

U. V. Absorptions-spektren.

Zur Sicherheit wurde noch festgestellt, dass die Substanzen (I), (II) und (III) in der Umgegend von $240\text{ m}\mu$ keine selektive Absorption zeigen von der Grössenordnung wie sie für α, β -ungesättigte Ketone charakteristisch ist.

Die Mikroanalysen wurden im hiesigen Mikrolaboratorium (Leitung Dr. M. Furter) von Hrn. H. Gysel ausgeführt, die Zerewitinoff-Bestimmungen von Frau Aklín. Die U. V. Absorptionsaufnahmen verdanke ich wiederum der freundlichen Vermittlung von Hrn. Prof. R. Kuhn, Heidelberg.

Laboratorium für organ. Chemie, Eidg. Techn.
Hochschule Zürich.

117. La perméabilité des membranes. IV.

Analyse de la structure de membranes végétales et animales

par Kurt H. Meyer et J.-F. Sievers.

(26. VII. 36.)

Dans notre première communication¹⁾, nous avons développé une théorie de la perméabilité sélective basée sur les travaux de l'un de nous sur la structure des tissus; la grandeur de cette perméabilité a pu ainsi être mise en relation quantitative avec une série de facteurs, c'est-à-dire la concentration des ions fixes, l'effet tamis et le pouvoir dissolvant de la membrane. Nous avons communiqué ces théories à l'Association des Chimistes de Genève, dans une séance publique, le 29 novembre 1935²⁾.

La même année, T. Teorell a publié une brève communication intitulée « An Attempt to formulate a Quantitative Theory of Membrane Permeability »³⁾. Sans examiner le problème de la constitution chimique de la membrane, l'auteur ramène son effet au rôle d'ions « additionnés » qui sont considérés comme étant immobiles dans la membrane. Les différences de potentiel mesurées sont décomposées en deux potentiels de *Donnan* et un potentiel de diffusion (potentiel de *Henderson*); l'équation dans laquelle l'auteur formule les relations quantitatives est identique à notre équation (6) de notre 1ère communication.

On voit que *Teorell* suit une ligne qui concorde avec une partie essentielle de notre théorie. Comme son travail n'a été résumé jusqu'à présent, ni dans le *Zentralblatt* allemand, ni dans les *Abstracts of the Amer. Chem. Soc.*, ni dans la dernière revue de *Hoerber*⁴⁾

¹⁾ Helv. **19**, 649 (1936).

²⁾ Une seconde conférence sur le même sujet a eu lieu, en février 1936, à la session de la Société Suisse de Chimie, à Lausanne.

³⁾ Proc. Soc. expl. Biol. and Med. **33**, 282 (1935).

⁴⁾ Naturwiss. **24**, 196 (1936); *Physiol. Rev.* **16**, 52 (1936).

consacrée, en 1936, à la perméabilité des membranes, nous n'avons pu que l'ignorer. Ce n'est que maintenant que M. *Teorell* lui-même nous l'a signalé, ce dont nous lui sommes très reconnaissants.

Dans les communications précédentes, nous avons étudié la perméabilité ionique de membranes à structure et de couches huileuses liquides non miscibles à l'eau. Aujourd'hui, nous allons examiner jusqu'à quel point les notions acquises peuvent servir à l'analyse de la microstructure de membranes végétales et animales.

I. *Membranes en mosaïque.*

Les membranes sélectives artificielles représentent des systèmes simples, dont l'analyse potentiométrique est facile et sûre; dans le cas des membranes biologiques par contre, la situation est beaucoup plus compliquée. De nombreuses observations ont amené les biologistes à créer la notion des membranes dites en mosaïque. Il s'agit de membranes contenant, juxtaposés les uns à côté des autres, 1° des domaines lipoidiques, 2° des domaines perméables à l'eau. Les domaines « lipoidiques » permettent le passage de substances liposolubles telles que le chloroforme, et parmi lesquelles il faut nommer aussi les gaz carbonique et ammoniac. Le passage des ions et de l'eau, et probablement aussi le passage de l'urée, substance très hydrophile, se fait à travers les domaines hydroperméables pouvant être constitués, à notre avis, par des chaînes, soit protéiques, soit d'hydrates de carbone.

Lorsqu'on veut obtenir des renseignements sur la constitution des membranes à l'aide de la méthode potentiométrique, il faut se rappeler que ce procédé ne donne de renseignements que sur le transport des ions. Ce dernier — *Collander* notamment l'a exposé très clairement — se limitera entièrement au domaine hydroperméable, car la solubilité des ions dans des substances vraiment « lipoidiques » du type des matières grasses, de la lécithine ou de la cholestérine, est tellement faible qu'elle n'entre pratiquement pas en ligne de compte.

