

BBA 75253

LE SYSTÈME DE TRANSPORT DE SULFATE CHEZ *CHLORELLA*  
*PYRENOIDOSA* ET SA RÉGULATION

## IV. ÉTUDES AVEC L'ION CHROMATE

MYRIAM VALLÉE\*

*Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier (France)*

(Reçu le 25 octobre, 1968)

(Manuscrit révisé reçu le 18 décembre, 1968)

## SUMMARY

*The sulphate transport system of Chlorella pyrenoidosa and its regulation**IV. Studies with chromate*

The entry of chromate (a nonmetabolised ion) in *Chlorella* is similar to that of sulphate as previously reported.

1.  $\text{CrO}_4^{2-}$  is absorbed against a concentration gradient.
2. Its rate of entry increases when the cells are sulphur starved and decreases when starved cells are incubated with  $\text{CrO}_4^{2-}$ .
3. Intracellular chromate is not exchangeable.
4. The  $K_m$  of absorption decreases during sulphate starvation.
5. The transport system is inhibited by SH group reagents; its sensitivity to the latter increases after incubation of the cells in a medium without sulphate.

Two kinds of inhibitory interactions between  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{CrO}_4^{2-}$  have been observed: one is competitive at the level of entry and the other is due to regulatory phenomena; the latter appears after the entrance of these ions in the cells.

The rates of entry of  $\text{SO}_4^{2-}$  can decrease more than 70 % when sulphur-starved cells are pre-incubated for short periods with  $\text{CrO}_4^{2-}$  or sulphate; the  $K_m$ 's are apparently little affected. On the other hand when starved cells are incubated much longer with  $\text{SO}_4^{2-}$ , the  $K_m$  increases. These facts, among others, suggest the existence of two modes of regulation, one concerning essentially the  $v_{\max}$ , the other the  $K_m$ .

The entry of chromate stops after several hours of absorption. The internal concentration is then a function of the external one and varies with it approximately in the same manner as the initial rates. As in the case of initial rates, the corresponding  $K_m$ 's depend on the state of sulphur starvation of the cells.

When cells whose absorption at a certain external concentration of  $\text{CrO}_4^{2-}$  has reached a maximal level are resuspended at a higher concentration, absorption commences again. On the other hand, if this maximum level has not yet been attained, the process of absorption can be stopped by lowering the external concentration of  $\text{CrO}_4^{2-}$  to a specific level which depends on the internal concentration.

By experiments of this type, sigmoidal absorption kinetics are demonstrated.

---

\* Adresse actuelle: Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, Davis, Calif 95616, U.S.A.

## INTRODUCTION

Les vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  dans *Chlorella pyrenoidosa* croissent rapidement au cours des premières heures de carence en cet ion<sup>1</sup>. D'autre part, lorsqu'on incube des Chlorelles carencées en sulfate en présence de ce dernier, les vitesses diminuent très vite en fonction du temps. Cette diminution est réelle et non apparente comme c'est le cas pour les vitesses d'entrée de divers solutés chez les bactéries<sup>2</sup>. Pour expliquer ce phénomène un mécanisme de régulation régi par un effecteur, probablement un composé soufré, a été proposé.

Des expériences préliminaires<sup>3</sup> montraient que le  $\text{CrO}_4^{2-}$  pénétrait, comme chez les bactéries<sup>4</sup>, par le même système de transport que le  $\text{SO}_4^{2-}$ . Or cet ion n'est pas métabolisé bien qu'il réagisse avec le premier enzyme d'activation du  $\text{SO}_4^{2-}$  (bibl. 5).

Nous avons pensé qu'une étude de l'entrée de cet ion apporterait des indications sur le mécanisme de régulation. Les résultats obtenus suggèrent l'existence de deux modes de régulation: l'un affecterait les  $v_{\text{max}}$ , l'autre les  $K_m$ . De plus, les courbes d'absorption du chromate en fonction du temps atteignent un plateau dont la valeur dépend de la concentration extérieure. Ce résultat pose le paradoxe de l'équilibre irréversible puisqu'il indique l'atteinte d'un équilibre entre le chromate intracellulaire et celui du milieu, alors que le transport est irréversible.

## MÉTHODES ET TECHNIQUES

Elles ont été essentiellement décrites précédemment<sup>1</sup>. Les Chlorelles sont cultivées stérilement dans un milieu minéral, A\*, à la lumière, à 29°, avec barbotage d'un mélange d'air et de  $\text{CO}_2$ . Elles sont diluées quotidiennement et utilisées pour les expériences d'absorption 24 h après dilution.

Les Chlorelles après centrifugation et lavage sont resuspendues dans Milieu B (identique au Milieu A mais sans  $\text{MgSO}_4$ ), tel quel ou épuisé en impuretés de  $\text{SO}_4^{2-}$ \*\* en raison de 0.04 à 0.8  $\mu\text{l/ml}$  de suspension. La suspension est aérée (air +  $\text{CO}_2$ ) et éclairée. Les expériences ont lieu à 29°.

L'entrée du  $\text{CrO}_4^{2-}$ , du  $\text{SO}_4^{2-}$  et du  $\text{PO}_4^{3-}$ , est étudiée par la technique des millipores avec des sels de potassium marqués avec du  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$  respectivement. La radioactivité du chrome est mesurée avec un compteur  $\gamma$ , celle du soufre et du phosphore, soit au Packard avec 4 ml de solution de scintillation (5 g de 2,5-diphényloxazole et 0.3 g de diméthyl 1,4-bis-(5-phényloxazolyl-2)-benzène par 1 l de toluène), soit avec un compteur Geiger à fenêtre.

D'autres détails sont donnés avec les protocoles expérimentaux.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

*Absorption du  $\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction du temps et de la durée de carence en  $\text{SO}_4^{2-}$* 

L'allure des courbes d'entrée en fonction du temps varie avec la durée de carence (Figs. 1 et 2). Plus celle-ci est prolongée plus les vitesses initiales sont élevées, plus

\* Milieu A:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 mM,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  6 mM,  $\text{MgSO}_4$  0.15 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.1 mM, microéléments cf. bibl. 1; pH ajusté avec  $\text{HCl}$  6.5.

\*\* Milieu épuisé en  $\text{SO}_4^{2-}$ : l'épuisement des impuretés en  $\text{SO}_4^{2-}$  du Milieu B, évaluées à  $3 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-7}$  M, est effectué par les Chlorelles elles-mêmes qu'on y laisse séjourner pendant 3 h. La suspension est centrifugée et le surnageant recueilli et filtré.

la diminution des vitesses est rapide. Il est à noter que la Courbe A (Fig. 2), correspondant à des Chlorelles peu carencées, est pratiquement linéaire pendant les premières minutes. Pour le  $\text{SO}_4^{2-}$ , la diminution des vitesses se produit dès la première minute aussi bien chez des Chlorelles carencées 15 à 20 min que chez celles qui ont subi une durée de carence plus longue (Fig. 3).

