

2 - 2
Régulation de la synthèse isoprénique

Voilà près de quinze ans que des travaux sont poursuivis sur la régulation du métabolisme de la cellule laticifère.

Des résultats remarquables ont été obtenus. Ils ont confirmé les connaissances acquises par ailleurs. Ils ont permis d'établir des possibilités nouvelles de régulation. Ils ont parfois permis la découverte d'enzymes nouvelles.

2 - 2 - 1
L'invertase
L. Primot

Invertase

Invertase is an enzyme which plays an important part in the metabolism of isoprene and its regulation. It has been possible to isolate it and partly purify it. Its molecular weight is very high and lies in the region of 800,000. Its K_m for saccharose at pH 7.2 is of the order of 15 mM. The inhibiting effect of magnesium varies with pH and is greater at pH 6.5 than at pH 7.2, for physiological concentrations of between 5 and 10 mM.

★

Les travaux de Tupy ont montré que l'invertase était une enzyme clef du métabolisme isoprénique. De son activité semble dépendre le bon fonctionnement de la régénération du caoutchouc et, partant, la production de l'hévéa lors de la saignée.

Il était donc important d'entreprendre l'étude de cette enzyme afin d'en apprécier les propriétés.

1 - Isolement et purification de l'enzyme

L'invertase du latex est localisée exclusivement dans le sérum cytoplasmique. Les opérations de purification sont donc faites à partir du sérum cytoplasmique clair obtenu par centrifugation à 55 000 xg. Le dosage de l'enzyme est

effectué par la mesure de sucres réducteurs obtenus par hydrolyse du saccharose sous l'action de l'invertase. La première étape de purification est une centrifugation à 220 000 xg, qui permet de sédimenter l'enzyme et de la concentrer. Cette étape permet en outre une purification non négligeable (tableau 1). Le culot de sédimentation repris dans un tampon phosphate pH 7,3 est ensuite chromatographié sur du Sepharose 6B. Le choix de cette méthode nous a été dicté par le fait que l'enzyme a un poids moléculaire élevé. En effet, d'une part elle sédimente très bien par ultra-centrifugation, d'autre part des essais de purification sur Sephadex G 200 nous ont montré que son poids moléculaire devait être supérieur à 200 000.

Tableau 1
Évolution de l'activité spécifique de l'invertase
au cours des différentes étapes de purification

Étapes	Protéine mg/ml	Invertase Activité/ml	Activité/mg de protéine	Purification
Sérum cytoplasmique	20	200	10	-
Culot de centrifugation	68	3 200	47	4,7
Filtration sur Sepharose 6B	2,25	620	276	27,6
Chromatographie sur DEAE cellulose	0,154	100	649	64,9

La séparation sur colonne de Sépharose 6B permet une purification intéressante. En outre, un étalonnage de la colonne nous a permis d'évaluer son poids moléculaire aux environs de 800 000. L'invertase est donc une très grosse protéine.

La purification est poursuivie par passage sur une colonne de DEAE Cellulose permettant une séparation de l'enzyme, non plus en fonction de son poids moléculaire, mais en fonction de ses propriétés électriques. L'enzyme est éluée de la colonne par NaCl 0,3 M.

A ce stade de purification, l'enzyme est encore contaminée par d'autres protéines, mais nous pensons que la purification est suffisante pour l'étude de ses propriétés.

2 - Propriétés de l'invertase partiellement purifiée

Influence de la température

La figure 1 montre la variation d'activité de l'enzyme en fonction de la température d'incubation. On peut constater que l'invertase est particulièrement sensible à l'augmentation de température entre 20° et 40° C.

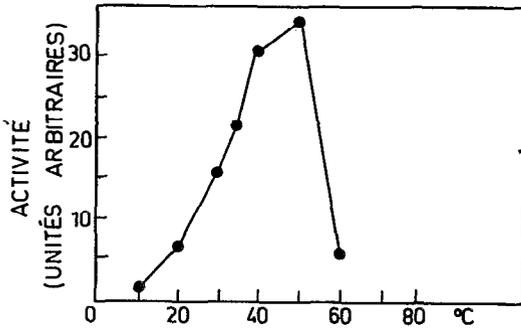


Figure 1

Activité de l'invertase du latex en fonction de la température
Milieu d'incubation :
tampon phosphate 0,02 M ; citrate : 0,01 M pH 7,2 ; saccharose : 0,6 M ; incubation : 10 min. aux différentes températures.

Influence de la concentration en saccharose

Le K_m de l'enzyme a été déterminé à pH 7,2, c'est-à-dire dans les conditions d'activité optimum de l'enzyme. La valeur du K_m est de 0,015 M.

Influence du magnésium et du pH

L'effet inhibiteur du magnésium sur l'invertase a déjà été montré sur le sérum cytoplasmique. Nous avons étudié ce phénomène à deux pH différents : 6,5 et 7,2. La figure 2 montre que la sensibilité au magnésium varie d'une façon importante selon le pH du milieu réactionnel.

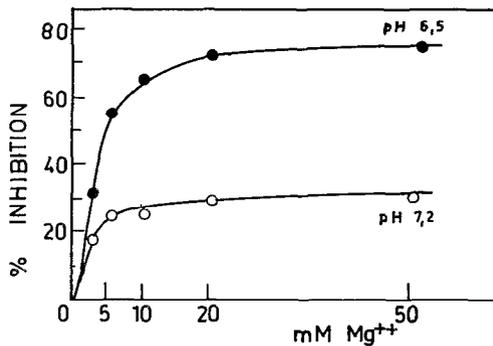


Figure 2

Inhibition de l'invertase du latex par le magnésium à pH 6,5 et 7,2.
Milieu d'incubation : tampon phosphate 0,02 M ; citrate 0,01 M pH 6,5 et 7,2 ; Mg^{++} 2,5, 5, 10, 20 et 50 mM ; incubation 30 min. à 30° C.

Ce résultat appelle quelques commentaires sur le rôle très important du pH sur l'activité métabolique au sein des laticifères.

Tout d'abord, l'activité invertasique est multipliée par 4 lorsque l'on passe du pH 6,5 au pH 7,2. Ensuite, à pH élevé (7,2), la sensibilité au magnésium

diminue. L'inhibition par 10 mM de magnésium n'est que de 25% à pH 7,2 alors qu'elle atteint 70% à pH 6,5. Les déterminations de pH et de concentration en magnésium effectuées sur différents latex montrent que les valeurs de pH, allant de 6,5 à 7,2, sont parfaitement physiologiques, de même que les concentrations en magnésium de 5 à 10 mM. On comprend dès lors l'importance du pH dans le métabolisme de la cellule laticifère. La stimulation, dont une des actions est l'augmentation du pH, diminue donc dans le même temps l'effet inhibiteur du magnésium présent, vis-à-vis de cette enzyme.

★