Nous avons été confirmés dans cette manière de voir par nos essais faits avec une membrane « lipoidique » artificielle, que nous avons obtenue en laissant sécher une mince pellicule de cellulose enduite d'huile de lin. Voici les différences de potentiel obtenues avec cette membrane intercalée entre deux solutions salines.

KCl		mv	
+	0,01/0,02	-	+ 12
+	0,04/0,08	-	+ 7
+	0,16/0,32	-	+ 5

		mv	H ₂ O	Val. lim.	
-	0,1 KCl/0,1 (CH ₃) ₄ NCl	+	11	5,5	11,7
-	0,1 KCl/0,1 NaCl . .	+	7	4,4	9,9

On voit que la membrane est tout simplement une membrane à structure, à perméabilité cationique. Les valeurs des potentiels obtenues permettent de calculer $A \cong 0,02$ et $\frac{U_K}{U_A} \cong 1,6$. Le résultat d'une opposition du chlorure de potassium au chlorure de tétraméthylammonium ou au chlorure de sodium, montre que l'ion potassium passe plus rapidement que les ions $N(CH_3)_4^+$ et Na^+ . Dans la colonne « H_2O », nous avons indiqué les valeurs pour la diffusion libre de solutions de même concentration $KCl/N(CH_3)_4 Cl$ et $KCl/NaCl$; les valeurs limite obtenues lors de la diffusion à travers une membrane imperméable aux anions en l'absence de tout effet tamis ou de solubilité, figurent dans la colonne « Valeurs limite »¹⁾. Les données expérimentales sont comprises entre les chiffres de ces deux colonnes; il s'agit donc d'une membrane à perméabilité cationique, pratiquement sans effet de solubilité. Il en résulte qu'il n'y a pratiquement pas de transport d'ions à travers la couche huileuse puisque, dans ce cas, la solubilité plus grande de l'ion $N(CH_3)_4^+$ devrait se faire sentir.

Le transport des ions ne se fait donc que dans les fissures de la couche de linosyne; les groupes carboxyle libres de l'acide linoléique émergeant à l'intérieur de ces fissures sont responsables du caractère acide de la membrane et, partant, de sa perméabilité cationique.

Si nous pouvons ainsi localiser le transport des ions dans les domaines hydroperméables, nous devons d'autre part tenir compte de la possibilité du passage de NH_3 et de CO_2 , ainsi que d'autres molécules non dissociées pouvant se former à partir des ions (par exemple les bases organiques libres) à travers les domaines lipoidiques. Nous avons trouvé un bon exemple d'une membrane « hydrophobe » dans une mince pellicule d'alcool poly-vinyle, qu'on peut obtenir par évaporation d'une solution acétonique de cet alcool sur du verre. D'après des mesures de conductibilité, cette pellicule très mince, rappelant le caoutchouc, ne laisse pas passer les ions. L'ammoniaque par contre passait rapidement; lorsqu'on séparait une solution décimolaire d'ammoniaque d'une couche d'eau additionnée de bleu de bromothymol, à l'aide d'une pellicule pareille, l'eau devenait alcaline après $1\frac{1}{2}$ heure de contact. De la soude caustique de même concentration ne traversait pas la pellicule; ce n'est qu'après plusieurs jours de repos qu'une réaction alcaline se manifestait de l'autre côté de la membrane, peut-être par passage de soude caustique à travers des fissures ou des inétanchéités de l'appareil.

De ce qui précède, nous pouvons conclure à la possibilité d'appliquer l'analyse potentiométrique aussi aux membranes en mosaïque,

¹⁾ Voir 1ère communication, p. 664.

mais les données qu'on obtient alors se rapportent exclusivement aux domaines perméables à l'eau.

II. *Les membranes à couches.*

De nombreuses membranes végétales et animales se composent de couches de perméabilités différentes. Dans ces cas, l'analyse potentiométrique ne donnera qu'une valeur moyenne à la fois de la constante de sélectivité et de l'effet tamis.

Pour arriver à pénétrer plus en avant, on peut avoir recours à un procédé que les biologistes ont souvent employé, que par exemple *Brauner*¹⁾ a employé pour l'analyse des diverses couches de l'écorce de châtaigne. La membrane est immergée un certain temps dans une solution déterminée, par exemple KCl 0,1-n. jusqu'à l'obtention de l'équilibre; ensuite on remplace, à la surface de membranes que l'on veut étudier, cette solution par une autre. La totalité de la chute de concentration se localisera au premier moment dans cette couche externe, et des mesures de la différence de potentiel permettront l'analyse de cette couche externe.

