

## CARACTERISATION D'UNE ATP-ase MEMBRANAIRE EN PRESENCE D'UNE PHOSPHATASE ACIDE DANS LES LUTOÏDES DU LATEX D'*HEVEA BRASILIENSIS*

JEAN D'AUZAC

Laboratoire de Physiologie Végétale, Université des Sciences et Techniques du Languedoc,  
34060 Montpellier-Cédex, France

(Révisée reçue le 17 septembre 1974)

**Key Word Index**—*Hevea brasiliensis*; Euphorbiaceae; ATP-ase; phosphatase acide; membrane; vacuole; lysosomes.

**Abstract**—Latex lutoïdes constitute a polydispersed vacuole with lysosomal character. Lutoïdes possess a membrane which retains ATP-ase and acid phosphatase activity. Acid phosphatase may be inhibited by ammonium molybdate or phosphate, making it possible to characterize an ATP-ase with an optimum pH of between 7.5 and 8.0. This ATP-ase is  $Mg^{2+}$  dependent, does not require  $K^+$  specifically but is affected by the ionic concentration of the medium.

**Résumé**—Les lutoïdes constituant dans le latex d'Hévéa un vacuome polydispersé à caractère lysosomal, retiennent sur leur membrane une ATP-ase et une phosphatase acide. Cette phosphatase peut être inhibée par le molybdate et le phosphate. On peut alors caractériser une ATP-ase de pH optimum 7,5–8,0, dépendante du  $Mg^{2+}$  et de la force ionique du milieu mais ne dépendant pas spécifiquement de  $K^+$ .

### INTRODUCTION

Les lutoïdes constituent dans le latex d'*Hevea brasiliensis* un vacuome polydispersé à caractère lysosomal [1, 2]. On a montré précédemment que les lutoïdes isolés du cytoplasme que constitue le latex d'Hévéa sont susceptibles d'absorber *in vitro* du citrate radioactif de même qu'ils accumulent naturellement le citrate *in vivo* [3]. La vitesse de cette absorption est multipliée par 2 en présence d'ATP exogène et ceci conduit logiquement à admettre l'existence d'une ATP-ase membranaire.

Si la facilité que l'on a grâce au latex à disposer de microvacuoles est un facteur favorable à l'étude d'une telle ATP-ase, leur caractère lysosomal complique l'expérimentation par suite de la présence d'une phosphatase acide.

Le voisinage d'ATP-ase et de phosphatase au niveau des microsomes est cependant assez courant. Ainsi Rungie et Wiskich [4] mettaient en évidence une ATP-ase microsomale chez *Brassica rapa* en présence d'une phosphatase acide. Ils suggéraient d'ailleurs que cette ATP-ase pouvait être

localisée sur le tonoplaste. Par contre, Atkinson et Polya [5] concluaient que les activités ATP-asi-ques mises en évidence chez la carotte, la betterave et *Chara australis* étaient entièrement dues à la phosphatase acide. Mettant à profit un matériel particulièrement adapté, nous avons cherché, dans le présent travail, à caractériser une ATP-ase liée à une membrane bien définie, en l'occurrence de type tonoplastique.

### RESULTATS

#### Mise en évidence d'une ATP-ase

La mise en évidence d'une activité ATP-asi-que en présence d'une phosphatase acide implique une bonne connaissance de cette phosphatase afin de se placer dans des conditions où son fonctionnement est limité ou impossible.

Il est classique que les ATP-ase membranaires présentent un pH optimum neutre ou basique et c'est ainsi que le pH a été utilisé pour distinguer les activités phosphatases acide et ATP-ase. Nous

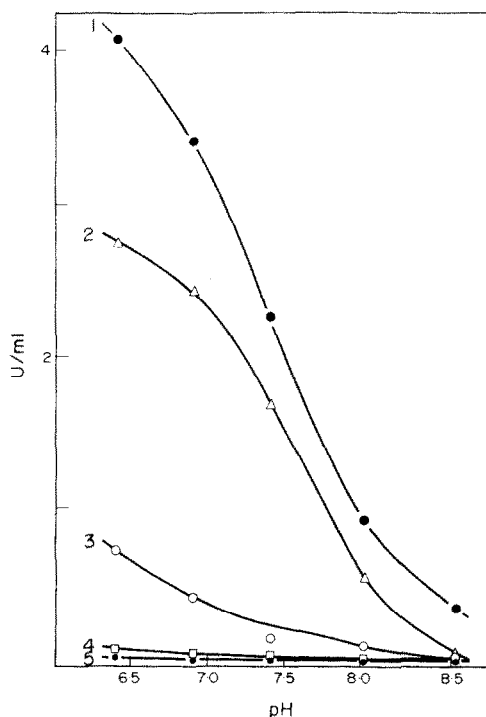


Fig. 1. Utilisation de l'ATP et du PNPP en fonction du pH par un serum intralutoïdique dialysé. (1) Activité vis à vis du PNPP (5 mM); (2) activité vis à vis de l'ATP (1 mM); (3) activité vis à vis de l'ATP +  $\text{MgCl}_2$  5 mM +  $\text{KCl}$  50 mM; (4) activité vis à vis de l'ATP +  $\text{KCl}$  +  $\text{MgCl}_2$  +  $\text{NH}_4$  Molybdate: 0,1 mM; (5) activité vis à vis du PNPP +  $\text{NH}_4$  Molybdate: 0,1 mM. Sur cette figure et les suivantes l'activité enzymatique exprimée en unités par ml (U/ml) est portée en ordonnée.

