

## Mise en évidence d'une NAD kinase dans le compartiment membranaire du latex d'*Hevea brasiliensis*

Jean LORQUIN, Yvan FRANCEY et Hervé CHRESTIN

**Résumé** — Une NAD kinase (EC 2.7.1.23) a été mise en évidence dans le latex d'*Hevea brasiliensis*. Elle est localisée dans la fraction membranaire de latex ultracentrifugé et serait liée soit aux lutoïdes (microvacuoles lysosomales) soit à une autre structure membranaire et catalyse la formation du NADP faiblement présent dans le cytosol ( $< 1 \mu\text{M}$ ). Le pH optimal de son activité est 8,0 et l'affinité de l'enzyme à ce pH est comprise entre 0,5 et 1,0 mM pour le NAD et entre 1,0 et 1,5 mM pour l'ATP. Il s'agit d'une enzyme de type allostérique présentant une coopérativité positive aux faibles concentrations en substrats. En régénérant du NADP(H), molécule activatrice et cofacteur d'enzymes clés de la biosynthèse du caoutchouc, cette enzyme pourrait jouer un rôle important dans la physiologie de la production du latex.

### Evidence for a NAD kinase in the membrane compartment from the latex of *Hevea brasiliensis*

**Abstract** — A NAD kinase (EC 2.7.1.23) activity has been characterized in latex from *Hevea brasiliensis*. It was localised in the bottom fraction of ultracentrifuged latex and is probably bound either to membranes of lutoïds, the latex vacuolysosomal compartment, or to another membrane structure bound itself to lutoïds. This enzyme needs NAD and ATP as substrates and catalyses the formation of NADP that is poorly present in the cytosol ( $< 1 \mu\text{M}$ ). The optimal pH for its activity was found to be 8,0 and at this pH, its affinity is between 0.5 and 1.0 mM for NAD and between 1.0 and 1.5 mM for ATP. NAD kinase is an allosteric enzyme displaying a positive cooperativity at the lower concentrations of substrates. As NADP(H) has been shown to act as an activator and cofactor for several key enzymes in rubber biosynthesis, it is suggested that this enzyme plays a major role in the biochemical mechanisms involved in the latex production.

**INTRODUCTION.** — Chez l'*Hevea brasiliensis*, les dérivés nicotinamidiques NAD(H) et NADP(H) jouent un rôle fondamental dans le catabolisme glucidique et l'anabolisme isoprénique : ils sont substrats et cofacteurs de nombreuses enzymes qui assurent la régénération du caoutchouc entre les saignées et peuvent constituer des facteurs limitants de la production.

Pour la majorité des organismes, l'étape finale de la biosynthèse du NADP est due à une phosphorylation ATP-dépendante du NAD, catalysée par une enzyme présentant une seule forme (ou un seul isoenzyme), la NAD kinase (ATP : NAD 2' phosphotransférase) (EC 2.7.1.23) ([4] à [8]).

Les enzymes intervenant dans la phosphorylation et la déphosphorylation du NADP sont maintenant bien connues chez les végétaux; dans le latex ([1], [2]), cette déphosphorylation est catalysée par une 2' nucléotidase dont la très forte activité spécifique expliquerait les faibles quantités de NADP ( $< 1 \mu\text{M}$ ) trouvées dans le cytosol de latex ultracentrifugé [11].

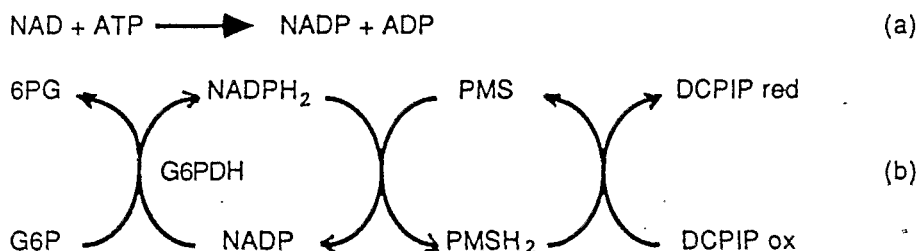
Nous mettons ici en évidence la présence d'une NAD kinase dans le latex d'Hévéa et nous rapportons quelques résultats relatifs à sa localisation et son fonctionnement.

