

INSTITUT DE RECHERCHES SUR LE CAOUTCHOUC



RAPPORT DE MISSION A L'UNIVERSITE PARIS VII
LABORATOIRE D'ELECTROPHYSIOLOGIE DES MEMBRANES
6 et 7 avril 1987 et du 11 au 23 mai 1987

Regis LACROTE

RAPPORT DE MISSION
à l'Université PARIS VII
Laboratoire d'électrophysiologie des Membranes
6 et 7 avril 1987
et du 11 au 23 mai 1987

Regis LACROTTE

Je tiens à remercier très chaleureusement M. J.P. RONA, responsable du laboratoire, non seulement pour l'accueil qu'il m'a réservé mais aussi pour le temps qu'il a personnellement consacré au bon déroulement de ce stage : expérimentation, conseils et encouragements.

Daniel CORNEL s'est exclusivement attaché à mon initiation en matière d'électrophysiologie. Durant ces 2 semaines, nous avons travaillé ensemble. Qu'il en soit très vivement remercié.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe de recherche pour l'atmosphère d'une haute compétence professionnelle et d'extrême cordialité entretenue durant cette mission.

Ma reconnaissance va également à MM. CARRON et JACOB pour la fourniture de matériel végétal.

Je remercie la direction de l'IRCA Paris et de l'IRCA Côte d'Ivoire de m'avoir permis d'effectuer ce stage.

S O M M A I R E

- + BUT DE LA MISSION
- + GENERALITES SUR LA BIOPHYSIQUE CELLULAIRE : TRANSPORTS MEMBRANAIRES
- + INTRODUCTION A L'ELECTROPHYSIOLOGIE PRATIQUE
- + RESULTATS
- + CONCLUSION ET PERSPECTIVES

+

BUT DE LA MISSION

Dans l'étude des processus physiologiques et biochimiques de la production de latex, un des facteurs principaux limitant est l'approvisionnement des laticifères en saccharose, précurseur du polyisoprène. Si la recherche sur les mécanismes de perméabilité sélective au niveau du plasmalemme de la cellule laticifère in situ permet d'ores et déjà d'émettre l'hypothèse d'une énergisation du phénomène, il reste à préciser les modalités du transport du saccharose à l'intérieur de la cellule laticifère. On veut donc caractériser le mode de transport du saccharose et/ou du glucose-fructose au travers de la membrane plasmalemmique, et partant démontrer l'action de l'éthylène sur ces mécanismes.

+

GENERALITES SUR LA BIOPHYSIQUE CELLULAIRE : TRANSPORTS MEMBRANAIRES

Lorsque un soluté S est en concentrations différentes dans 2 compartiments séparés par une membrane, les molécules de S vont se déplacer du compartiment le plus concentré dans le compartiment le plus dilué jusqu'à atteindre une distribution uniforme des deux côtés. Ce type de transport dont la force motrice est un gradient de concentration ou gradient de potentiel chimique, est appelé diffusion.

Dans le cas de particules chargées, les ions, dont le mouvement est causé seulement par des différences de concentration, les mobilités variables des anions et des cations de l'électrolyte ($u^+ \neq u^-$) peuvent conduire à une distribution inégale des charges électriques, et donc créer une différence de potentiel, appelé le potentiel de diffusion :

$$E = \frac{RT}{F} \frac{\mu^+ - \mu^-}{\mu^+ + \mu^-} \cdot \ln \frac{d_+}{d_-}$$

d_+/d_- = gradient de concentration.

Donc le transport des ions dépend de deux facteurs :

- le gradient de potentiel chimique
- le gradient de potentiel électrique

La force motrice qui permet le mouvement d'un ion j peut être définie par son gradient de potentiel électrochimique : $\mu_j = \mu_j^s + RT \ln a_j + z_j F E$

La direction et la magnitude de cette force est donnée par la différence entre les valeurs de μ_j , e.g., $\mu_j^+ - \mu_j^-$

μ^s = potentiel d'état standard

R = constante des gaz (litre atmosphère molé⁻¹ k⁻¹)

T = température absolue (K)

a_j = activité de l'ion j

Z = valence de l'ion

F = Faraday (96500 Coulombs)

E = potentiel de diffusion

A l'équilibre, les forces motrices qui permettent le mouvement des ions de l'extérieur à l'intérieur d'un compartiment et de l'intérieur vers l'extérieur sont égales, i.e. $\mu_j^{i \rightarrow o} = \mu_j^{o \rightarrow i}$

on a donc : $\mu_j^s + RT \ln a_j^o + Z_j \cdot F E_o = \mu_j^s + RT \ln a_j^i + Z_j \cdot F E_i$

soit : $E_j = (E_j^i - E_j^o) = \frac{RT}{Z_j \cdot F} \ln \frac{a_j^o}{a_j^i}$

c'est l'équation de Nernst.

A l'équilibre, le flux de charge nette est nul : l'influx J_{oi} et l'efflux J_{io} sont égaux, i.e., $\mu_{oi} = \mu_{io}$ et $J_{oi} = J_{io}$.

Goldman (1943) exprime le flux net sous la forme : $J_j = - \frac{z_j u_j E}{d} \cdot \frac{a_j^o - a_j^i e^{z_j F E / RT}}{1 - e^{z_j F E / RT}}$

d = épaisseur de la membrane.

En considérant que la charge totale transportée dans un tel système par les anions et par les cations est équivalente, que l'essentiel en est assuré par les ions les plus mobiles K^+ Na^+ et Cl^- , que l'électroneutralité est maintenue et le flux de charge nette, I, nul on a :

Ce qui permet d'écrire l'équation de Goldman-Hodghin et Katz.

$$E = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_{K^+} [K^+]_o + P_{Na^+} [Na^+]_o + P_{Cl^-} [Cl^-]_i}{P_{K^+} [K^+]_i + P_{Na^+} [Na^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_o}$$

E = potentiel de diffusion

P = coefficient de perméabilité.

Quand les ions sont distribués passivement, selon le gradient de potentiel électrochimique, le système à l'équilibre obéit à la loi de Nernst ou de Goldman Hodgkin Katz. Le potentiel de diffusion E_j crée par les flux ioniques doit être égal au potentiel de membrane mesuré E_m .

Chez les cellules végétales, pendant longtemps, la polarisation électrique n'a été expliquée que par la diffusion ionique. Or le plus souvent le potentiel de membrane mesuré E_m est plus électronégatif que le potentiel de diffusion calculé. Il existe donc, en plus du gradient de potentiel électrochimique, d'autres forces mises en jeu dans les mouvements ioniques. Cela suggère qu'un mécanisme de transport actif d'ion peut fonctionner de l'intérieur vers l'extérieur ou bien dans le sens opposé.

Dans le cas de particules chargées électriquement, la définition du transport actif est la suivante : mouvement net de ces particules contre le gradient de leur potentiel électrochimique.

Un transport d'ions dépendant du métabolisme, et qui génère un potentiel électrique est appelé, pompe électrogène. La mise en évidence de pompes électrogènes se fait entre autres :

- en comparant le potentiel effectivement mesuré au potentiel de diffusion calculé ;
- en employant des inhibiteurs métaboliques qui ont une action dépolarisante, rapide et réversible ;
- en observant si intensité de la respiration et potentiel transmembranaire sont interdépendants.

Ainsi il a été de nombreuses fois démontré que le potentiel de membrane mesuré est dépendant du métabolisme énergétique.

La rapidité de la dépolarisation du potentiel intracellulaire sous l'action des inhibiteurs permet de penser que le mécanisme électrogène est situé au niveau de la membrane plasmique. De plus, l'action des effecteurs est réversible lors de la suppression de l'agent inhibant.

La cohérence des observations faites chez les végétaux supérieurs avec la théorie chimiosmotique de Mitchell (1974) sur le transport actif des protons tend à démontrer la relation existant entre l'excrétion de protons et le caractère électrogène observée chez les eucaryotes, d'où le terme de pompe à protons électrogène dont le fonctionnement est associé à l'hydrolyse de l'ATP.

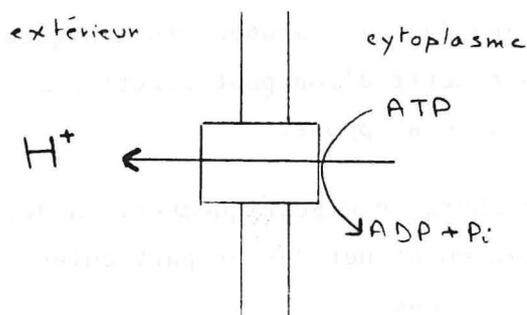


Schéma de fonctionnement de la pompe électrogène

Cette pompe contribue fortement à l'existence du potentiel de membrane. Le gradient de potentiel électrochimique ainsi entretenu crée une force, appelé force proton-motrice qui sera employée dans les échanges d'ions et de molécules organiques telles les sucres.

De nombreux travaux sur les mécanismes de transport trans-membranaire ont permis d'établir un modèle de fonctionnement de la pompe à protons électrogène et le transport couplé d'ions, de solutés et de protons par la force motrice.

