

DUALITÉ D'ACTION DE Mg^{++} ET DES AUTRES CATIONS DIVALENTS SUR DES MEMBRANES BIMOLÉCULAIRES PHOSPHOLIPIDIQUES MODIFIÉES PAR UN ADDITIF PROTÉIQUE (EIM)

M. BARA ⁽¹⁾, H. GOUDEAU et B. ROUZAIRE

*Laboratoire de Physiologie générale,
Université Paris VI,
9, quai Saint-Bernard,
Paris 75005*

RÉSUMÉ

Les membranes bimoléculaires phospholipidiques ont une résistance élevée qui peut être abaissée par l'adjonction de protéines. Dans ce travail, nous avons ajouté de l'EIM (« Excitability inducing material »), dans les solutions aqueuses, d'un seul côté de la membrane. L'EIM est une protéine qui provoque une diminution de la résistance, plus ou moins importante suivant la concentration en EIM ; en outre, les courbes courant-voltage présentent des changements de pente, correspondant à la fermeture puis à l'ouverture des « pores ou channels ». L'EIM est ajoutée à la concentration de 5 mg/ml et à pH 6,9. Quand l'EIM est adsorbée sur la membrane, on ajoute les cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++}) du côté de l'EIM.

Pour les trois cations, on enregistre un déplacement du point de changement de pente, des courbes courant-voltage, sur l'axe des voltages : 40 mV pour Mg^{++} , 30 mV pour Ca^{++} , 25 mV pour Ba^{++} , pour un facteur 10 de concentration.

Pour Mg^{++} , la résistance de la membrane diminue immédiatement ; alors que pour Ca^{++} et Ba^{++} , elle augmente pour les faibles concentrations, puis diminue ensuite. Pour les trois cations divalents, la résistance ne varie plus après 5 mM. Ces résultats indiquent que la sélectivité des sites de l'EIM est dans l'ordre croissant : $Ba^{++} < Ca^{++} < Mg^{++}$ (séquence VII d'EISENMAN).

Par application de la théorie de la double couche de GOUV-CHAPMAN, on voit que les cations divalents agissent sur la partie lipidique et sur les pores protéiques de la membrane : Mg^{++} ayant une action plus importante sur la partie protéique.

INTRODUCTION

Les membranes bimoléculaires lipidiques (MUELLER et RUDIN, 1968), ont une résistance élevée ($10^8 \cdot \text{ohms} \cdot \text{cm}^{-2}$) ; celle-ci, peut être abaissée par l'adjonction de certaines substances : antibiotiques (alaméthicine, amphotéricine B, monazomy-

⁽¹⁾ Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Université Paris VI, Tour 32 et Bât. G, 4 place Jussieu, Paris 75005.

cine) ou protéines (« Excitability inducing Material » ou EIM). L'addition de cations divalents a permis de mettre en évidence l'action de ceux-ci vis-à-vis de la partie lipidique et de la partie protéique de la membrane.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

A. — L'EIM (« Excitability inducing Material »)

L'EIM est une protéine extraite de la bactérie *Aerobacter Cloacae feccalis* ATCC 961. Elle a été isolée par adsorption sur Kieselgel et par élution avec 1 p. 100 de solution ammoniacuée. Par chromatographie sur colonne de TEAE-cellulose, deux parties ont été séparées : RNA et protéine (KUSHNIR, 1968) (ce sont les seuls composés détectables de l'EIM).

La séparation de ces deux parties entraîne une perte de l'activité. Une réactivation partielle peut être obtenue en mélangeant 1 p. 100 de la solution de la protéine avec du RNA.

Les propriétés basiques de la partie protéique, non évidente avec de l'EIM totale, deviennent apparentes après la séparation du complexe RNA-protéine.

Les études chimiques, chromatographiques, électrophorétiques, montrent la possibilité qu'un complexe ribonucléoprotéique constitue l'entité fonctionnelle de ce matériel.

B. — Méthodes

Le montage expérimental est identique à celui déjà décrit (BARA, 1974). Les mesures électriques ont été réalisées à l'aide d'un électromètre Keithley 610B.