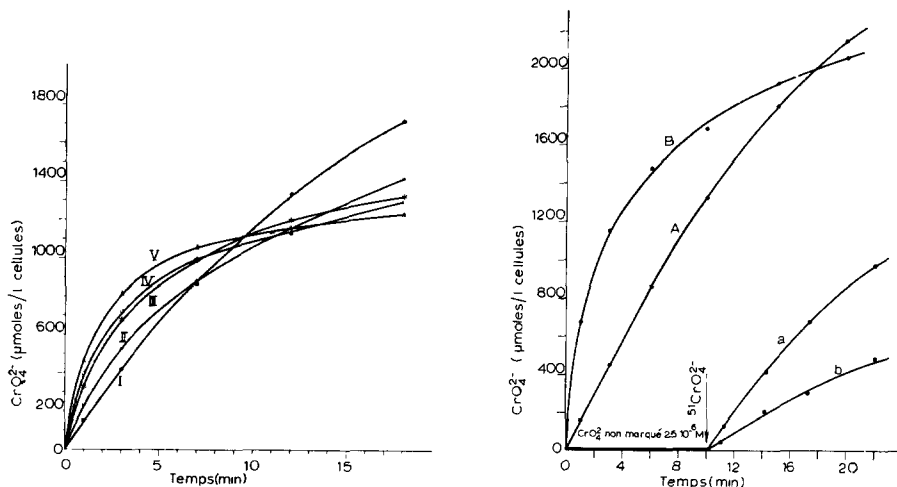


Fig. 1. Absorption du  $\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction du temps et de la durée de séjour dans un milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$ . Carence en  $\text{SO}_4^{2-}$  (min): I, 30, II, 90, III, 150; IV, 210; V, 270. Conc. en  $\text{CrO}_4^{2-}$ :  $2.5 \cdot 10^{-6}$  M.

Fig. 2. Absorption du  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction du temps par des Chlorelles carencées pendant 15 min (A) et 3 h 40 min (B) respectivement. Courbes a et b: *ibid* après 10 min d'incubation dans une solution de  $\text{CrO}_4^{2-}$  non marqué. Conc. en  $\text{CrO}_4^{2-}$ :  $2.5 \cdot 10^{-6}$  M.

### Echange du $\text{CrO}_4^{2-}$ intracellulaire

Des Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 15 min ou 3 h 40 min sont incubées dans une solution de chromate non-marqué. Après 10 min, ce dernier est marqué avec du  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  et son entrée est suivie en fonction du temps. Les courbes d'absorption (Fig. 2, a et b) sont à peu près parallèles aux parties des courbes témoins (A et B) correspondant à l'entrée du  $\text{CrO}_4^{2-}$  après 10 min.

Cette expérience montre que le  $\text{CrO}_4^{2-}$  intracellulaire n'est pas échangeable (*cf.* bibl. 1) et que par conséquent la diminution des vitesses observée en fonction du temps est réelle.

Dans une autre expérience, des Chlorelles qui ont absorbé du  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  sont filtrées et resuspendues dans Milieu B, sans ou avec addition de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  non-marqué (10 fois la concn. du milieu d'absorption). A des temps déterminés, quelques ml de suspension sont filtrés et la radioactivité des Chlorelles mesurée (Fig. 4). On constate que très peu de  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  diffuse à l'extérieur et cela indépendamment de la présence de  $\text{CrO}_4^{2-}$  dans le milieu ambiant. Ces résultats confirment l'absence d'échanges entre le  $\text{CrO}_4^{2-}$  intracellulaire et celui de l'extérieur.

### Vitesses d'entrée en fonction de la concentration

Le  $K_m$  des vitesses pour des Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 3.5 h ou plus se situe autour de  $3 \cdot 10^{-7} \pm 0.8 \cdot 10^{-7}$  M (zone des concentrations étudiées de

$2 \cdot 10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M). Il est donc du même ordre de grandeur que le  $K_t$  (constante d'inhibition) de l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  par le  $\text{CrO}_4^{2-}$  (bibl. 1).

Les  $K_m$  correspondant au matériel peu carencé sont plus difficiles à déterminer à cause de l'évolution rapide des vitesses pendant la durée de l'expérience. Celles-ci peuvent augmenter de 50 % ou plus au cours de 10 min. Nous avons par conséquent

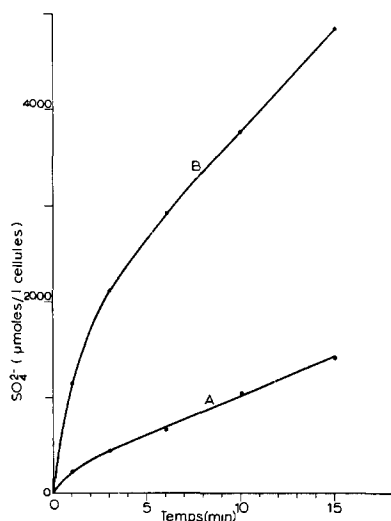


Fig. 3. Entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  en fonction du temps. Courbe A, chlorelles carencées pendant 20 min; Courbe B, chlorelles carencées pendant 3 h 40 min. Conc. en  $\text{SO}_4^{2-}$ :  $10^{-5}$  M.

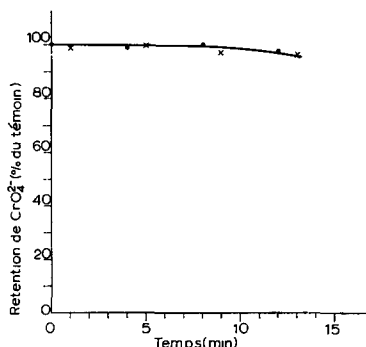


Fig. 4. Echange du  $\text{CrO}_4^{2-}$  intracellulaire avec celui de l'extérieur. Une suspension de Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 20 min est additionnée de  $\text{CrO}_4^{2-}$  marqué ( $2.5 \cdot 10^{-8}$  M). Après 27 min, les Chlorelles sont filtrées, lavées, resuspendues dans milieu B. La suspension est divisée en deux lots. Après 10 min l'un d'eux est additionné de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  non-marqué ( $2.5 \cdot 10^{-5}$  M), puis à des temps variables, quelques ml de suspension sont filtrés et la radioactivité des Chlorelles mesurée. ●, Milieu B, ×, Milieu B +  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ .

adopté le protocole expérimental suivant: 3 séries de mesures des vitesses d'entrée à 5 concentrations sont effectuées successivement. Les valeurs obtenues pour chaque concentration sont tracées en fonction du temps qui s'est écoulé depuis le début des essais jusqu'au moment où les mesures ont été faites. Les courbes sont extrapolées au temps 0 de l'expérience. Les valeurs correspondantes des ordonnées sont considérées comme représentatives des vitesses.

Les résultats d'une expérience sont présentés dans la Fig. 5. Les  $K_m$  des vitesses sont respectivement  $3.4 \cdot 10^{-8}$  M pour les Chlorelles carencées pendant 15 min et  $2.5 \cdot 10^{-7}$  M pour celles carencées pendant 4.5 h.

Cette expérience a été faite avec des Chlorelles resuspendues dans un milieu épuisé en  $\text{SO}_4^{2-}$  (voir note p. 487) et ceci afin de s'assurer que les impuretés en  $\text{SO}_4^{2-}$  contenues dans le milieu B n'interviennent pas dans l'absorption du  $\text{CrO}_4^{2-}$  aux faibles concentrations, le  $\text{SO}_4^{2-}$  étant un inhibiteur compétitif de l'entrée du chromate (voir ci-dessous).

