

DIVERSES PROPRIETES DE L'ABSORPTION DU CITRATE DU MALATE ET DU SUCCINATE PAR LES LUTOIDES DU LATEX D'*HEVEA* *BRASILIENSIS*

M. C. MONTARDY et C. LAMBERT

Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences d'Abidjan, B.P. 4322-Abidjan (Côte d'Ivoire)

(Received 3 May 1976)

Key Word Index—*Hevea brasiliensis*; Euphorbiaceae; vacuole; lysosome; membrane; transport.

Abstract—Lutoïdes from *Hevea* latex are microvacuoles with lysosomal character. *In vitro* in a medium free of energetic substrate citrate, malate and succinate are absorbed. The properties of this absorption and the action of some modifiers are discussed.

INTRODUCTION

Les lutoïdes qui représentent de 10 à 20% du volume du latex sont des microvacuoles [1, 2] à caractère lysosomal [3, 4]. La composition du sérum intralutoïdique en cations divalents tel que Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , en anions citrate et phosphate [5], en acides aminés basiques [6] comparée à celle du sérum cytoplasmique indique que ces produits sont accumulés dans les lutoïdes.

Ribaillier a démontré que le citrate était absorbé *in vitro* par les lutoïdes contre un gradient de concentration de 10. D'Auzac et Lioret [7] ont défini un certain nombre de propriétés du mécanisme d'absorption de citrate par des lutoïdes placés dans un milieu isotonique non énergétique. Cette absorption qui est thermodépendante a une cinétique linéaire et michaelienne en fonction de la concentration en citrate. L'ATP multiplie par deux la vitesse d'absorption sans modifier le ' K_m apparent' de la réaction d'absorption, alors que le 2,4 dinitrophénol et la *N*-éthylmaléimide inhibent la pénétration du citrate.

Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un transport médiat. Afin de tester la spécificité du médiateur nous avons étudié comparativement l'absorption du citrate du malate et du succinate. Le choix de ces trois acides organiques a été dicté par le fait qu'ils sont répartis d'une manière très différente dans les sérums cytoplasmiques et lutoïdiques: le citrate est accumulé dans les lutoïdes, le malate est réparti uniformément dans les deux sérums, le succinate n'est présent dans aucun des deux compartiments.

RESULTATS

Cinétique d'absorption et irréversibilité du transport

Les cinétiques que nous avons obtenues ont toutes l'allure de celles présentées sur la Fig. 1. Elles sont pratiquement linéaires pendant 1 heure; au-delà d'1 heure les lutoïdes ne sont plus stables. Les trois cinétiques d'absorption présentent une allure très voisine, les seules différences étant dans l'ordre de grandeur des quantités absorbées. Ces différences ne sont pas significatives car elles proviennent de l'état des lutoïdes. Nous avons

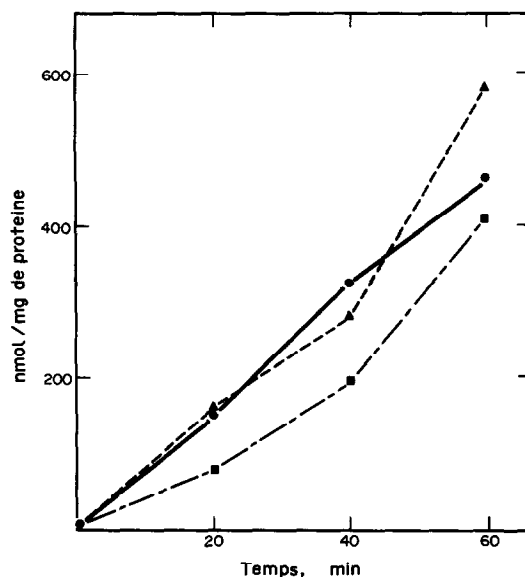


Fig. 1. Cinétique d'absorption du citrate, malate et succinate en milieu d'incubation TEA 0,1 M pH 7. ●—● citrate 5 mM, ▲---▲ succinate 5 mM, ■---■ malate 5 mM.

observé des fluctuations très importantes dans les quantités de substrats absorbés par des lutoïdes provenant de mêmes arbres saignés à des jours différents.