Dans ce but, il faut naturellement faire des essais en série avec des concentrations absolues variées et des quotients de concentrations identiques, ce qui ne semble pas avoir été fait.

Nous saisissons cette occasion pour rectifier une erreur que *Brauner*²⁾ a commise. Il mesure les différences de potentiel sel₁-membrane-sel₂; il en déduit la différence de potentiel sel₁-sel₂, observée en milieu aqueux à diffusion libre pour obtenir ainsi la « part revenant à la membrane ». Il y a là une erreur de principe puisque, dans le dispositif expérimental de *Brauner*, il n'y a pas de variation de concentration dans les solutions aqueuses puisque la totalité de la chute de concentration est localisée dans la membrane. Le potentiel dans son ensemble représente donc la « part revenant à la membrane ».

Des membranes naturelles présentent souvent une différence de potentiel, même lorsqu'elles sont en contact avec la même solution saline des deux côtés. Ces différences de potentiel mettent en évidence une absence d'équilibre à l'intérieur de la membrane. Lorsqu'il s'agit d'une membrane morte, ces différences de potentiels diminuent progressivement jusqu'à obtention de l'équilibre final avec la différence de potentiel zéro.

III. *Etude de membranes végétales et animales.*

Sur le conseil de M. *Hochreutiner*, nous avons examiné des bractées d'Iris amoena comme exemple de membranes végétales minces et très homogènes. Les plantes étaient mises à notre disposition par la direction du Jardin botanique de Genève. Nous saisissons cette occasion pour renouveler ici à son directeur, M. le Prof. *Hochreutiner*, l'expression de nos remerciements.

Les fragments de 2 × 2 cm. découpés dans ces bractées ont été fixés dans notre appareil, qui a été chargé de solutions de chlorure de potassium de concentrations variables.

¹⁾ Jahrbücher wiss. Botanik 73, 600 (1930).

²⁾ loc. cit. p. 604.

Conc. KCl			
+	0,005/0,01	-	+11,5 mv
+	0,01 /0,02	-	+11 „
+	0,02 /0,04	-	+10 „
+	0,04 /0,08	-	+ 7 „
+	0,08 /0,16	-	+ 5 „
+	0,16 /0,32	-	+ 4,5 „

		mv	H ₂ O	Val. lim.	
-	0,1 KCl/0,1 N(CH ₃) ₄ Cl	+	9,5	5,5	11,5

Il résulte de ces valeurs qu'il s'agit d'une membrane à perméabilité cationique typique; sa constante de sélectivité est $A \leq 0,02$. Aux plus fortes dilutions, le potentiel mesuré n'était pas constant mais baissait progressivement, si bien que nous supposons que la valeur de 11,5 mv figurant dans le tableau est déjà due à une altération. En effet, la membrane gonfle, les groupes acides fixes sont écartés les uns des autres, si bien que leur concentration dans les domaines aqueux de la membrane diminue, concentration exprimée par la grandeur de A .

La valeur obtenue pour le système N(CH₃)₄Cl/KCl est comprise entre la valeur-limite et la valeur obtenue dans l'eau. La membrane ne présente donc ni effet tamis ni effet de solubilité.

La membrane est colorée par la chrysoïdine et par le bleu de méthylène, signe qu'elle contient des substances acides de poids moléculaire élevé (« cutine » des botanistes). Elle n'est pas colorée par l'éosine.

Un comportement qualitatif semblable s'observe chez des feuilles, des disques découpés dans les racines et d'autres objets végétaux analogues. Partout on constate une perméabilité cationique qui permet toujours de conclure à la présence d'acides de poids moléculaire élevé. Le potassium des tissus végétaux doit être fixé en bonne partie par ces acides.

Nous avons fait encore quelques essais avec des membranes animales. La peau disséquée de *Bombinator igneus* a été introduite dans notre appareil; en maintenant constante la concentration du côté externe, nous avons fait varier celle du côté interne. Au contact avec des solutions diluées, la peau gonfle et le potentiel baisse.

	Conc. Côté externe	Conc. Côté interne		mv	Différences
+	0,08 KCl	0,32 KCl	-	1—2	
+	0,08 KCl	0,16 KCl	-	1	0,5
	0,08 KCl	0,08 KCl		0	1
-	0,08 KCl	0,04 KCl	+	2	2
-	0,08 KCl	0,02 KCl	+	4—5	2,5
-	0,08 KCl	0,01 KCl	+	7	2,5

			mv	H ₂ O	Val. lim.
-	KCl/N(CH ₃) ₄ Cl	+	8	5,5	11,5

Il semble y avoir une légère perméabilité cationique dans la couche interne de la peau.

