

2 - 4 - 5 - 2
 L'absorption des acides organiques par les lutoïdes
 C. Lambert

The absorption of organic acids by the lutoïds

It is known that lutoïds isolated in vitro are capable of accumulating radioactive citric acid linearly as a function of time, the kinetics involved being michaelian and the process very thermodependent. Accumulation occurs in an energyless isotonic system and is doubled in presence of ATP.

It has been shown that preincubation of lutoïds in presence of ATP, followed by elimination of the latter, enables absorption of the citrate to be increased. ATP is the most effective of the triphosphate nucleotides. Whilst oligomycin has no effect on the absorption of citrate in presence of ATP, 2,4 DNP is effective in decreasing absorption.

It has been found, by determining the pH of the intralutoïd serum, that ATP (5 mM) causes a drop in pH of the intralutoïd serum of the order of 0,5 pH units in 30 minutes. This observation has given rise to a hypothesis according to which ATP may control the operation of a proton pump.

A comparison of the absorption of citrate, malate and succinate respectively has shown that the kinetics are linear for one hour and that the amounts absorbed are very similar. A study of the kinetics involved gives similar apparent Km values and there is a temptation to postulate a common mediator. ATP and 2,4 DNP have an identical effect on the absorption as does the temperature.

After absorption of the tagged molecules, taking back into suspension in a fresh medium indicates an 80% retention of the substrates concerned.

However, a number of observations cast doubt on the existence of a single carrier. Although citrate competitively inhibits the absorption of succinate, there is no evidence of the reverse process. The optimum pH for the absorption of succinate is different from that for the absorption of citrate and malate. As compared with the triethanolamine hydrochloride buffer normally used, the cacodylate buffer doubles the absorption of citrate and has no effect on that of malate and succinate.

★

J'ai abordé les problèmes concernant les mécanismes de transport du citrate par les membranes lutoïdiques sur la base des résultats de Ribaillier (1972), d'Auzac et Lioret (1974). Le sérum lutoïdique est très riche en citrate (50 mM) alors que

D. RIBAILLIER - Thèse d'État, 1972, A.O. 7716, Abidjan.

J. d'AUZAC et C. LORET - *Physiol. vég.*, 12, 617-635, (1974).

dans le sérum cytoplasmique celui-ci se trouve à la concentration 5 mM. Il y a donc accumulation de ce substrat dans les lutoïdes. Les lutoïdes, placés dans un milieu artificiel non énergétique, contenant du citrate, peuvent l'absorber selon une cinétique linéaire. L'absorption qui est thermodépendante, peut être doublée en présence d'ATP et peut être inhibée par le 2,4 DNP, le NEM. Tous ces résultats sont en faveur de l'existence d'un «transport médiat» pour le citrate. Il convenait d'apporter des résultats complémentaires afin de pouvoir définir plus précisément les mécanismes de transport. J'ai réalisé deux approches différentes du problème :

- l'étude du mécanisme par la recherche du mode d'action de l'ATP ;
- l'étude comparée de l'absorption du citrate, malate, succinate. Ces absorptions devraient avoir des caractéristiques différentes si l'on tient compte du fait que la concentration intralutoïdique du citrate est très élevée (gradient de l'ordre de 10 par rapport au sérum cytoplasmique) que le malate est présent dans les lutoïdes et dans le sérum cytoplasmique à des concentrations très voisines, et que la présence de succinate n'a jamais été signalée dans les sérums cytoplasmique et lutoïdique.

En ce qui concerne l'influence de l'ATP on peut supposer qu'il fournit au niveau de la membrane lutoïdique des liaisons riches en énergie qui favorisent l'absorption. Dans ces conditions, en préincubant les lutoïdes en présence d'ATP, puis en éliminant cet ATP, l'absorption du citrate devrait être également favorisée. Les résultats obtenus montrent que l'ATP modifie effectivement les lutoïdes en leur apportant de l'énergie, favorisant ainsi l'absorption du citrate (Figure 1). J'ai étudié l'influence d'autres nucléotides sur cette même absorption. A des concentrations équivalentes à celles de l'ATP, le CTP, l'UTP et le GTP ont une action positive mais moindre que celle de l'ATP (Tableau 1).