#### *Effets de divers inhibiteurs*

L'entrée du  $\text{CrO}_4^{2-}$  est sensible au dinitrophénol, à l'azoture de sodium et à la température. D'autre part elle s'effectue contre un gradient de concentration. Elle

est inhibée par les réactifs de groupement SH: *N*-éthyl-maléimide, *p*-chlorophényl-mercurisulfonate, *etc.* L'inactivation par ces derniers est plus rapide chez des *Chlorelles* carencées pendant des temps longs (Fig. 6).

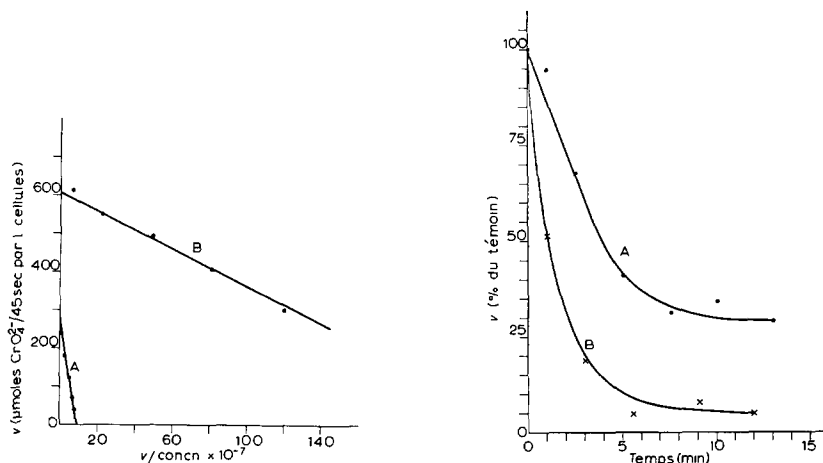


Fig. 5. Vitesses d'entrée du  $\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction de la concentration. Résultats exprimés sous forme de  $v = f(v/\text{concn.})$ . *Chlorelles* carencées pendant 15 min (A) et 3.5 h (B). Pour le mode de détermination des vitesses chez des *Chlorelles* carencées pendant 15 min voir texte.

Fig. 6. Vitesses d'entrée de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction de la durée de séjour dans une solution de *N*-éthyl-maléimide à  $1.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Concn. en  $\text{CrO}_4^{2-}$ :  $2.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . Durée des mesures: 1 min. *Chlorelles* carencées pendant 15 min (A) et 4 h (B).

### Interactions $\text{CrO}_4^{2-}$ – $\text{SO}_4^{2-}$

Ces deux ions inhibent réciproquement l'absorption l'un de l'autre (Fig. 7 et bibl. 1). L'inhibition est compétitive (*cf.* bibl. 6). Pour des *Chlorelles* carencées pendant 3 à 4 h en  $\text{SO}_4^{2-}$ , les  $K_i$  d'inhibition de l'un des ions des vitesses d'entrée de l'autre sont du même ordre de grandeur que les  $K_m$  de leurs propres vitesses d'absorption. Une deuxième interaction, elle aussi réciproquement inhibitrice se manifeste lorsqu'on mesure les vitesses d'entrée de l'un de ces ions en fonction de la durée de séjour des *Chlorelles* dans un milieu contenant l'autre (Fig. 8)\*.

Les interactions  $\text{CrO}_4^{2-}$ – $\text{SO}_4^{2-}$  semblent être très spécifiques, car, d'une part le  $\text{CrO}_4^{2-}$  affecte peu l'entrée d'un autre ion, le phosphate (Fig. 9) et d'autre part les vitesses d'entrée de  $\text{CrO}_4^{2-}$  chez des *Chlorelles* carencées dans Milieu B puis centrifugées et resuspendues, soit dans le même milieu (il contient divers ions), soit dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-4} \text{ M}$ , pH 6.4), sont du même ordre de grandeur.

Les résultats obtenus avec le chromate montrent que l'entrée de cet ion présente les mêmes caractéristiques que celles précédemment observées pour le  $\text{SO}_4^{2-}$  (bibl. 1 et 7): (1) Augmentation des vitesses au cours d'une carence en  $\text{SO}_4^{2-}$ . Diminution

\* La diminution des vitesses d'entrée de l'ion sulfate au cours d'une incubation dans une solution de  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Fig. 8) est plus grande que celle rapportée précédemment (*cf.* Fig. 7, bibl. 3). Les premières expériences sur ce point ont été entreprises avant l'étude systématique de l'entrée du  $\text{CrO}_4^{2-}$ , avec des suspensions de *Chlorelles* relativement concentrées. Des expériences ultérieures révélaient que dans ces conditions la concentration extérieure de  $\text{CrO}_4^{2-}$  baissait très sensiblement pendant la durée d'incubation.

rapide des vitesses lorsqu'on incube des Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  en présence de l'un ou de l'autre ion. (2) Baisse des  $K_m$  apparents avec la durée de carence. (3) Augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs SH avec la durée de carence. (4) Inhibitions réciproques dues: (a) à une compétition au niveau de la perméation; (b) à des phénomènes de régulation provoqués directement ou indirectement après l'entrée de ces ions dans les cellules.

Nous en concluons que les deux ions utilisent le même système de transport et que leur entrée est probablement soumise aux mêmes mécanismes de régulation.

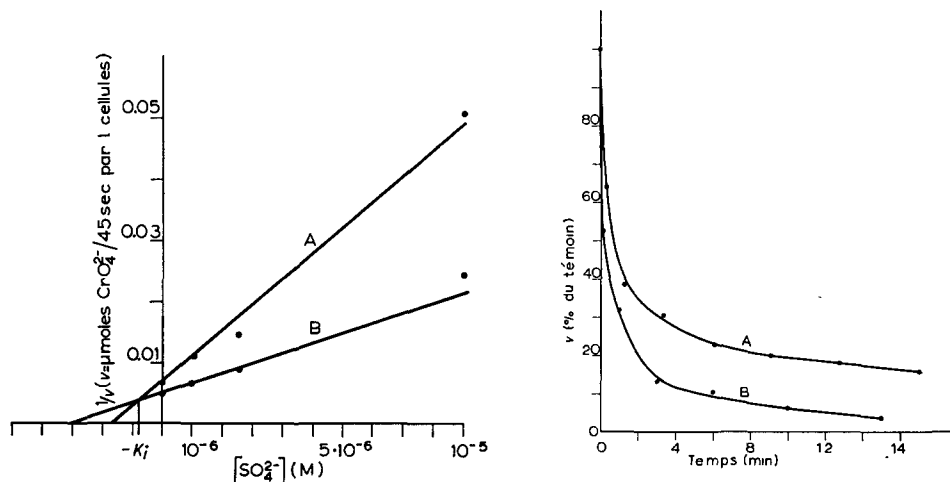


Fig. 7. Vitesses d'entrée de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction de la concentration de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Résultats exprimés sous forme de  $1/v = f(\text{concn.})$ . Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 3 h. Concn. en  $\text{CrO}_4^{2-}$ : A  $5 \cdot 10^{-7}$  M, B  $10^{-6}$  M.  $K_t = 0.8 \cdot 10^{-6}$  M.

