

2 - 4 - 5 - 3
 Pénétration des acides aminés dans les lutoïdes
 P. Hanower et J. Brzozowska

Penetration of amino acids into the lutoïds

A study has been undertaken of the absorption of glutamic acid, alanine and radioactive lysine by lutoïds in vitro. A special study was made of lysine since it is the only one of these three amino acids to be absorbed against the concentration gradient (5/1).

Lysine is the most strongly absorbed of the three acids studied (2.4% of lysine present). The absorption of amino acids is thermally dependent and its kinetics are michaelian, which means that it is possible to determine the apparent Km values (12 mM for lysine).

Although 90% of the radioactive lysine absorbed by the lutoïds cannot be desorbed during an hour's incubation, the possibility of an exchange of isotopes cannot be excluded.

The pH of the incubation medium affects the rate of absorption of lysine. The rate reaches a maximum at between pH 8.0 and 8.5 and drops sharply at pH 6.0. It was then postulated that the proton gradient existing between the S serum and the C serum could control the absorption of lysine.

ATP increases this absorption, but less markedly than in the case of citrate.

If the specificity of the transport of lysine is considered, it is found that alanine has no effect whereas arginine is an inhibitor.

The stimulation of trees with Ethrel leads to an increase (+ 80%) in the absorption of lysine, which could be due to the increase in the pH gradient between serums C and S.

In fact, it was found that ATP, which lowers the intralutoïd pH, increases the absorption of lysine, whereas 2,4 DNP and NH_4Cl have the reverse effect on both pH and absorption.

★

La compartimentation des acides aminés libres du latex - prédominance des composés acides dans le sérum cytoplasmique et prédominance des composés à caractère basique dans des lutoïdes - nous a conduits à étudier la perméabilité de la membrane lutoïdique aux acides aminés.

Dans la réalisation de ce travail nous nous sommes inspirés des études analogues concernant l'accumulation du citrate dans les lutoïdes réalisées par d'Auzac et Lioret (1974).

La pénétration des acides aminés acide (acide glutamique), neutre (alanine) et basique (lysine) dans les lutoïdes, a été suivie à l'aide des molécules marquées au ^{14}C .

Les lutoïdes ont été placés dans un milieu isotonique (mannitol 0,3 M), dépourvu du matériel métabolique énergétique à pH 7,0 (tampon phosphate 0,1 M), proche du pH du sérum cytoplasmique et à 25°C . Les gradients naturels de concentration en acides aminés testés ayant été respectés, l'absorption se faisait dans le sens du gradient pour l'acide glutamique et l'alanine ($\approx 3/1$) et contre le gradient de concentration pour la lysine ($\approx 5/1$). C'est pourquoi l'accent a été mis sur l'étude de l'absorption de ce dernier composé.

Dans la plupart des cas, les résultats ont été rapportés aux protéines lutoïdiques restantes.

Caractéristiques générales de l'absorption des acides aminés par les lutoïdes

1 - Cinétique de la pénétration

L'absorption de l'acide glutamique, de l'alanine et de la lysine, est parfaitement linéaire en fonction du temps pendant au moins trente minutes (Figure 1). Dans les conditions expérimentales utilisées, proches des conditions physiologiques, la lysine est plus intensément absorbée après trente minutes (environ 2,4%) que l'alanine (1,7%) ou que l'acide glutamique (0,2% seulement).

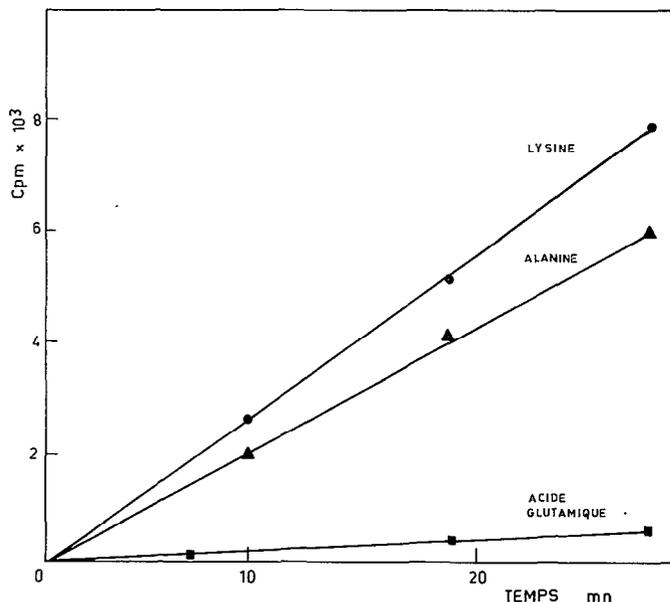


Figure 1
Cinétique de la pénétration des acides aminés dans les lutoïdes

2 - Influence de la température

L'absorption des acides aminés est thermodépendante. Les valeurs élevées de Q_{10} (4,2 entre 0° et 10° , 2,5 entre 10° et 20° et 2,2 entre 20° et 30° , dans le cas de la lysine) impliquent le franchissement de la membrane ; elles pourraient indiquer que le phénomène ne correspond pas à une simple diffusion, mais à un transport actif. Toutefois, cette thermodépendance peut également être expliquée par un nombre croissant de sites de passage transitoires dus à l'écartement temporaire des molécules lipidiques constitutives de la membrane, constant pour une température donnée, et n'exclut pas un échange isotopique.