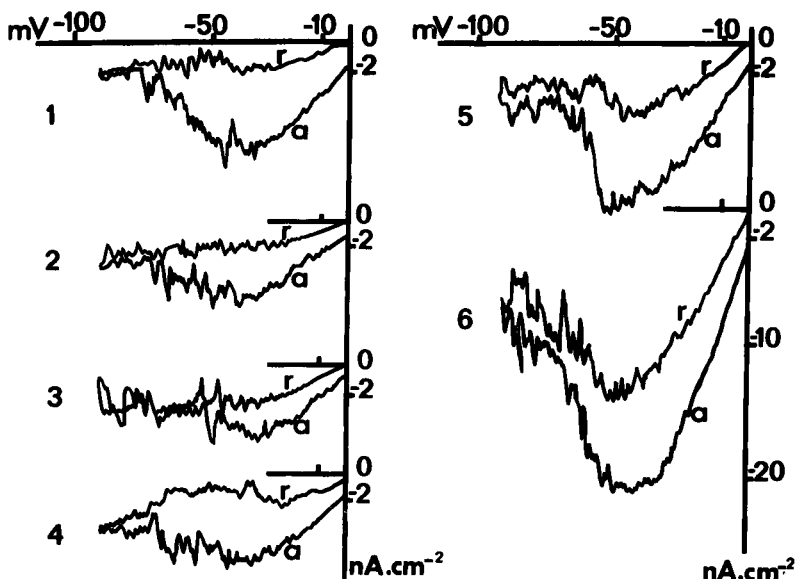


FIG. 1. — Courbes courant-voltage

Mise en évidence de l'action de l'EIM sur une membrane bimoléculaire formée de lipides totaux. Quand l'EIM s'adsorbe sur la membrane, la résistance diminue (5), et on enregistre un point de changement de pente (6). (a et r correspondent au passage aller et retour d'une rampe de tension).

L'EIM (5 mg/ml, pH 6,9) étant ajoutée aux doses convenables (0,5 à $2 \cdot 10^{-3}$ ml), dans les solutions aqueuse (KCl 0,1M à 36°C), après agitation, on enregistre une diminution de la résistance des membranes bimoléculaires formées de : phospholipides totaux : 3 p. 100, tocophérol : 20 p. 100, cholestérol : 3 p. 100, dissous dans un mélange chloroforme-méthanol 2 : 1. Ceci corres-

pond à une augmentation de la conductance aux cations monovalents, mais sans aucune discrimination intercationique (fig. 1). La résistance peut être abaissée d'un facteur variant entre 100 et 1 000 suivant la concentration en EIM.

En outre, les courbes courant-voltage présentent des changements de pente (fig. 1), correspondant à la fermeture puis à l'ouverture des « pores ou channels ».

Quand ces effets sont obtenus, on ajoute les cations divalents, à des concentrations croissantes, du côté de l'EIM.

RÉSULTATS

Les cations divalents (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Ba⁺⁺), ajoutés d'un seul côté de la membrane, ont une action double : sur la résistance de la membrane et sur la différence de potentiel (les cations sont sous forme de chlorures à pH 7,4).

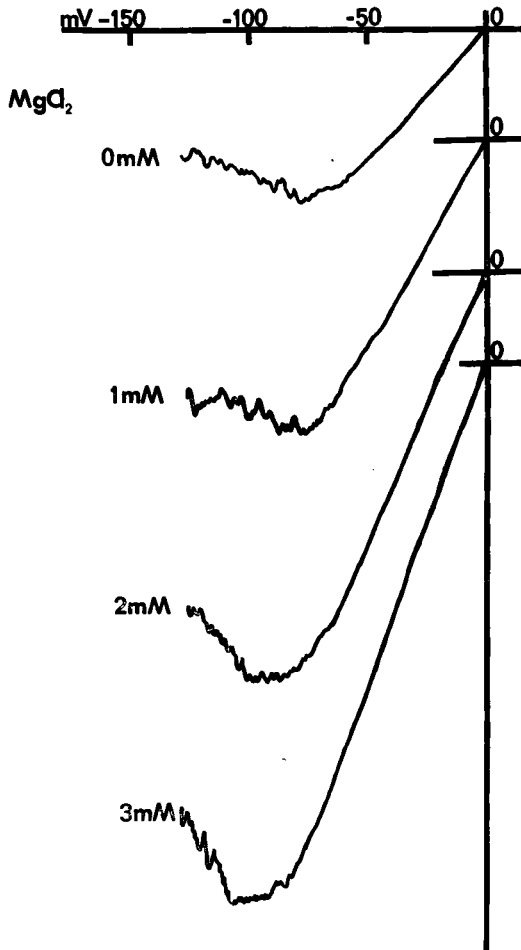


FIG. 2. — Courbes courant-voltage

Enregistrements de l'action d'additions croissantes de Mg⁺⁺ : la résistance de la membrane diminue et le point de changement de pente se déplace sur l'axe des voltages.