Fig. 8. Vitesses d'entrée de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  (A) et de  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  (B) en fonction de la durée de séjour dans une solution contenant du  $\text{CrO}_4^{2-}$  et du  $\text{SO}_4^{2-}$  non-marqués, respectivement. Durée des mesures: 30 sec. Concn. en  $\text{SO}_4^{2-}$ :  $10^{-6}$  M, en  $\text{CrO}_4^{2-}$ :  $2.5 \cdot 10^{-6}$  M. Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 3.5 h.

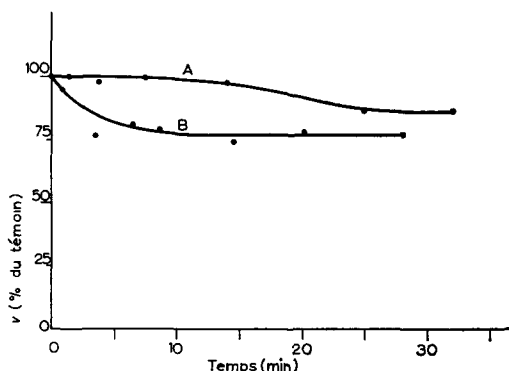


Fig. 9. Vitesses d'entrée de l'ion phosphate marqué en fonction de la durée de séjour dans une solution de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  non-marqué. Concn. en phosphate:  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M. Concn. en  $\text{CrO}_4^{2-}$ : (A)  $2.5 \cdot 10^{-6}$  M, (B)  $10^{-6}$  M. Durée des mesures: 1 min. Les Chlorelles ont séjourné pendant 3.5 h dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-4}$  M). Cette dernière correspond à la "solution physiologique" des cellules animales. Des expériences préliminaires montraient que dans ces conditions, les vitesses d'entrée du phosphate se stabilisent plus ou moins (elles augmentent pendant les premières heures de carence en cet ion).

Une seule différence de comportement a été observée: les vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  chez des Chlorelles peu carencées diminuent plus vite que celles de  $\text{CrO}_4^{2-}$  (cf. Courbes A des Figs. 2 et 3). Ce point n'a pas été étudié de plus près.

Les changements de  $K_m$  au cours d'une carence en  $\text{SO}_4^{2-}$  montrent que les constantes cinétiques d'une ou plus des réactions qui régissent l'entrée sont touchées. La régulation de phénomènes exclusivement membranaires est très peu connue. Sans exclure l'éventualité de mécanismes spécifiques comme changements locaux de potentiel ou de pH susceptibles d'influencer le transport des ions<sup>8</sup>, il est possible que les variations de  $K_m$  soient dues à l'action d'effecteurs intracellulaires.

Des variations de  $K_m$  ont été constatées pour l'entrée de divers solutés chez des micro-organismes<sup>9-11</sup>, et d'autre part, plusieurs chercheurs ont proposé des mécanismes de rétro-inhibition pour expliquer la régulation du transport dans ce matériel<sup>10-12</sup>.

Les vitesses d'entrée de  $\text{CrO}_4^{2-}$  et de  $\text{SO}_4^{2-}$  chez des Chlorelles longuement carencées, baissent très rapidement en présence de ces ions. Ce phénomène serait-il dû à des changements rapides de  $K_m$  se produisant en sens inverse de ceux qui ont lieu au cours d'une carence en  $\text{SO}_4^{2-}$ ? Ce point a été examiné dans la section suivante.

#### *$K_m$ des vitesses d'entrée de $\text{SO}_4^{2-}$ chez des Chlorelles "chargées" en $\text{SO}_4^{2-}$ ou en $\text{CrO}_4^{2-}$*

Le protocole expérimental est le suivant: une suspension de Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant une durée supérieure à 3.5 h est divisée en deux lots ou plus. L'un sert à la détermination des  $K_m$  témoins; l'autre est additionné de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  non-marqué. Après 15 min la suspension est centrifugée et le culot est resuspendu dans un milieu épuisé en  $\text{SO}_4^{2-}$ . Les mesures des vitesses d'entrée débutent après 15 à 25 min.

Les autres lots servent éventuellement à divers contrôles: entrée du  $\text{CrO}_4^{2-}$  (avec  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ ) en fonction du temps, mesures des vitesses d'entrée de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  au cours du séjour des Chlorelles dans une solution de chromate non-marqué, effets de la centrifugation sur les  $K_m$  et les vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$ , etc.

Les résultats obtenus dans 7 expériences peuvent être résumés ainsi: (1) dans nos conditions d'expérience, ni les vitesses, ni les  $K_m$  ne sont sensiblement affectés par une centrifugation préalable; (2) les vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  de Chlorelles "chargées" de  $\text{CrO}_4^{2-}$  sont très sensiblement inférieures aux témoins non "chargés" (Fig. 10); (3) dans tous les cas, les graphiques  $v = f(v/\text{concn.})$  des témoins sont linéaires. (4) Ceux correspondant aux Chlorelles "chargées" en  $\text{CrO}_4^{2-}$  donnent, soit des droites (2 expériences), soit des courbes (5 expériences), celles-ci ayant toutes la même allure, notamment une partie plus ou moins linéaire correspondant aux concentrations inférieures à  $10^{-5}$  M. Pour des concentrations égales ou supérieures à cette dernière les points expérimentaux dévient de la droite, mais la déviation est relativement faible (Fig. 10). Les  $K_m$  correspondant à la partie linéaire sont à peu près égaux à ceux des témoins non "chargés". Il en ressort, qu'au moins pour les faibles concentrations, le  $\text{CrO}_4^{2-}$  intracellulaire agit surtout sur les  $v_{\text{max}}$  alors que les vitesses peuvent diminuer considérablement par rapport aux témoins.

Ce type d'expérience a été répété en incubant des Chlorelles carencées, avec du  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non-marqué, puis à des temps variables les Chlorelles sont centrifugées, lavées et resuspendues dans un milieu épuisé en  $\text{SO}_4^{2-}$ . Après 10 à 20 min on procède à des mesures de vitesses en fonction de la concentration de sulfate. Les vitesses

peuvent augmenter considérablement pendant la durée de l'expérience, par conséquent elles ont été déterminées comme décrit plus haut (*Vitesses d'entrée en fonction de la concentration*).

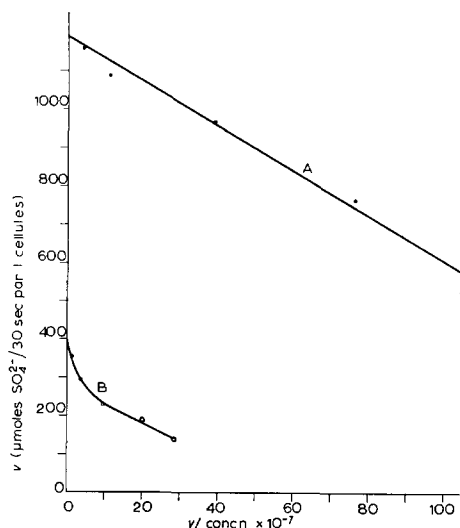


Fig. 10. Vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  en fonction de la concentration chez des Chlorelles "chargées" en  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Résultats exprimés sous forme de  $v = f(v/\text{concn.})$ . Courbe A, chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 3 h 40 min, Courbe B, les Chlorelles après 3 h 40 min de carence sont additionnées de  $\text{CrO}_4^{2-}$  non-marqué ( $2.5 \cdot 10^{-6}$  M). Au bout de 15 min elles sont centrifugées et resuspendues dans un milieu épuisé en  $\text{SO}_4^{2-}$ . Les mesures débutent après 20 min.