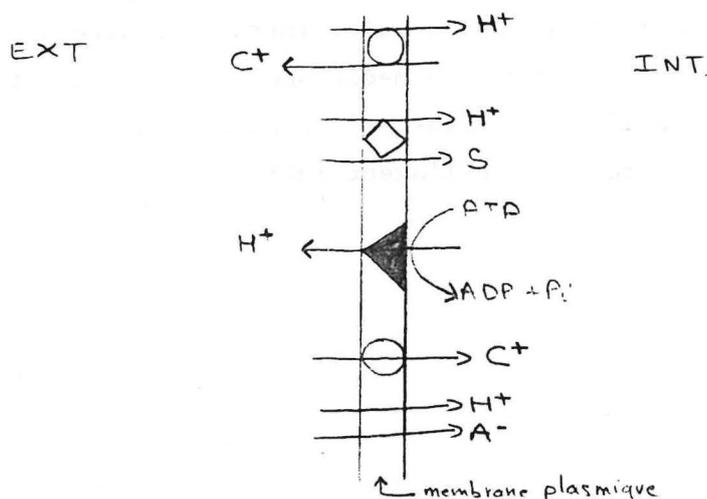


Schéma de fonctionnement des mécanismes de transport trans-membranaire
SZEM. Ann. Rev. plant. Physiol. 1985.

On a montré l'antiport cations - H^+ (Ca^{2+}/H^+ , H^+/K^+), le symport sucres - H^+ (glucose/ H^+) l'antiport sucres - anions (glucose/ OH^-). Dans le cas des cellules végétales, c'est l'ion H^+ qui est impliqué dans le mécanisme de transport couplé. L'influx de sucres serait couplé au flux de H^+ par l'intermédiaire d'un système transporteur qui "fixe" l'ion et le soluté.

On appelle système de transport actif primaire la pompe électrogène ATP-dépendant tandis que l'influx de soluté couplé au flux d'ions constitue le mécanisme actif secondaire.

+ INTRODUCTION A L'ELECTROPHYSIOLOGIE PRATIQUE

Le matériel biologique

Dans l'impossibilité actuelle de travailler sur des cellules isolées de laticifères, des fragments de tissus superficiels ont été prélevés à l'aide d'un scalpel sur de jeunes tiges de seedlings âgés d'environ 5 mois. D'une longueur de 5 mm et de largeur de 1 mm. Ils sont maintenus par une pâte adhésive dans un milieu minimum contenant : KCl, $CaCl_2$ et NaCl à 0,1 m M. Le volume du milieu déposé sur la lame de l'échantillon est de 100 μ l.

L'observation au microscope (X500) permet de repérer les réseaux laticifères. Les cellules sont anastomosées, au contenu granuleux, le latex. De grosses cellules voisines à pigments rouges sont très visibles : les cellules à tanins. Le reste est constitué de cellules de taille plus réduite, de couleur claire : cellules du parenchyme.

L'instrumentation

- Toutes les manipulations sont effectuées sous un microscope optique classique (objectif 50, oculaire 10X).
- La localisation précise de l'électrode de mesure dans la cellule laticifère, nécessite l'emploi d'un micromanipulateur.

Un boîtier de commande comprend un levier unique agissant sur 3 pistons orientés selon les axes X Y Z, et un variateur de vitesse d'avancement du microinstrument. Le récepteur-porteur de l'électrode est séparé du manipulateur, ce qui évite toute vibration (fig 1).

L'entraînement électrique permet de contrôler la vitesse et la profondeur de pénétration de la microélectrode.

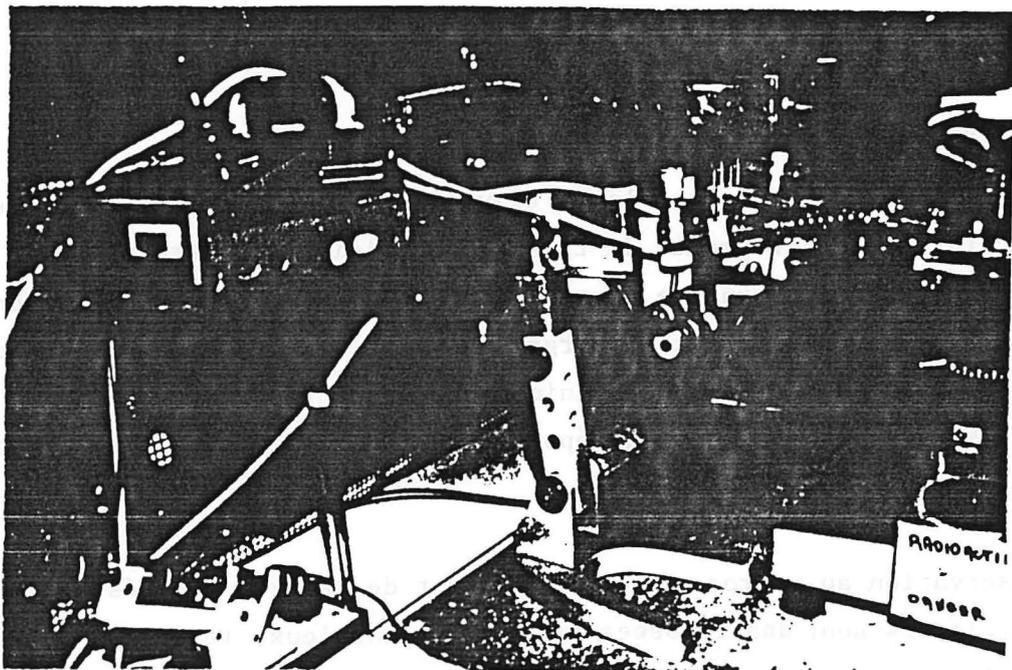


Fig. 1 : Micromanipulateur à commande électrique pour l'implantation des microélectrodes.

(d'après CORNEL 1985 Thèse de Doctorat)

- la mesure des potentiels est réalisée à l'aide de microélectrodes de verre. Leur fabrication est faite grâce à une étireuse verticale NARISHIGE PE2. Le réglage de la force d'étirement et le réglage du courant de chauffage permet d'obtenir une grande variété de profils de microélectrodes. Le diamètre de la pointe est de $1\mu\text{m}$.

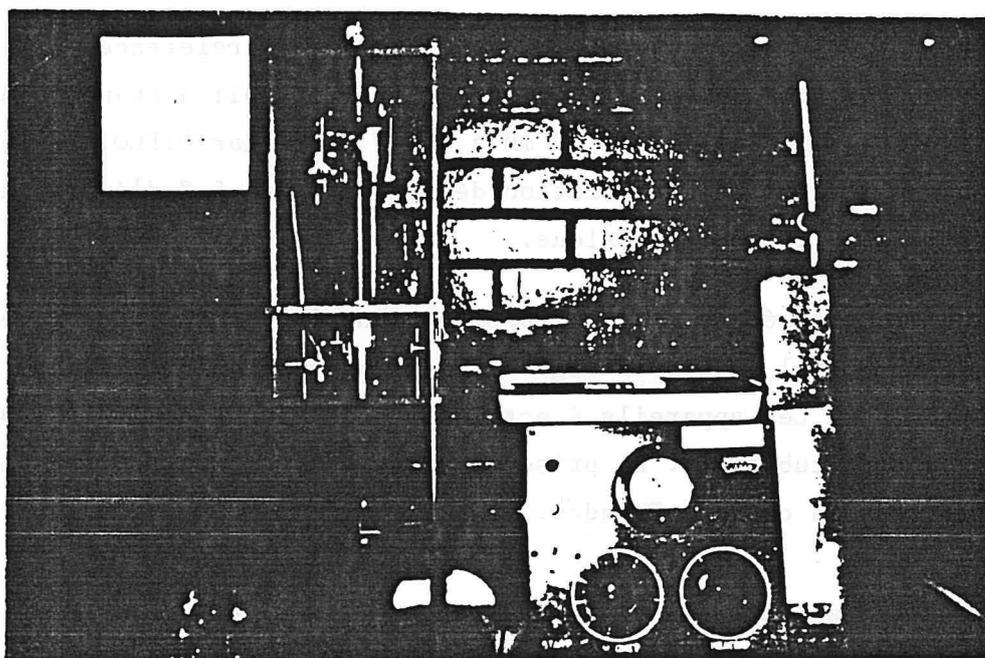


Fig. 2 : Etireuse NARISHIGE PE2 utilisée pour la fabrication des microélectrodes.

Pour être opérationnelles, les micropipettes sont remplies d'un électrolyte concentré : KCl 3 M dont la mobilité des 2 ions le constituant, est très voisine. La forte concentration de l'électrolyte permet de véhiculer la quasi totalité du courant.

Pour le remplissage des microélectrodes, on utilise des seringues à fils de verre incorporés. Le raccordement électrique de la micropipette est assuré par une cellule Ag/Ag Cl.

Pour fermer le circuit, on emploie une électrode de référence. Elle est constituée d'un tube de verre à pointe éfilée, rempli à chaud à la seringue d'une solution de KCl 10 mM à 1,5 % Agar-Agar DIFCO, relié par un tube souple rempli d'une solution de KCl à 3M à 1,5 % d'Agar-Agar, à une électrode au calomel classique.

Il est absolument nécessaire de constituer une isolation électrique. L'élément principal en est la cage de Faraday fermée d'un grillage englobant les instruments. Les appareils électriques sont placés à l'extérieur afin d'éviter des perturbations. La prise de terre est unique pour tous les instruments de la cage de Faraday.

- Les conditions sont maintenant réunies pour la mesure du potentiel transmembranaire des cellules laticifères.