3 - Influence de la concentration externe en acide aminé

En suivant l'absorption en fonction de la concentration, on obtient une cinétique de type michaelien. La courbe vitesse-concentration en substrat est d'allure hyperbolique. La représentation des inverses permet d'obtenir une droite conduisant à un K_m apparent d'environ 12 mM pour la lysine et 30 mM pour l'alanine.

La cinétique michaelienne laisserait supposer que l'influx est lié à l'existence d'un transporteur pouvant être saturé en substrat. Mais ici également l'interprétation évoquée ci-dessus, basée sur la formation des sites de passages en nombre constant et limité par unité de temps, peut, *a priori*, rendre compte du phénomène observé.

4 - Exsorption de la lysine

Les essais d'exsorption tels qu'ils ont été réalisés (exsorption pendant une heure dans un milieu sans lysine, contrôle de l'intégrité des lutoïdes par le dosage des protéines) ne permettent pas, malgré une forte rétention de la radioactivité absorbée par les lutoïdes (plus de 90%) de conclure à l'absence d'un échange isotopique. Des techniques plus fines devront être imaginées.

Influence du pH du milieu extérieur

Entre 5,5 et 8,5.

Le pH du milieu d'incubation influe d'une manière très nette sur la vitesse de pénétration de la lysine. Cette vitesse est optimale à pH 8,0-8,5 et baisse fortement à pH 6.

Compte tenu du pH proche de la neutralité du sérum cytoplasmique et de l'acidité du sérum intralutoïdique - $pH \approx 5,6$ - l'hypothèse a été émise, suivant laquelle le gradient de pH pourrait être une des sources d'énergie permettant l'absorption par les lutoïdes de la lysine et, plus généralement, des acides aminés basiques, contre le gradient de concentration. Les résultats des expériences relatives à la pénétration de la lysine en fonction du pH du milieu corroborent une telle hypothèse.

Effecteurs de la pénétration

1 - Action du NH_4Cl

Nous avons testé l'action du NH_4Cl (connu comme substance qui décharge le gradient de protons intrachloroplastique), sur la pénétration de la lysine. Contrairement à ce qui a été noté pour le citrate, le NH_4Cl inhibe fortement (50% d'inhibition à la concentration ≈ 7 mM) l'absorption de la lysine. Le gradient de H^+ semble donc jouer un rôle dans le transport des acides aminés basiques (Figure 1).

2 - Action de l'ATP

L'ATP exalte la pénétration de la lysine. L'effet maximal - la vitesse de l'absorption multipliée par un facteur 1,4 - est observé à concentration entre 1 et 2,5 mM.

Deux modes d'action sont attribués à l'ATP :

- chargement du gradient des protons ;
- création des liaisons à haut potentiel énergétique ($\text{X}\sim\text{I}$).

3 - Action du 2,4 DNP (Figure 2)

Le 2,4 DNP inhibe l'absorption de la lysine par les lutoïdes. Son action, en tant que découpleur des phosphorylations, peut avoir une double explication :

- soit qu'il décharge la liaison à haute énergie $\text{X}\sim\text{I}$;
- soit qu'il décharge le gradient de protons à l'origine de la formation d'ATP.

4 - Action de la NEM (Figure 2)

La NEM exerce un effet inhibiteur net sur l'absorption de la lysine. La NEM étant un inhibiteur des groupes SH, ceci semble indiquer que ces groupes sont liés à la pénétration de la lysine.

Spécificité du transport de la lysine

1 - L'effet de l'alanine

L'alanine n'inhibe pas la pénétration de la lysine. Il en résulte que les sites de pénétration ne sont pas les mêmes pour les deux amino acides, ou bien que les transporteurs sont différents et spécifiques.

2 - L'effet de l'arginine

Contrairement à l'alanine, l'arginine exerce un effet inhibiteur net sur l'absorption de la lysine. Nous avons cherché à préciser s'il s'agit là d'une inhibition de type compétitif, mais les résultats de ces expériences n'ont pas encore été dépouillés. S'il en était ainsi, cela prouverait que les deux acides aminés basiques utilisent le même système transporteur ou, au moins, les mêmes sites de passage à travers la membrane lutoïdique.