Précédemment [7] il a été montré que la vitesse d'absorption du citrate était michaelienne en fonction de la concentration en substrats du milieu d'incubation. Cela avait permis à D'Auzac de déterminer le ' K_m apparent' du système de transport qui en tampon triéthanolamine (TEA) 0,1 M pH 7 est de 5 mM pour le citrate. Les variations des vitesses d'absorption du malate et du succinate en fonction de leurs concentrations dans le milieu d'incubation sont de même type. La figure 2 représente les variations de l'inverse de la vitesse d'absorption en fonction de l'inverse de la concentration. Ceci permet de déterminer les ' K_m apparents' des réactions de transport

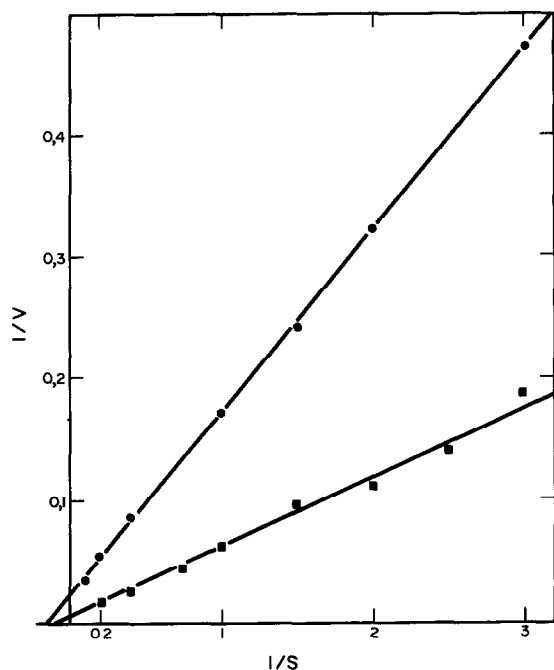


Fig. 2. Variations de la vitesse d'absorption en fonction de la concentration en succinate et en malate du milieu. Représentation selon les inverses de la concentration (mM) et de la vitesse d'absorption (nmol/mg de protéines/30 mn). ■—■ succinate, ●—● malate.

du malate et du succinate en tampon TEA 0,1 M pH 7 qui sont respectivement de 7,5 et 10 mM.

Ayant montré que les lutoïdes absorbent les trois acides organiques utilisés nous avons vérifié qu'il s'agit bien d'un influx de substance et non d'un simple échange isotopique entre milieu extra et intralutoïdique. Pour étudier ceci nous avons fait absorber durant 30 min chacun des trois produits. On partage alors les lutoïdes en deux lots. Un lot est utilisé immédiatement pour déterminer la quantité de substance absorbée au bout de ces 30 min (temps 0, Tableau 1). L'autre lot, après un lavage, est remis en suspension sur milieu d'incubation durant 45 min après lesquelles on détermine la quantité de produit considéré, restant dans les lutoïdes. Les

Tableau 1. Rétention des substrats par des lutoïdes mis en suspension sur milieu d'incubation TEA 0,1 M pH 7 pour le citrate et le malate et milieu d'incubation Tris-maléate 0,1 M pH 6 pour le succinate

	nmol de substrat/mg protéine		
	citrate	malate	succinate
nmol de substrat exogène présent dans les lutoïdes au temps 0	38,8	102	87,3
nmol de substrat restant dans les lutoïdes après 45 mn	33,7	95,8	76,5
Pourcentage de substrat restant par rapport au temps 0	87	94	88

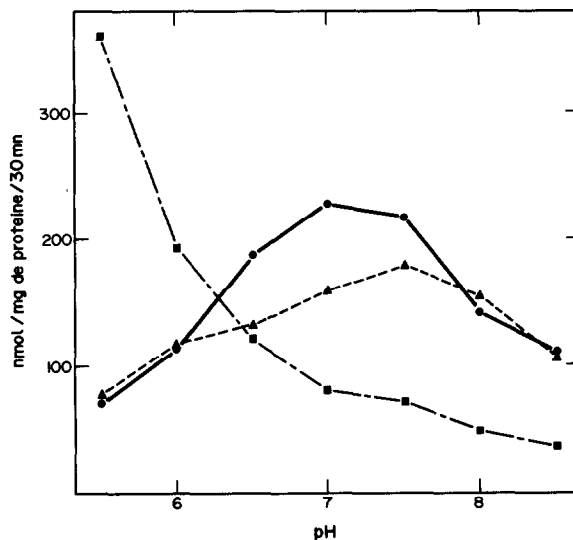


Fig. 3. Influence du pH sur l'absorption du citrate, malate et succinate en milieu d'incubation Tris-maléate 0,1 M. ●—● citrate 5 mM, ▲—▲ malate 5 mM, ■—■ succinate 5 mM.

résultats obtenus sont présentés dans le tableau I. Nous voyons que les taux de rétention de ces substrats sont très importants, la perte de 10% pouvant correspondre à une diffusion due au gradient de concentration.