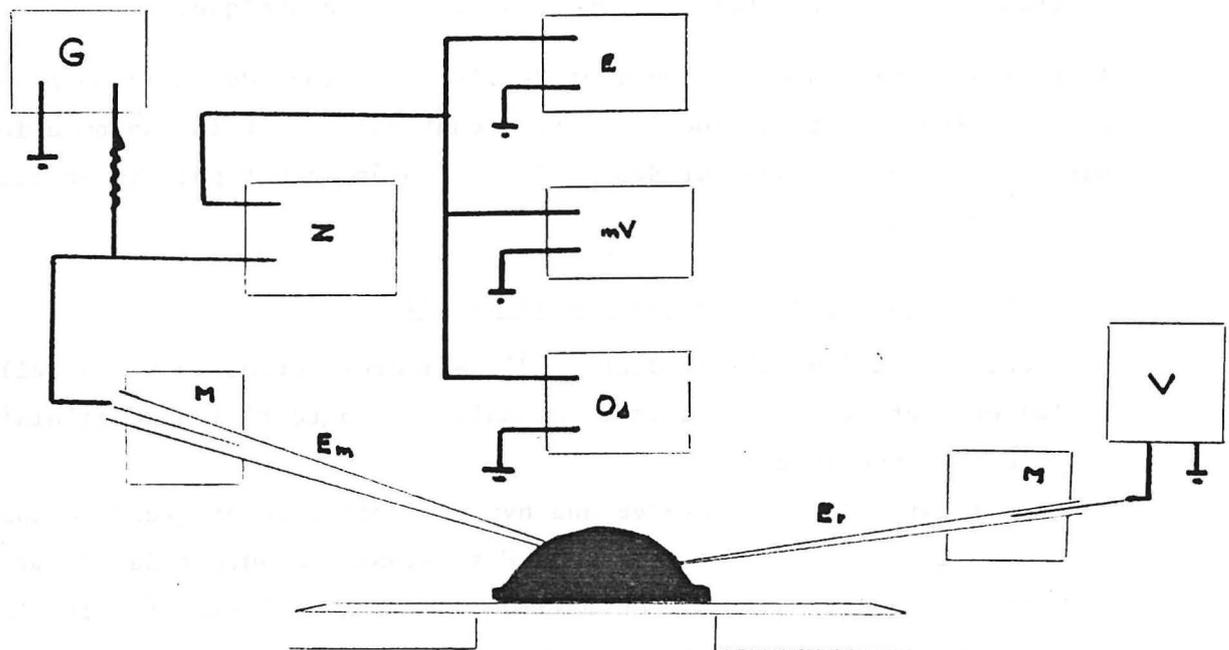


Fig. 3 : Dispositif de mesure et d'enregistrement des potentiels endocellulaires.

V = boîte de tarage ; Z = adaptateur d'impédance ; mV = millivoltmètre ;

E = enregistreur ; M = micromanipulateurs ; E_m = microélectrode de mesure ;

E_r = microélectrode de référence ; G = générateur de fréquence ;

O_s = oscilloscope. (d'après RONA 1982, Thèse de Doctorat d'Etat, modifié pour la circonstance).

+ RESULTATS

Les résultats présentés ne sont que préliminaires. En raison de la très courte durée de la mission, il n'a pas été possible de préciser une méthodologie de travail sur le tissu laticifère lui-même bien particulier. Nous avons préféré essayer le plus tôt possible de connaître l'électrophysiologie de la cellule laticifère, et de caractériser le ou les systèmes de transports des solutés à travers la membrane plasmique.

Ainsi les problèmes de prélèvement de l'échantillon, du choix du niveau d'incubation (goutte de 100 μ l ou flux continu), et de la manipulation sur un tissu et non pas sur des cellules isolés, n'ont pas été abordés en profondeur.

+ Electrophysiologie de la cellule laticifère

Plusieurs tentatives d'introduction d'une microélectrode dans la cellule laticifère ont été faites afin de connaître le potentiel endocellulaire moyen de ce type de tissu.

Dans la figure N° 1, on observe une hyperpolarisation progressive après entrée de l'électrode : la valeur de E se stabilise autour de -82 mv pendant 35 secondes environ. Un maximum est atteint à -122 mv puis les valeurs obtenues atteignent à nouveau -82 mv.

Dans la figure N° 2, on peut suivre 3 profils électriques de cellules laticifères. Ils présentent des similitudes quant aux valeurs stables de E les plus électronégatives, -157 mv, -127 mv, -157 mv respectivement pour les 3 profils. La dépolarisation observée chez la première cellule traduit son agonie suite sans doute à la blessure de l'électrode. La cellule se vide de son contenu, la ddp d'avec le milieu disparaît.

Deux autres profils ont été obtenus (fig. 3 A et B). La polarisation reste progressive mais la variation de la mesure est grande. On observe comme dans la figure 1, une hyperpolarisation transitoire atteignant -250 et -280 mv.

Ces premières mesures du potentiel transmembranaire laticifère montrent que les cellules sont bien polarisées. Em peut varier de -80 à -160 mv.

A trois reprises, on a observé des hyperpolarisations brèves. N'est ce pas le potentiel du cytoplasme pariétal et non plus du latex qui serait mesuré à ce moment précis ? Suite à un léger ajustement de l'électrode ? La question peut être posée.

Les mesures du potentiel sont répétables (fig. 4) et permettent de constater une certaine unité d'électronégativité du milieu intracellulaire par rapport au milieu d'incubation, aux environs de -100, -130 mv.

Il a été mis en évidence des cellules laticifères beaucoup moins polarisées que les précédentes (fig. 5 a et b). $E_m = -70$ et -90 mv au plus fortes polarisations ou -77 mv (fig. 6a) ou -68 mv (fig. 6b).

Il est alors possible de distinguer des cellules laticifères moins polarisées de celles dont E_m est très électronégative. Cette différence est-elle due à une pompe électrogène moins active dans un cas que dans l'autre ? La composante électrogène du potentiel transmembranaire s'exprimant le mieux chez les cellules les plus polarisées.

+ Electrophysiologie de cellules non laticifères

Les cellules épithéliales sont nettement moins polarisées que les laticifères (fig. 7). Il en est de même pour les cellules voisines (parenchyme) de ces dernières (fig. 8). E_m n'atteint pas la valeur de -60 mv.

Les cellules laticifères se différencient des autres tissus voisins de par leur électronégativité plus marquée. Cette information est importante en pratique car, parfois il n'est pas toujours facile de reconnaître la pointe de la microélectrode dans la cellule laticifère ; c'est la valeur du potentiel mesuré qui certifiera si l'on atteint le compartiment cytosolique.

+ Essais de caractérisation d'une pompe électrogène sur le plasmalemme laticifère.

+ Effet du glucose

Dans la figure N° 9, l'apport de glucose 50 mM final ne se traduit pas par une variation immédiate de E_m . La cellule reste polarisée vers -80 mv pendant plus d'une minute. Puis après une brusque variation de ddp, il se produit une dépolarisation progressive pendant 80 secondes. La mesure est stable pendant 2 minutes vers -40 mv. Un deuxième apport de glucose n'entraîne aucune modification de E_m . L'action dépolarisante de glucose est nettement plus évidente dans la figure N° 10 : de l'ordre de 40 mv pendant 2 minutes et 20 secondes.

+ Effet du saccharose

L'effet du saccharose est beaucoup plus faible que celui du glucose. Son action est aussi moins rapide. Dans la figure N° 11, on observe une dépolarisation de 10 mv, 10 minutes après addition de saccharose 50 mM. Un deuxième apport ne produit qu'une différence de 2 mv. On obtient le même type de réponse dans la figure N° 12, où un apport de saccharose provoque une dépolarisation de 10 mv après 22 minutes.

+ Effet du vanadate

L'action de l'orthovanate de sodium (200 μ M) paraît significative, puisqu'une dépolarisation de l'ordre de 30 mv est observée en 9 minutes d'enregistrement électrique. Dans ce cas précis (fig. 13), la cellule était bien polarisée à -157 mv au moment de l'apport de l'effecteur.

+ Discussion.

L'action dépolarisante du glucose, celle beaucoup moins marquée du saccharose permet d'émettre l'hypothèse d'un transport couplé sucre - ions : soit un symport sucre - H^+ ou bien un antiport sucre - anion (OH^-).

L'effet moins rapide et moins intense du saccharose pourrait être expliqué par deux phénomènes. D'abord on peut penser à un mécanisme de dégradation du saccharose en glucose et fructose, afin d'assurer l'entrée du glucide dans la cellule. Cette étape intermédiaire catalysée par une invertase pariétale, ralentirait le transport couplé sucre - ions. D'autre part, dans le cas de la figure N° 11, la plus faible polarisation endocellulaire est la cause de la faible réponse enregistrée après apport de saccharose : la composante électrogène s'exprime peu, d'où la faible ampleur des variations. Cependant, il est intéressant d'observer (fig. 11) que le mécanisme de dépolarisation est réversible : la suppression de saccharose du milieu est suivi par une hyperpolarisation traduisant le déséquilibre électrochimique entre compartiment cellulaire et extérieur suite à la dilution : la pompe électrogène continue d'excréter des protons alors que le transport couplé du saccharose ou du glucose-fructose est limité.

L'hypothèse de l'existence de la pompe électrogène et sans doute d'une pompe à protons sur le plasmalemma est renforcée par le résultat de l'action du 0-vanadate. L'orthovanadate est connu pour son action inhibante sur le fonctionnement des ATPases plasmalemmiques qui catalysent l'excrétion des protons. La dépolarisation observée après addition de l'agent inhibant traduit le ralentissement du fonctionnement de la pompe.