Tableau 1
Comparaison de l'action de divers nucléotides triphosphates (5 mM)
sur l'absorption intralutoïdique du citrate *in vitro*

	témoin	ATP	CTP	GTP	UTP
nanomoles de citrate absorbé/mg de protéines/30 mn	20	38,8	26,0	27,1	27,2

Ceci peut correspondre à une affinité plus faible de l'ATP-ase membranaire des lutoïdes pour ces substrats. Pour confirmer l'hypothèse de l'existence de liaisons riches en énergie au niveau de la membrane, j'ai étudié l'influence de l'oligomycine et du 2,4 DNP. L'oligomycine intervient en empêchant la formation de liaisons énergétiques. Donc utilisée en présence d'ATP, elle devrait inhiber l'augmentation de l'absorption du citrate : sa présence n'a pas modifié l'influence de l'ATP (Figure 1). Selon Chance, le 2,4 DNP provoque l'hydrolyse des liaisons énergétiques. Utilisé seul, il diminue l'absorption du citrate et, en présence d'ATP,

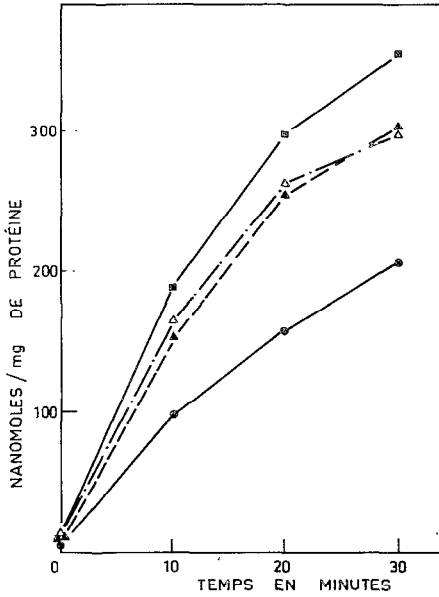


Figure 1

Cinétique d'absorption du citrate par les lutoïdes réalisé en milieu d'incubation complet TEA 0,1 M pH 7

- témoin
- absorption en présence d'ATP 5 mM
- △—△ absorption sans ATP par des lutoïdes préincubés durant 30 mn en présence d'ATP 5 mM
- ▲—▲ absorption sans ATP par des lutoïdes préincubés durant 30 mn en présence d'ATP 5 mM + oligomycine 30 µg/ml.

Figure 2

Influence de l'ATP et du 2,4 DNP sur l'absorption du citrate en milieu complet TEA 0,1 M pH 7

- ▲—▲ Citrate 5 mM
- Citrate 5 mM + ATP 5 mM
- Citrate 5 mM + 2,4 DNP 5 mM
- Citrate 5 mM + ATP 5 mM + 2,4 DNP 5 mM

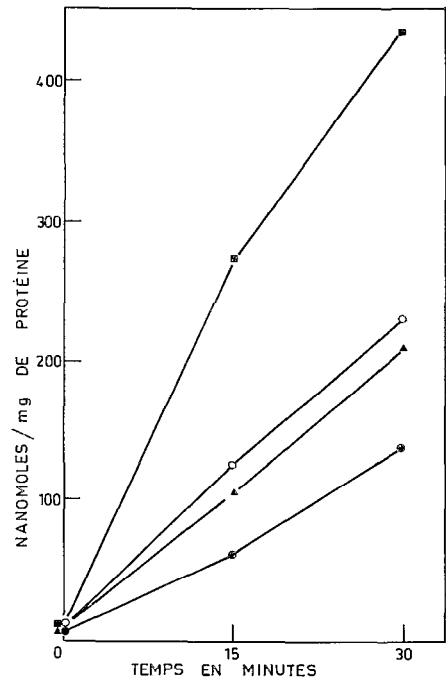


Tableau 2
Influence de l'ATP (5 mM) sur la variation du pH intralutoïdique
in vitro en fonction du temps de contact

	Durée de la mise en présence avec l'ATP				
	0	5 mn	10 mn	20 mn	30 mn
pH intralutoïdique	6,18	6,08	6,04	5,84	5,81

Tableau 3
Expérience de désorption de citrate, de malate et de succinate radioactifs
préalablement absorbés par des lutoïdes *in vitro*
Au temps 0, les substrats ont été préalablement absorbés pendant 30 mn par les
lutoïdes puis ceux-ci sont remis 45 mn en suspension dans un tampon sans substrat.

	Nanomoles de substrat/mg de protéines		
	Citrate	Malate	Succinate
Nanomoles de substrat exogène présent dans les lutoïdes au temps 0	34,46	72,74	119,53
Nanomoles de substrat exogène restant dans les lutoïdes après 45 minutes	26,08	64,16	93,77
Pourcentage de substrat au temps 45 mn par rapport au temps 0	76 %	89 %	78 %

il annule l'effet stimulant de ce facteur (Figure 2). J'ai également observé que l'ATP avait une influence sur le pH interne des lutoïdes. A la concentration 5 mM, l'ATP provoque en 30 minutes une diminution de pH de l'ordre de 0,5 unité (Tableau 2). Ce résultat me semble très important car, d'une part on n'a pas démontré, à ma connaissance, aussi directement le fonctionnement d'une pompe à proton commandé par l'ATP, d'autre part cette influence de l'ATP sur le pH intralutoïdique permet d'interpréter l'ensemble des résultats obtenus. L'ATP fournit l'énergie nécessaire à une pompe à protons qui peut agir de deux manières différentes. Si elle est électrogénique, elle peut induire des flux passifs d'ions, dont le citrate. Si elle n'est pas électrogénique, elle peut transmettre une partie de l'énergie qu'elle reçoit au système de transport.