Dans l'expérience présentée dans la Fig. 11, nous avons également mesuré les vitesses à diverses concentrations en fonction de la durée de carence. On constate que: (a) les  $K_m$  diminuent au cours d'une incubation dans un milieu dépourvu de  $\text{SO}_4^{2-}$  (Fig. 11a); (b) comme pour le  $\text{CrO}_4^{2-}$ , les vitesses d'entrée chez des Chlorelles carencées au préalable en sulfate diminuent après un traitement avec cet ion; (c) l'allure des graphiques  $v = f(v/\text{concn.})$  varie avec la durée du traitement: après 2 h d'incubation, le graphique est linéaire (Fig. 11b, I); le  $K_m$  est du même ordre de grandeur que celui correspondant aux Chlorelles longuement carencées; autrement dit le sulfate absorbé affecte directement ou indirectement les  $v_{\text{max}}$ . Un résultat analogue a été obtenu par BELLENGER *et al.*<sup>13</sup> sur l'entrée de choline-*o*-sulfate chez des champignons. Par la suite les graphiques deviennent curvilignes (Fig. 11b, II, III et IV). Après 24 h, la relation  $v = f(v/\text{concn.})$  est de nouveau linéaire. Le  $K_m$  est alors caractéristique de celui des Chlorelles peu carencées.

Il est à noter que 2.5 à 3 h de carence suffisent pour que les  $K_m$  atteignent la valeur caractéristique du matériel carencé. L'inverse, passage des vitesses du régime carencé au non carencé, est beaucoup plus long.

Des graphiques  $v = f(v/\text{concn.})$  curvilignes sont très souvent obtenus dans les études des vitesses d'entrée de divers ions, en fonction de la concentration chez les végétaux (*cf.* bibliographie de l'article de EPSTEIN<sup>14</sup>).

Ils sont généralement interprétés comme indiquant l'existence de deux mécanismes de perméation, chacun possédant ses propres constantes cinétiques. Le système



de transport de  $\text{SO}_4^{2-}$  offre un exemple pour lequel cette interprétation ne semble pas justifiée. Ces courbes seraient dues plutôt au passage progressif du système de transport du régime carencé au non carencé, passage qui ne se produirait pas au même rythme dans toutes les cellules. Les résultats obtenus dans cette série d'expériences infirment notre hypothèse de départ: baisse des vitesses due à une augmentation

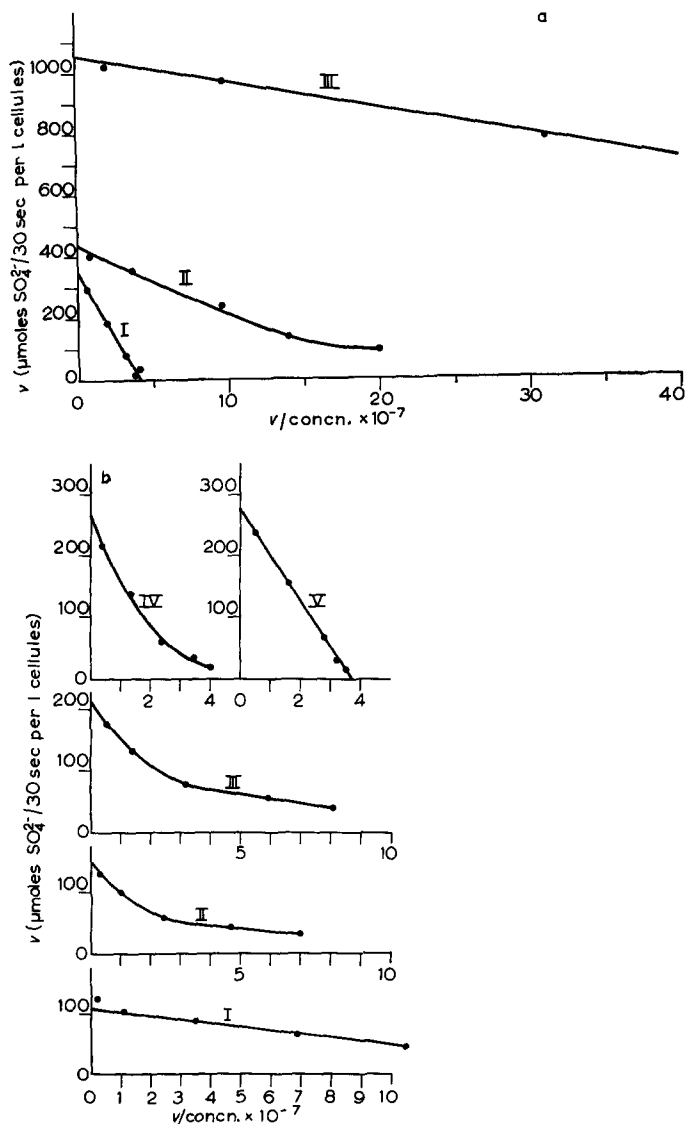
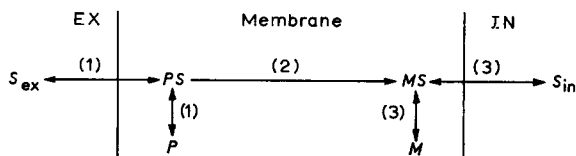


Fig. 11. Vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  en fonction de la concentration, dans diverses conditions. Résultats exprimés sous forme de  $v = f(v/\text{concn.})$ . a. Les vitesses à diverses concentrations sont mesurées en fonction de la durée de carence: I, 15 min; II, 1.25 h; III, 4.5 h. b. Une suspension de Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 4.5 h est additionnée de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $1.5 \cdot 10^{-4}$  M. A des temps variables, un lot de Chlorelles est centrifugé, lavé et resuspendu dans milieu B épuisé en  $\text{SO}_4^{2-}$ . Les mesures des vitesses débutent après 15 à 20 min. Durées d'incubation: I, 2 h; II, 5 h; III, 10 h; IV, 15 h et V, 24 h.

du  $K_m$ . Ils impliquent en revanche, l'existence d'un second mode de régulation qui affecterait essentiellement les  $v_{\max}$ .

Une nouvelle hypothèse a été formulée concernant ce second mécanisme que nous schématisons ci-dessous.



