T_{in} n'est pas régénéré.

L'effet du glucose peut s'expliquer également si ce sucre entre dans la cellule par un mécanisme distinct par sa stéréospecificité, mais qui libère dans la cellule le même transporteur. Comme le glucose est consommé au fur et à mesure de son entrée, T se libère en excès par rapport à son niveau de régime stationnaire et contribue à la sortie des galactosides.

Ce dernier mécanisme fonctionne également en l'absence de galactoside-perméase, et réalise l'expulsion active des galactosides par le glucose. C'est un exemple de transport actif peu spécifique des galactosides, couplé au transport actif enzymatique du glucose et du transporteur T .

Le nombre des faits à expliquer nous a obligé à élaborer un modèle aussi détaillé, il va sans dire que ce n'est qu'un modèle possible et que l'identification des constituants du système peut seul apporter la solution du mécanisme des perméases et peut être du transport actif en général.

RÉSUMÉ

L'accumulation de thiogalactosides radioactifs dans l'espace intracellulaire de *E. coli* possédant la galactoside-perméase aboutit à un état stationnaire. La mesure de la concentration intracellulaire, de l'affinité et de la vitesse d'échange permet de calculer l'activité du mécanisme d'entrée et la constante de vitesse de la sortie passive. Le mécanisme d'entrée est catalytique, il est couplé avec l'énergie métabolique. La consommation d'énergie correspond à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par molécule de galactoside transporté. La sortie passive n'est pas une diffusion libre, mais peut être interprétée comme une diffusion facilitée en combinaison avec une molécule transporteur.

Le comportement des paramètres d'entrée et de sortie dans des conditions variées est expliqué par un modèle cohérent.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ H. W. RICKENBERG, G. N. COHEN, G. BUTTIN ET J. MONOD, *Ann. inst. Pasteur*, 91 (1956) 829.
- ² A. KEPES ET J. MONOD, *Compt. rend.*, 244 (1957) 809.
- ³ A. KEPES, *Compt. rend.*, 244 (1957) 1550.
- ⁴ W. R. SISTROM, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 579.
- ⁵ L. HERZENBERG, communication personnelle.
- ⁶ B. HORECKER, communication personnelle.
- ⁷ H. LARDY ET H. WELLMAN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 215.