IV. *Les expériences de Loeb et Beutner et de Michaelis sur l'écorce de pomme.*

Dans leurs travaux connus sur l'écorce de pomme, *Loeb et Beutner* ont constaté la perméabilité cationique de cette écorce. Leurs résultats ont été confirmés par *Michaelis et Fujita*¹⁾. Par leurs mesures potentiométriques, ils ont constaté que la différence de potentiel est fonction de la concentration absolue. Leurs valeurs permettent le calcul de la constante de sélectivité de la membrane.

L'écorce de pomme intacte a donné les différences de potentiel suivantes²⁾:

Concentrations	mv.	calc. mv.
+ 0,1 /1 - KCl	14	14
+ 0,01 /0,1 - KCl	46	45
+ 0,001/0,01 - KCl	52	57

Ce comportement est caractéristique d'une membrane à structure et à perméabilité cationique. Le calcul donne pour *A* la valeur de 0,08, c'est-à-dire que la concentration des anions immobiles dans le liquide aqueux qui imbibe l'écorce est 0,08-n. Cette membrane contient donc des produits de poids moléculaire élevé à fonctions carboxyles; les botanistes les désignent par le terme de cutine et les identifient par leur coloration aux colorants basiques, par exemple à la chrysoïdine. En même temps, nous constatons que l'ion potassium est légèrement accéléré par rapport à l'ion chlore ($\frac{U_K}{U_A} = 1,2$), tandis qu'en phase aqueuse, les vitesses de migration des deux ions sont identiques. Cette anomalie peut s'expliquer peut-être par le fait que l'échange de tous les ions mobiles qui préexistent dans la membrane contre des ions chlore et potassium n'a pas pu être réalisé intégralement, si bien qu'il subsiste encore, à l'intérieur de la membrane, des ions hydrogène et éventuellement aussi des anions du type de l'acide malique; il en résultera que le rapport mesuré $\frac{U_K}{U_A}$ ne représente pas la valeur pour KCl mais une valeur moyenne pour

¹⁾ Bioch. Zeitschrift 158, 11 (1925).

²⁾ Cité d'après le Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Berlin 1928, Bd. 8, p. 763.

plusieurs sels. Mais on peut aussi envisager la possibilité d'un gonflement de la membrane dans les solutions diluées, de manière qu'en solution diluée *A* devienne plus petit, particularité que nous avons constatée nous-mêmes dans le cas des bractées.

V. L'« effet de concentration » de différents objets.

Lorsqu'on interpose entre deux solutions de concentration différente du même sel, une membrane ou un tissu, il se produit en thèse générale, une différence de potentiel que les physiologistes ont coutume de désigner par le terme d'« effet de concentration ». Il y a un très grand nombre de travaux qui ont été consacrés à cet effet. On l'a observé avec des tissus végétaux et avec des tissus animaux, avec le nerf, le muscle, le foie, la peau, etc.

Cet effet résulte des différences de vitesse de diffusion des ions de signe contraire; on peut dire que l'organe interposé en entier joue le rôle de membrane. Par des essais systématiques, il sera certainement possible de préciser la nature de ces membranes, tout comme cela a pu se faire pour l'écorce de pomme en se basant sur des chiffres de *Loeb*, *Beutner* et *Michaelis*.

Malheureusement, on ne trouve pas beaucoup de données systématiques, mais néanmoins nous pouvons montrer, à l'aide de quelques exemples, que l'on peut arriver au moins à des conclusions d'ordre qualitatif concernant la structure des membranes.

Dans un travail d'*Osterhout* et *Harris*¹⁾, on trouve les valeurs suivantes obtenues avec l'algue *Nitella*. Dans ces essais, la membrane était constituée tantôt par la membrane cellulaire, tantôt par le protoplasme.

		mv
Membrane cellulaire .	- 0,1 /0,01 + KCl	+ 10
	- 0,01/0,001 + KCl	+ 16,8
Protoplasme	- 0,1 /0,01 + KCl	+ 25,4
	- 0,01/0,001 + KCl	+ 56,4

Comme on le voit, la différence de potentiel dépend, pour le protoplasme, dans une très forte mesure, de la concentration absolue, à quotient de concentrations constant. Cela démontre la très grande sélectivité du protoplasme, dans lequel il doit y avoir des acides de poids moléculaire élevé, neutralisés par des cations mobiles.

Dans le cas de la membrane cellulaire, par contre, la variation de la différence de potentiel est beaucoup moins grande. Ici, il doit s'agir, soit d'un effet tamis, soit d'une modification de la mem-

¹⁾ J. gen. Physiol. 12, 761 (1929).

brane au contact avec des solutions diluées causée par le gonflement, ce qui diminue sa sélectivité.