**ABRÉVIATIONS.** — NAD, Nicotinamide adénine dinucléotide; NADH, Nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite; NADP, Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; NADPH, Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite; ATP,

Adénosine 5'-triphosphate; ADP, Adénosine 5'-diphosphate; PMS, Phénazine methosulfate; DCPIP, 2,6 dichlorophénol indophénol; G6P, Glucose 6-phosphate; G6PDH, glucose 6-phosphate déshydrogenase; 6PG, 6-phosphogluconate; HMGGCoA Reductase : 3-Hydroxy 3-méthylglutaryl coenzyme A Reductase.

MÉTHODES. — Le latex récolté par saignée de l'arbre (clone GT1) est recueilli dans un flacon entouré de glace, puis centrifugé pendant 40 mn à 100 000 g (4°C). La phase surnageante correspondant aux particules de caoutchouc en suspension dans le cytosol des cellules laticifères est écartée. Le culot constitué essentiellement de lutoïdes (vacuo-lysosomes) est soumis à une lyse osmotique dans 10 fois son volume de tampon (tris-HCl 10 mM, pH 8,0). Les membranes résultantes lavées à deux reprises dans le même tampon et centrifugées (20 000 g, 1 mn) sont pottérisées dans deux volumes de tampon tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 et congelées à -20°C pour analyses ultérieures.

La détermination de l'activité de la NAD kinase est réalisée suivant une modification de la méthode de Slater et Sawyer [8] utilisant le phénazine méthosulfate comme intermédiaire de transport d'électrons et le 2,6-dichlorophénol indophénol dont on suit la réduction à 600 nm (a et b).



L'incubation est réalisée à 30°C pendant 30 mn avec NAD 3 mM, ATP 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM, 0,2 à 0,8 mg de protéines dans du tampon tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 et pour un volume final de 1,0 ml. La réaction est arrêtée par chauffage au bain-marie bouillant et le système de révélation contient du G6P 5 mM, PMS 1,3 mM, EGTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. La réaction est initiée par l'addition de 10 µg de G6PDH.

Les gradients discontinus de saccharose sont réalisés dans du tampon tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contenant du mannitol 0,32 M. Les tubes sont centrifugés à 100 000 g pendant 1 h à 4°C.

Les protéines ont été estimées selon la méthode de Bradford [19].

RÉSULTATS. — Les premiers tests indiquent que l'activité comprise entre 0,5 et 1,5 pKat/mg de protéines n'est pas cytosolique mais liée à un système membranaire sédimentable [12]. Afin de confirmer cette localisation, une centrifugation isopycnique sur gradient de saccharose [14] est effectuée et cinq zones correspondantes à des fractions enrichies en lutoïdes de différentes densités sont observées (*fig. 1*). Le tableau ci-dessous rend compte de la nature membranaire de la kinase et la mesure de l'activité phosphatase [13] montre que la protéine est associée à une structure membranaire de même densité que les lutoïdes ou bien aux lutoïdes eux-mêmes.

Contrairement à la phosphatase acide intralutoïdique [13], la présence de triton X 100 (lyse lutoïdique) n'affecte pas l'activité de la NAD kinase indiquant que le site catalytique de l'enzyme est localisé sur la face externe de la membrane, faisant face au compartiment cytosolique.

L'addition de G6PDH sur le système de révélation induit une diminution de la densité optique en fonction du temps et la pente observée est proportionnelle à la quantité de NADP contenue dans le milieu.