Influence du pH et effet particulier du tampon cacodylate

D'Auzac [7] avait montré une influence très nette du pH du milieu d'incubation sur le transport du citrate.

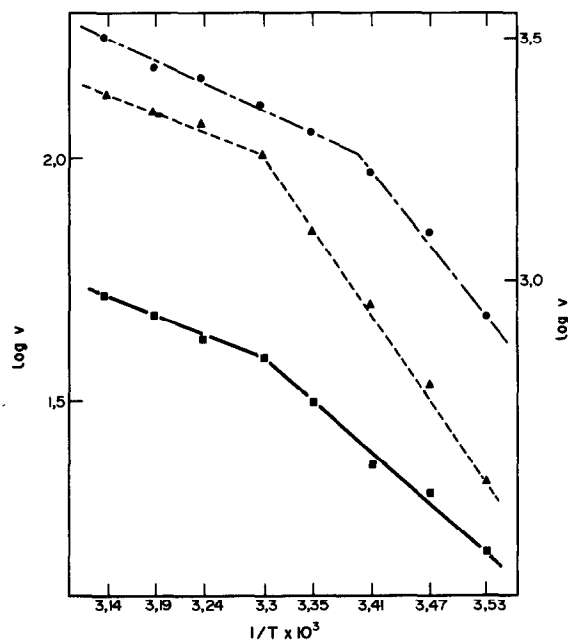


Fig. 4. Influence de la température sur les trois absorptions (vitesse d'absorption en nmol/mg de protéines/30 mn). ■—■ échelle de gauche: malate 5 mM en milieu TEA 0,1 M pH 7, ▲—▲ échelle de gauche: citrate 5 mM en milieu TEA 0,1 M pH 7, ●—● échelle de droite: succinate 5 mM en milieu Tris-maléate 0,1 M pH 6.

Tableau 2. Comparaison entre les absorptions de citrate, malate et succinate dans des milieux d'incubation TEA 0,1 M pH 7 ou cacodylate 0,1 M pH 7

temps d'incubation	absorption		nmol absorbées/mg protéine			
	TEA	Citrate cacodylate	TEA	Succinate cacodylate	TEA	Malate cacodylate
10 mn	14,4	24,3	9,9	3,6	17,1	6,1
20 mn	27,5	47,2	18,4	7,7	36,9	13,3
30 mn	45,6	73	29,9	11,7	50,4	17,4

Nous avons tracé les courbes de variation des absorptions en fonction du pH (Figure 3). Nous avons travaillé en tampon Tris-maléate 0,1 M. Pour le citrate nous retrouvons le même optimum que celui trouvé en tampon TEA-HCl c'est-à-dire un pH de 7. Pour le malate l'optimum est légèrement moins prononcé et se trouve à pH 7,5. Pour le succinate nous n'avons pas pu déterminer d'optimum car si l'on travaille en-dessous de pH 5,5 les lutoïdes s'agrègent et il n'est plus possible de faire de détermination d'absorption. Mais il apparaît que le pH 5,5 est le plus favorable pour l'absorption du succinate.

Nous avons étudié également l'influence de la nature du tampon sur les différents transports. Les tampons TEA-HCl, phosphate, Tris-maléate conduisent à des résultats voisins mais il en est tout autrement du tampon cacodylate. Si en présence de cacodylate on observe une augmentation très nette de l'absorption du citrate comparée à celle obtenue en TEA, la situation est inversée dans le cas des absorptions du succinate et du malate (Tableau 2). Il convient de préciser que si la quantité de substrat absorbé est influencée par la nature du tampon, les cinétiques d'absorption restent linéaires durant 1 hr quelque soit le tampon.

Influence de la température

La thermodépendance d'un système de transport est l'une des caractéristiques essentielles d'un transport médiat. Primot (résultats non publiés) a montré qu'entre 20 et 30° la réaction d'absorption du citrate a un Q_{10} de 2,14. Nous avons étudié l'influence de la température sur les trois transports. Entre 10 et 45° pour le transport du citrate et du succinate les Q_{10} sont compris entre 2 et 2,9 et pour le malate entre 1,7 et 2,1. Ces valeurs indiquent que les transports ne doivent pas être de simples diffusions. De plus la représentation selon Arrhénius de l'influence de la température indique pour les trois transports une cassure qui doit correspondre à un changement de phase de la structure membranaire des lutoïdes (Fig. 4). Ceci est compatible avec l'existence de médiateurs plus ou moins liés à la membrane. Pour les absorptions du citrate et du malate en tampon Tris-maléate pH 7 la cassure a lieu aux environs de 30°. Pour le succinate dans le même tampon à pH 6 la cassure se situe vers 25°.

