

## Variations de la différence de potentiel électrochimique des chlorures chez *Nitella* en présence de benzène sulphonate

Dans cette note nous nous proposons d'étudier les variations du potentiel électrochimique de l'ion chlorure de part et d'autre de la membrane de *Nitella* en fonction de sa concentration dans le milieu extérieur. Pour maintenir constante la concentration totale des solutions nous avons choisi le benzène sulphonate comme anion de substitution de Cl.

Les essais ont porté sur les cellules internodales de l'algue d'eau douce *Nitella translucens* (Pers.) Ag. recueillie dans un Loch d'Ecosse. Les cellules sont pré-traitées dans NaCl 5 mM pendant 24 h puis elles sont plongées dans la première solution testée (KCl 0,1 mM + NaCl 1,0 mM). Suivant une technique similaire à celle décrite par BRADLEY et WILLIAMS<sup>1</sup>, 2 électrodes sont introduites dans la vacuole. Une micropipette de verre remplie de KCl 3M destinée à mesurer le potentiel de membrane (tonoplaste + plasmalemme) et une électrode d'argent dont la pointe a été préalablement amincie par électrolyse. La partie qui pénètre dans la cellule est seule recouverte d'une couche d'Ag-AgCl. La différence de potentiel entre cette dernière électrode et une autre plongée dans le milieu extérieur est la différence de potentiel électrochimique ( $\Delta E_{Cl}$ ) (exprimée en mV) de l'ion chlorure entre l'intérieur de la cellule (cytoplasme + vacuole) et la solution testée. Elle est égale à la différence entre le potentiel de membrane ( $E_{oi}$ ) et le potentiel d'équilibre des chlorures (Potentiel de Nernst) soit  $E_{Cl}$ . En effet:

$$\begin{aligned}\bar{\mu}_{Cl}^i - \bar{\mu}_{Cl}^o &= RT \ln \frac{[Cl]_i}{[Cl]_o} + zF(\psi^i - \psi^o) \\ \frac{\bar{\mu}_{Cl}^i - \bar{\mu}_{Cl}^o}{zF} &= E_{oi} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Cl]_o}{[Cl]_i} \\ \Delta E_{Cl} &= E_{oi} - E_{Cl}\end{aligned}$$

où  $\bar{\mu}_{Cl}^i$  et  $\bar{\mu}_{Cl}^o$  sont les potentiels électrochimiques de l'ion chlorure dans la phase cellulaire et dans la phase extérieure. Les autres symboles ont leur signification habituelle.

L'expérience consiste à modifier rapidement la concentration externe en chlorure de la solution en lui substituant le benzène sulphonate. Les différentes valeurs testées de  $[Cl]_o$  sont les suivantes: 1,1 mM; 0,67 mM; 0,42 mM; 0,20 mM et 0,10 mM. Ces concentrations sont testées dans le sens décroissant (aller) puis croissant (retour). Les concentrations en  $K^+$  (0,1 mM) et  $Na^+$  (1,0 mM) restent constantes. Après avoir noté la valeur de  $E_{oi}$  et de  $\Delta E_{Cl}$ , le milieu est aspiré, la cellule rincée à l'eau distillée puis baignée dans la nouvelle solution. Chaque essai a comporté 10 cellules.

**Résultats.** Le potentiel de membrane (tonoplaste + plasmalemme) devient plus négatif à mesure que la concentration en chlorures diminue et qu'augmente parallèlement celle en benzène sulphonate. Il passe ainsi de -105 mV à -146 mV (Figure 1). Au retour, la cellule continue à manifester une légère hyperpolarisation puis se dépolarise brusquement dans la dernière solution où  $[Cl]_o$  est maximum et le benzène sulphonate absent. Les valeurs calculées de l'erreur standard ( $\sigma$ ) pour les différents points de la Figure 1 oscillent autour de  $\pm 9$  mV.

Le potentiel d'équilibre  $E_{Cl}$ , devient plus négatif à mesure que  $[Cl]_o$  diminue (Figure 2). Cette variation est directement proportionnelle au  $\log [Cl]_o$ . La pente de la droite correspond à un changement de 14 mV pour une modification de 10 fois la concentration extérieure en chlorure. Au retour, cette relation subsiste sauf pour les

2 solutions où  $[Cl]_o$  est la plus forte. Les valeurs de l'erreur standard ( $\sigma$ ) pour les différents points de la Figure 2 oscillent autour de  $\pm 10$  mV.

