

2 - 2 - 7
**Schéma général des problèmes de régulation de la
 synthèse isoprénique**
 J.-L. Jacob

Isoprene synthesis regulation

A study of the synthesis of isoprene in latex has revealed the existence of a number of stages or reactions which play a part in the regulation process.

The first corresponds to the functioning of invertase. The second concerns the conversion of pyruvate into acetyl-coenzyme A. The third which accounts for the reduction of hydroxy methyl glutaryl coenzyme A to mevalonic acid, raises the problem of the metabolism of NADPH (synthesis, reduction and hydrolysis) which is necessary for it to function. The fourth raises the major problem of the production and regeneration of energy essential to the synthesis as a whole, especially via the metabolism of the phosphate nucleotides.

A mechanism is proposed for the regulation of the metabolism of isoprene, its prime object being to show the importance of pH variations within the latex and to clarify one of the possible roles of citric trapping by the lutoids.:

★

Le schéma général de la synthèse isoprénique est maintenant connu (figure 1). Il implique trois problèmes fondamentaux :

- un problème d'approvisionnement et de transformation des matières premières, en l'occurrence les sucres ;
- un problème d'ordre énergétique, la synthèse nécessitant de l'ATP ;
- un problème de pouvoir réducteur, le NADPH étant nécessaire à l'anabolisme isoprénique.

Les travaux réalisés à ce jour tant par les équipes anglophones que franco-phones ont permis de préciser les étapes susceptibles d'intervenir dans la régulation du fonctionnement d'ensemble de ce vaste processus métabolique.

Il est possible d'en désigner quatre principales :

- la première correspond au clivage du saccharose en glucose et fructose par l'invertase ;
- la seconde rend compte du passage pyruvate → acétyl-coenzyme A ;
- la troisième se situe à la transformation du HMG-CoA en acide mévalonique par l'intermédiaire de la HMG-CoA-réductase ;
- le quatrième groupe, les réactions de phosphorylation catalysées par la mévalonate kinase, la phosphomévalonate-kinase, et la pyrophosphomévalonate décarboxylase.

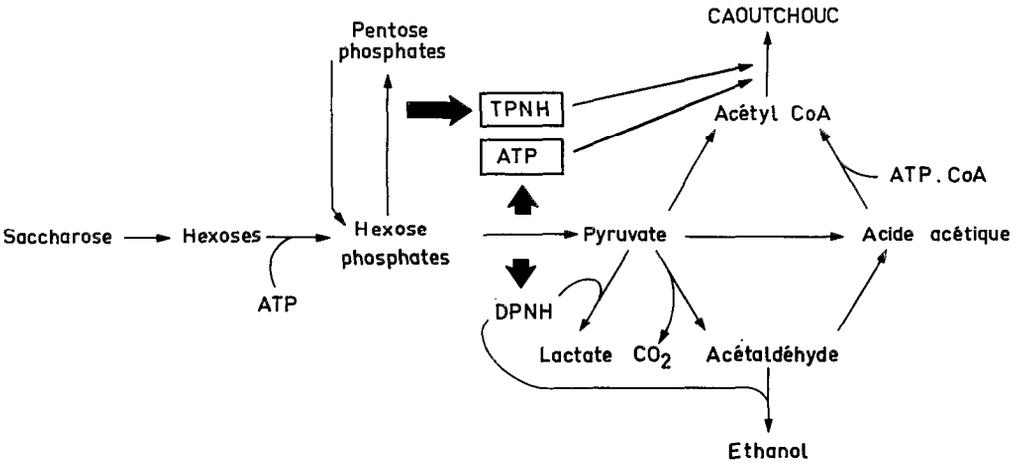


Figure 1

Les relations entre la glycolyse et la synthèse du caoutchouc

Quels sont les facteurs capables d'influencer l'activité de chacune de ces étapes et, par conséquent, la synthèse du caoutchouc ?

a - L'invertase

Il ne fait plus de doute que l'invertase catalyse une étape limitante et, par conséquent, régulatrice de la glycolyse (cf. travaux de Tupy*).