+

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette expérimentation préliminaire sur l'électrophysiologie du tissu laticifère nous a permis de vérifier que les schémas de fonctionnement des membranes observés d'une manière générale, se retrouvent chez les cellules laticifères. Il reste à caractériser et démontrer très précisément les mécanismes de transport chez les cellules laticifères. L'action de l'éthylène pourra être étudiée en profondeur de manière à en connaître les premiers effets. La possibilité d'avoir un accès direct à la composition ionique endocellulaire est déterminante pour la compréhension des mécanismes de transport et des perméabilités membranaires dans l'écorce de l'hévéa.

La démonstration complète de l'action de l'éthylène est alors possible. Des horizons nouveaux s'ouvrent tant sur la meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu (effets des glucides, d'inhibiteurs, de poisons métaboliques et d'effecteurs dont l'éthylène) que sur l'application rapide des connaissances nouvelles. Notamment le prolongement de l'action de la stimulation par une meilleure sensibilisation de l'ensemble des tissus de l'écorce à l'éthylène avec ou sans adjuvants, ou bien à une nouvelle matière active.

Il reste encore à mettre au point une méthodologie de travail sur le tissu laticifère en électrophysiologie. Confirmer les résultats obtenus et pousser plus loin les investigations sur la caractérisation électrophysiologique non seulement des cellules laticifères, mais aussi de leur environnement tissulaire et "démontrer" les mécanismes de l'alimentation glucidique des tissus producteurs. L'action de l'éthylène sera étudiée en profondeur. Une mission de 30 jours au début de 1988 s'avère indispensable afin de poursuivre une voie de recherche prometteuse quant à l'étude de la stimulation de la production chez l'hévéa.