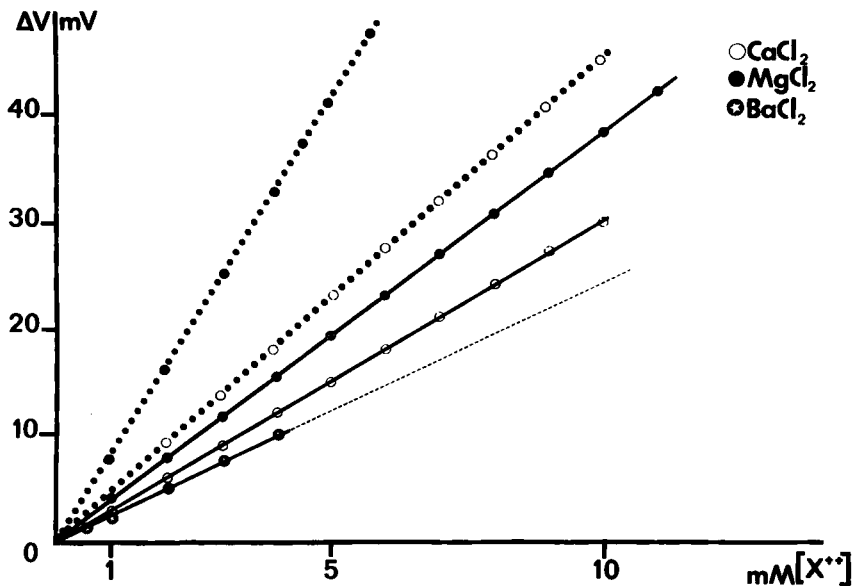


FIG. 3. — Variation de potentiel en fonction de la concentration en cations divalents

Pour 10 mM de Mg^{++} : 40 mV

— — — Ca^{++} : 30 mV

— — — Ba^{++} : 25 mV

(— et correspondent à deux séries d'expériences)

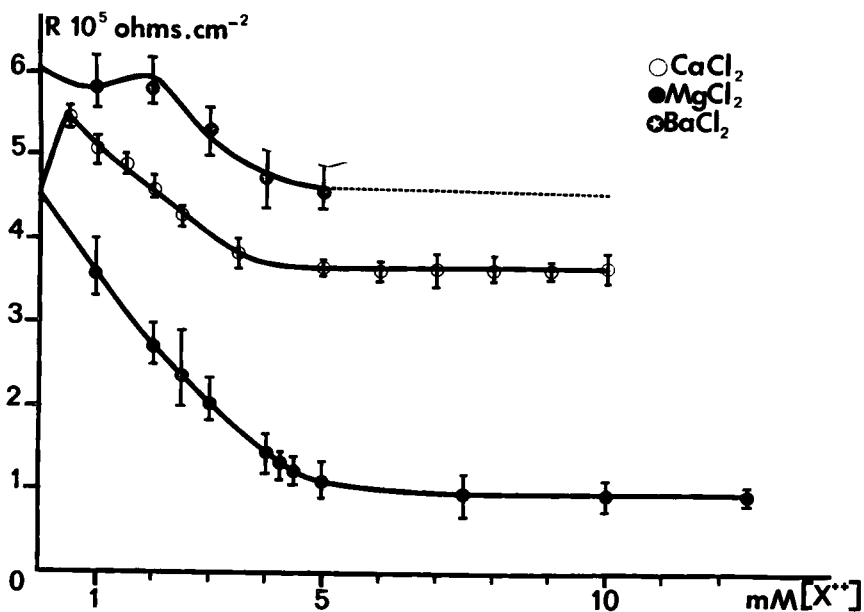


FIG. 4. — Variation de la résistance en fonction de la concentration en cations divalents

Avec Mg^{++} , la résistance diminue immédiatement; avec Ca^{++} et Ba^{++} , on enregistre, pour les faibles concentrations, une augmentation de la résistance. Ceci montre que les cations divalents agissent par effet d'écran et aussi en se liant aux groupes phosphate négatif.

A. — *Effet de Mg⁺⁺* (fig 2, 3, 4)

L'addition de chlorure de magnésium (0,5 à 15 mM), du côté de l'EIM, dans les solutions aqueuses, après agitation, entraîne des modifications des courbes courant-voltage ; on constate :

- un déplacement du point de changement de pente, des courbes courant-voltage, sur l'axe des voltages : 40 mV pour un facteur 10 de variation de concentration (40 mV/10 mM) ;
- une diminution immédiate de la résistance (R diminue de 4 fois ; puis R demeure constante jusqu'à des concentrations supérieures à 10 mM.