Le fonctionnement de cette enzyme est lié en premier lieu à la concentration en saccharose du latex. Cette concentration est elle-même dépendante non seulement de la synthèse chlorophyllienne, mais aussi du transport phloémique de ce sucre et de son passage au sein des laticifères.

En deuxième lieu, Tupy** a clairement montré que le pH joue un grand rôle dans l'activité invertase. L'enzyme fonctionne très bien à un pH faiblement basique (7,2 - 7,3) mais une légère modification du milieu entraîne une forte variation de son activité.

Enfin, Tupy et Primot ont mis en évidence l'inhibition de l'invertase par le magnésium. Cette inhibition est relativement beaucoup plus importante à pH 6,5 (80%) qu'à pH 7,2 (30%) dans des conditions analogues.

Soulignons, dès maintenant, la grande influence que semble avoir le facteur pH du milieu en ce qui concerne cette étape.

J. TUPY* - *Physiol. vég.*, 11, 633-641, (1973).

J. TUPY** - *J. Exp. Bot.*, 24, 516-524, (1973).

J. TUPY et L. PRIMOT - Rapport annuel I.R.C.A., (1973).

b - Le passage pyruvate → acétyl coenzyme A

Il est encore mal connu ; selon les résultats obtenus à ce jour (cf. paragraphe 2.2.4), la pyruvate-décarboxylase, présente au sein du latex, transformerait le pyruvate en acétaldéhyde qui, ultérieurement, donnerait soit de l'acétate, soit de l'acétyl-CoA comme l'ont montré certaines expériences *in vitro*.

Il faut noter au passage que la pyruvate-décarboxylase a un optimum de pH acide (pH 5,5 - 6,0) et que son activité, contrairement à celle de l'invertase, diminue considérablement lorsque le pH atteint la neutralité.

Par ailleurs, l'existence d'une lactate déshydrogénase et d'une alcool-déshydrogénase actives dans le sérum cytoplasmique, implique une compétition très sérieuse entre la production de lactate et d'éthanol d'une part et celle d'acétyl-coenzyme A précurseur du polyisoprène d'autre part, à partir de pyruvate et d'acétaldéhyde. Cette compétition mise en évidence dans des expériences *in vitro*, doit absolument être évitée *in situ* (Jacob). Deux possibilités sont envisageables :

- une carence de NADH nécessaire au fonctionnement de la lactate et de l'alcool déshydrogénase par l'intermédiaire de mécanismes utilisant le cofacteur réduit ;
- une inhibition de ces réactions par un facteur déterminé, dans certaines conditions.

L'analyse du carrefour phosphoénolpyruvique (figure 2) a permis d'éclairer ce problème. En effet, l'existence dans le latex d'une phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) (EC 4.1.1.31) enzyme active surtout à pH basique ($\neq 7,5$), rend compte de la synthèse ac. oxaloacétique (AOA). L'ion HCO_3^{3--} nécessaire à la réaction est produit abondamment, soit lors du passage pyruvate-acétate, soit lors de la production du maillon isopenténylpyrophosphate. L'AOA formé, en présence de NADH est réduit immédiatement en malate grâce à une malate déshydrogénase. L'activité potentielle de cette enzyme est telle qu'elle peut jouer le rôle de pompe à NADH aux dépens de la lactate et de l'alcool déshydrogénase dont l'activité est bien plus faible, à condition bien sûr que la quantité d'AOA produit soit suffisante pour épuiser le cofacteur réduit disponible.

On peut imaginer qu'il existe d'autres processus de «détoxification du NADH» susceptibles d'éviter une dérivation métabolique vers le lactate et l'éthanol, tels que le système cytochrome c deshydrogénase mis en évidence dans les membranes lutoïdiques*.

