

2 - 4 - 2
 L'ATP-ase membranaire lutoïdique
 J. d'Auzac

Lutoid membrane ATP-ase

Membrane fractions obtained from lyophilised lutoids possess an acid phosphatase activity and an ATP-ase activity.

It is possible to characterise the ATP-ase and to study it either by inhibiting the acid phosphatase (molybdate or phosphate) or by desorbing it from the membrane using alkaline buffers in presence of EDTA and desoxycholate.

ATP-ase possesses an optimum at pH 7,5 in a cationic buffer such as Tris. In a phosphate buffer it optimum occurs at pH 6.5. This enzyme is strictly dependent on a divalent cation ; Mg is the physiological activator. The Km for ATP varies between 0.5 and 2 mM depending on the operating conditions.

Since this ATP-ase belongs to a tonoplast type membrane, it is distinguished from plasmic ATP-ases in the sense that it is not activated by monovalent cations (e.g. K and Na) but by anions. The Cl⁻ anion is effective and so also are bicarbonate and organic ions such as malate, aspartate and tartrate).

ATP is a better substrate than the other triphosphate nucleotides, ADP being a powerful non-competitive inhibitor.

ATP-ase functions at up to about 40° C without loss of activity. The Arrhenius plot shows a break in the log V-1/T curve characteristic of membrane type enzymes.

Inhibitors of SH groups and decoupling agents have an inhibiting effect on relatively high concentrations.

A theory has been formulated according to which membrane type ATP-ase. plays some part in the acidification of the lutoid fraction.

★

Travaillant sur des lutoïdes lyophilisés venus de Côte d'Ivoire grâce à de nombreuses bonnes volontés, il a été possible de mettre en évidence sur les sédiments membranaires une activité ATP-ase.

La difficulté majeure était de distinguer une telle ATP-ase d'une importante activité phosphatase acide résiduelle adsorbée sur le sédiment membranaire.

L'utilisation de molybdate ou de Pm s'est avérée efficace pour inhiber totalement la phosphatase acide résiduelle sans toucher à l'activité ATP-ase (Figure 1) (d'Auzac).

