

Une nouvelle activité enzymatique au niveau des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg. : L'ATP-AMP- phosphotransférase

Isabelle NAUD, Christophe BRUGIDOU, Zakia AMALOU et Bernard MARIN

Résumé — Le latex d'*Hevea brasiliensis* contient une fraction membranaire, vésiculée, équivalente au système vacuo-lysosomal des végétaux supérieurs. Elle est décrite sous le vocable de lutoïdes.

Maintes fois, il a été rapporté une activité ATPase membranaire, mesurée par la libération du phosphate à partir de l'ATP hydrolysé. Dans cet article, il est proposé de l'étudier en suivant l'évolution du pool adénylique au cours de la réaction, en séparant simultanément les différents adénylates par chromatographie liquide haute performance.

Force est de constater que la corrélation existant entre l'ATP hydrolysé et l'ADP formé ne résulte pas de la simple activité ATPase membranaire jusqu'à présent identifiée. Il est suggéré l'existence d'autres activités enzymatiques membranaires utilisant l'ATP comme substrat. Il est évoqué l'existence d'une activité adénylate-kinase (E.C.2.7.4.3.). La synthèse d'une molécule d'ATP se ferait à partir de la condensation de deux molécules d'ADP. Il en résulterait l'apparition d'une molécule d'AMP. Comme l' Ap^5A s'avère un inhibiteur efficace de cette réaction, il s'agirait d'une activité ATP-AMP-phosphotransférase.

L'équipement enzymatique de la membrane lutoïdique permettrait de mieux utiliser l'énergie disponible dans les différents transferts bidirectionnels de solutés entre le cytoplasme et le milieu vacuolaire.

A new enzymatic activity lutoid membrane from latex of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg.: ATP-AMP-phosphotransferase

Abstract — The latex of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. contains a vesicular membrane fraction called lutoid, which can be regarded as the equivalent of the vacuolar compartment of higher plant cells.

Among the different enzymatic activities described as a intrinsic component of the lutoid membrane, an ATPase activity has been characterized. This activity could be studied on lyophilized material without loss of activity. In this paper, this activity was examined using an HPLC separation and quantification of adenylic nucleotides.

Our results suggested the existence of additional activities which can use ATP as substrate. Thus, one of them has been characterized as an adenyate-kinase. When ADP was added to a lutoid suspension, AMP appearance and concomitant ATP synthesis were observed. A stoichiometry could be suggested as follows: $2ADP \rightarrow 1ATP + 1AMP$. This reaction was inhibited by Ap^5A . Such activity could be regarded as an ATP-AMP-phosphotransferase. No report has been published up to now on the occurrence of a lutoid phosphotransferase activity in *Hevea* latex.

The enzymatic equipment of the lutoidic membrane could be considered as efficient for an optimization of the energy-consuming systems involved in the bidirectional transfert of solutes between the cytoplasm and the intra-vacuolar medium. This enzyme could take part in a regulation process of ATP regeneration, supplying the substrate for the ATPase activity.

Abridged English Version — The latex of *Hevea brasiliensis* Müll Arg. (rubber tree) consists of the fluid cytoplasmic content of the laticiferous cell. Lutoids are identified as a vesicular fraction which, according to enzymatic and cytological criteria, can be regarded as equivalent to the vacuolar compartment of higher plant cells ([1]-[2]).

MATERIAL AND METHODS. — Latex was obtained from selected trees of *Hevea brasiliensis* (clone GT₁) growing on the experimental plantation of I.R.C.A. (Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique, Bimbresso, Ivory Coast, Africa). The lutoids were prepared according to [3]. Finally, the organelles were dispersed in a buffered medium containing 25 mM MES, 25 mM HEPES, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 5 mM MgSO₄, adjusted to pH 7.0 with Tris-base. The procedure used allowed the preparation of a highly purified tonoplast membrane fraction that corresponded to a population of tightly sealed vesicles.

Note présentée par Alexis MOYSE.

0764-4469/91/03130273 \$ 2.00 © Académie des Sciences

C. R., 1991, 2^e Semestre (T. 313)

Fonds Documentaire ORSTOM
Cote : **B*5679** Ex : **1**

Série III — 22



Membrane suspension was sampled for the estimation of ATPase activity by different methods [3]. On the other hand, this activity was calculated from the adenylate determinations carried out according to M. Hill *et al.* ([7]-[8]). Proteins were estimated by the method of M. Bradford modified by M. Hill *et al.* [8].

