

2 - 4 - 5 - 4  
 «Énergisation» de l'accumulation intralutoïdique  
 J. d'Auzac

*Energy sources for intralutoid accumulation*

*As we have seen, certain of the cytoplasmic serum components such as citric acid and lysine are capable of accumulating in vitro against a concentration gradient in the lutoid fraction. Although this accumulation is activated by ATP, it can also take place in the absence of a source of energy.*

*We cannot yet be absolutely certain that the absorption which has been shown to occur in vitro is the result of active transfer. It is, however, highly likely that an active effect of this type occurs in vivo. The problem then arises as to the source of energy necessary for this transfer to occur.*

*A number of hypotheses have been put forward to account for this accumulation. These are as follows :*

- 1 - on the lutoid membrane there are pumps of varying specificity which use cytoplasmic ATP ;*
- 2 - if a membrane ATPase or an oxidation-reduction reaction associated, for example, with NADH cytochrome c, oxidase was involved, this would give rise to an energised state of the membrane or to a conformational modification. One or other of these states would energise the pumps ;*
- 3 - oxidation of respiratory substrates, or more simply the hydrolysis of ATP, is coupled with an intralutoid accumulation of protons. This gradient would be the source of energy for the various systems of active transfer.*

*The results as they stand at present favour the last of these hypothesis.*

★

Posons clairement le problème :

- D'une façon générale, le mécanisme susceptible d'énergiser l'accumulation active dans les vacuoles *in vivo* est peu ou pas connu.
- On parle en terme de potentiel de NERNST, de flux, etc.. mais on ignore la source d'énergie qui assure en dernier ressort le transport actif.

La solution simple est de supposer que le métabolisme cytoplasmique est le fournisseur d'énergie. Il n'en reste pas moins que les médiateurs impliqués dans la transformation de l'énergie chimique en gradient de concentration sont inconnus.

On parle, bien sûr, d'une ATP-ase. D'une façon générale le système enzymatique du tonoplasme est pratiquement inconnu, dans l'impossibilité où sont la plupart des chercheurs de disposer en quantité suffisante d'une fraction membranaire dont on puisse être sûr qu'il s'agisse d'un tonoplasme.

- L'équipe francophone, qui travaille sur le latex, a la chance certaine de posséder en grande quantité du matériel végétal bien adapté à une telle étude ; il serait extrêmement regrettable de ne pas utiliser une telle chance.
- Il se trouve par ailleurs que des vacuoles isolés *in vitro* dans un milieu isotonique **mais non énergétique** sont susceptibles d'accumuler citrate et acides aminés basiques contre un gradient de concentration d'une façon qui semble active.

Quel peut donc être le mécanisme susceptible d'«énergiser» une telle accumulation ?

La solution simple impliquant l'existence de pompes plus ou moins spécifiques utilisant l'ATP peut, semble-t-il, être écartée. En effet, sans ATP, l'absorption du citrate représente 50% et celle des acides aminés basiques au moins les deux-tiers de celle obtenue avec ATP.

La plupart des connaissances acquises dans l'activation des transports membranaires découlent de l'école de Kaback et concernent des vésicules reconstitués à partir de bactéries ou de levures privées de leur paroi cellulaire. Il s'agit donc de vésicules possédant des membranes de type mitochondrial, donc énergétiques.

Le processus le plus général mis en évidence par Kaback est le suivant : des électrons dérivés du lactate ou de donneurs artificiels sont transférés à  $O_2$  par une chaîne respiratoire membranaire et la respiration est couplée au transport actif à travers un fragment de cette chaîne. Dans la majorité des cas, la formation et l'hydrolyse de l'ATP n'est pas impliquée.

En anaérobiose le fumarate ou le nitrate peuvent remplacer  $O_2$  comme accepteurs d'électrons.

A ce schéma général, sans doute le plus courant, mais que nous n'avons pas réussi à faire fonctionner, s'ajoute un schéma plus particulier mais peut-être plus intéressant mis en évidence par Berger sur des *E. coli* affamés (Figure 1). Le transport de la proline est activé directement par un état riche en énergie de la membrane lequel peut être produit, soit par un transport d'électrons le long de la chaîne respiratoire, soit par l'hydrolyse de l'ATP.

L'absorption de la glutamine est commandée par l'énergie des liaisons phosphates formées par des phosphorylations, oxydatives ou au niveau du substrat.

Travaillant sur des vacuoles lysosomales, nous sommes dans un domaine quasiment vierge si l'on considère l'«énergisation» des accumulations.

Il faut donc faire des hypothèses heuristiques. On peut en proposer trois :  
- la première implique le couplage direct de pompes spécifiques à l'hydrolyse de l'ATP (Figure 2) ;

---

H.R. KABACK - *Science*, 186, 882, (1974).

E.A. BERGER - *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 74, 5, 1514, (1973).