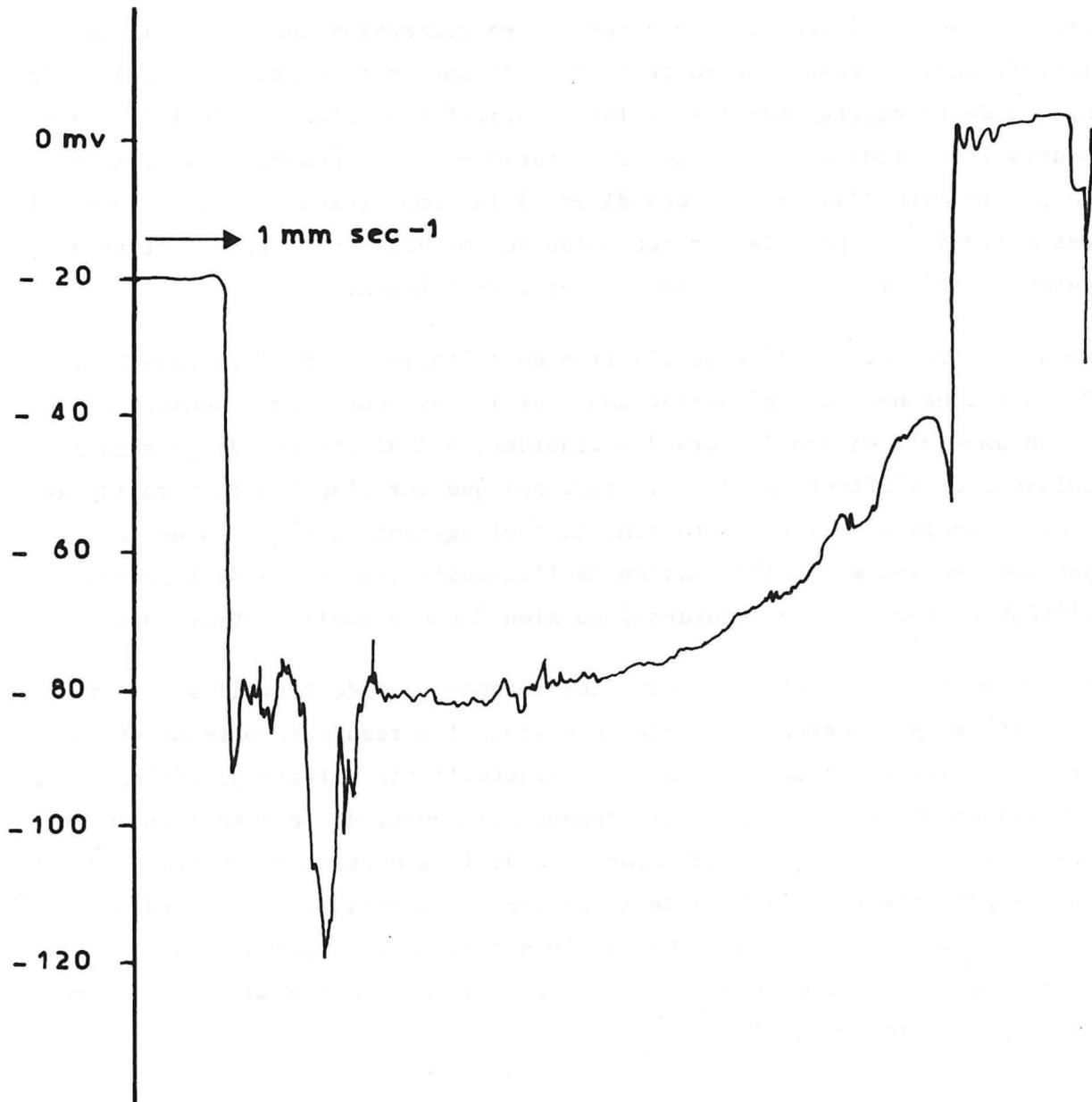


Fig.1- PROFIL ELECTRIQUE DE 1 CELLULE LATICIFERE

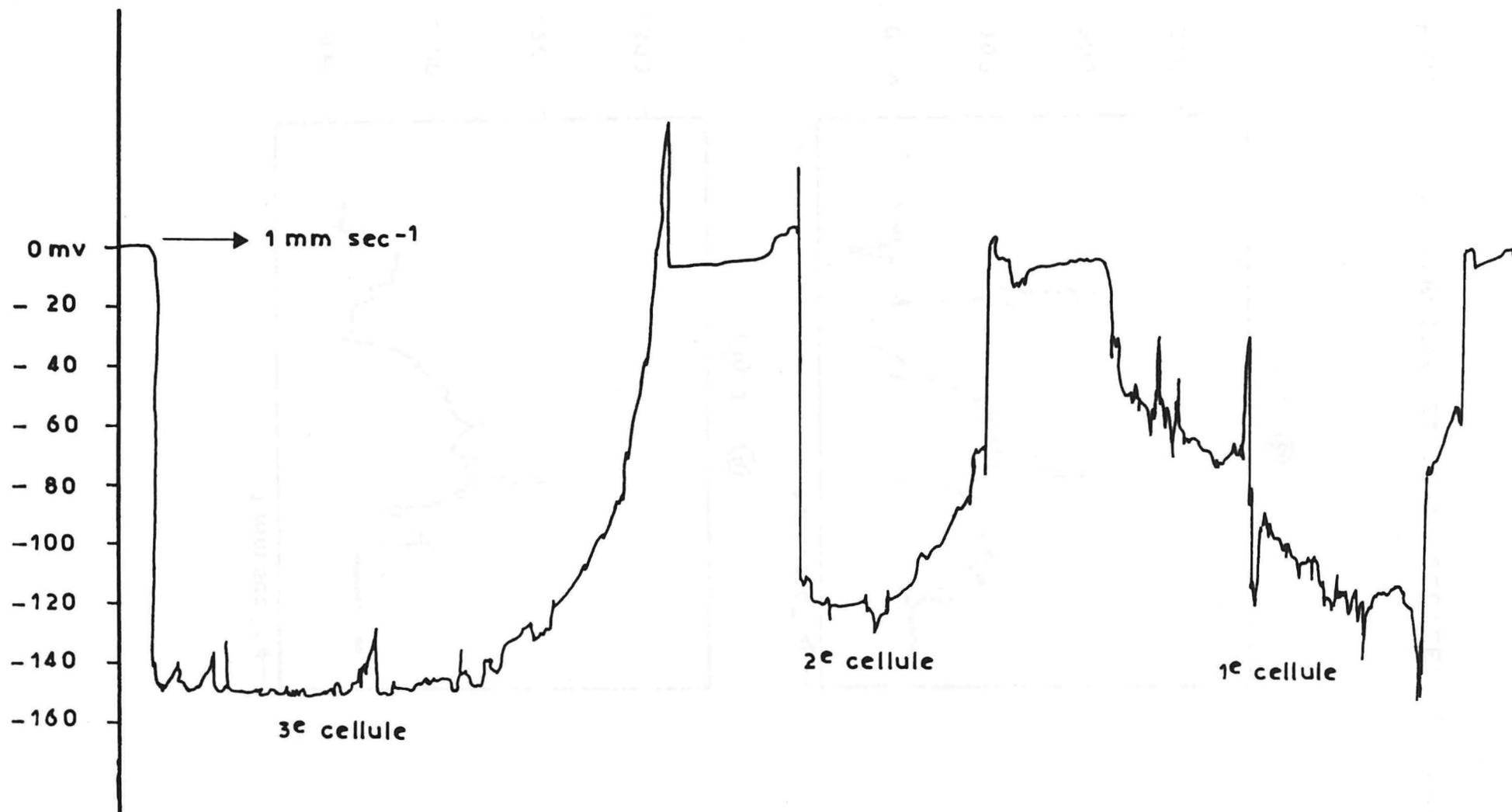


Fig. 2 - PROFILS ELECTRIQUES DE 3 CELLULES LATICIFERES

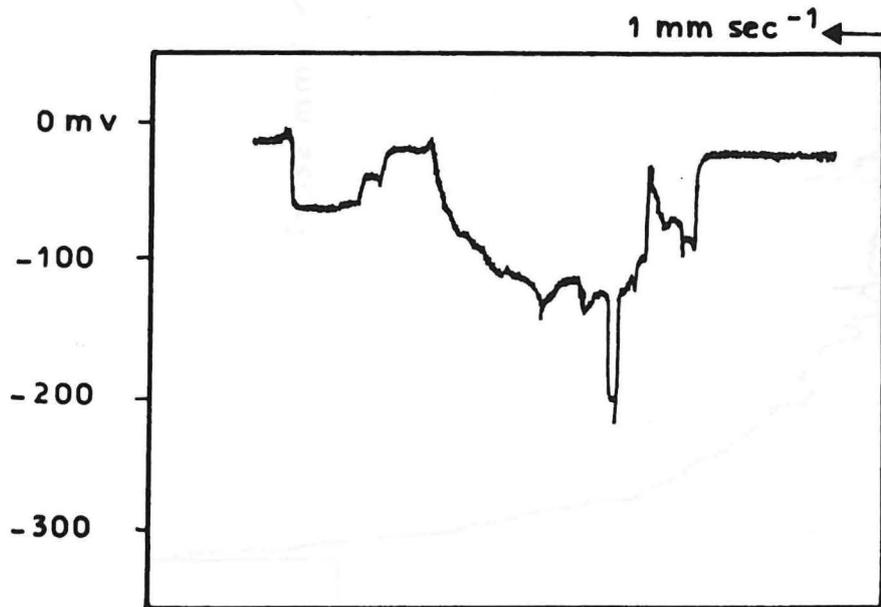


Fig. 3 (A)

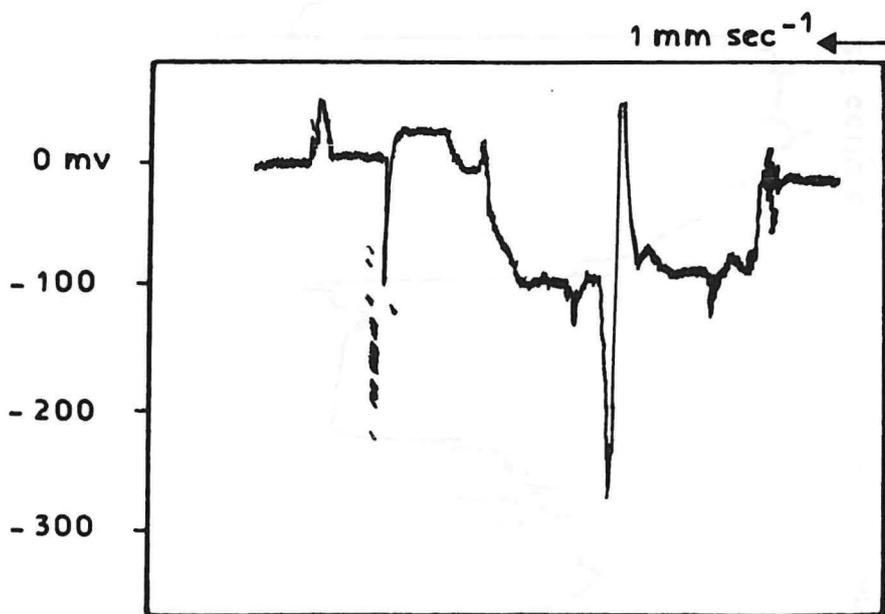


Fig. 3 (B)

Fig.3 - PROFILS ELECTRIQUES DE 2 CELLULES LATICIFERES

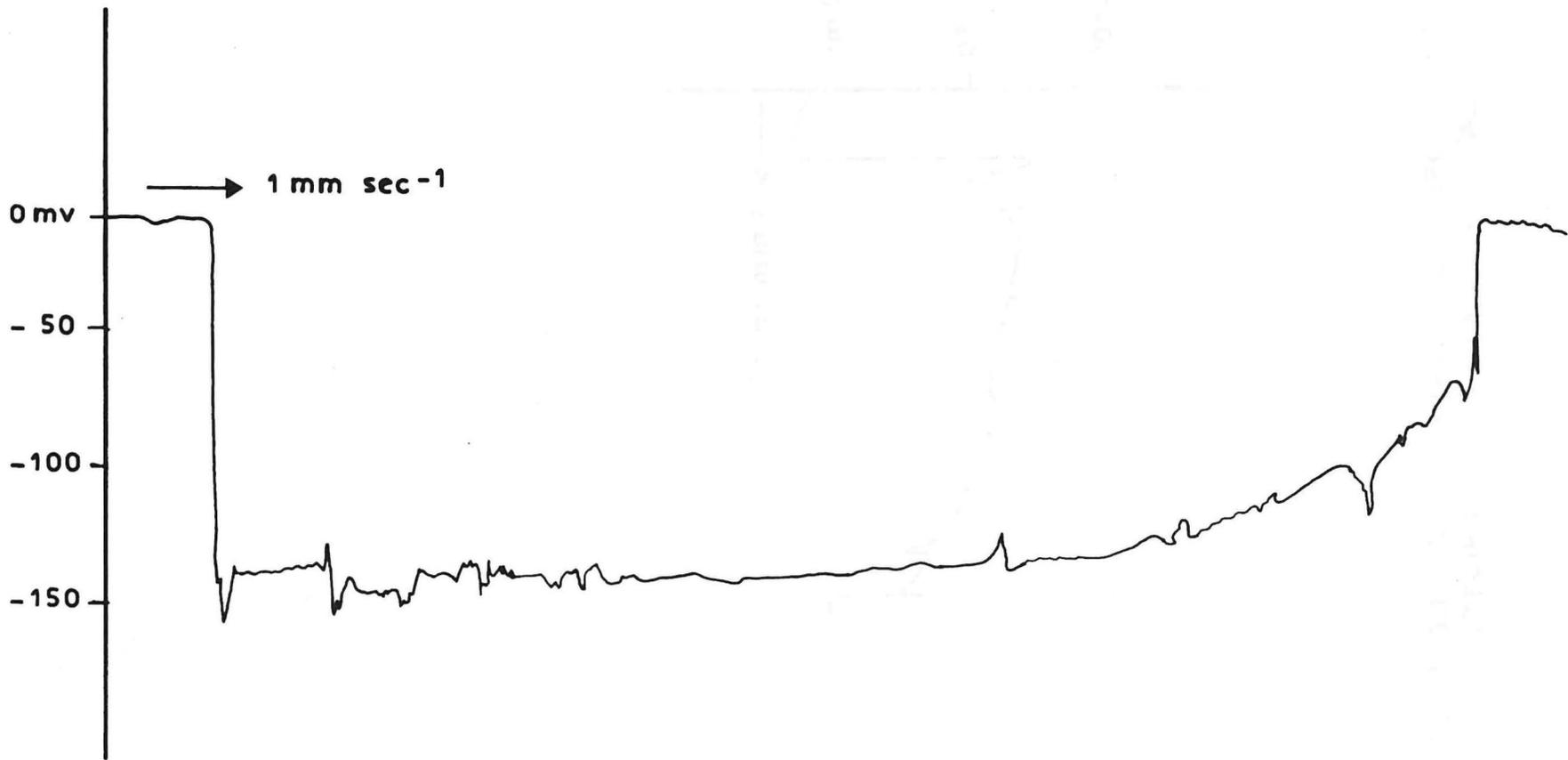


Fig.4 - PROFIL ELECTRIQUE DE 1 CELLULE LATICIFERE

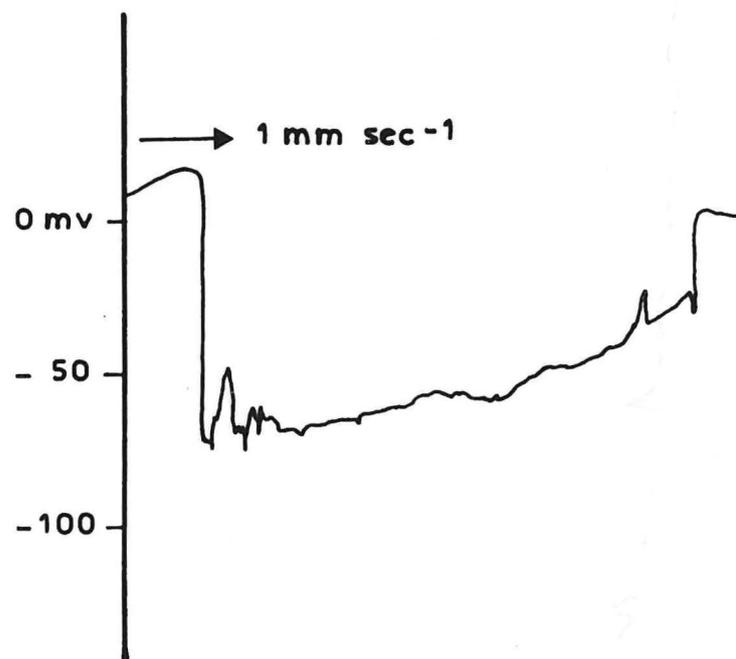


Fig.5 a - PROFIL ELECTRIQUE DE 1 CELLULE LATICIFERE MOINS POLARISEE.