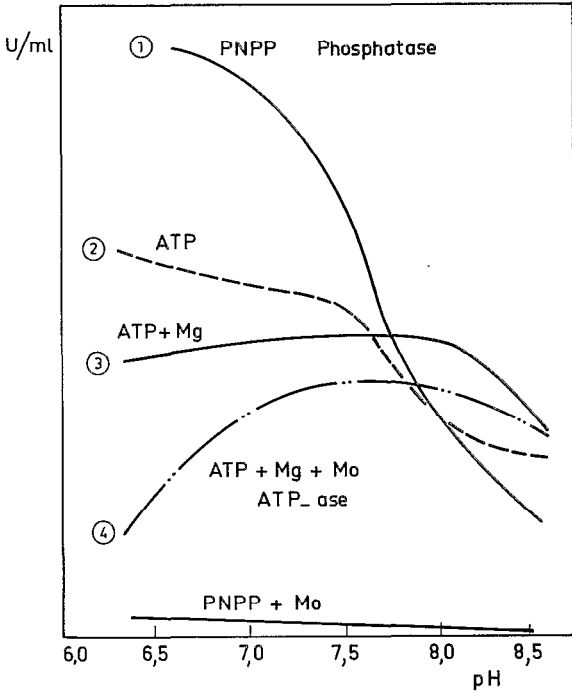


Figure 1
Mise en évidence d'une
ATP-ase sur un sédiment
de membranes lutoïdiques

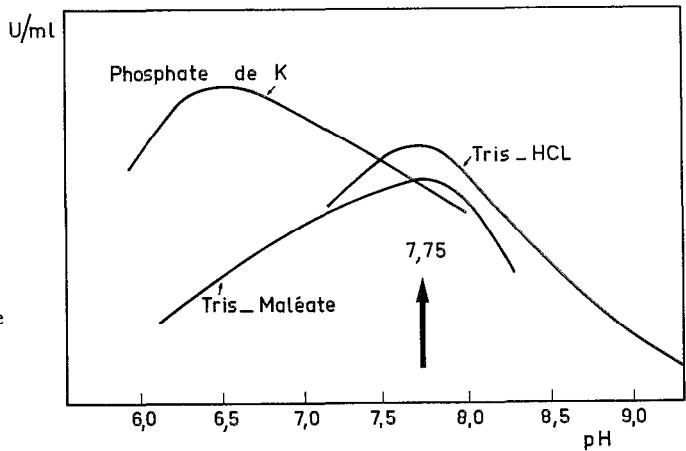


Figure 2
Activité de l'ATP-ase
en fonction du pH

- Divers traitements ont été utilisés pour éliminer du sédiment membranaire la phosphatase adsorbée. Ces traitements ont permis de faire passer le rapport ATP-ase/P ase de 0,5 - 2,0 à plus de 50. La méthode usuellement employée consiste à laver le sédiment membranaire plusieurs fois dans un tampon Glycine-NaOH (20 mM pH 7,5) - EDTA : 10 mM et MSH : 5 mM. L'adjonction de DOC à 2% du poids du lyophilisat de lutoïdes s'avère particulièrement efficace.

- L'ATP-ase présente un optimum d'activité à pH 7,75 dans la plupart des tampons alcalins, tandis que son optimum se situe à pH 6,5 en tampon phosphate (Figure 2).

- Le K_m pour l'ATP présente une valeur oscillant entre 0,5 et 2 mM selon les conditions opératoires et, notamment, la valeur du rapport ATP-Mg.

- Mn, Mg et Ca sont dans l'ordre d'efficacités décroissantes indispensables au fonctionnement de l'ATP-ase. Il est hors de doute que Mg est l'activateur physiologique. Le rapport optimum pour l'activation est classique : $ATP/Mg = 1$ (Figure 3).

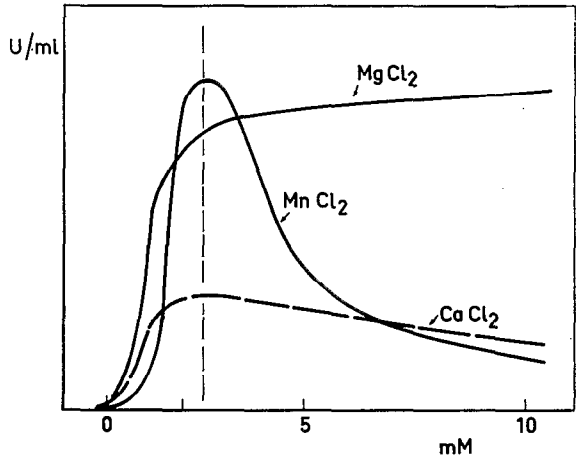


Figure 3
Activation de l'ATP-ase par
trois cations divalents

$$\frac{ATP}{\text{cations divers}} = 1$$

- Comme cela avait été montré par ailleurs, il n'a pas été possible de mettre en évidence une activation par les cations monovalents. La molarité du tampon intervient faiblement sur l'activité de l'enzyme lorsqu'il s'agit d'un tampon purement organique tel Hepes-Tris. Il est apparu par contre que l'ion Cl^- présentait un optimum d'activation vers 75 mM. Il n'y a pas d'action synergique $Na + K$ (Figures 4, 5 et 6).

Alors que divers anions ont une action positive marquée (Malate, Tartrate, Aspartate, Bicarbonate), Iodure et Nitrate sont fortement inhibiteurs. L'attention est retenue par CO_3H^- présent dans le latex en quantité importante et qui active fortement l'ATP-ase. On ne peut pas ne pas faire l'analogie avec des ATP-ases présentes sur la muqueuse gastrique du chien ou sur les lysosomes du foie de rat qui, toutes deux, concourent vraisemblablement à l'acidification d'un compartiment. Remarquons que l'activation de certaines ATP-ases membranaires serait, selon quelques auteurs, caractéristiques des ATP-ases tonoplastiques.