**Discussion et conclusion.** L'hyperpolarisation de la cellule à mesure que la concentration en chlorures diminue dans le milieu extérieur suppose une absorption importante de l'anion benzène sulphonate par *Nitella*. La substitution de cet anion aux chlorures entraîne toujours une diminution correspondante du potentiel (HOPE et WALKER<sup>2</sup>, SPANSWICK, STOLAREK et WILLIAMS<sup>3</sup>, RAVEN<sup>4</sup>). Ce potentiel plus négatif ne résulte pas d'une diminution du coefficient de perméabilité du plasmalemme aux chlorures ( $P_{Cl}$ ) tel qu'il est défini par HODGKIN et KATZ<sup>5</sup>. En effet en introduisant les valeurs de  $[Cl]_i$  calculées d'après Goldman nous trouvons, pour un  $P_{Cl}$  constant de  $7.10^{-9}$  (SMITH<sup>6</sup>), une décroissance progressive de l'efflux net: 0,64; 0,52; 0,38; 0,22 et 0,09 pmoles  $cm^{-2} sec^{-1}$  quand  $[Cl]_o$  est respectivement de 1,1; 0,67; 0,42; 0,20 et 0,10

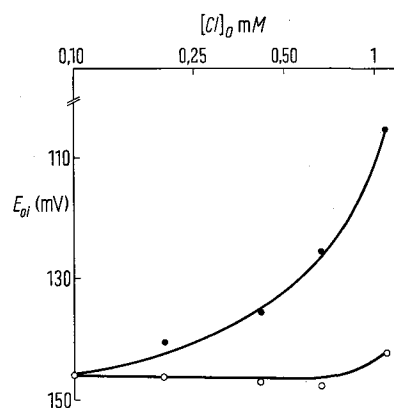


Fig. 1. Effet de la concentration externe des chlorures (remplacés progressivement par du benzène sulphonate) sur le potentiel de membrane. ●, aller; ○, retour.

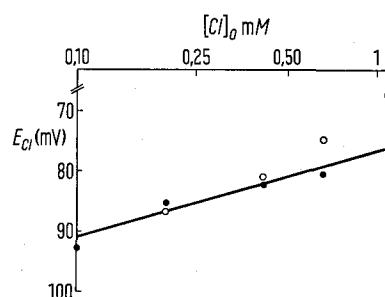


Fig. 2. Effet de la concentration externe des chlorures (remplacés progressivement par du benzène sulphonate) sur le potentiel d'équilibre des chlorures ( $-E_{Cl}$ ).

<sup>1</sup> J. BRADLEY and E. J. WILLIAMS, J. exp. Bot. 55, 241 (1967).

<sup>2</sup> A. B. HOPE and N. A. WALKER, Aust. J. biol. Sci. 14, 26 (1961).

<sup>3</sup> R. M. SPANSWICK, J. STOLAREK and E. J. WILLIAMS, J. exp. Bot. 54, 1 (1967).

<sup>4</sup> J. A. RAVEN, J. exp. Bot. 59, 233 (1968).

<sup>5</sup> A. L. HODGKIN and B. KATZ, J. Physiol. 108, 37 (1949).

<sup>6</sup> F. A. SMITH, J. exp. Bot. 58, 207 (1968).

mM. La première et la dernière de ces valeurs correspondent remarquablement aux 2 efflux observés par HOPE, SIMPSON et WALKER<sup>7</sup> au moyen de <sup>36</sup>Cl chez *N. translucens* plongée dans une solution où  $[Cl]_o = 1,1$  mM ( $\Phi_{Cl} = 0,61$  pmoles  $cm^{-2} sec^{-1}$ ) et dans un autre où les chlorures sont remplacés par du benzène sulphonate ( $\Phi_{Cl} = 0,11$  pmoles  $cm^{-2} sec^{-1}$ ). En outre, au retour, l'efflux des chlorures augmente à nouveau (cfr. Figure 2) alors que la cellule reste hyperpolarisée. Une diminution de l'influx de Na du type de celle observée par SMITH<sup>8</sup> lorsque la concentration en chlorures décroît dans le milieu extérieur est insuffisante pour rendre compte de l'hyperpolarisation observée. Nous estimons donc que le benzène sulphonate pénètre activement dans *Nitella* et que

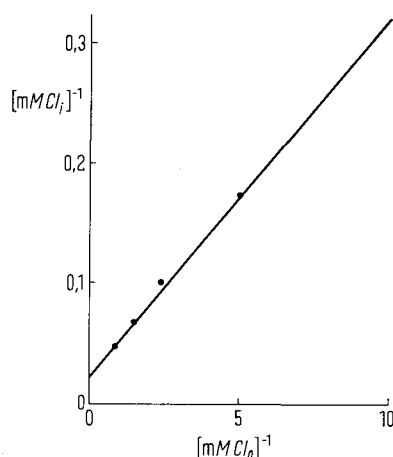


Fig. 3. Réciproque de l'accumulation des chlorures en fonction de la réciproque de la concentration externe en chlorures.

cette pompe est électrogénique. Comme l'hyperpolarisation persiste alors que la concentration externe en benzène sulphonate diminue nous devons admettre que l'efflux passif de cet ion est très faible.