Le substrat extérieur,  $S_{\text{ex}}$ , s'associe à une protéine spécifique  $P$  située sur le côté EX de la membrane pour donner réversiblement  $PS$ .  $S$  passe de  $P$  à  $M$ , localisé sur le côté IN de la membrane, par l'intermédiaire d'une ou plusieurs réactions indiquées sur le schéma par  $\xrightarrow{(2)}$ . Celles-ci doivent rendre compte de l'absorption contre un gradient de concentration (cf. schémas dans bibl. 15-17). Au moins une d'entre elles serait irréversible, étant donné que le transport l'est lui-même.  $MS$  se dissocie réversiblement en  $M + S_{\text{in}}$ . A mesure que  $S_{\text{in}}$  s'accumule, il réagira sur la dissociation de  $MS$  (loi de l'action des masses), d'où une diminution des vitesses d'entrée.

Indépendamment du détail des réactions sommairement indiquées par  $\xrightarrow{(a)}$ , un tel schéma implique que: (a) l'absorption s'arrêtera lorsque tout le composant  $M$  sera sous forme de  $MS$ ; la courbe d'absorption en fonction du temps atteindra alors un plateau; (b) la valeur de l'absorption au plateau,  $S_{\text{in}}^{\text{pl}}$ , sera la même pour toutes les concentrations extérieures, donc indépendante de celles-ci. Le seul effet de ces dernières porterait sur le temps nécessaire pour que l'absorption atteigne cette valeur.

Cette hypothèse a été examinée dans les expériences suivantes.

#### Absorption en fonction du temps et de la concentration

Les Figs. 12a et 12b, présentent les résultats de deux expériences d'absorption du  $\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction du temps et de la concentration, l'une faite sur des Chlorelles carencées pendant 20 min, l'autre avec des Chlorelles carencées pendant 4,5 h.

On constate que: (a) les vitesses d'entrée diminuent en fonction du temps, et cela à toutes les concentrations; (b) au bout de quelques heures les courbes atteignent un plateau. Ce résultat est confirmé par KABACK<sup>18</sup> pour un autre système d'entrée irréversible: sucres dans des préparations membranaires d'*Escherichia coli*; (c) les valeurs de l'absorption au plateau,  $S_{\text{in}}^{\text{pl}}$ , sont fonction de la concentration extérieure (cf. bibl. 19); (d) les graphiques  $S_{\text{in}}^{\text{pl}} = f(S_{\text{in}}^{\text{pl}}/\text{concn.})$  sont à peu près linéaires (Fig. 13). La valeur des  $K_m$  des plateaux est voisine ou du même ordre de grandeur que les  $K_m$  des vitesses initiales.

Pour les expériences de la Fig. 13, nous obtenons

Durée de carence	$K_m$ des vitesses initiales	$K_m$ des plateaux
20 min	$3.9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$2.2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
5 h	$2.45 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	$2.3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

Notons aussi que la valeur maximale de  $S_{\text{in}}^{\text{pl}}$  ( $S_{\text{in}}^{\text{max}}$  sur la Fig. 13) est plus faible chez les Chlorelles longuement carencées.

Ces résultats, qui ne justifient pas notre hypothèse, soulèvent le paradoxe suivant : le fait que l'absorption atteigne un plateau indique l'établissement d'un équilibre (direct ou indirect) entre le  $\text{CrO}_4^{2-}$  intracellulaire et le système d'entrée. D'autre part la valeur du plateau, donc de l'absorption à l'équilibre, dépend de la concentration extérieure; par conséquent, apparemment  $S_{\text{in}}$  est en équilibre avec  $S_{\text{ex}}$ . Comment un tel équilibre peut-il exister, l'absorption étant irréversible?

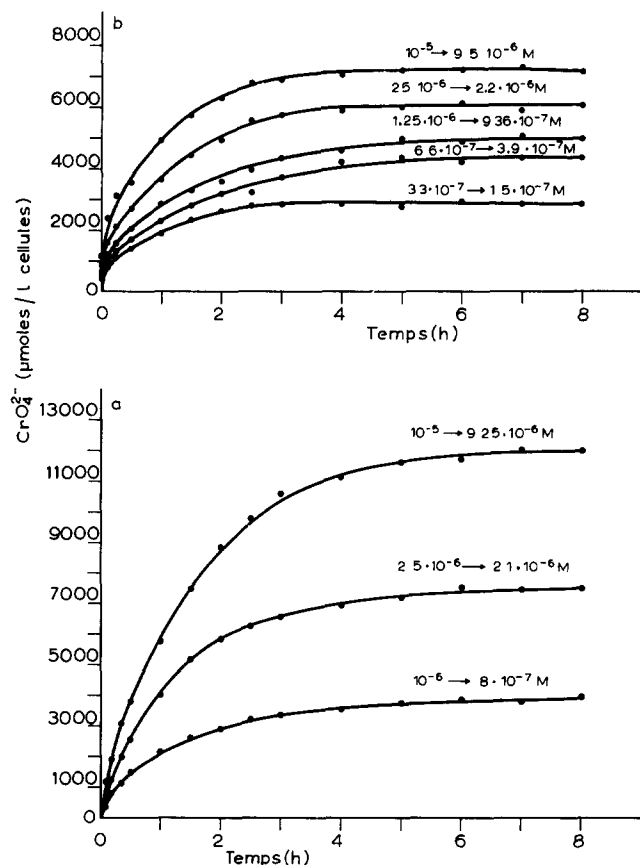


Fig. 12. Absorption du  $\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction du temps et de la concentration. a. Chlorelles carencées pendant 15 min. b. Chlorelles carencées pendant 5 h. Sur la droite des courbes figurent les valeurs des concentrations extérieures au début et à la fin de l'expérience.

Quoiqu'il en soit, les résultats permettent de faire les deux prédictions suivantes : (1) Une augmentation de la concentration extérieure lorsque l'entrée à une concentration donnée a atteint sa valeur maximale, devrait produire un redémarrage de l'absorption. (2) Une diminution de la concentration extérieure lorsque cette valeur n'a pas encore été atteinte, mais celle correspondant à la nouvelle concentration, plus basse, l'a déjà été, devrait conduire à un arrêt de l'absorption.

Cela a été confirmé aussi bien pour des Chlorelles peu carencées que pour celles qui l'ont été longtemps.

Dans l'expérience présentée dans la Fig. 14, une suspension de Chlorelles qui

a séjourné pendant 3.5 h dans un milieu sans sulfate, est additionnée de  $\text{CrO}_4^{2-}$  à  $10^{-6}$  M. Au bout de 4 h 10 min, alors que l'absorption a pratiquement atteint le plateau, on rajoute du  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Les concentrations extérieures avant et après cette addition étaient approx.  $6.8 \cdot 10^{-7}$  et approx.  $1.68 \cdot 10^{-6}$  M respectivement. Un redémarrage de l'absorption s'ensuit, jusqu'à ce qu'un nouveau plateau soit atteint.