RESULTS AND DISCUSSION. — Some enzymes are bound to the lutoidal membrane, especially an ATP-hydrolyzing enzyme (ATPase) which has been well characterized [4] and a $NADH_2$ -cytochrome *c*-oxydoreductase which has been described recently [5]. These two enzymes were involved in the transport of protons across the membrane [5]. They contributed to the energization of this membrane producing a transmembrane protonmotive potential difference positive inside ([4]-[6]).

For *Hevea* latex, we have used a new and more specific method to estimate the tonoplast ATPase activity: the HPLC separation and quantification of adenylate nucleotides ([7], [8]). It is possible to follow the simultaneous measurement of changes in adenylate nucleotides during ATP hydrolysis.

Lutoids contained an acid phosphatase activity which can be inhibited completely in the presence of 0.1 mM ammonium molybdate [9]. In these conditions, with lyophilized lutoids, any ATP-consuming activity could be characterized. The HPLC method revealed a lack of stoichiometry between ADP formation and ATP hydrolysis. The expected ratio ATP/ADP was never equal to 1. A slight release of AMP was also observed. ATP seemed to be degraded into ADP and AMP. When ADP was added, AMP and ATP followed a parallel increasing course. AMP appearance and concomitant ATP synthesis were inhibited by Ap^5A (M. Marin, résultats non publiés). Such a molecule did not inhibit lutoidal ATPase. On the other hand, it inhibited any adenylate-kinase activity described as an ATP-AMP-phosphotransferase [12]. Consequently, the formation of AMP could be the result of an ATP-AMP-phosphotransferase activity associated with the lutoidal membrane.

Such activity was regarded as ubiquitous [14]. In plant cells, the existence of different molecular species of adenylate kinase has been suspected for a long time. For example, in green leaves, a large proportion (about 50 %) of this activity is contained in the chloroplasts, especially in the stroma [14]. Recently, in other tissues, some activity was localized in the mitochondria. Nevertheless, in these two cases, a part of this activity was tightly bound to the membrane, the envelope of the chloroplasts and the inner membrane of the mitochondria, respectively. Such enzymes could represent a significant part of the membrane proteins. The preliminary results reported in this paper contributed to ascribe the occurrence of such an enzyme in an other cellular membrane, the tonoplast.

Consequently, adenylate nucleotides could play a key role in energy transduction as coupling agents in most metabolic sequences even in the latex of *Hevea brasiliensis*. The role of adenylate kinase in the translocation of adenylates between the cytoplasm and the intravacuolar medium could be more important than expected.

INTRODUCTION. — Le tonoplaste des végétaux supérieurs est fort mal connu du fait des problèmes liés à son isolement et à son caractère natif [1]. Or, le latex d'*Hevea brasiliensis* est le seul matériel biologique qui puisse permettre d'obtenir une membrane biologique ayant des propriétés voisines de ce tonoplaste sans avoir perdu ses propriétés natives [2]. Dès lors, il devient possible de mieux caractériser cette membrane.

Ainsi, il a été mis en évidence des activités vectorielles liées au fonctionnement de l'adénosine-triphosphatase (ATPase) [14] et de la $NADH_2$ -cyt *c*-oxydoréductase [5].

Depuis, cela a été observé chez de nombreux autres végétaux supérieurs [6]. Toutefois, du moins, pour ce qui concerne l'activité ATPase, en particulier, lorsque cette dernière est mesurée par HPLC, le bilan nucléotidique suggère l'existence d'une activité ATP-AMP-phosphotransférase (plus communément appelée adénylate-kinase, E.C.2.7.4.3.).

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Matériel végétal et préparation des lutoïdes.* — Le latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg. est récolté en pratiquant une saignée sur une quarantaine d'arbres de même âge [3]. Il est recueilli directement dans un flacon d'Erlenmeyer, refroidi par de la glace, sur place. Il est centrifugé à 15 000 g pendant 15 mn, à 4°C. Le sédiment, riche en lutoïdes, contient aussi des particules de Frey-Wyssling. Quatre lavages successifs sont effectués pour les éliminer. Le dernier culot est lyophilisé dans une boîte de Petri.

Préparation de la suspension lutoïdique. — 50 mg de lutoïdes lyophilisés sont mis en suspension dans 5 ml de TpR (25 mM MES, 25 mM HEPES, 1 mM DTT, 1 mM EDTA et 5 mM MgSO₄, pH ajusté à 7,0 par addition de Tris-base). Cette préparation est impérativement effectuée à 4°C. La réimbibition dure 30 mn. La suspension est homogénéisée à l'aide d'un broyeur du type Potter, la rotation du piston en téflon n'excédant pas 100 tr/mn. La suspension est centrifugée à 4 500 g pendant 5 mn à 4°C. Le sédiment est repris par 10 ml de milieu TpR. Après deux lavages, les lutoïdes sont remis en suspension dans 3 ml de milieu TpR sans Mg²⁺ et conservés dans la glace jusqu'au moment de leur utilisation.

