

Études du pH intracellulaire par la résonance magnétique nucléaire du phosphore (31P-RMN)

Autor(en): **Lenk, Rudolf / Crespi, Pierre / Greppin, Hubert**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société**

Band (Jahr): **39 (1986)**

Heft 2: **Archives de Sciences**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-740363>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

ETUDES DU pH INTRACELLULAIRE PAR LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DU PHOSPHORE (^{31}P -RMN)

PAR

Rudolf LENK, Pierre CRESPI et Hubert GREPPIN

SUMMARY

The measurements of intracellular pH is a complex task [1, 2], however ^{31}P -NMR provides an efficient method in this domain, as first shown in 1973 [3]. In practice, the resonance of inorganic phosphate (Pi) is generally the most suitable to these investigations because Pi is widely distributed in cells in quantities to be easily detected by modern NMR apparatus and as it has a pK_a in the pH region of biological interest. But the most important feature of this approach is that only by ^{31}P -NMR one can resolve in several cases the individual Pi components and measure the pH gradients of the different intracellular compartments, the orthophosphate concentration and their transport.

INTRODUCTION

La RMN du phosphore est devenue une méthode efficace pour les études des tissus animaux et végétaux. Comme on le sait, le phénomène de résonance dépend de son environnement électronique et nucléaire. Ceci conduit à une certaine multiplicité des raies spectrales, qui détermine notamment le «déplacement chimique». L'étude du ^{31}P dans les systèmes biologiques est importante pour les raisons suivantes: a) Le noyau de ^{31}P possède le spin $I = 1/2$, ce que élimine l'élargissement des raies spectrales par l'interaction quadripolaire; b) Le spectre est relativement simple, par conséquent il est facilement interprétable; c) On observe surtout le spectre des petites molécules, mobiles dans leurs matrices, comme par exemple les phosphates inorganiques (Pi), l'ATP, la phosphocréatine et les sucres phosphorylés, d'où l'intérêt pour une étude bioénergétique.

MESURES DU pH

L'importance du pH de l'eau dans la cellule et ses compartiments est bien connue. L'activité enzymatique en est étroitement liée. Des variations de pH au sein d'un compartiment cellulaire provoquent des modifications du degré d'ionisation de groupements intervenant soit dans la formation du complexe enzyme-substrat, soit dans le maintien de la conformation de l'enzyme et du substrat. On peut ainsi imaginer un contrôle fin et microlocalisé, de l'activité enzymatique. Le pH revêt d'ailleurs dans ce contexte un intérêt particulier pour les réactions d'oxydo-réductions mettant en jeu des coenzymes tels que FAD, NAD, NADP.

Le pH intervient aussi dans le maintien d'équilibres et de gradients dans la cellule; entre celle-ci et son environnement (paroi cellulaire et espace extracellulaire pour les végétaux). Ces gradients correspondent pour les systèmes biologiques à une énergie libre interconvertible, indispensable à de nombreuses activités liées aux membranes cellulaires:

- a) Implication dans les chaînes de transport d'électrons (respiration, photosynthèse).
- b) Participation au métabolisme de l'ATP.
- c) Modulation de certains flux ioniques (pompes à Na/K etc...) par modification de ces gradients.

Les mesures de pH intracellulaires nous apportent donc de précieux renseignements sur ce qui se passe *in vivo*. Toutefois certaines difficultés expérimentales existent. L'insertion d'une microélectrode à pH dans une cellule perturbe le potentiel membranaire et modifie défavorablement le résultat (voir WADDEL et BATES [1]). Il en est de même lors de l'utilisation de pigments fluorescents, sensibles au pH. L'emploi de la RMN peut être plus judicieux, dans certains cas.