Par ailleurs, il faut noter qu'une diminution de pH, résultant par exemple d'une accumulation de malate, provoque consécutivement une diminution de l'activité PEPC. Cette acidification va entraîner une inhibition de la lactate-deshydrogénase et de l'alcool-deshydrogénase par des teneurs physiologiques d'ATP (d'Auzac,

J.L. JACOB - *Physiol. vég.*, 8, 395-411, (1970).

* F. MOREAU, J.L. JACOB, J. DUPONT et C. LANCE - *Biochim. Biophys. Acta*, 396, 116-124, (1975).

J. d'AUZAC et J.L. JACOB - *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 80, 143-156, (1968).

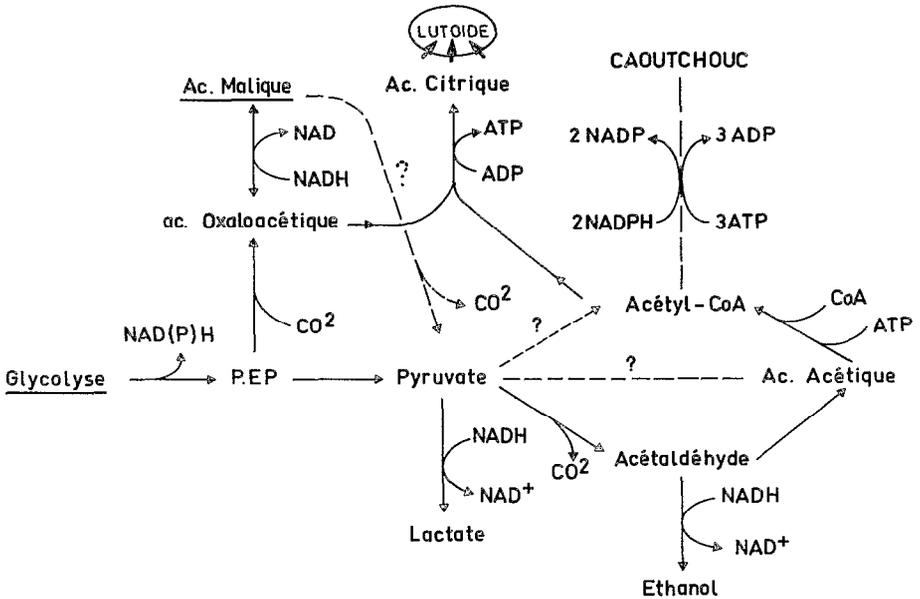


Figure 2

Schéma général du métabolisme dans le latex

Jacob). Là encore, le fonctionnement pyruvate → acétyl-coenzyme A doit être favorisé, d'autant que la pyruvate-décarboxylase est activée.

L'importance du facteur pH apparaît aussi nettement que dans le paragraphe précédent.

c - L'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase

La très faible activité potentielle de cette enzyme est déjà un facteur limitant dans l'enchaînement de l'anabolisme isoprénique (Hepper).

Comme elle ne fonctionne bien qu'en présence de NADPH, la quantité de ce cofacteur réduit sera aussi un facteur important susceptible d'influencer l'activité de cette étape essentielle dans la synthèse du caoutchouc.

Trois problèmes sont à considérer :

- la synthèse du NADP (H) ,
- la régénération du cofacteur réduit ;
- sa destruction par des phosphatases spécifiques ou non.

- synthèse du NADP(H)

Aucun travail n'a été fait à ce jour pour approfondir ce processus et il serait souhaitable que ce sujet soit abordé.