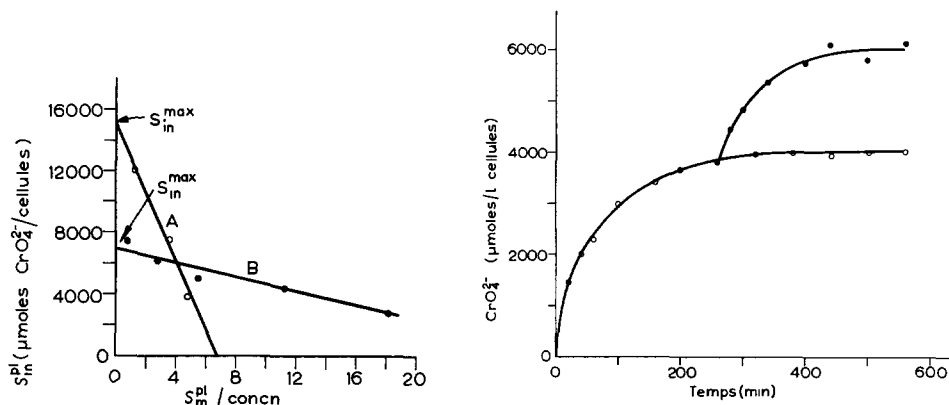


Fig. 13. Valeurs de l'absorption aux plateaux ( $S_{in}^{pl}$ ) en fonction de la concentration d'après l'expérience présentée dans la Fig. 12. Résultats exprimés sous forme de  $S_{in}^{pl} = f(S_m^{pl}/\text{concn.})$ . Concn. = concentration extérieure à la fin de l'expérience. A. Chlorelles carencées pendant 15 min; B. Chlorelles carencées pendant 5 h.

Fig. 14. Redémarrage du transport du  $\text{CrO}_4^{2-}$ , à la suite d'une augmentation de la concentration extérieure, chez des Chlorelles dont l'absorption a atteint un plateau. Concentration du  $\text{CrO}_4^{2-}$  au début de l'expérience était  $10^{-6}$  M. Après 260 min la suspension est additionnée de  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Les concentrations extérieures avant et après addition étaient  $6.8 \cdot 10^{-7}$  M et  $1.68 \cdot 10^{-6}$  M respectivement.

Dans deux autres expériences, des Chlorelles carencées pendant 15 min (Fig. 15a) ou 4.5 h (Fig. 15b) sont incubées avec du  $\text{CrO}_4^{2-}$  à  $10^{-5}$  M.

Au bout de 50 min, la suspension est répartie en 6 lots: les 3 premiers sont dilués  $20 \times$ ,  $10 \times$  et  $3 \times$  respectivement, le 4ème est laissé tel quel et sert de témoin, les deux autres sont additionnés de  $\text{CrO}_4^{2-}$ , l'un après dilution préalable ( $10 \times$ ), l'autre sans dilution.

Les concentrations respectives étaient les suivantes

Durée de carence en $\text{SO}_4^{2-}$	Concn. (M)					
	I	II	III	IV	V	VI
15 min	$2.8 \cdot 10^{-7}$	$5.6 \cdot 10^{-7}$	$1.86 \cdot 10^{-6}$	$5.6 \cdot 10^{-6}$	$1.3 \cdot 10^{-5}$	$3.5 \cdot 10^{-5}$
4.5 h	$3.35 \cdot 10^{-7}$	$6.7 \cdot 10^{-7}$	$2.23 \cdot 10^{-6}$	$6.7 \cdot 10^{-6}$	$1.3 \cdot 10^{-5}$	$3.6 \cdot 10^{-5}$

On constate que l'absorption s'arrête dans I et II. Elle est faible pour les Chlorelles diluées  $3 \times$ , plus élevée par rapport au témoin (IV) dans les suspensions enrichies en  $\text{CrO}_4^{2-}$ .

Notons aussi que la différence entre l'absorption des lots V ou VI et le témoin IV, est plus grande pour les Chlorelles peu carencées; d'autre part, une augmentation

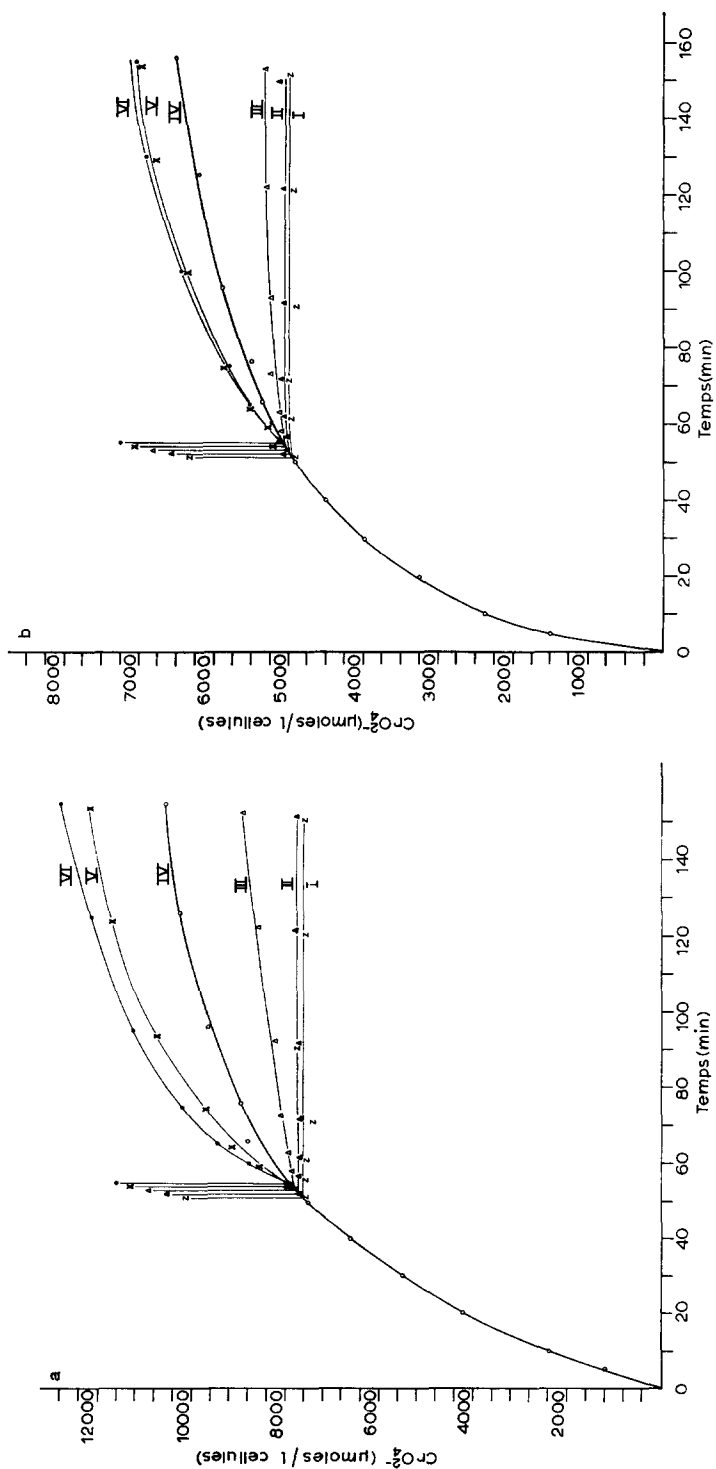


Fig. 15. Entrée du  $\text{CrO}_4^{2-}$  en fonction de la concentration et du temps chez des Chlorococques préincubés en présence de cet ion. Après 50 à 55 min les Chlorococques sont dilués ou additionnés de  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Concentration  $10^{-6}$  M. Durée de carence préalable (a) 15 min, (b) 45 h. IV, témoin. I, dilution  $20 \times$ ; II, dilution  $10 \times$ ; III, dilution  $3 \times$ ; V, addition de  $1.25 \cdot 10^{-5}$  M  $\text{CrO}_4^{2-}$  (après dilution  $10 \times$ ); VI, addition de  $3 \cdot 10^{-5}$  M  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Pour d'autres détails voir texte.

de la concentration extérieure de 1.31 à 3.6 M a peu d'effet sur l'absorption par des Chlorelles longuement carencées. Ces résultats sont en accord avec le fait que les  $K_m$  des plateaux (comme ceux des vitesses initiales) diminuent avec la durée de carence.