Influence de l'ATP et de divers inhibiteurs

A la concentration 5 mM dans le milieu d'incubation l'ATP multiplie par deux en moyenne l'absorption du citrate [7]. Nous avons montré que l'on obtient une

augmentation semblable si on préincube les lutoïdes en présence d'ATP et si l'on fait absorber le citrate après élimination de cet ATP [9]. L'ATP favorise également l'absorption du succinate et du malate dans des proportions semblables comme cela est indiqué sur le tableau 3.

Les autres nucléotides tels que l'UTP le CTP et le GTP peuvent augmenter l'absorption des trois acides organiques mais dans des proportions bien plus faibles [9]. Le 2,4 DNP dès la concentration de 5 mM provoque une diminution de l'absorption comme l'indique le tableau 3. Pour une concentration 25 mM on obtient une inhibition de plus de 90% pour les trois absorptions. Le chlorure d'ammonium ne provoque aucune diminution de l'absorption même à une concentration 25 mM (Tableau 3). Les inhibitions obtenues avec le bleu de bromothymol sont du même ordre pour les trois substrats (Tableau 3). Elles peuvent être également pratiquement totales pour une concentration 20 mM en bromothymol. En ce qui concerne l'action du mersalyl on observe toujours nettement une inhibition plus importante de l'absorption dans le cas du citrate (63%) que pour le succinate (39%) et le malate (32%), comme le montrent les résultats portés dans le tableau 3. On obtient également une inhibition de 90% et plus de trois transports à une concentration 25 mM en mersalyl.

DISCUSSION

L'accumulation de certaines substances dans les lutoïdes pose le problème du mécanisme de leur transport à travers la membrane lutoïdique. La possibilité d'isoler facilement ces microvacuoles et d'obtenir *in vitro* une absorption du citrate ainsi que de la lysine [10] nous a conduit à mieux définir la spécificité du système de transport vis-à-vis du citrate.

Tableau 3. Influence de divers effecteurs sur l'absorption du citrate, malate, succinate 5 mM dans un tampon TEA 0,1 M pH 7

	nmol/mg protéine/30 mn		
	Citrate	Succinate	Malate
Témoins sans ATP	40	12,2	24,9
avec ATP 5 mM	72	23,5	51
Témoins sans 2,4 DNP	23,2	15,4	30,3
avec 2,4 DNP 5 mM	17,7	11,7	23,9
Témoin sans NH ₄ Cl	60,1	73,6	59
avec NH ₄ Cl 25 mM	62,4	74,8	56
Témoins sans bromothymol	29,6	11,6	26
avec bromothymol 5 mM	21,6	9,6	19,5
Témoin sans mersalyl	10,4	6,6	12,3
avec mersalyl 5 mM	3,8	4	8,3

Nous avons montré que le citrate n'était pas le seul acide organique qui pouvait être absorbé. Les trois substrats utilisés sont absorbés suivant des cinétiques très semblables et les trois transports sont également saturables en fonctions de la concentration en substrat. Les valeurs très voisines que nous avons trouvées pour le K_m apparent des trois transports sont compatibles avec l'existence d'un système de transport unique. Ceci est confirmé par des résultats obtenus récemment concernant les interactions entre les trois absorptions: ou il y a un transporteur unique qui est plus spécifique pour le triacide que pour les deux diacides, ou alors les compétitions entre les trois acides se font au niveau de l'énergie nécessaire au transport.

Par contre les résultats obtenus dans la recherche de l'optimum de pH indiquent une différence notable entre le transport du citrate et du malate et celui du succinate. L'action du pH peut s'exercer au niveau de l'affinité du substrat pour un transporteur unique mais peut se faire au niveau de systèmes de transport qui diffèrent par leur optimum de pH. L'action du tampon cacodylate peut difficilement s'interpréter dans le cas d'un transporteur unique.

Les influences des divers effecteurs étudiés sur les trois transports sont très semblables et sont compatibles avec l'existence d'un médiateur unique mais peut aussi s'expliquer par des réponses identiques de plusieurs médiateurs aux divers effecteurs. En ce qui concerne l'influence de l'ATP, l'existence d'une ATPase liée à la membrane lutoïdique [11] permet de comprendre l'augmentation d'absorption observée. La présence d'ATP dans le milieu d'incubation provoque une diminution du pH intralutoïdique [9]. Ce gradient de proton peut fournir à la membrane l'énergie qui provoque l'augmentation de l'absorption des trois acides organiques ou provoque des flux d'ions supplémentaires. L'action du mersalyl que nous observons pourrait être une conséquence de l'inhibition de l'ATPase par le mersalyl qui a été mise en évidence par d'Auzac [12].