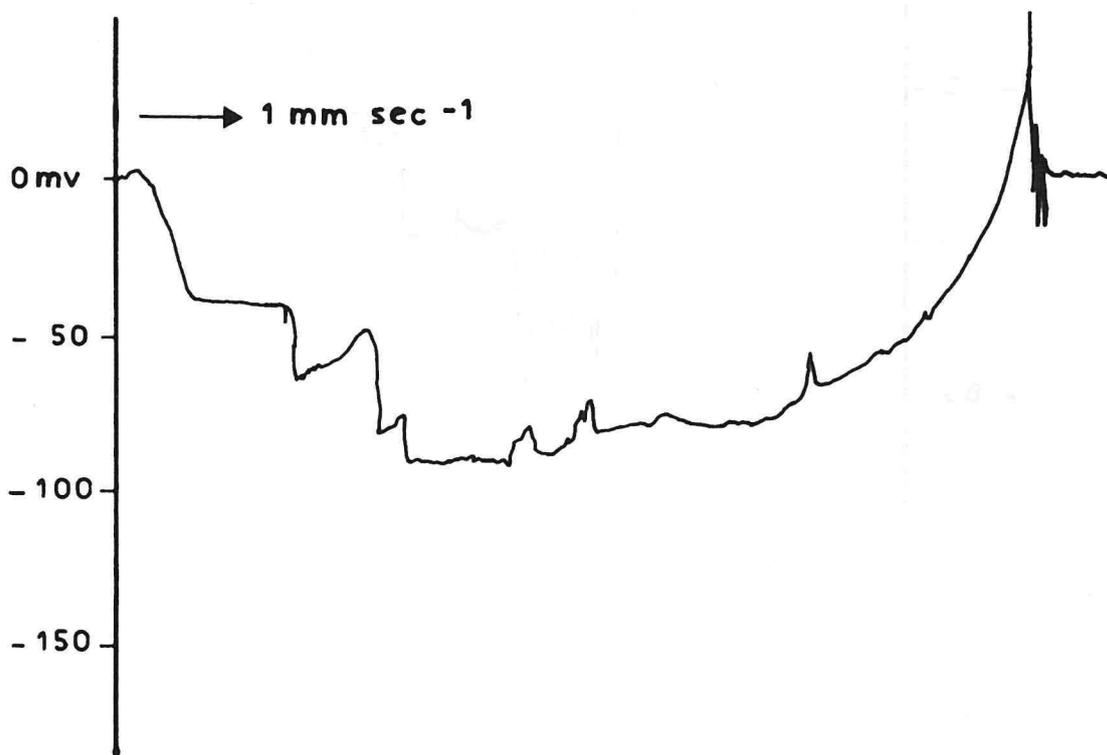


Fig.5 b- PROFIL ELECTRIQUE DE 1 CELLULE LATICIFERE MOINS POLARISEE.

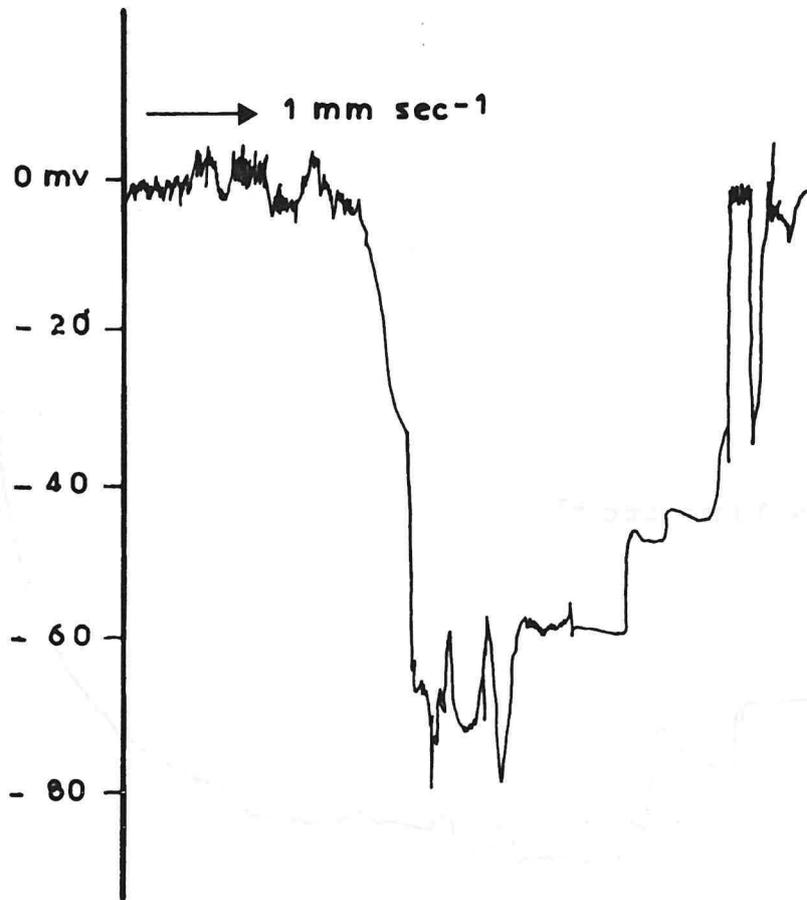


Fig.6 a- PROFIL ELECTRIQUE DE 1 CELLULE LATICIFERE MOINS POLARISEE.

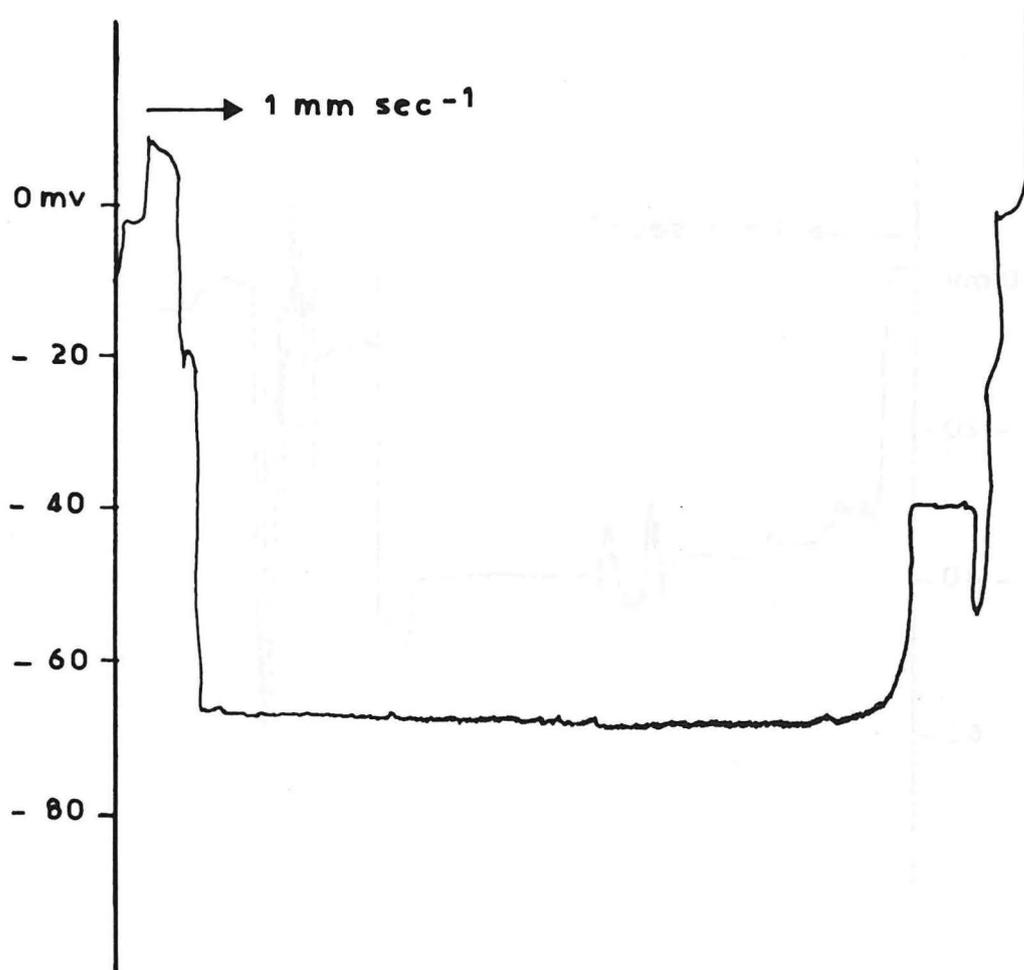


Fig.6 b - PROFIL ELECTRIQUE DE 1 CELLULE LATICIFERE MOINS POLARISEE.