Dosage de l'activité enzymatique. — Chaque échantillon est préparé dans un milieu TpR sans Mg²⁺, en présence ou non de 0,1 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄. Selon la nature de l'essai, le substrat est ajouté à la concentration finale indiquée dans le texte. Pour la mesure de l'activité ATPase, il est ajouté du MgSO₄ de façon à obtenir une concentration finale de 6 mM. Le milieu d'incubation est ajusté à pH 7,0 par addition d'une solution saturée de Tris-base.

Chaque essai est incubé dans un bain thermostaté sous agitation à 30°C. La réaction enzymatique est stoppée par l'addition d'un volume égal d'acide trichloracétique préparé à 4 % (vol./vol.) à 0°C. Une fois les protéines précipitées, elles sont éliminées par centrifugation. Chaque surnageant est congelé à -30°C. Il est neutralisé par l'addition de NaOH 2 N, une fois décongelé, juste avant l'analyse du pool adénylique par HPLC. L'activité ATPase est exprimée en nmoles d'ATP hydrolysées par minute et par milligramme de protéines.

Détermination du pool adénylique. — La méthode employée s'inspire de celle décrite par M. Hill et coll. [7].

A l'aide d'un auto-injecteur « Philips PU 4700 », 25 µl sont déposés sur un ensemble chromatographique composé d'une précolonne « Brownlee RP-18 » (7 µm, 3,2 × 1,5 mm) et d'une colonne « Supelcosil LC-18-DB » (5 µm, 150 × 4,6 mm). Au préalable, l'ensemble a été lavé par un milieu tamponné constitué de 100 mM KH₂PO₄ et de 25 mM TBAHS, ajusté à pH 7,0 par addition de NaOH. L'élution se fait avec ce même milieu, en présence de méthanol (18 % (vol./vol.)). Le chromatographe haute pression « Philips PU 4100 » assure un débit de 1 300 µl par minute à la température ambiante. L'éluat est analysé à 254 nm avec le détecteur « Philips PU 4021 ».

Dosage des protéines. — La méthode suivie est celle décrite par M. Bradford et modifiée par M. Hill et coll. [8].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — *Validité des conditions employées pour la mesure de l'activité ATPase lutoïdique.* — Par commodité, très souvent, il est rendu compte de l'activité ATPase en suivant la libération du phosphate dans le milieu d'incubation [8]. Or, souvent, il n'est pas tenu compte de la stabilité du phosphate inorganique en milieu acide, une étape limitante dans la plupart des techniques colorimétriques employées jusqu'à présent. D'où le développement de tout un ensemble de méthodes pour mesurer l'hydrolyse de l'ATP (systèmes couplés régénérant l'ATP, libération de ³²P à partir de [γ-³²P_i]-ATP, etc.). Une étude préliminaire de cette nature a été effectuée sur le latex d'*Hevea*. Il est vérifié que les résultats obtenus sont équivalents quelle que soit la méthode employée.

Par ailleurs, l'étude de l'ATPase tonoplastique n'est pas sans poser quelques problèmes d'identification lorsque l'activité phosphatase acide (Pase) est importante. Les propriétés lysosomales du compartiment vacuolaire des végétaux supérieurs ont été identifiées depuis longtemps [9]. Les activités vacuolaires hydrolysant l'ATP sont fort nombreuses et mal

connues. Les activités phosphomonoestérase, phosphodiesterase, polyphosphatase et ribonucléasiques lutoïdiques dégradent l'ATP (B. Marin, résultats non publiés). Leur dépendance vis-à-vis du pH (5,0-5,5) les différencie de l'activité ATPase membranaire (6,8-7,0).

La membrane lutoïdique ne présente aucune activité P_{ase} significative en présence de molybdate d'ammonium employé à la concentration de 0,1 mM. Ainsi, en son absence, l'activité hydrolysant l'ATP atteint 28 nmoles/mn/mg de protéines. Par contre, en sa présence, l'activité mesurée n'est plus que de 2 nmoles/mn/mg de protéines. Cette hydrolyse d'ATP non spécifique est imputable à l'activité P_{ase} acide adsorbée sur la membrane lutoïdique [10]. Dès lors, dans ces conditions expérimentales, il est possible de mesurer une activité membranaire (lutoïdique) hydrolysant l'ATP.