Le 2,4 DNP pénètre dans les lutoïdes et peut agir soit sur le gradient de pH soit en provoquant une hydrolyse de liaisons énergétiques. Il empêche donc l'absorption qui ne dispose plus d'énergie pour se réaliser. Le NH_4Cl provoque une légère augmentation de l'absorption que l'on peut relier aux résultats de d'Auzac [12] qui montre une activation de l'ATPase par NH_4Cl . Mais par contre Hanower [10] observe une diminution de l'absorption de la lysine par NH_4Cl . Ceci implique des systèmes de transport différents dans le cas de l'absorption des acides organiques et des aminoacides basiques. Le bleu de bromothymol inhibe les déplacements d'anions à travers la membrane mitochondriale soit par une liaison directe

sur les charges positives des systèmes transporteurs soit par inhibition d'un enzyme du cycle de Krebs [13]. Dans notre cas le bleu de bromothymol inhibe certainement l'absorption en bloquant les sites de fixation des anions des médiateurs.

PARTE EXPERIMENTALE

Le latex d'*Hevea brasiliensis*, clone PR 107, est récolté dans un récipient refroidi par la glace puis stabilisé sur champs par 6% de TEA 1M pH 7 contenant du mercaptoéthanol 0,1 M. Les lutoïdes sont préparés au laboratoire par lavages et centrifugations successives [7]. Les incubations sont conduites, en général à 25°C, dans le milieu suivant: mannitol 0,3 M; MgCl_2 10 mM; CaCl_2 0,25 mM; K_2HPO_4 10 mM; β -mercaptoéthanol 2 mM; tampon TEA-HCl ou Tris-maléate ou cacodylate 0,1 M. Pour suivre l'absorption des 3 acides organiques nous avons utilisé du citrate ($1,5\text{-}^{14}\text{C}$) d'activité spécifique 30 mCi/mM, du malate ($1\text{-}^{14}\text{C}$) d'activité spécifique 58 mCi/mM, du succinate ($1\text{-}^{14}\text{C}$) d'activité spécifique 40 mCi/mM. Le protocole expérimental est le même que celui décrit précédemment [7]. Au temps zéro on met en présence les lutoïdes et le milieu d'incubation en respectant toujours le rapport de volume 1/2,5. Puis en mesurant la radioactivité du sérum intralutoïdique on détermine l'absorption du produit considéré. Les résultats sont exprimés en nanomoles de produit absorbé par milligramme de protéines lutoïdiques déterminées par la méthode de Lowry [8].

Remerciements—Nous remercions le CEA qui nous a aimablement fourni les produits radioactifs. Nous remercions le Prof. d'Auzac pour les fructueux entretiens que nous avons eu avec lui. Ce travail fait l'objet du contrat DGRST n° 727 029.

REFERENCES

1. Archer, B. L., Audley, G. B., McSweeney, G. P. et Tan Chee Hong (1969) *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* **21**, 560.
2. Ribaillier, D., Jacob, J. L. et d'Auzac, J. (1971) *Physiol. Vég.* **9**, 423.
3. Pujarniscle, S. (1968) *Physiol. Vég.* **6**, 27.
4. Pujarniscle, S. (1969) *Physiol. Vég.* **7**, 391.
5. Ribaillier, D. (1972) *Thèse Doc. Etat Université d'Abidjan* CNRS. n° AO 7716.
6. Brzozowska, J., Hanower, P. et Chezeau, R. (1973) *Experientia* **30**, 394.
7. d'Auzac, J. et Lioret, C. (1974) *Physiol. Vég.* **12**, 617.
8. Layne, E. (1967) dans *Methods of Enzymology* (Collowick, S. P. et Kaplan, N. O. eds.) **3**, pp. 448–460. Academic Press, New York.
9. Lambert, C. (1975) *C.R. Acad. Sc. Paris* **281** série D, 1705.
10. Hanower, P. et Brzozowska J. (1976) à paraître.
11. d'Auzac, J. (1975) *Phytochemistry* **14**, 671.
12. d'Auzac, J. (1976) à paraître.
13. Alexandrowicz, Z. et Zwierczynski, J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **382**, 92.