L'étude comparée de l'absorption du citrate, du malate et du succinate a pour but essentiel de déterminer la spécificité d'un système de transport unique ou de mettre en évidence l'existence de plusieurs médiateurs. Dans un premier temps, j'ai montré que les trois acides organiques sont absorbés par les lutoïdes dans des proportions très voisines (Figure 3). J'ai obtenu certaines caractéristiques

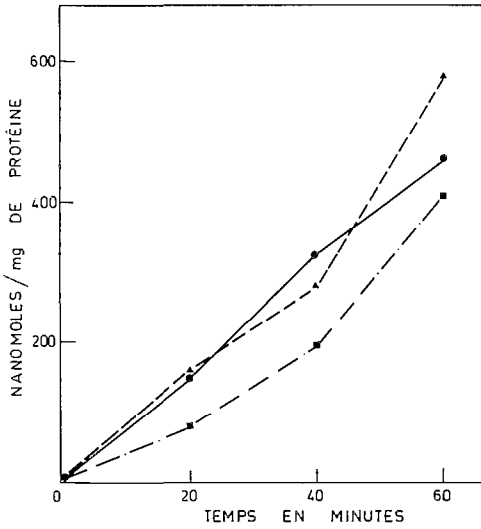


Figure 3

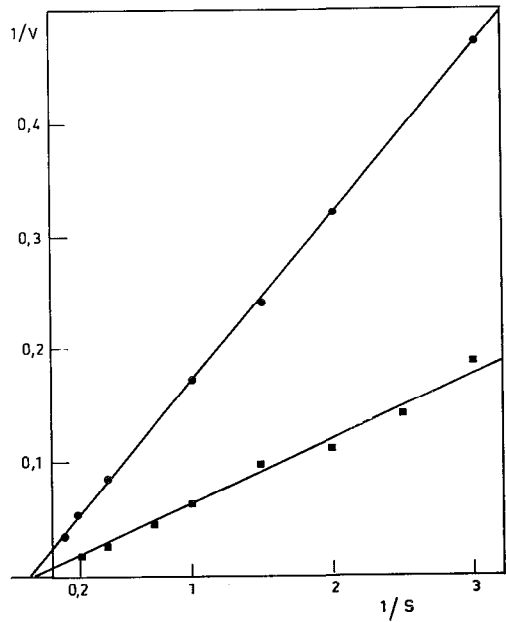
Courbes des cinétiques d'absorption du succinate, du malate et du citrate par les lutoïdes *in vitro*

--▲-- Succinate
 —●— Citrate
 --■-- Malate

Figure 4

Cinétique d'incorporation dans les lutoïdes du succinate et du malate en fonction de leur concentration dans le milieu

—■— Succinate
 —●— Malate



des transports qui sont en faveur de l'existence d'un médiateur unique. Les cinétiques sont linéaires durant au moins une heure. On obtient dans les trois cas une saturation de la vitesse d'absorption en fonction de la concentration en substrat. Ceci permet de déterminer un « K_m d'affinité apparent» : les valeurs obtenues sont très voisines (Figure 4). Les trois transports sont sensibles à la température. De plus, ils sont irréversibles puisque la remise en suspension sur milieu frais durant

une heure des lutoïdes ayant absorbé les trois substrats, indique une rétention de ces substrats de 80% (tableau 3). L'ATP double pratiquement l'absorption des trois composés alors que le 2,4 DNP inhibe ces absorptions.

J'ai montré que le citrate inhibe compétitivement l'absorption du succinate. Par contre, le succinate n'inhibe pas l'absorption du citrate. Il pourrait y avoir un système de transport unique présentant une spécificité plus importante pour le triacide qu'est le citrate que pour les diacides que sont le malate et le succinate. Par contre certains résultats conduisent à une interprétation faisant intervenir plusieurs transporteurs. En effet, l'optimum de pH pour l'absorption du citrate et du malate est de 7 alors que pour le succinate il est de 5,2 (Figure 5). De même, on observe dans le cas du citrate que le tampon cacodylate double l'absorption obtenue en tampon TEA alors que c'est l'inverse dans le cas du succinate et du malate.

Les travaux en cours actuellement devraient permettre de préciser les mécanismes qui permettent les échanges au travers de la membrane lutoïdique.

Figure 5
Variation de l'absorption
du Citrate, Malate, Succinate
en fonction du pH
en tampon Tris-Maléate
0,1 M

- Citrate
- -▲- - Malate
- -■- - Succinate