Démontré pour la première fois en 1973 [3], il est apparu que chaque molécule, détectable par la ^{31}P -RMN présente, en principe, un déplacement chimique dépendant du pH. Les phosphates inorganiques, Pi (orthophosphates monovalents (H_2PO_4^-) et divalents (HPO_4^{2-})) se sont révélés les plus adéquats pour la titration du pH et ceci pour les raisons suivantes: A) Ces composés sont largement distribués dans les cellules. B) En raison de la dynamique moléculaire, la raie spectrale RMN est relativement étroite et facilement détectable. (L'accumulation des spectres pendant quelques minutes et leur transformée de Fourier donne le pic de Pi avec une intensité suffisante). C) Les déplacements chimiques du Pi se situent dans la gamme des valeurs *in vivo* du pH (entre 4 et 9). Il faut aussi noter que l'orthophosphate joue un rôle important dans le fonctionnement des cellules.

Le problème crucial, concernant la ^{31}P -RMN, est le calibrage des déplacements chimiques. Cela peut être réalisé à l'aide de «phosphates-standards», intérieurs et extérieurs, par exemple, l'acide phosphorique, l'acide méthylène diphosphonique, la phosphocréatine et le phosphodiester. La figure 1 montre la courbe de calibration du déplacement chimique par rapport au pH des Pi, repérée par rapport au standard (acide méthylène diphosphonique).

Il faut signaler que les appareils de RMN modernes utilisent pour la stabilisation du champ magnétique directeur, la résonance du deutérium dans $^2\text{H}_2\text{O}$ ajoutée dans le tissu étudié. Cependant cet enrichissement par de l'eau lourde n'a pas un effet négligeable sur la titration du pH. Il est préférable d'ajouter dans l'échantillon de l' $^2\text{H}_2\text{O}$ dans un petit tube séparé.

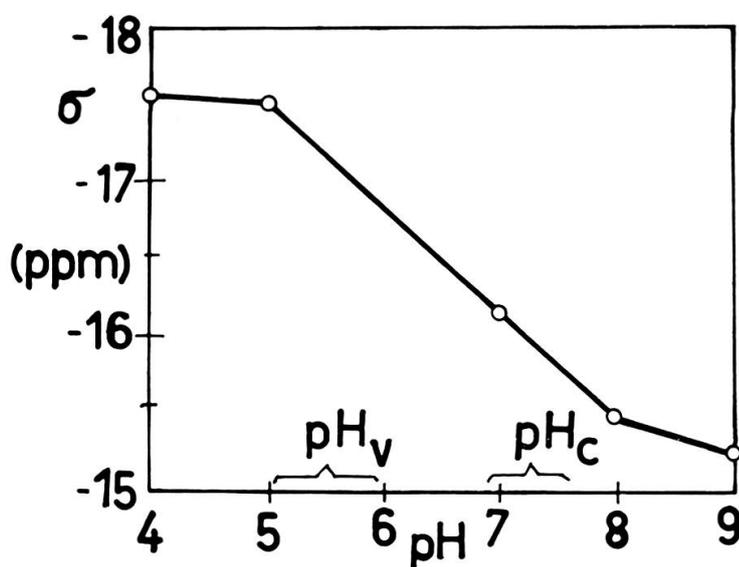


FIG. 1.

Courbe de calibration des valeurs du pH en fonction du déplacement chimique des orthophosphates (σ).
La référence pour ce calibrage est l'acide méthylène diphosphonique (81 MHz).
La gamme des pH vacolaire et cytoplasmique (pH_c) a été indiquée.

RÉSULTATS

La spectroscopie RMN du ^{31}P prend actuellement une place importante parce qu'elle représente un moyen de distinguer (même *in vivo*), les gradients de pH existant entre les compartiments cellulaires (cytoplasme et vacuole, par exemple). Ceci sous la condition que la largeur de la raie spectrale soit inférieure à la différence des déplacements chimiques correspondants. En principe, les Pi vacolaires ont des valeurs de pH plutôt acide ($\text{pH}_v \sim 5,5$) et les Pi cytoplasmiques sont plutôt neutres ou légèrement alcalins. Quelques exemples sont présentés dans le tableau I.

TABLEAU I.

Valeurs du pH vacuolaire et cytoplasmique (pH_c), déterminée par la RMN du phosphore.