L'effet tamis de la membrane est rendu probable aussi par d'autres expériences qu'*Osterhout* a faites avec cette algue *Nitella*¹⁾. Il a comparé les différences de potentiel des systèmes: suc cellulaire — membrane — 0,01-n. KCl et suc cellulaire — membrane — 0,01-n. NaCl. Dans le premier système, il a constaté une différence de potentiel dans laquelle le côté du KCl était de 82,9 mv plus négatif que le côté NaCl du second système. Le potassium passe donc beaucoup plus rapidement que le sodium, environ 20 fois plus rapidement; ce phénomène doit s'expliquer par un effet tamis retenant l'ion Na⁺ plus volumineux. *Osterhout* et *Hill* ont appelé ce phénomène « effet potassium ». Comme *Osterhout* et *Hill* l'ont trouvé²⁾, ce phénomène disparaît presque complètement lorsque l'algue séjourne plusieurs jours dans de l'eau distillée avant la mesure. Dans ces conditions, la paroi cellulaire se gonfle, les pores s'agrandissent, et l'effet tamis diminue. Il revient lorsqu'on ramène l'algue dans une solution physiologique.

Damon et *Osterhout*³⁾ ont fait d'autres essais avec l'algue *Valonia*. Dans une série, ils ont étudié les systèmes « eau de mer normale — *Valonia* — eau de mer d'autre concentration ». Ils trouvent que le côté le plus concentré est toujours positif. Voici leurs chiffres pour les différences de potentiel:

Concentrations			mv
+	1,5 / 0,5	-	17,3
+	1 / 0,33	-	19
+	0,67 / 0,23	-	19

On voit que la différence de potentiel est fonction uniquement du quotient des concentrations et non pas des concentrations absolues, fait que les auteurs ont déjà relevé en soulignant que

$$E = \frac{2RT}{3F} \ln \frac{c_1}{c_2}.$$

En d'autres termes, $A = 0$; il n'y a aucune sélectivité; il s'agit uniquement d'un effet tamis; les cations Na⁺ et Mg⁺⁺, un peu plus grands que le chlore, sont ralentis. Pour le rapport $\frac{U_K}{U_A}$, on trouve $\frac{1}{5}$ contre $\frac{1}{1,5}$ pour NaCl dans l'eau.

¹⁾ J. gen. Physiol. **13**, 715 (1930).

²⁾ J. gen. Physiol. **17**, 105 (1934).

³⁾ J. gen. Physiol. **13**, 445 (1930).

D'après les valeurs indiquées par *Osterhout* et ses collaborateurs, et d'après la composition chimique de la membrane de *Valonia*, nous n'estimons pas possible que le transport des ions à travers la membrane de *Valonia* se fasse avec l'intervention de couches huileuses; cette membrane possède une structure; elle est formée de chaînes neutres de cellulose, dont la disposition spatiale a été étudiée par *Sponsler*¹⁾. Nous soulignons ce point puisque *Osterhout* et *Stanley*²⁾ ont construit divers systèmes « sel₁-gaïacol-sel₂ » qui, d'après eux, se comporteraient comme la membrane externe des cellules vivantes de *Valonia* entre le suc cellulaire et l'eau de mer. Nous estimons qu'avec ces systèmes destinés à expliquer l'enrichissement en potassium par rapport au sodium, les auteurs se sont écartés beaucoup des conditions qu'on trouve dans les cellules de *Valonia*. La situation privilégiée du potassium ne s'explique pas par sa solubilité sélective dans une couche huileuse, mais par son passage plus facile à travers un réseau ou tamis à mailles serrées.

Nous dépasserions le cadre de la tâche que nous nous sommes assignée si nous voulions étudier d'autres membranes végétales ou animales. Par la discussion des données numériques publiées, nous avons seulement voulu donner des exemples de l'application de nos méthodes, et nous avons voulu montrer quelles sont les conclusions que l'on peut tirer d'expériences sur la perméabilité.

RÉSUMÉ.

Nous avons étudié la perméabilité ionique de quelques objets d'origine animale ou végétale.

La composition des membranes représentées par ces objets a été précisée.

En partant de mesures se rapportant à différents objets et exécutées par divers auteurs, nous avons pu donner des indications concernant la structure de ces objets: écorce de pomme, cellules de *Valonia* et de *Nitella*.

Genève, Laboratoires de chimie inorganique et de chimie organique de l'Université.

¹⁾ *Protoplasma* **12**, 214 (1931).

²⁾ *J. gen. Physiol.* **15**, 667 (1932).