La formation de NADP est linéaire pendant 40 mn et le pH optimum de la NAD kinase, mesuré dans un tampon tris-HCl 0,1 M est de 8,0, pH similaire à celui déjà observé sur d'autres sources ([4], [9], [17]) (*fig. 2 et 3*). L'activité est linéaire en fonction

TABLEAU

Saccharose (M)	0,6	0,8	1,0	1,2	
NAD-kinase (nmole NADP/mg protéines/h) . . . . .	2,4	3,1	3,3	3,4	4,8
Phosphatase (DO/mg protéines) . . . . .	6,2	6,4	8,9	9,7	9,7
NAD-kinase/Phosphatase . . . . .	0,39	0,48	0,37	0,35	0,49

de la quantité de protéines ajoutée (du moins dans l'intervalle testé : 0,8 mg de protéines). Par ailleurs, le chauffage de l'incubation au bain-marie bouillant supprime toute activité.

Le traitement des membranes ne requiert aucun composé protecteur et l'activité de la kinase est stable pendant au moins 6 h à température ambiante et au moins 7 jours lorsque l'enzyme est conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Contrairement à la majorité des kinases dont le substrat réel est le complexe Mg-ATP ([4], [9], [10]), l'effet activateur du  $\text{Mg}^{2+}$  et du  $\text{Ca}^{2+}$  est faible et s'il existe, il est maximal à 0,5 et 0,05 mM respectivement; l'enzyme est d'ailleurs active en l'absence de ces deux cations et ne semble ni activée par de la calmoduline exogène ni inhibée par les anticalmoduline telle la trifluopérazine et la chlorpromazine.

Les premières analyses cinétiques ont montré que la NAD kinase du latex ne suit pas un simple mécanisme michaelien; aux faibles concentrations ( $< 50 \mu\text{M}$ , concentrations physiologiques) on observe une coopérativité positive pour NAD et ATP, correspondant à une activation de l'enzyme pour ses deux substrats. Au contraire, aux fortes concentrations (concentrations non physiologiques), les études cinétiques rendent compte d'une inhibition par excès de substrat. La protéine se comporte comme une enzyme allostérique à mécanisme non compétitif simple pour le NAD et non compétitif mixte pour l'ATP (fig. 4 et 5). Par ailleurs, l'enzyme ne semble pas affectée par l'ADP, sous-produit de la réaction. Le  $K_m$  apparent (pH 8,0) calculé dans la partie linéaire de la courbe de Michaelis-Menten est estimé entre 0,5 et 1,0 mM pour le NAD et entre 1,0 et 1,5 mM pour l'ATP.

DISCUSSION. — Une NAD kinase fonctionnelle susceptible de régénérer le NADP (H) du sérum cytoplasmique est présente dans une fraction membranaire du latex d'Hévéa.

La localisation lutoïdique supposée de l'enzyme ne nous paraît pas en accord avec la nature vacuo-lysosomale de ces organites. Nos recherches sur la localisation membranaire de cette enzyme se poursuivent dans le sens de l'identification d'autres organites secondaires ou de réticulum endoplasmique sédimentant avec les lutoïdes ou de densité voisine.

Malgré la faible activité spécifique de cette enzyme et la forte activité spécifique de son antagoniste, la 2' nucléotidase, il ne fait aucun doute que la NAD kinase est une enzyme importante pour la synthèse du NADP (H) aussitôt utilisé par d'autres enzymes comme l'HMG-CoA réductase ([3], [15]), protéine-clef de la voie mévalonique conduisant à la biosynthèse du caoutchouc.

Note reçue le 13 avril 1987, acceptée le 18 mai 1987.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J.-L. JACOB, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 269, série D, 1969, p. 1573-1576.
- [2] J.-L. JACOB, D. RIBAILLER et J. D'AUZAC, *Physiol. vég.*, 8, 1970, p. 247.
- [3] A. B. SIPAT, *Phytochem.*, 21, 1982, p. 2613.
- [4] Y. YAMAMOTO, *Plant. Physiol.*, 41, 1966, p. 523.