- régénération du NADPH

Deux voies métaboliques sont capables de réaliser cette régénération au sein du latex (Figure 3) :

- la voie oxydative des pentoses par l'intermédiaire de la glucose-6-phosphate deshydrogénase (Arreguin) ;
- la régénération du NADPH se fait alors aux dépens d'une molécule d'hexose ;

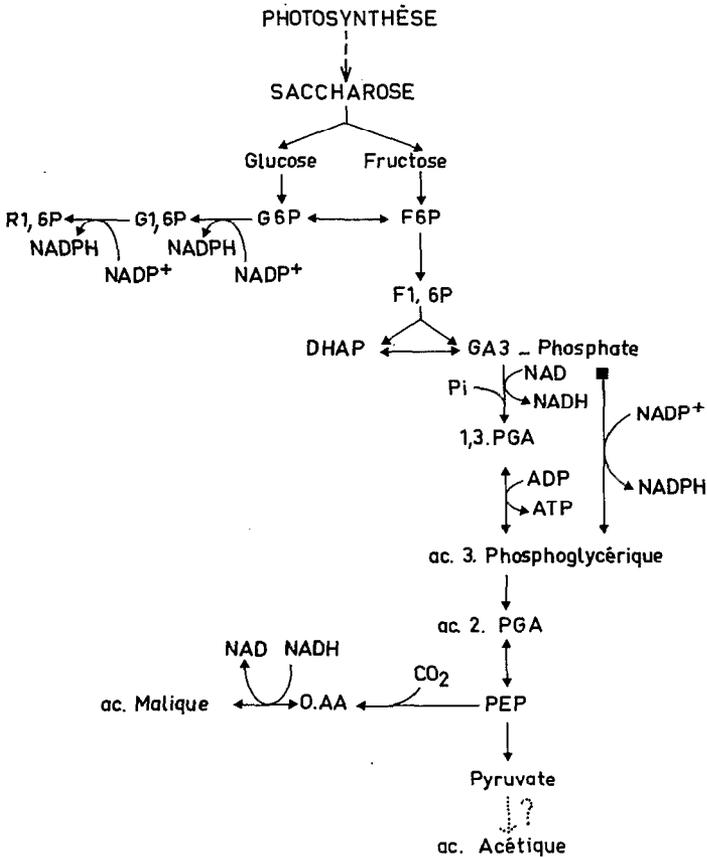


Figure 3

Schéma du catabolisme glucidique dans le latex

- la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (E.C. 1.2.1.9.) non phosphorylante qui donne de l'acide 3-phosphoglycérique (Jacob - d'Auzac) ; la régénération du NADPH se fait alors aux dépens de la régénération d'une molécule d'ATP puisque, contrairement à son homologue phosphorylante d'ailleurs fonctionnelle dans le latex, elle court-circuite l'étape catalysée par la phosphoglycérate kinase, génératrice d'ATP.

Il est difficile de dire actuellement quelle est la voie la plus utilisée. Il est probable qu'elles fonctionnent toutes les deux et différemment selon les conditions à un moment donné.

- la dégradation du NADP (H)

Compte tenu des très faibles quantités de NADP trouvées au sein du latex, ce processus peut avoir un rôle important dans la limitation de la synthèse isoprénique.

Toutefois, il faut tenir compte des stress provoqués notamment lors de la saignée et qui se traduisent par la libération de phosphatases acides lutoïdiques capables d'hydrolyser le NADP (H).

Néanmoins, une enzyme nouvelle, étroitement spécifique du cofacteur : une 2'nucléotidase (Jacob - Sontag) a été mise en évidence récemment dans le sérum cytoplasmique du latex. Elle s'oppose donc à la synthèse du caoutchouc par destruction du cofacteur. Son inhibition doit être un facteur favorable à l'élaboration du polyisoprène ; ceci a pu être vérifié *in vitro* en utilisant du cuivre qui est, même à très faible concentration, un inhibiteur extrêmement puissant de la 2'nucléotidase.

d - Les étapes ATP dépendantes

Le problème majeur est, dans ce cas, la régénération de l'ATP. Elle est surtout réalisée par la glycolyse. Mais cette somme d'énergie n'est probablement pas la seule, d'autres processus dont il est difficile d'apprécier actuellement l'activité réelle doivent intervenir, telle que la synthèse de citrate par l'intermédiaire de la citrate lyase (E.C. 4.1.3.3.).