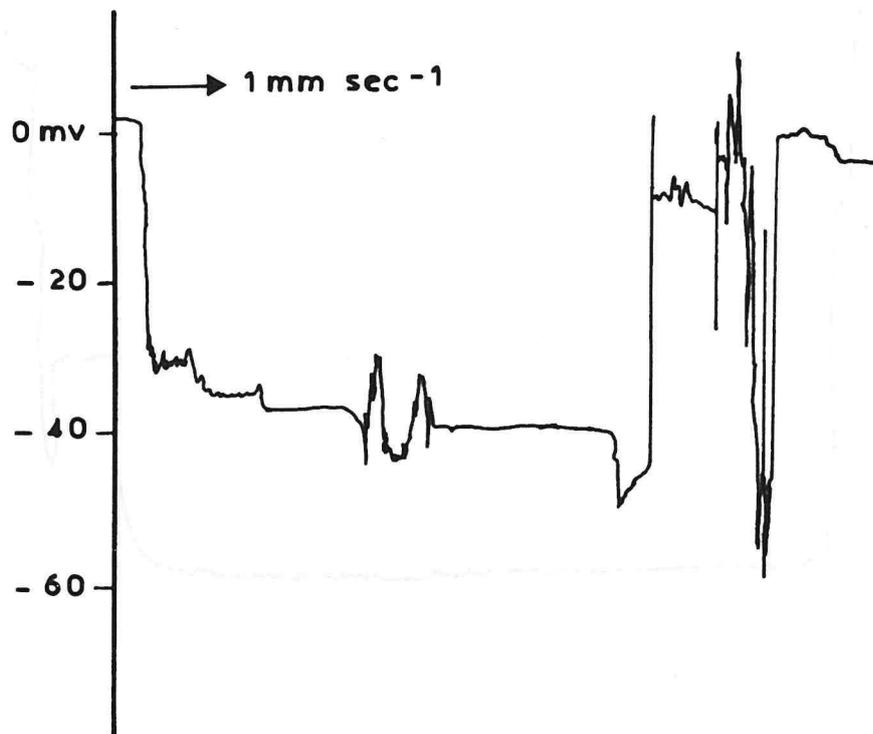


Fig.7- PROFIL ELECTRIQUE D'UNE CELLULE EPITHELIOLE

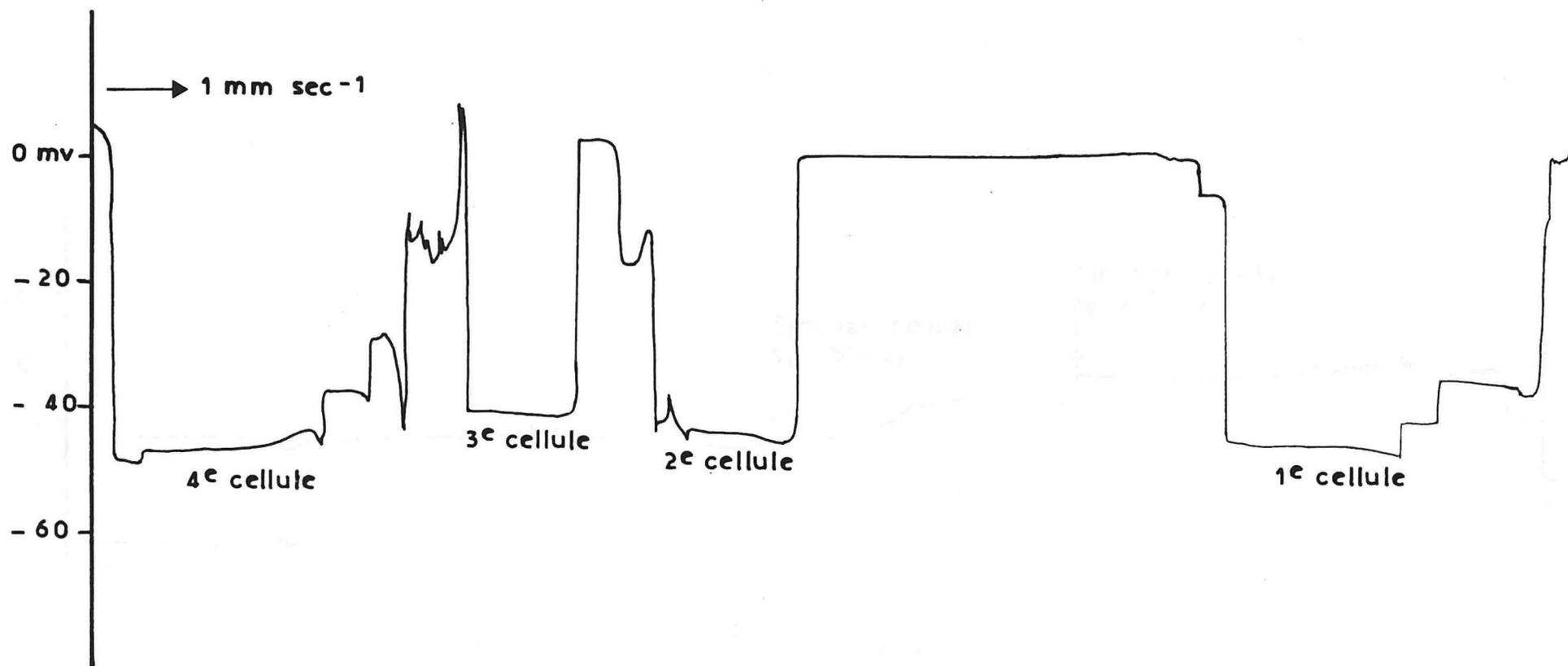


Fig.8 - PROFILS ELECTRIQUES DE 4 CELLULES DE PARENCHYME

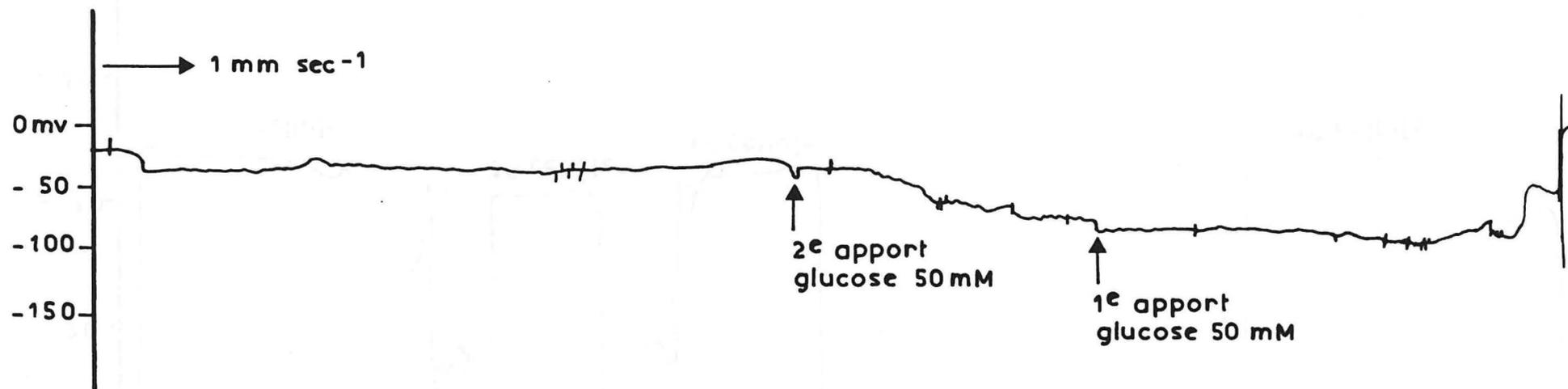


Fig.9-ACTION DU GLUCOSE SUR LA DDP TRANSMEMBRANAIRE D'UNE CELLULE LATICIFERE

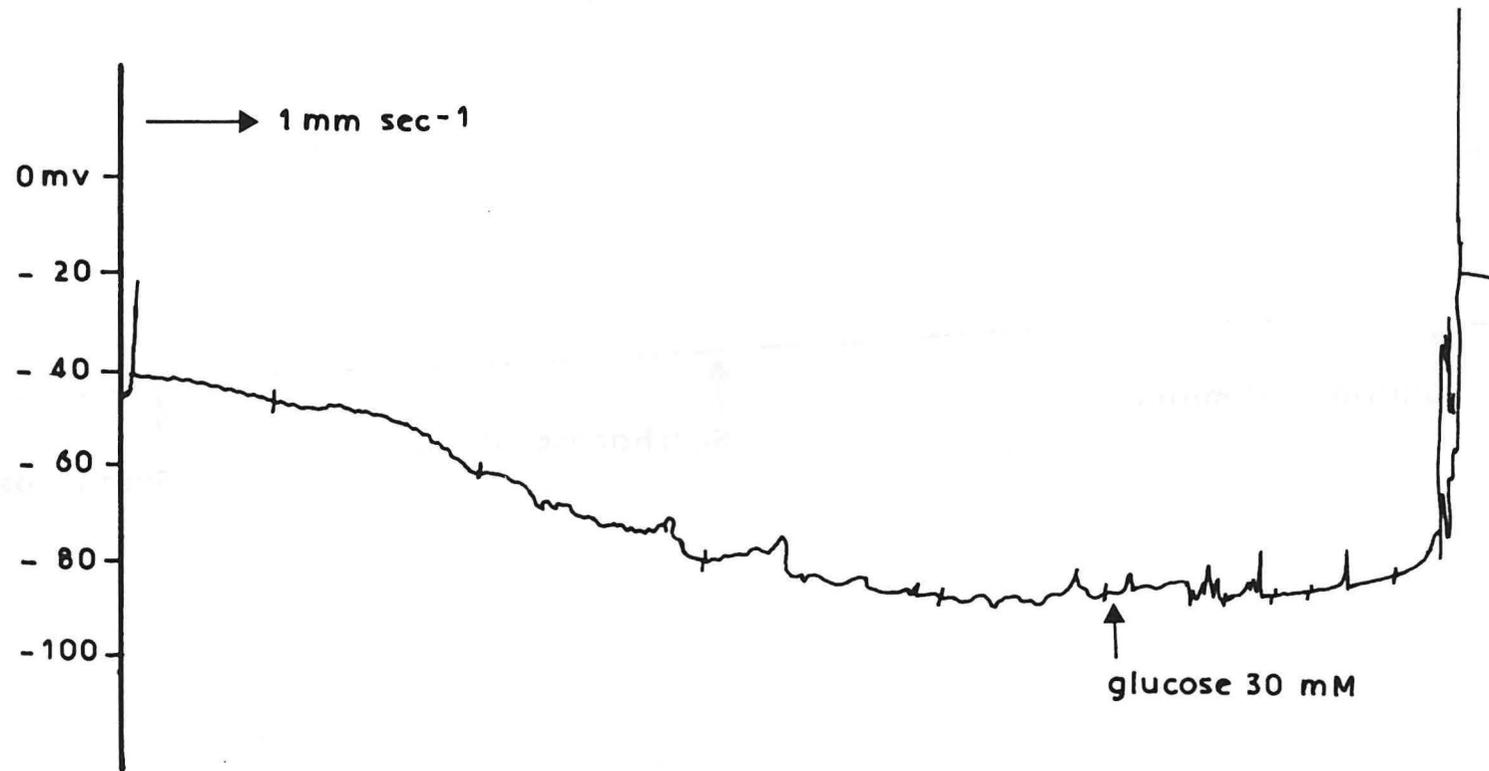


Fig.10- ACTION DU GLUCOSE SUR LA DDP TRANSMEMBRANAIRE D'UNE CELLULE LATICIFERE