B. — *Effet de Ca⁺⁺* (fig. 3, 4)

Dans des conditions expérimentales identiques à celles décrites avec Mg⁺⁺, nous constatons :

- un déplacement du point de changement de pente des courbes courant-voltage, sur l'axe des voltages : 30 mV/10 mM ;
- une augmentation de la résistance pour :

$$0 < [\text{Ca}^{++}] < 0,5 \text{ mM/l} ;$$

puis une diminution pour :

$$0,5 < [\text{Ca}^{++}] < 5 \text{ mM/l},$$

où elle demeure constante jusqu'à des concentrations supérieures à 10 mM.

C. — *Effet de Ba⁺⁺* (fig 3, 4)

Dans des conditions expérimentales identiques à celles décrites avec du Mg⁺⁺, nous constatons :

- un déplacement du point de changement de pente des courbes courant-voltage, sur l'axe des voltages : 25 mV/10 mM ;
- une diminution de la résistance, mais moins importante que celle enregistrée avec Mg⁺⁺ ou Ca⁺⁺.

D. — *Comparaison*

Pour les trois cations divalents, la résistance ne varie plus après 5 mM, tous les sites négatifs étant mobilisés par les cations. Ces résultats indiquent que la sélectivité des sites de l'EIM est dans l'ordre croissant : Ba⁺⁺ < Ca⁺⁺ < Mg⁺⁺ (séquence VII d'Eisenman). Nous avons déjà montré (BARA, 1974), que les cations divalents agissent aussi avec les phospholipides.

DISCUSSION

FRANKENHAEUSER et HODGKIN (1957) ont montré que l'accroissement de concentration en ions calcium, dans les solutions baignant un axone géant, produisait un décalage dans les courbes courant-voltage le long de l'axe des voltages, et dans le

sens positif. Ces auteurs n'émettent pas d'hypothèses définitives pour expliquer ce phénomène, mais firent état d'une suggestion de HUXLEY selon laquelle le calcium pourrait se lier à la surface externe du nerf et produire de ce fait une hyperpolarisation locale, ou un champ électrique additionnel, au travers de la membrane, capable d'influer sur les pores sodium et potassium dont le fonctionnement est voltage-dépendant.

McLAUGHLIN *et al.* (1971) fournissent une explication plus précise et solidement argumentée, en ce qui concerne ce phénomène : ils postulent l'existence d'une densité de charges élevée sur la surface de la membrane, ou bien à l'entrée des pores spécifiques au sodium et au potassium ; dans ce cas, il existe un potentiel négatif à la surface de la membrane par rapport à la solution. La théorie de la couche ionique diffuse (GOUY-CHAPMAN) prédit que l'addition, même à très faible concentration d'un ion divalent doit réduire le potentiel de surface négatif, du côté où se trouve le divalent, par un effet de grille. Cet effet se produit à des concentrations en cations divalents très basses (entre 10^{-5} et 10^{-4} M pour le calcium), et la variation de potentiel atteint 27 mV par facteur 10 de concentration en divalent.

Il n'est pas nécessaire que le cation divalent soit lié au site, mais simplement localisé à son voisinage, rendant de ce fait son accès impossible aux ions monovalents ; il suffit que la densité de charges négatives soit suffisante.

McLAUGHLIN *et al.* (1971) ont pleinement vérifié cette assertion en utilisant des membranes bimoléculaires fabriquées avec des phospholipides plus ou moins électro-négatifs. Ils notent cependant que le calcium, (avec du phosphatidylglycérol comme phospholipide), agit non seulement par effet d'écran, mais aussi en se liant aux sites négatifs.

Nos résultats vérifient pleinement les hypothèses de McLAUGHLIN *et al.* (1971). En effet, nous pouvons penser que le décalage, le long de l'axe des voltages, des courbes courant-voltage, est dû à une action des cations divalents : Mg^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} , sur les charges négatives portées par les phospholipides : l'addition de divalent dans la solution où se trouve l'EIM, va provoquer une diminution de potentiel entre la membrane et la solution. Pour amener le système des pores à l'état fermé, il faudra donc contrebalancer cette hyperpolarisation, en imposant un voltage plus négatif (BEAN *et al.*, 1969).