- [5] T. P. WANG et N. O. KAPLAN, *J. Biol. Chem.*, 206, 1954, p. 311.  
 [6] D. K. APPS, *Eur. J. Biochem.*, 5, 1968, p. 444.  
 [7] D. K. APPS, *Eur. J. Biochem.*, 7, 1969, p. 260.  
 [8] T. F. SLATER et B. SAWYER, *Nature*, 193, 1962, p. 454.  
 [9] P. D. MARME, *J. Biol. Chem.*, 259, 1984, p. 184.  
 [10] J. M. ANDERSON et M. J. CORMIER, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 84, 1978, p. 595.  
 [11] Y. FRANCEY, Dosage des cofacteurs (NADH, NADPH, NAD et NADP) du latex d'*Hevea brasiliensis*, Rapport ORSTOM, Laboratoire de Physiologie Végétale, Centre ORSTOM d'Adiopodoumé, B.P. n° V.51, Abidjan 01, Ivory Coast.  
 [12] B. L. ARCHER, D. BARNAR, E. G. COCKBAIN, P. B. DICKENSON et A. I. McMULLEN, *The chemistry and Physics of Rubber-like substances*, McLaren and Sons Ltd London, 1963, p. 41.  
 [13] D. RIBAILLER, J.-L. JACOB et J. D'AUZAC, *Physiol. vég.*, 9, 1971, p. 423.  
 [14] S. PUJARNISCLE, *Physiol. vég.*, 6, 1968, p. 27.  
 [15] R. WITITSUWANNAKUL, *Experientia*, 42, 1986, p. 44.  
 [16] H. CHRESTIN, *La vacuole dans l'homéostasie et la sénescence des cellules laticifères d'Hévéa*, Collection Études et Thèses, ORSTOM, 1985, ISBN 2-7099-0775-5.  
 [17] D. K. APPS, *Eur. J. Biochem.*, 13, 1970, p. 223.  
 [18] L. LISCUM, J. FINER-MOORE, R. B. STROUD, K. L. LUSKEY, M. S. BROW et J. L. GOLDSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 60, 1985, p. 522.  
 [19] M. M. BRADFORD, *Anal. Biochem.*, 72, 1976, p. 248.

*Laboratoire de Physiologie Végétale,  
 ORSTOM, Centre d'Adiopodoumé, B.P. V51 Abidjan 01, Côte-d'Ivoire.*

#### EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

*Nota* : Les activités sont exprimées en nmole de NADP par heure et par milligramme de protéines.

*Nota*: Activities are expressed in nmole of NADP per hour per milligramme of protein.

Fig. 1. — Centrifugation isopiquique sur gradient de saccharose montrant les cinq zones de différentes densités obtenues.

Fig. 1. — *Isopicnic centrifugation on sucrose gradient showing five zones of various densities.*

Fig. 2. — Activités NAD kinase du latex en fonction du pH. Tampon tris-HCl 0,1 M.

Fig. 2. — *Latex NAD kinase activities as a function of pH. Tris-HCl buffer 0,1 M.*

Fig. 3. — Linéarité de la formation du NADP en fonction du temps d'incubation de la NAD kinase jusqu'à 40 mn.

Fig. 3. — *Linearity of NADP formation as a function of NAD kinase incubation time for 40 min.*

Fig. 4. — Représentation de Lineweaver-Burk pour l'ATP à différentes concentrations de NAD. ○—○, 2 mM; ▲—▲, 3 mM; ●—●, 4 mM.

Fig. 4. — *Lineweaver-Burk plots for ATP at various NAD concentrations. ○—○, 2 mM; ▲—▲, 3 mM; ●—●, 4 mM.*

Fig. 5. — Représentation de Lineweaver-Burk pour le NAD à différentes concentrations d'ATP. □—□, 1 mM; ●—●, 3 mM.