Ce sujet semble important et mérite d'attirer l'attention.

Un deuxième aspect à considérer est la dégradation de l'ATP par des phosphatases acides. En réalité, seules les enzymes lutoïdiques sont capables d'hydrolyser efficacement le cofacteur, et leur localisation réduit certainement beaucoup leur rôle *in situ*. Par ailleurs, il faut noter que l'ATP est toujours sous forme ATP-Mg au sein du latex, compte tenu de la concentration respective, de ces deux produits, or ce chélat est difficilement attaqué par les monostéarases lutoïdiques.

J.L. JACOB et J. d'AUZAC - *Eur. J. Biochem.*, 31, 255-265, (1972).

J.L. JACOB et N. SONTAG - *Eur. J. Biochem.*, 40, 207-214, (1973).

Examinons, pour terminer, un schéma de régulation partielle du métabolisme isoprénique au vu de certains résultats évoqués précédemment.

— l'augmentation du pH au sein du latex :

- active le fonctionnement de l'invertase et par conséquent de la glycolyse ;
- active le fonctionnement de la PEPC, qui a pour effet :
 - d'accélérer la synthèse d'AOA et de malate,
 - d'épuiser conjointement le NADH du milieu, tout en évitant la formation de lactate et d'éthanol.

— l'accumulation de malate consécutive au processus précédent va entraîner une diminution du pH, qui pourra se traduire par :

- une diminution de l'activité invertasique et PEPC entraînant une diminution de la synthèse de malate,
- une inhibition de la lactate deshydrogénase et de l'alcool deshydrogénase par l'ATP,
- une activation de la pyruvate décarboxylase et par conséquent de la production d'acétyl-Co A.

Or, en présence d'acétyl-Co A, l'AOA peut donner aisément du citrate, lequel peut être piégé par les lutoïdes d'autant plus facilement que la citrate lyase mise en jeu produit de l'ATP susceptible d'activer ce piégeage. Il en résulte que la quantité de malate du sérum cytoplasmique transformé en citrate via l'AOA, diminue.

Le fonctionnement d'une enzyme malique évoqué par d'Auzac qui produirait du pyruvate à partir du malate, transformant ainsi un acide fort en acide faible peut également intervenir.

Dans tous les cas, il s'ensuit une augmentation de pH qui nous ramène aux conditions du début.

Cette hypothèse ne se veut en aucun cas définitive, car beaucoup de paramètres ne sont pas encore connus qui doivent entrer en ligne de compte. Toutefois, elle permet d'envisager une esquisse de la régulation générale conduisant à l'idée que la synthèse du caoutchouc est peut-être sous l'influence d'un certain rythme, notion de plus en plus répandue en physiologie et qui ouvre des horizons nouveaux à la compréhension des phénomènes biologiques.

Elle aide enfin à percevoir plus nettement l'importance du piégeage citrique par les lutoïdes, dans un cadre métabolique non plus ponctuel mais beaucoup plus global.

J. d'AUZAC et C. LIORET - *Physiol. vég.*, 12, 617-635, (1974).

J. d'AUZAC - Thèse de Doctorat d'État, 5447, Paris, 1965.

Il faut souligner que de ces travaux assez fondamentaux, de ces résultats souvent spécifiques, a pris naissance une notion de fatigue des tissus laticifères qui, sur le plan pratique, est de la plus grande importance. Ainsi, l'étude de la teneur en saccharose du latex, qui traduit l'approvisionnement et l'utilisation des sucres, peut être utilisée comme critère de réponse à la stimulation mais oriente également l'exploitation vers des méthodes nouvelles telles que la microsaignée, mieux adaptées à la physiologie de l'hévéa.

★