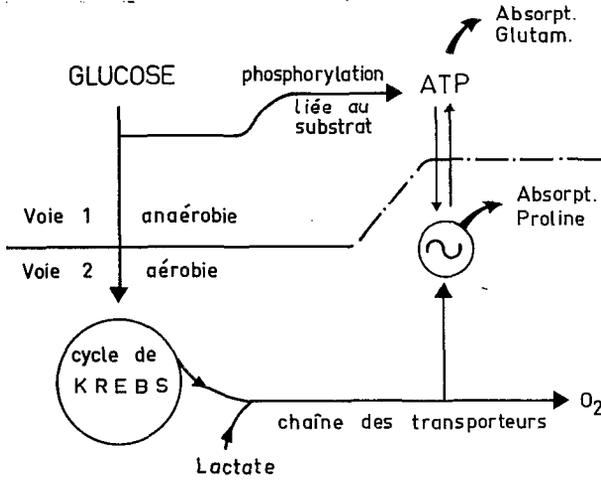


Figure 1

Différents mécanismes de couplage énergétique du transport actif chez *E. coli*  
 E.A. BERGER - *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 70, 5, 1514, (1973)

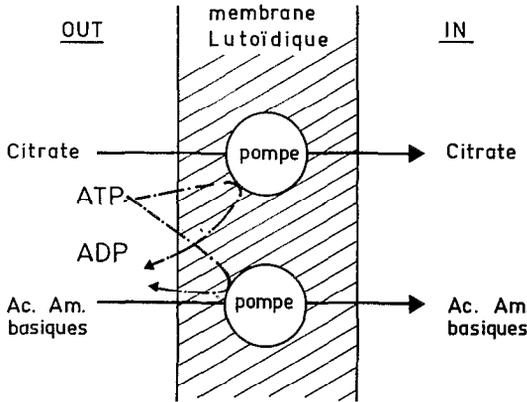


Figure 2

Energisation du transport actif - Hypothèse I

Pompes spécifiques utilisant l'ATP

Hypothèse peu vraisemblable car les transports fonctionnent sans ATP

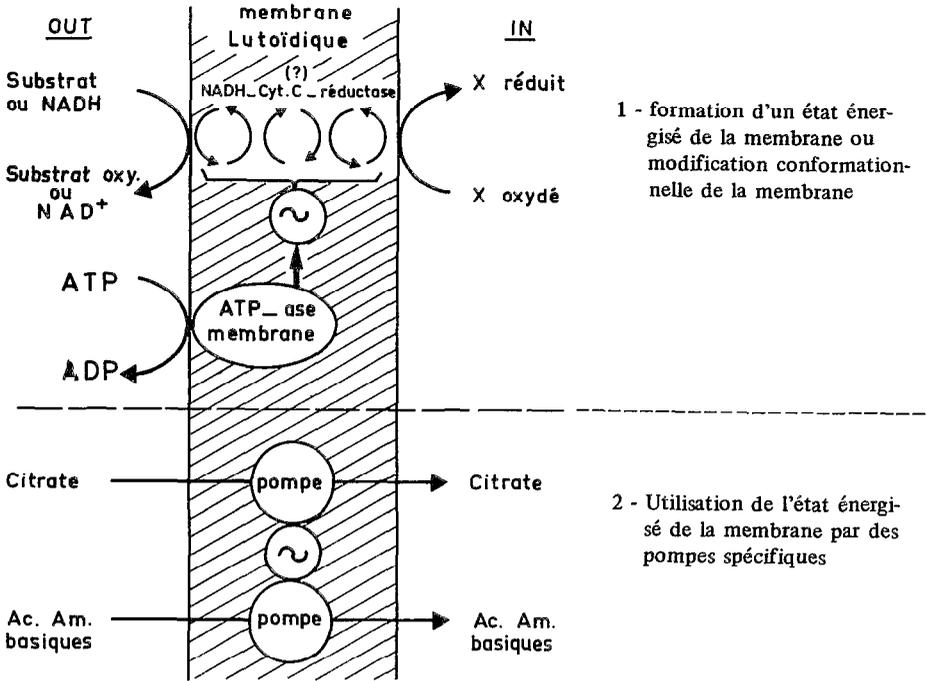


Figure 1

Énergisation du transport actif - Hypothèse II

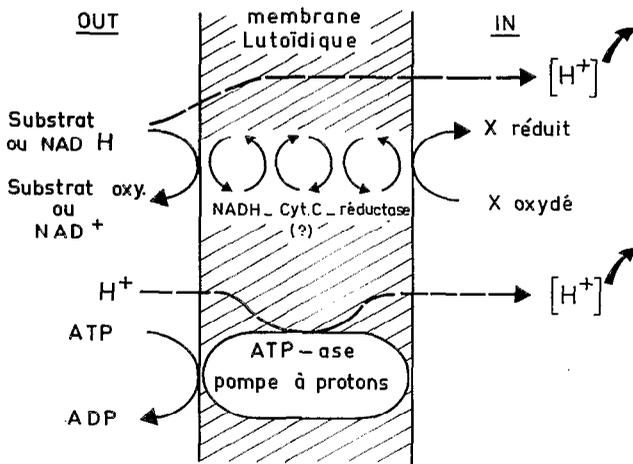
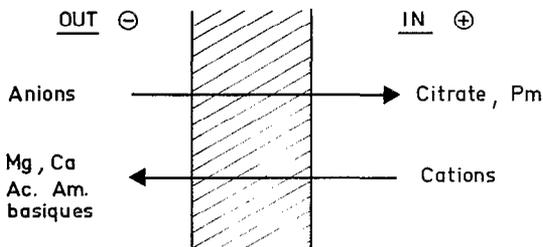