Ces dernières expériences montrent de plus une relation sigmoïdale entre la concentration et le transport de  $\text{CrO}_4^{2-}$  chez des Chlorelles préincubées avec cet ion. La technique expérimentale n'est pas suffisamment précise pour des mesures de vitesses, mais la relation est très nette: pratiquement pas d'absorption aux faibles concentrations, tendance à la saturation aux concentrations élevées.

La question suivante se pose: pourquoi une telle cinétique n'a-t-elle pas été obtenue dans les expériences où les vitesses en fonction de la concentration en  $\text{SO}_4^{2-}$  ont été mesurées après "chargement" des Chlorelles en  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Fig. 10). Nous pensons que les conditions expérimentales en sont la cause: durée trop courte de préincubation avec du chromate, emploi d'une gamme de concentrations en  $\text{SO}_4^{2-}$  trop restreinte, et surtout il est possible que la centrifugation, l'attente de 15 à 20 min après resuspension des Chlorelles, modifie l'environnement immédiat des sites d'absorption. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier ce point.

Il n'est pas impossible, nous avons quelques indications, qu'une cinétique du type sigmoïdal existe chez les Chlorelles non carencées et qu'une modification des techniques expérimentales permette de la détecter. Il ne semble pas que ce soit le cas pour du matériel longuement carencé: nous avons effectué plusieurs expériences avec ce matériel, la cinétique d'entrée en fonction de la concentration était toujours Michaelienne. Toutefois la zone des concentrations très basses n'a pas été suffisamment explorée pour être définitif sur ce point.

#### CONCLUSION

Les points les plus importants qui ont été mis en évidence dans ce travail sont l'existence d'au moins deux modes de régulation, l'un affectant les  $K_m$ , l'autre les  $v_{\max}$ . De plus, nos résultats soulèvent le paradoxe de l'"équilibre irréversible" très difficilement interprétable en termes de la thermodynamique classique, suggérant un mode de régulation relativement complexe.

#### REMERCIEMENT

Je remercie très vivement Monsieur A. Kepes de ses nombreuses suggestions et critiques ainsi que de l'intérêt chaleureux qu'il a pris à ce travail. Mes vifs remerciements vont également à Monsieur A. Lebor pour nos discussions.

#### RÉSUMÉ

L'entrée du chromate, ion non métabolisable, chez *Chlorella* présente les mêmes caractéristiques que celles précédemment rapportées pour le  $\text{SO}_4^{2-}$ .

1. L'absorption a lieu contre le gradient de concentration.
2. Les vitesses augmentent au cours d'une carence en  $\text{SO}_4^{2-}$  et diminuent rapidement lorsque les Chlorelles carencées sont incubées en présence de  $\text{CrO}_4^{2-}$ .
3. Le chromate intracellulaire n'est pas échangeable.
4. Les  $K_m$  des vitesses baissent avec la durée de carence.

5. Le système de transport est sensible aux inhibiteurs SH, et cette sensibilité augmente avec la durée de carence.

Des inhibitions réciproques spécifiques  $\text{CrO}_4^{2-}$ - $\text{SO}_4^{2-}$  ont été observées. Elles sont dues: (a) à une compétition au niveau de l'entrée; (b) à des phénomènes de régulation qui se manifestent après l'entrée de ces ions dans les cellules.

Les vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  peuvent diminuer considérablement lorsque des Chlorelles carencées en cet ion sont pré-incubées pendant des temps courts dans un milieu contenant du  $\text{SO}_4^{2-}$  ou du  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Les  $K_m$  sont apparemment peu affectés. D'autre part, lorsque ce même matériel subit une pré-incubation prolongée avec du sulfate, les  $K_m$  augmentent. Ces faits suggèrent deux modes de régulation, l'un portant sur les  $v_{\text{max}}$ , l'autre sur les  $K_m$ .

L'entrée du chromate s'arrête au bout de quelques heures d'absorption. Les teneurs des Chlorelles en cet ion sont alors fonction de la concentration extérieure et varient avec elle à peu près de la même manière que les vitesses initiales. Comme pour ces dernières, les  $K_m$  correspondants dépendent de la durée de carence en  $\text{SO}_4^{2-}$  avant le début de l'expérience.

Lorsque des cellules, dont l'absorption de  $\text{CrO}_4^{2-}$  à une certaine concentration extérieure a atteint son niveau maximal, sont resuspendues à une concentration plus élevée, le transport de  $\text{CrO}_4^{2-}$  redémarre.

Si, en revanche, ce niveau n'a pas encore été atteint, il est possible d'arrêter le transport en baissant la concentration externe de  $\text{CrO}_4^{2-}$  à un niveau qui dépend de la concentration interne.

Par ce type d'expériences, une cinétique d'entrée sigmoïdale peut être mise en évidence.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. VALLÉE ET R. JEANJEAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 599.
- 2 A. KEPES, *Biochim. Biophys. Acta* 40 (1960) 70.
- 3 M. VALLÉE ET R. JEANJEAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 607
- 4 A. PARDEE, L. S. PRESTIDGE, M. D. WHIPPLE ET J. DREYFUSS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1968) 3962.
- 5 L. G. WILSON ET R. S. BANDURSKY, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 975.
- 6 J. W. TWEEDE ET I. H. SEGEL, *Bacteriol. Proc.*, (1967) P 29.
- 7 M. VALLÉE, *Compt. Rend.*, 266 (1968) 1797.
- 8 P. MITCHELL, *Biol. Rev.*, 41 (1966) 455.
- 9 A. KEPES ET G. GACHELIN, *Coll. D.G.R.S.T., Orsay*, 1967.
- 10 A. KOTYK ET A. KLEINZELLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 135 (1967) 106.
- 11 P. V. BENKO, T. C. WOOD ET I. H. SEGEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 122 (1967) 783.
- 12 J. DREYFUSS ET A. B. PARDEE, *J. Bacteriol.*, 91 (1966) 2275
- 13 N. BELLENGER, P. NISSEN, T. C. WOOD ET I. H. SEGEL, *J. Bacteriol.*, 96 (1968) 1574.
- 14 E. EPSTEIN, *Nature*, 212 (1966) 1324
- 15 C. F. FOX ET E. P. KENNEDY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54 (1965) 89
- 16 H. WINKLER ET T. H. WILSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 135 (1967) 1030
- 17 H. A. LARDY, S. N. GRAVEN ET S. ESTRADA-O, *Federation Proc.*, 26 (1967) 1355.
- 18 H. R. KABACK, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 3711.
- 19 M. VALLÉE, Thèse doctorat d'état de l'Université de Paris, 1963, pp. 63-69