Utilisation de la technique HPLC pour mesurer l'activité ATPase lutoïdique. — La méthode de M. Hill et coll. ([7]-[8]) permet d'estimer une activité hydrolytique de l'ATP à partir de l'évolution du pool des nucléotides adényliques (AMP, ADP, ATP) au cours de l'incubation. Des essais préliminaires effectués avec différentes activités ATPase le prouvent (M. Marin et B. Marin, résultats non publiés). Il s'agit donc d'une méthode fiable donnant des résultats répétitifs et significatifs. Dès lors, à tout moment, il sera possible de corrélérer la vitesse de formation d'ADP (par son apparition) à la vitesse d'hydrolyse d'ATP (par sa disparition).

Or, l'activité ATPase s'avère différente selon le mode utilisé pour l'exprimer : 21 nmoles d'ADP formées pour 34 nmoles de P_i résultant de l'hydrolyse de l'ATP. Par voie de conséquence, la vitesse de formation d'ADP et la vitesse d'hydrolyse d'ATP ne sont pas équivalentes. Cette différence n'est pas liée à la méthodologie employée mais au matériel biologique. Une telle différence n'est jamais observée avec une activité membranaire partiellement purifiée (M. Marin et B. Marin, résultats non publiés).

Lors de l'incubation, lorsque l'ATP est remplacé par de l'ADP, à la même concentration, toujours en présence de Mg²⁺, au bout de 60 mn, le contenu en ADP de la suspension prélevée a diminué de 350 nmoles (*fig.*). Or, parallèlement, pendant le même temps, les contenus en ATP et en AMP augmentent respectivement de 142 et de 218 nmoles.

Ces variations du contenu adénylique de la suspension lutoïdique ne sont pas observées en présence d'Ap⁵A (M. Marin, résultats non publiés). Cette molécule n'est pas un inhibiteur de l'activité ATPase lutoïdique. Par contre, elle s'avère efficace sur les différentes activités adénylate-kinase décrites jusqu'à présent ([11]-[12]).

Ainsi, en présence de Mg²⁺, il est observé, parallèlement à la disparition de l'ADP, une apparition d'ATP et d'AMP dans un rapport 2/1/1. Cette proportionalité n'est jamais observée en absence de cation divalent dans le milieu réactionnel. Cette dépendance vis-à-vis du magnésium et un tel rapport suggèrent l'existence d'une activité adénylate-kinase, souvent décrite dans le monde animal.

CONCLUSIONS. — La membrane lutoïdique dispose d'un équipement enzymatique plus complexe qu'il n'apparaît *a priori*. Certes, il existe une activité ATPase pompe-à-protons [4] mais aussi d'autres activités enzymatiques dont les nucléotides adényliques seraient, soit les substrats, soit les produits de la réaction. Dans ces conditions, il est mesuré un bilan des produits de ces réactions.

L'emploi de la technique HPLC, adaptée, éprouvée et optimisée pour ce matériel biologique permet de mettre en évidence un type d'activité, l'activité adénylate-kinase, qui n'avait jamais été mis en évidence jusqu'à présent sur ce matériel biologique. De par

son inhibition par l'Ap⁵A, il s'agirait davantage d'une activité ATP-AMP-phosphotransférase ([11]-[12]).

Ce type de résultats est à rapprocher de ceux décrits par M. Hill et coll. sur le tonoplaste de *Catharanthus roseus* [13]. De par ses propriétés, cette activité semble différente des autres types d'activité adénylate-kinase trouvés chez les végétaux supérieurs. Selon la nature des tissus, la répartition cellulaire de cette activité s'avère différente [14]. Ainsi, dans une feuille mature, près de 50 % se trouvent dans les chloroplastes, le stroma plus particulièrement. Dans d'autres cas, elle se trouve essentiellement dans les mitochondries. Mais, ce qui semble le plus important, c'est qu'il existe une faible partie de cette activité associée aux membranes de ces organites. Elle a été décrite associée à l'enveloppe des chloroplastes. Elle serait une composante de la membrane interne des mitochondries. Dès lors, il ne serait pas surprenant de la retrouver dans l'équipement enzymatique d'autres membranes cellulaires comme le tonoplaste. Les résultats décrits dans ce papier l'indiquent clairement. Ils confirment ceux obtenus sur le tonoplaste de *Catharanthus roseus* ([7]-[8]). La membrane lutoïdique du latex d'*Hevea brasiliensis* a longtemps été considérée comme représentative d'un système vacuo-lysosomal ([2], [10]). Depuis, elle a été souvent considérée comme trop spécifique pour être représentative du tonoplaste des végétaux supérieurs. Toutefois, ce point de vue mériterait une réflexion plus approfondie.