Système	pH_v	pH_c	Ref.
Globules rouges	6,9		[3]
Muscle intact (rat)	7,2		[4]
Racine (maïs)	5,5	7,1	[5]
Feuille (blé)	5,7	7,0	[6]
Cellules (érable)	5,9	7,0 - 7,5	[7-10]
Cellules (algue)		7,0 - 8,1	[11]
Feuille (pois)	5,5	6,9	[12]
Cal (épinard)	$\sim 4,0$	5,2	[13]

Il faut ajouter que ces valeurs sont aussi dépendantes de divers paramètres, par exemple l'illumination [6, 11] et l'absorption de l'oxygène [7]; de plus, les raies spectrales dans les feuilles sont plus larges que dans les autres systèmes (protoplastes, racines). Ceci provient, d'une part, de l'existence d'un aerenchyme dans la feuille, qui modifie défavorablement la susceptibilité magnétique dans l'échantillon [6, 12], et d'autre part de la distribution statistique du pH et finalement de la dynamique moléculaire bloquée [13].

Les valeurs très acides du pH (~ 4) observées dans les cultures de tissu (voir par exemple fig. 2) ne peuvent pas être expliquées seulement par la valeur du pH (5,5) de milieu de culture [13] mais aussi par l'état très peu différencié du système («jeunesse physiologique»).

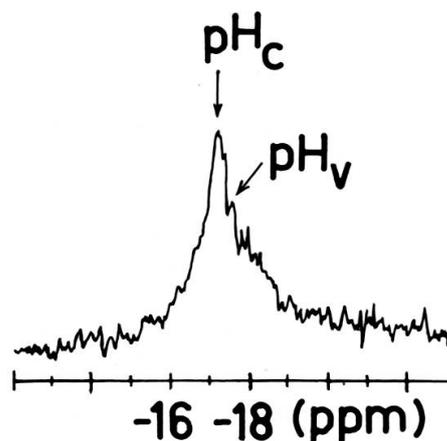


FIG. 2.

Bande spectrale du ^{31}P dans un cal d'épinard âgé de 20 jours (81 MHz). Les flèches déterminent la position des pH vacuolaire et cytoplasmique (pH_c).

Les mesures des intensités spectrales des pics des Pi donnent la possibilité d'étudier non seulement la concentration des orthophosphates dans les compartiments, mais aussi de déterminer le taux de leur transport à travers les membranes correspondantes [7-10].

CONCLUSION

La spectroscopie RMN du ^{31}P reste à l'heure actuelle le seul moyen expérimental *in vivo*, qui permette la mise en évidence des gradients de pH entre le cytoplasme et la vacuole, ainsi que la concentration et le transport des orthophosphates dans ces compartiments et ceci sans modifier l'intégrité cellulaire.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur J. Tronchet et Mme le D^r F. Barbalat-Rey de la Section de Pharmacie qui nous ont permis de réaliser les expériences sur leur appareil de RMN.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WADDELL, W. J., R. G. BATES (1969). *Physiol. Rev.* 49, 285.
- [2] SMITH, F. A., J. A. RAVEN (1979). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 289.
- [3] MOON, R. B., J. H. RICHARDS (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 7276.
- [4] BURT, C. T., T. GLONEK (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 2584.
- [5] ROBERTS, J. K. M., P. M. RAY, N. WADE-JARDEZKY, O. JARDEZKY (1980). *Nature* 283, 870.
- [6] WATERTON, J. C., I. G. BRIDGES, M. P. IRVING (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 763, 315.
- [7] MARTIN, J. B., R. BLIGNY, F. REBEILLE *et al.* (1982). *Plant Physiol.* 70, 1156.
- [8] REBEILLE, F., R. BLIGNY, J.-B. MARTIN, R. DOUCE (1983). *Arch. Biochim. Biophys.* 225, 143.
- [9] REBEILLE, F., R. BLIGNY, R. DOUCE (1984). *Plant Physiol.* 74, 355.
- [10] REBEILLE, F., R. BLIGNY, J. B. MARTIN, R. DOUCE (1985). *Biochem. J.* 226, 679.
- [11] MITSUMORI, F., O. ITO (1984). *J. Magn. Reson.* 60, 106 (1984). FEBS Lettres 174, 248.
- [12] FOYER, C., C. SPENCER (1986). *Planta* 167, 369.
- [13] LENK, R. Résultats non publiés.