- L'ATP-ase présente une spécificité assez marquée pour l'ATP et elle fonctionne mieux avec les nucléotides adenyliques que pyrimidiniques (Figure 7).

- L'ATP-ase est fortement inhibée par l'ADP (I 50% = 0,5 mM ADP) (Figure 8).

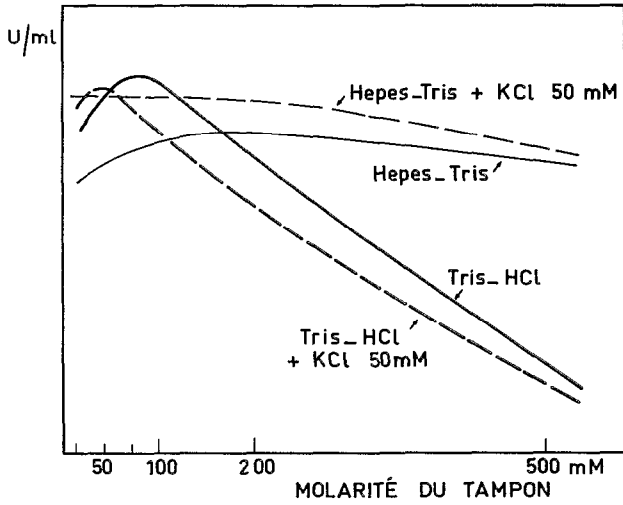


Figure 4

Influence de la molarité et de la nature du tampon (\pm KCl) sur l'activité de l'ATP-ase

ATP = 2 mM, $MgCl_2$ = 4 mM, pH : 7,75

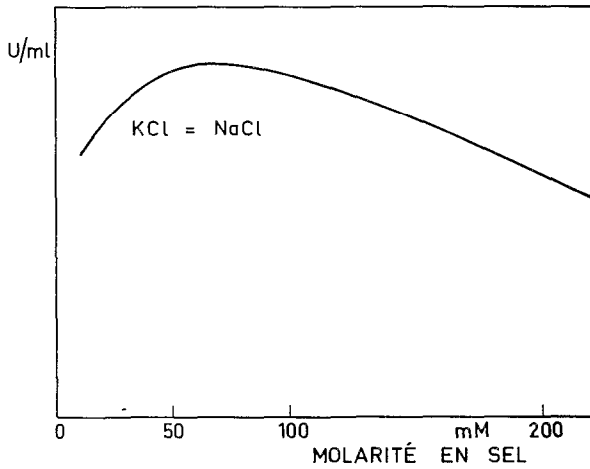


Figure 5

Activation de l'ATP-ase par KCl et NaCl

Tampon Hepes-Tris 25 mM - pH : 7,75

ATP = 2 mM, $MgCl_2$ = 4 mM

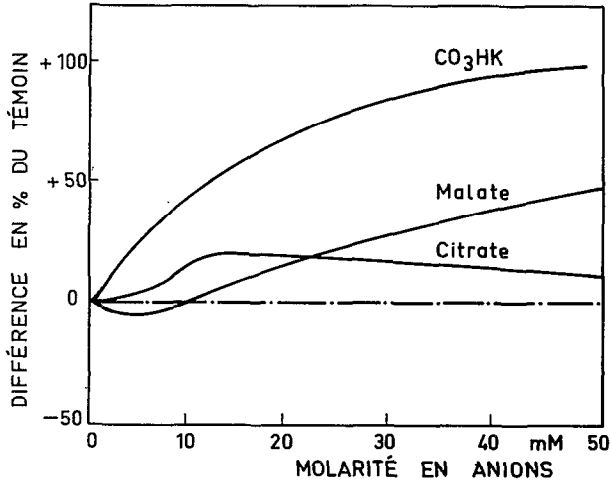


Figure 6

Activation de l'ATP-ase par trois anions différents
en fonction de leur concentration
Hepes-Tris : 25 mM, pH : 7,75 ± 0,02