L'influx actif de benzène sulphonate chez *Nitella* est à rapprocher de l'accumulation de colorants acides du type sulphonique chez de jeunes cellules de plantes supérieures (cfr. KINZEL<sup>9</sup>). D'autre part la Figure 3 établie d'après les valeurs expérimentales moyennes de  $[Cl]_i$  (en supposant que les interactions de la paroi sont proportionnelles à  $[Cl]_o$ ) démontre qu'il n'est pas impossible que l'influx actif de  $Cl^-$  chez *Nitella* se fasse au moyen d'un transporteur.

**Summary.** The chloride electrochemical potential difference between the inside of cells of *Nitella translucens* and some external solutions, where Cl has been progressively replaced by benzenesulphonate, has been measured by means of Ag-AgCl electrodes. It appears that benzenesulphonate moves into the cell by an electrogenic pump and that the uptake of Cl by *Nitella* is not in contradiction with a carrier hypothesis.

J. LEFEBVRE et C. GILLET<sup>10</sup>

Facultés Universitaires de Namur,  
Département de Biologie Végétale,  
B-5000 Namur (Belgique), 16 decembre 1969.

<sup>7</sup> A. B. HOPE, A. SIMPSON and N. A. WALKER, Aust. J. biol. Sci. 19, 255 (1966).

<sup>8</sup> F. A. SMITH, J. exp. Bot. 57, 716 (1967).

<sup>9</sup> H. KINZEL, Abh. dt. Akad. Wiss. Berlin, Kl. med. 4a, 205 (1968).

<sup>10</sup> This work was supported by grants from the F.N.R.S. and was carried out in the Biophysics Section of the Edinburgh University. We are indebted to Dr. E. J. WILLIAMS and Dr. HOGG for having sponsored this research and kindly provided the material.

## In vitro Action of Polyvinylsulfate on Acylation and Methylation of Nucleic Acids

Polyvinylsulphate (PVS) is an effective inhibitor of ribonuclease<sup>1</sup> and in many papers it has been used for that protective effect in enzymatic incorporations like aminoacylation of tRNA or cell free protein synthesis. Actually PVS action is not specific for ribonuclease but has other reactions: PVS combines with 70 S ribosomes to form a polysome-like structure in a reversible binding<sup>2</sup>; PVS gives a complete dissociation of proteins from rRNA<sup>3</sup>; while SHINOZAWA et al.<sup>2</sup> found that PVS reduces aminoacylation of tRNA, ILAN and ILAN<sup>4</sup> show an increased amount of aminoacylation. In the two cases concentrations of PVS are very different. This work gives the relation between different concentrations in PVS and acylation or methylation of nucleic acids in enzymatic assays: a kinetic study of methylation and the results of pre-incubated assays with PVS and enzymes or nucleic acids. Polyvinylsulfate potassium salt was obtained from General Biochemicals, Chagrin Falls (Ohio) (lot: 85284); adenosyl-L-methionine methyl <sup>14</sup>C from Schwarz, specific activity 52 mc/mM, yeast protein hydrolysate <sup>14</sup>C from Schwarz and DNA of *M. lysodeikticus* from Miles. *E. coli* tRNA for methylation assays was extracted from *E. coli* K12 W6 RC<sup>re1</sup> met<sup>-</sup> and tRNA for acylation studies was extracted from *E. coli* B, both extractions were performed by the method of RAMMLER<sup>5</sup>, using iso-

amyl alcohol and purifying with DEAE column chromatography and NaCl linear gradient. Crude extract enzymes from *E. coli* B are utilized after a 30–50% ammonium-sulphate precipitation.

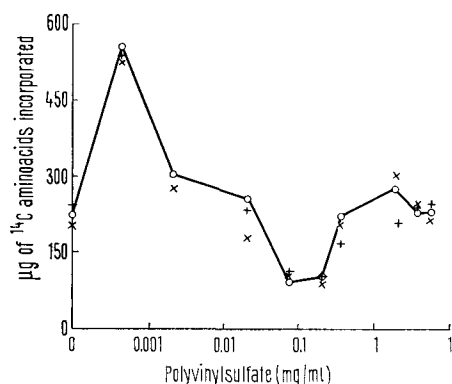


Fig. 1. Semi-log plot of action of PVS at different concentrations on the acylation of tRNA. ○—○, 30 min normal incubation; +—+, 15 min action on enzymes and normal completed incubation; ×—×, 15 min action on tRNA and normal completed incubation.