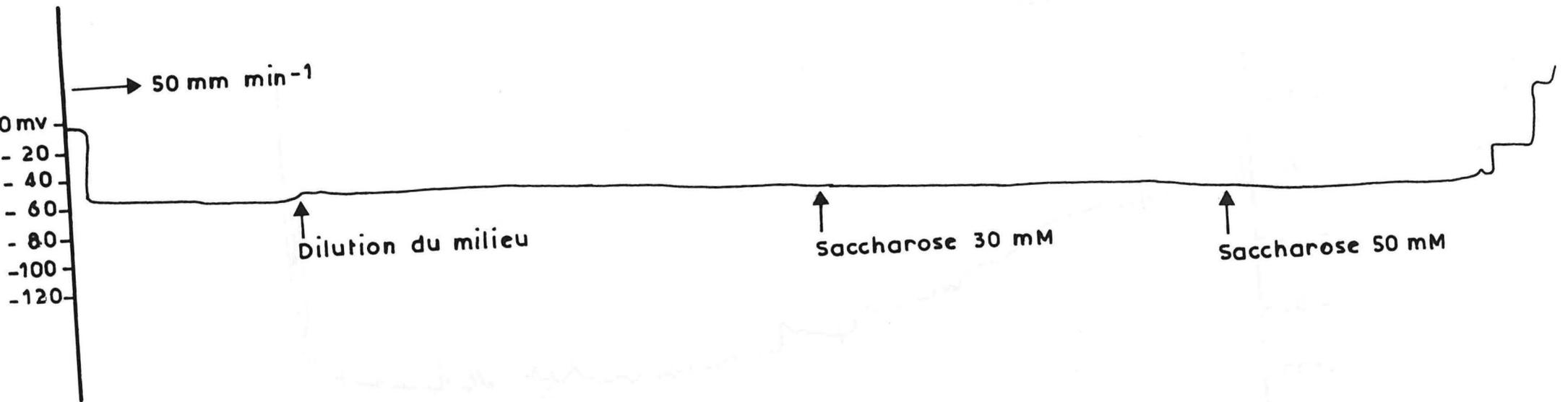


Fig.11-EFFET DU SACCHAROSE SUR LA DDP TRANSMEMBRANAIRE DE 1 CELLULE LATICIFERE

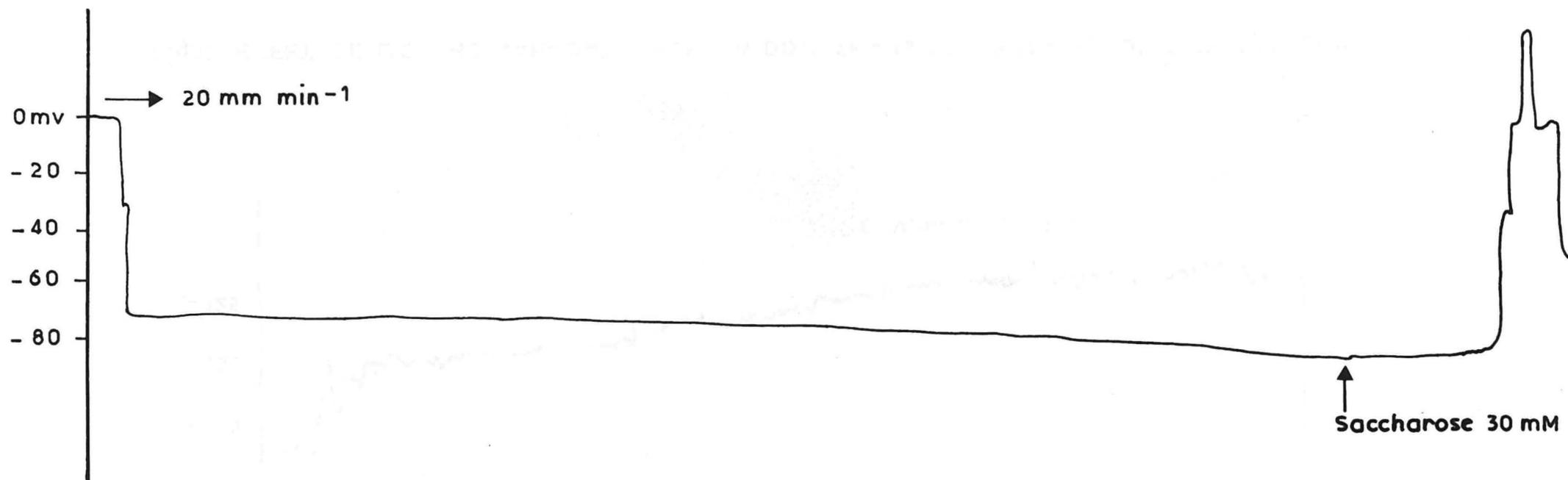


Fig.12- EFFET DU SACCHAROSE SUR LA DDP TRANSMEMBRANAIRE DE 1 CELLULE LATICIFERE

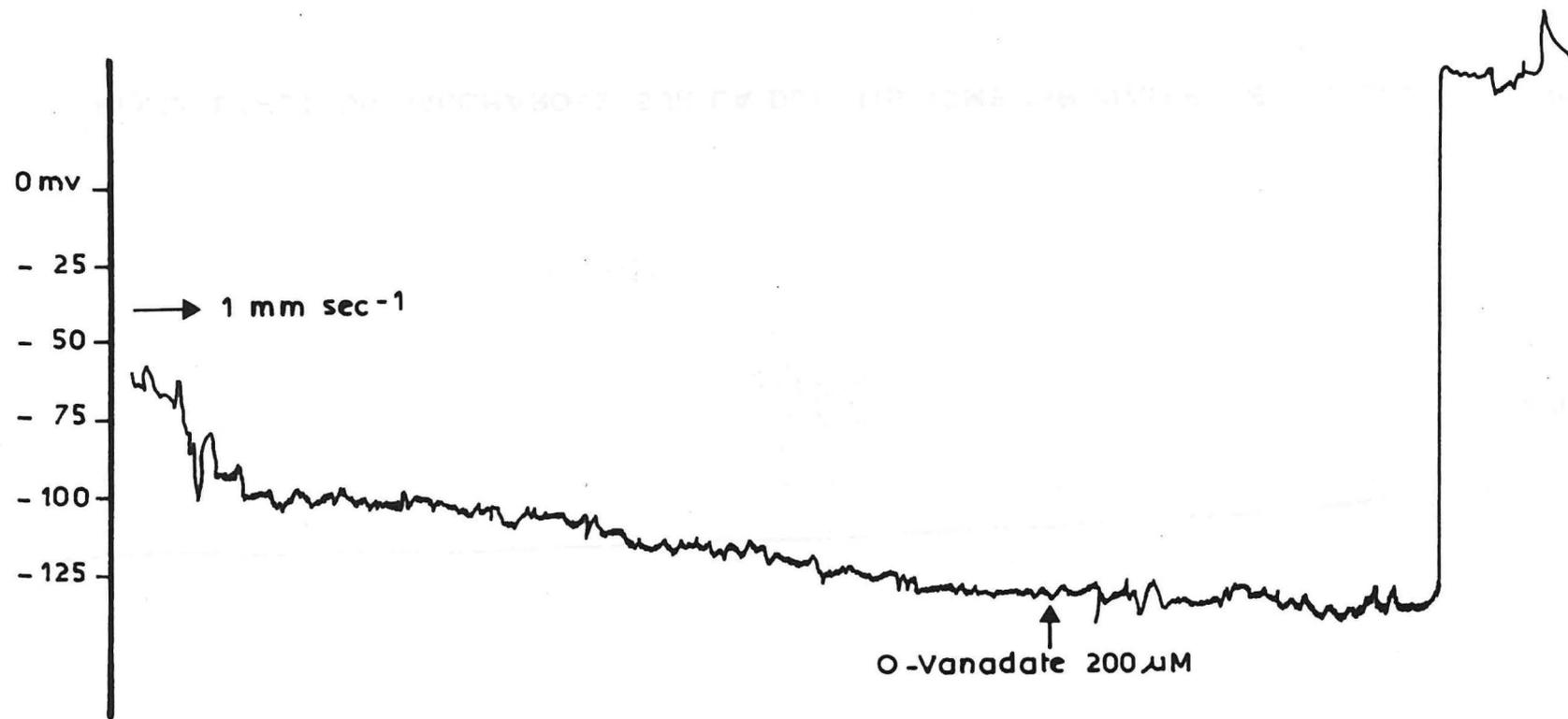


Fig.13-EFFET DE L'ORTHO VANADATE SUR LA DDP TRANSMEMBRANAIRE DE 1 CELLULE LATICIFERE