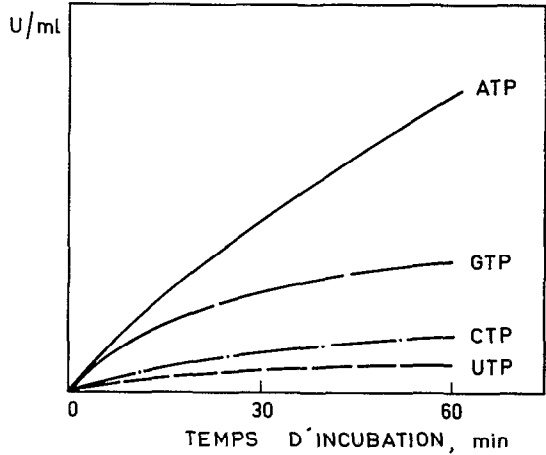


Figure 7
Spécificité de l'ATP-ase vis-à-vis
des nucléotides TriP

- La courbe d'action de la température fait apparaître une cassure correspondant à un changement d'état de la membrane, lequel se traduit par un changement d'énergie d'activation de l'enzyme (Figure 9).

- Les inhibiteurs des groupes SH (NEM, Mersalyl, PCMB) et les découpleurs (2,4 DNP, CCCP) possèdent une action dépressive sur l'ATP-ase ; les concentrations efficaces restent à préciser.

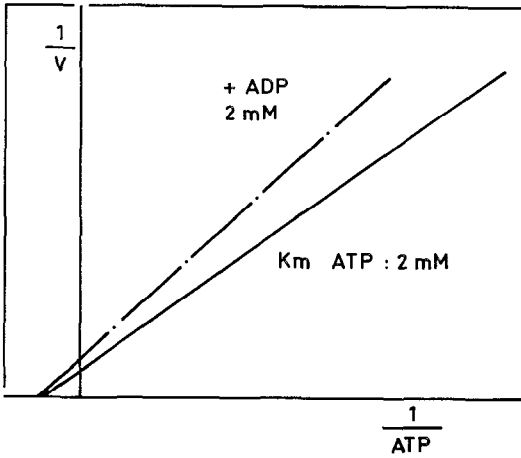
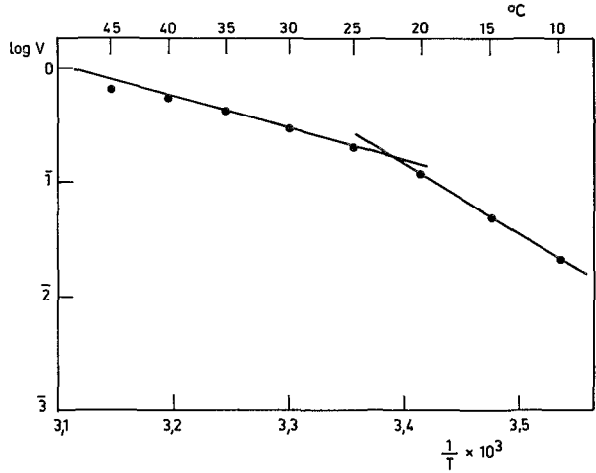


Figure 8
Inhibition de l'ATP-ase par
l'ADP

Figure 9
Représentation, selon
Arrhenius, de l'action de
la température sur l'activité
de l'ATP-ase membranaire
lutoïque.



Il paraît important de réaliser sur des lutoïdes frais toutes expérimentations souhaitables pour acquérir une certitude quant au fonctionnement de cette ATP-ase membranaire en tant que pompe à protons.

L'examen de la littérature, comme des contacts divers, montre clairement, alors que les hypothèses sont nombreuses, combien une démonstration péremptoire serait bienvenue.