Fig. 5. — *Lineweaver-Burk plots for NAD at various ATP concentrations. □—□, 1 mM; ●—●, 3 mM.*

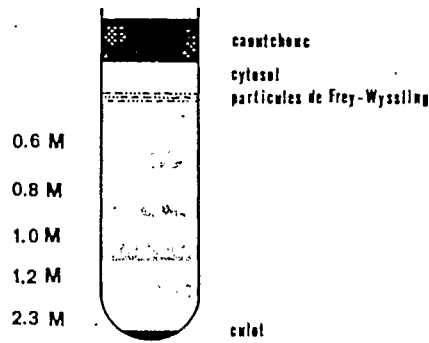


Fig. 1

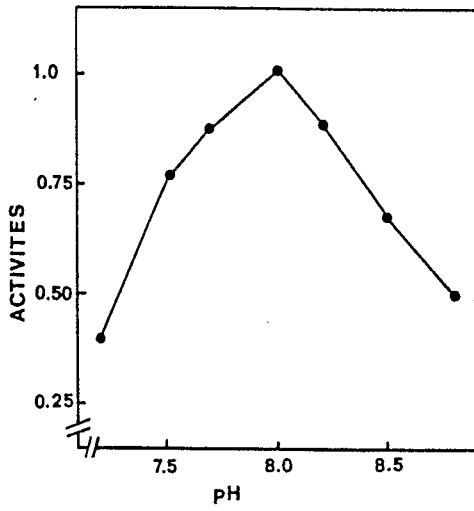


Fig. 2

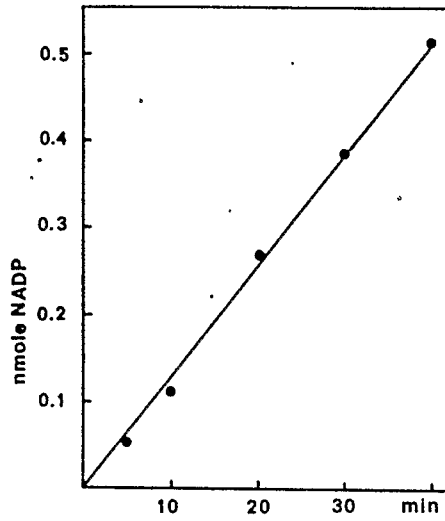


Fig. 3

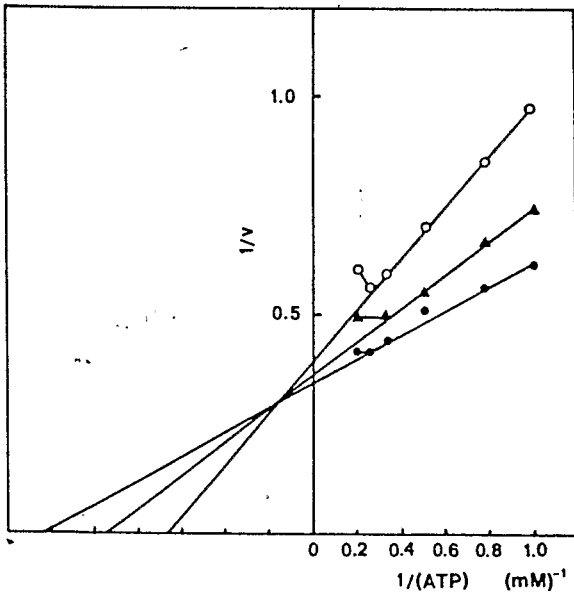


Fig. 4

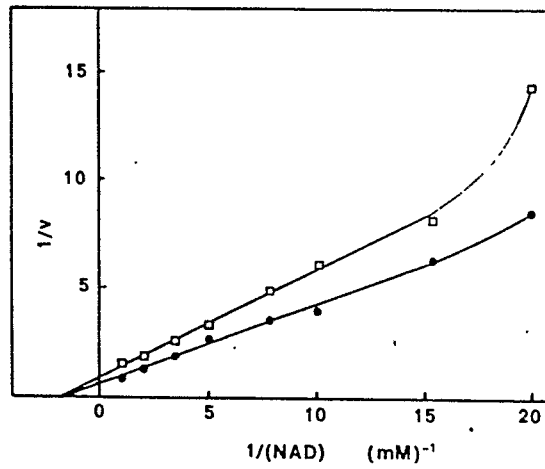


Fig. 5