Dans l'état actuel de nos connaissances sur ce matériel, il devient essentiel de caractériser son rôle dans la compartimentation des nucléotides entre le cytoplasme et la vacuole. Dans le contexte du fonctionnement biochimique et physiologique de la cellule laticifère, le contenu en nicotinamides réduits limite la synthèse d'un poly-isoprène économiquement important, le caoutchouc naturel [15]. D'autres effecteurs de la voie polyisoprénoïde existent. Ils sont l'objet d'un transport directionnel entre le cytoplasme et le milieu vacuolaire [16]. Par ailleurs, dans la mesure où le mécanisme de leur transporteur tonoplastique est connu, il s'avère entraîné par au moins l'ATPase membranaire [17]. Dans ces conditions, l'estimation du pool nucléotidique et celui de la charge énergétique constituent deux paramètres essentiels pour une meilleure connaissance de la productivité de l'*Hevea brasiliensis*.

On pourrait aussi, dans un tel contexte, évoquer les mécanismes liés au recyclage de l'ADP en ATP, une hypothèse qui pourrait être vérifiée avec ce matériel non dégradé. Sa vérification remettrait en cause la plupart des bilans énergétiques calculés pour rendre compte des différents transports actifs au niveau du tonoplaste des végétaux supérieurs.

ABRÉVIATIONS. — ADP : adénosine-5'-diphosphate. AMP : adénosine-5'-monophosphate. AP⁵A : P¹, P⁵-di (adénosine-5')-pentaphosphate. ATP : adénosine-5'-triphosphate. cyt *c* : cytochrome *c*. DTT : 1,4-dithiothrétiol. EDTA : acide (éthylène-dinitrolo)-tétraacétique. HEPES : acide 4-(2-hydroxy-éthyl)-1-pipérazine-éthane-sulfonique. HPLC : chromatographie liquide haute performance. MES : acide 2-(N-morpholino)-éthane-sulfonique. NADH₂ : β-nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit. Pase : phosphatase acide. PNP : para-nitro-phénol. TBAHS : tétra-*n*-butyl-ammonium hydrogène sulfate. Tris-base : tris-(hydroxyméthyl)-animo-éthane.

Les auteurs remercient, pour leurs conseils judicieux, Jean-Louis Jacob et Jean-Claude Prévôt (I.R.C.A.). Ils ont apprécié aussi l'assistance technique, chaleureuse, de Jacques Chanut (ORSTOM).

Note remise le 15 octobre 1990, acceptée après révision le 5 juillet 1991.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