Le décalage obtenu est de 40 mV pour Mg^{++} , 30 mV pour Ca^{++} , 25 mV pour Ba^{++} , pour une variation d'un facteur 10 de concentration. Ces valeurs élevées nous amènent à penser que en plus d'un effet d'écran, les cations divalents se lient aux groupes phosphate négatif ; mais, il faut noter que pour de basses concentrations en Ca^{++} et Ba^{++} (0,5 et 1 mM/l), la conductance de la membrane diminue, mais qu'elle augmente ensuite. Ceci est explicable, si on considère la membrane comme un système hétérogène, constitué de phospholipides et de pores protéiques ; l'effet de Ca^{++} et de Ba^{++} est alors double :

— d'une part, ils agissent sur les phospholipides en modifiant le potentiel, et en réduisant la conductance des zones phospholipidiques ;

— d'autre part, ils agissent sur les pores protéiques en augmentant leur conductance et en diminuant leur aptitude à se fermer. Comme la conductance de la portion lipidique, par rapport à la conductance des pores protéiques, n'est pas négligeable, il est normal que la diminution de conductance, lors de l'addition de petites quantités de Ca^{++} et de Ba^{++} , soit notable.

Mais, la conductance de la membrane augmentant avec de faibles concentrations de Mg⁺⁺, il faut admettre que Mg⁺⁺ a une action plus importante sur la partie protéinique que sur la partie lipidique.

CONCLUSION

Le magnésium et les autres cations divalents (Ca⁺⁺, Ba⁺⁺) agissent en diminuant la résistance et en augmentant la différence de potentiel de membranes bimoléculaires phospholipidiques modifiées par l'EIM : ils agissent tant sur la partie lipidique que sur la partie protéinique, par effet d'écran et en se liant aux groupes phosphate négatif ; Mg⁺⁺ agissant plus spécifiquement sur la partie protéinique.

Reçu pour publication en juillet 1975.

SUMMARY

DUALITY OF Mg⁺⁺ ACTION AND OTHER DIVALENT CATIONS ON PHOSPHOLIPIDIC BIMOLECULAR MEMBRANES CHANGED BY A PROTEIN ADDITIVE (EIM)

Phospholipidic bimolecular membranes have a high resistance which can be lowered by adding proteins. In this study we added EIM (Excitability inducing material) into the aqueous solution of one side of the membrane. EIM is a protein which lowers resistance ; its force depends on its concentration. Moreover, current-voltage curves show breaks in slope corresponding to the closing then to the opening of pores or channels. EIM is added at a concentration of 5 mg/ml, pH 6.9. When EIM is adsorbed on the membrane, divalent cations are added (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Ba⁺⁺ on the side of the EIM.

A displacement of the break of slope point of current-voltage curves is noted on the voltage axis : 40 mV for Mg⁺⁺, 30 mV for Ca⁺⁺, 25 mV for Ba⁺⁺ for a concentration factor 10.

Membrane resistance decreases immediately for Mg⁺⁺, while for Ca⁺⁺ and Ba⁺⁺, it increases for weak concentrations, and then decreases. For the three divalent cations, resistance does not vary after 5 mM. The results indicate that selectivity of EIM sites is in ascending order : Ba⁺⁺ < Ca⁺⁺ < Mg⁺⁺ (EISENMAN's sequence VII).

Applying the double layer theory of GOUY-CHAPMAN, it can be seen that divalent cations act on the lipid part and the protein pores of the membrane ; Mg⁺⁺ acting more strongly on the protein part.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARA M., 1974. Interaction entre cations mono et divalents et les membranes bimoléculaires phospholipidiques. *J. Physiol.*, (Paris) **69**, 138 A.
- BARA M., 1976. Effets du magnésium sur des membranes liquides et bimoléculaires phospholipidiques. L'ion magnésium compétiteur des cations monovalents. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **16** (sous presse).
- BEAN R. C., SHEPERD W. C., 1969. Divalent cation and polycation modification of excitability characteristics in lipid bilayer membranes. *Bioph. J., Abst.*, A, 31.
- FRANFENHAEUSER B. E., HODGKIN A. L., 1957. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol.*, (London), **137**, 218-244.

- KUSHNIR L. D., 1968. Studies on a material which induces electrical excitability in bimolecular lipid membranes. I. Production, isolation, gross identification and assay. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 285-299.
- McLAUGHLIN S. G. A., SZABO G., EISENMAN G., 1971. Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes. *J. Gen. Physiol.*, **58**, 667-687.
- MUELLER P., RUDIN D. C., 1968. Resting and action potentials in experimental bimolecular lipid membranes. *J. Theoret. Biol.*, **18**, 222-258.
-