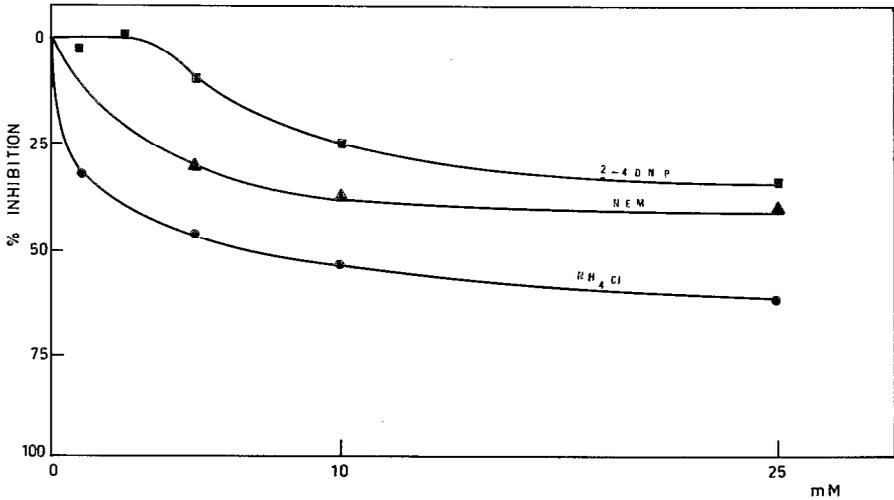


Figure 2

Inhibition de l'incorporation de la lysine dans les lutoïdes par NH_4Cl , 2,4 DNP et NEM

Spécificité du transport de l'alanine

A défaut de D-lysine, nous avons testé l'effet d'un isomère D sur la pénétration d'un isomère L de l'alanine.

Il s'avère que la D-alanine est sans influence sur l'absorption de la L-alanine ou, du moins, que la forme L est absorbée préférentiellement. Vu le peu de différence structurale entre la forme L et D, ce fait indiquerait une haute stéréospécificité du transport de l'alanine à travers la membrane lutoïdique et laisserait penser à l'existence d'un transporteur enzymatique.

Influence d'un traitement stimulant sur la perméabilité de la membrane lutoïdique

La stimulation des arbres par l'Ethrel, générateur de l'éthylène, se traduit par une augmentation importante de la pénétration de la lysine (allant jusqu'à 80%).

Une des explications possibles de ce phénomène pourrait être la montée du pH du sérum cytoplasmique observée après le traitement stimulant, montée qui peut atteindre 0,5 unité de pH (Primot, 1974) et qui, à son tour, augmenterait le gradient de pH entre le milieu extralutoïdique et le sérum intralutoïdique.

Tableau 1
Valeurs du pH intralutoïdique après divers traitements des lutoïdes (Moyennes de deux essais)

Milieu extra-lutoïdique naturel ou artificiel							Sérum intra-lutoïdique					
Sérum cytoplasmique	Milieu de base : Mannitol 0,3 M Tampon phosphate 0,1 M	Lysine 0,5 mM	A.T.P. 2,5 mM	NH ₄ Cl 25 mM	2,4 -DNP 20 mM	pH	Traitement des lutoïdes				pH	
							Centrifugation	Trois lavages avec milieu de base	Incubation 30mn à 25°C et centrifugation	Ultra-sons		
+	+					6,83	+				+	5,60
	"					7,00		+			"	6,02
	"					7,00		"		+	"	6,10
	"	+				7,00		"		"	"	6,11
	"			+		7,00		"		"	"	5,93
	"				+	7,00		"		"	"	6,45
	"					7,00		"		"	"	6,29

Gradient du pH entre le milieu externe et le sérum lutoïdique

Afin de vérifier si le gradient de pH contrôle la pénétration de la lysine dans les lutoïdes contre le gradient de concentration, une série de mesures du pH intralutoïdique ont été réalisées après les différents traitements (centrifugation, lavages, incorporation de la lysine en présence ou non des divers effecteurs de la pénétration (Tableau 1).

Les résultats obtenus plaident en faveur de cette hypothèse. Une corrélation positive semble exister entre l'intensité de pénétration de la lysine et la valeur du gradient de pH milieu externe/sérum lutoïdique :

- l'ATP entraîne une baisse du pH intralutoïdique, c'est-à-dire fait augmenter le gradient de pH et stimule l'absorption de la lysine ;
- le 2,4 DNP et surtout le NH_4Cl , font monter le pH intralutoïdique, donc diminuent le gradient du pH et inhibent la pénétration de la lysine.

Il est intéressant de noter (Tableau 1) que l'utilisation du tampon phosphate 0,1 M pour tamponner le milieu d'incubation entraîne une augmentation sensible du pH intralutoïdique ; de ce fait, le gradient de pH milieu extralutoïdique/milieu intralutoïdique, dans nos conditions expérimentales, est inférieur au gradient existant dans les conditions physiologiques naturelles (Δ pH 0,98 contre Δ pH 1,23), ce qui agirait dans le sens de diminution de la pénétration de la lysine dans les lutoïdes.

Il serait souhaitable, à l'avenir, d'employer un tampon plus faible.

★