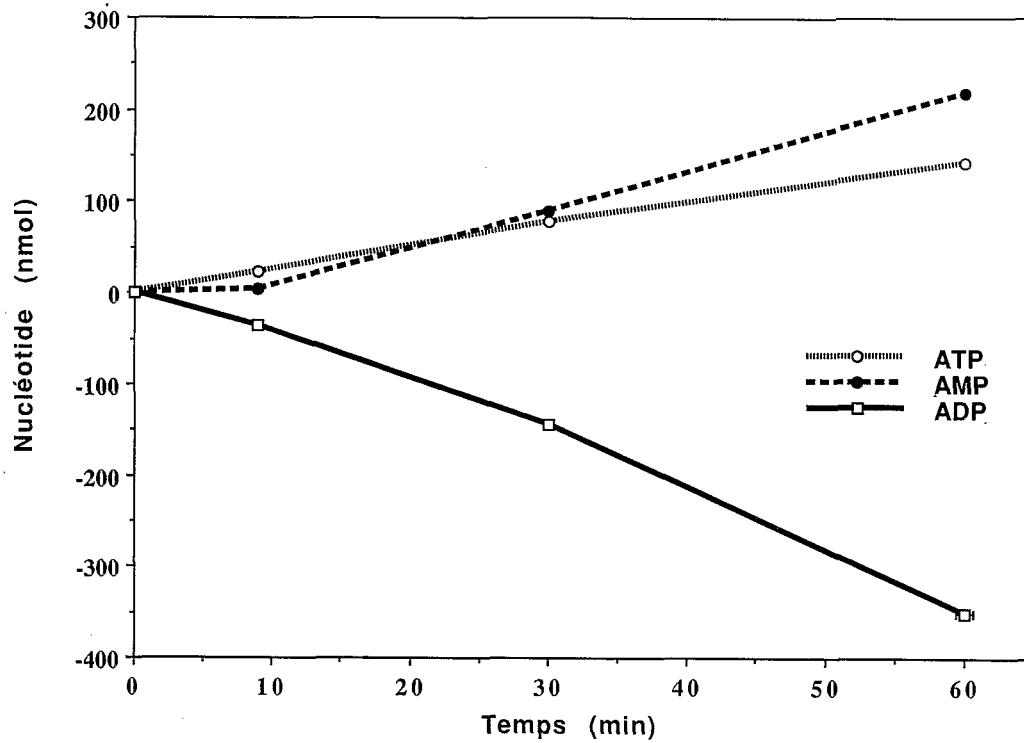
- [1] G. WAGNER, in *Plant Vacuoles: Their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology*, NATO ASI Series, Série A, 134, Plenum Press, New York et Londres, 1987, p. 7-19.
- [2] J. D'AUZAC, H. CHRÉSTIN, B. MARIN et C. LIORET, *Physiol. Végét.*, 20, 1982, p. 311-331.
- [3] B. MARIN et X. GIDROL, *Biochem. J.*, 226, 1985, p. 85-94.
- [4] B. MARIN, M. MARIN-LANZA et E. KOMOR, *Biochem. J.*, 198, 1981, p. 365-372.
- [5] H. CHRÉSTIN, X. GIDROL, B. MARIN, J. L. JACOB et J. D'AUZAC, *Z. Pflanzenphysiol.*, 114, 1984, p. 269-277.
- [6] B. MARIN, *Biochemistry and function of vacuolar adenosine-triphosphatase in fungi and plants*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York et Tokyo, 1985, 259 p.
- [7] M. HILL, A. DUPAIX, P. VOLFIN, A. KURKDJIAN et B. ARRIO, in *Plant Vacuoles: Their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology*, NATO ASI Series, Série A, 134, Plenum Press, New York et Londres, 1987, p. 127-133.
- [8] M. HILL, A. DUPAIX, P. VOLFIN, A. KURKDJIAN et B. ARRIO in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 148, 1987, p. 132-141.
- [9] D'AUZAC, *Phytochemistry*, 14, 1975, p. 671-675.
- [10] S. PUJARNISCLE, *Étude biochimique des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis Müll.-Arg. Différences et analogies avec les lysosomes*, Mémoires de l'ORSTOM, 48, 1971, 168 p.
- [11] G. E. LIENHARD et I. I. SECEMSKI, *J. Biol. Chem.*, 248, 1973, p. 1121-1123.
- [12] T. SAIDHA, A. I. STERN, D. LEE et J. SCHIFF, *Biochem. J.*, 232, 1985, p. 357-365.
- [13] M. HILL, A. DUPAIX, M. NHIRI, L. GUYEN et B. ARRIO, *F.E.B.S. Letters*, 230, 1988, p. 47-50.
- [14] A. PRADET et P. RAYMOND, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34, 1983, p. 199-224.
- [15] J. LORQUIN, *Thèse Doctorat*, Spécialité Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1990, 204 p.
- [16] B. MARIN, *Plant vacuoles: their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology*, NATO ASI Series, série A, 134, Plenum Press, New York et Londres, 1987, 562 p.
- [17] B. MARIN, *Le Fonctionnement du Transporteur tonoplastique du Citrate du Latex d'Hevea brasiliensis*, Trav. Doc. ORSTOM, 144, 1982, p. 1-409.

Laboratoire de Biotechnologie, ORSTOM, B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex 1;

I. N. : Nouvelle adresse : Laboratoire de Biochimie microbienne,

Département de Biologie moléculaire et structurale,

Centre d'Études nucléaires de Grenoble 85 X, avenue des Martyrs, 38041 Grenoble Cedex.



Cinétique de l'évolution du contenu nucléotidique au cours d'une incubation. Chaque essai représente la moyenne de quatre répétitions faites dans les mêmes conditions expérimentales. Il représente le contenu nucléotidique d'un échantillon de 25 μ l analysé par HPLC selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes.

Changes in the level of adenine nucleotides during the incubation of hevea lutoidic vesicles. The data points for each nucleotide represent the mean of four experiments. The adenylate content of a 25 μ l sample is analyzed by HPLC according to the procedure described in Material and Methods.