Figure 4

Énergisation du transport actif - Hypothèse III

Constitution *in vivo* d'un gradient d' $H^+$  intralutoïdique grâce au métabolisme cytoplasmique  
 Le gradient d' $H^+$  régulièrement entretenu *in vivo* et entretenu *in vitro* grâce à l'ATP exogène serait le moteur de certaines absorptions.

- 1 - le gradient d' $H^+$  serait responsable d'un transport passif dans le sens du gradient électrique (si transporteur, on a une diffusion facilitée)



- 2 - la décharge du gradient de protons énérgise *in vitro* diverses pompes

L'entrée des ions pourrait s'accompagner de la sortie de charges de même signe pour conserver l'équilibre électrique.

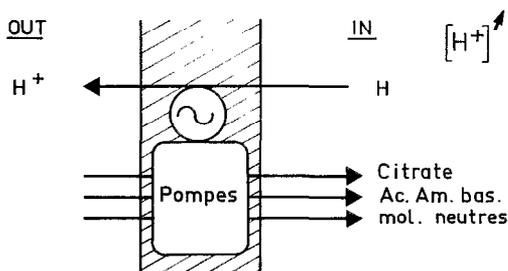


Figure 5

Énérgisation du transport actif - Hypothèse III (suite)

- la seconde implique la formation d'un état énérgisé de la membrane ou une modification conformationnelle. L'un ou l'autre de ces états énérgisant les pompes (Figure 3) ;
- alors que cette seconde hypothèse relève de la théorie de Chance, la troisième découle de Mitchell : l'oxydation de substrats respiratoires (ou de NADH), ou l'hydrolyse de l'ATP sont couplés avec une accumulation intralutoïdique de protons. C'est le gradient intralutoïdique de protons qui «énérgise» les différentes pompes (Figures 4 et 5).

☆

*De la discussion générale qui s'instaure à ce moment, on peut extraire les principales idées suivantes :*

- des diverses hypothèses plausibles, la troisième concernant le rôle majeur du pH dans l'absorption pourrait être la plus vraisemblable et mérite que l'on s'y arrête sur le plan expérimental ;
- les différences de pH intralutoïdique constatées par l'IRCA d'une part, l'ORSTOM et la Faculté d'Abidjan d'autre part, pourraient résulter de la préservation par un tampon dans ces deux derniers cas ;

- ceci pose le problème de la perméabilité aux tampons utilisés (phosphate - TEA - cacodylate - Tris-maléate) de la membrane lutoïdique. Il y aurait lieu de vérifier comment la conservation des lutoïdes dans ces différents tampons modifie le pH intralutoïdique ;
- la différence de comportement des tampons TEA et cacodylate vis-à-vis de divers acides organiques pourraient être considérée en fonction du point précédent ;
- il serait souhaitable de considérer l'influence des différents inhibiteurs, notamment des découpleurs CCCP et 2,4 DNP sur le pH intralutoïdique en même temps que sur l'absorption ;
- il est a priori deux façons d'étudier les relations entre l'action de molécules diverses et le pH intralutoïdique :
  - la première est de considérer la variation du pH intralutoïdique en fin et en cours d'incubation,
  - la deuxième est de suivre en cinétique l'évolution du pH du milieu d'incubation dans des conditions à définir très soigneusement ;
- si l'ATP-ase membranaire fonctionne pour abaisser le pH intralutoïdique, on peut se demander s'il est possible de la faire fonctionner à l'envers en fournissant un excès d'ADP et de P<sub>m</sub> ?

\*

*D'une façon générale, le facteur pH est apparu d'extrême importance tout au long de la réunion. Rappelons :*

- le pH élevé lié à une forte production,
- la régulation par le pH de l'invertase et de la pyruvate décarboxylase,
- l'hypothèse générale de régulation acido-basique du métabolisme latifère présentée par Jacob,
- le rôle du pH dans l'absorption intralutoïdique des différentes molécules organiques testées.

*Il peut paraître important dans cette dernière (?) année du contrat DGRST sur les membranes lutoïdiques de s'attacher à approfondir les résultats encourageants obtenus à ce jour quant à l'«énergisation» de l'accumulation dans un compartiment vacuolaire-lysosomal.*

*Il est envisagé, à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, d'entreprendre l'étude de l'absorption «active» et de ses mécanismes sur des vésicules membranaires lutoïdiques reconstitués. Il serait alors possible, connaissant le contenu intralutoïdique, d'avoir une meilleure approche du problème.*

★