avons tout d'abord vérifié l'influence du pH sur l'activité de la phosphatase acide lutoïdique pure vis à vis des substrats *p*-nitrophenylphosphate (PNPP) (5 mM) et ATP (1mM) entre pH 6,4 et 8,5 en tampon triethanolamine (TEA-HCl): 0,1 M. On a constaté que l'activité vis à vis de ces deux substrats est réduite d'environ 85% à pH 8,0 par rapport à pH 6,4 si l'on travaille sur une phosphatase acide pure. On a vérifié que sur un serum intra-lutoïdique dialysé et sur un sédiment membranaire soigneusement lavé la courbe d'activité vis à vis du PNPP en fonction du pH est du même type. Il apparaît donc que sur un sédiment membranaire il subsiste une activité phosphatase acide résiduelle et qu'un pH de 8,0 n'est pas suffisant pour annihiler totalement cette activité.

Jacob et Sontag [6] ont montré que l'utilisation de l'ATP par la phosphatase acide lutoïdique est considérablement inhibée par le  $\text{Mg}^{2+}$ . Nous avons confirmé ce résultat à pH 7,5 en analysant

l'action du  $\text{Mg}^{2+}$  sur l'activité phosphatase vis à vis de l'ATP pour une phosphatase acide pure et un serum intralutoïde dialysé. Il apparaît qu'à 5 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ , correspondant à un rapport ATP/Mg de 5, l'inhibition varie entre 80 et 90%. Une telle inhibition par le  $\text{Mg}^{2+}$  de l'activité de la phosphatase acide vis à vis de l'ATP a par ailleurs été signalée [4, 5].

L'inhibition par le molybdate de la phosphatase acide est bien connue [6-8]. Nous avons vérifié que le molybdate d'ammonium en tampon TEA-HCl 0,1 M de pH 7,5 inhibe à 95% l'activité phosphatase acide vis à vis du PNPP pour une concentration de 50  $\mu\text{M}$  et inhibe à 97,5% pour une concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Nous avons ensuite combiné les inhibitions par le pH,  $\text{Mg}^{2+}$  et Mo de l'utilisation de l'ATP par la phosphatase acide. La Fig. 1 montre l'influence de ces facteurs sur l'activité phosphatase acide vis à vis de l'ATP et du PNPP, d'un serum intralutoïdique dialysé qui contient l'essentiel de l'activité phosphatase acide. On constate que cette activité vis à vis du PNPP et de l'ATP (courbes 1 et 2) est, au-delà de pH 7,5, totalement inhibée en présence de Mo 0,1 mM (courbes 4 et 5); l'activité vis à vis de l'ATP est normalement très réduite en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  (courbe 3).

Disposant ainsi de moyens pour réduire ou annuler l'activité phosphatase acide, on a pu rechercher l'ATP-ase sur un sédiment membranaire issu d'un lyophilisat lutoïdique purifié par quatre mises en suspension et centrifugations successives. La Fig. 2 confirme au niveau du sédiment membranaire la présence d'une phosphatase acide résiduelle totalement inhibée par Mo (courbes 1 et 5). On remarque que les courbes de l'activité utilisant l'ATP comme substrat sont différentes de celles obtenues sur serum intralutoïdique (Fig. 1), c'est ainsi qu'il apparaît nettement en présence de  $\text{Mg}^{2+} + \text{K}^+$  (Fig. 2, courbe 3) et surtout de  $\text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ + \text{molybdate}$  (Fig. 2, courbe 4) une activité proprement ATP-ase qui présente un maximum entre pH 7,5 et 8,0.

#### Nécessité du $\text{Mg}^{2+}$ et du $\text{K}^+$

La quasi totalité des ATP-ases connues à ce jour dépendent pour leur fonctionnement d'un cation divalent en général  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ATP-ase de la membrane lutoïdique n'échappe pas à la règle. La Fig. 3 montre une activité quasi-nulle lorsque le

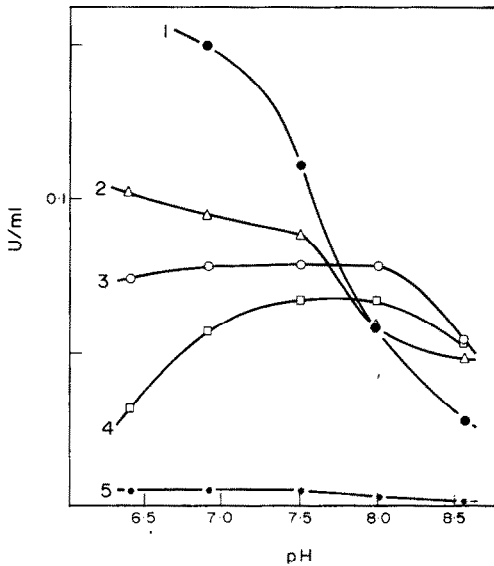


Fig. 2. Utilisation de l'ATP et du PNPP par un sédiment membranaire lutoïdique purifié. (1) Activité vis à vis du PNPP (5 mM); (2) activité vis à vis de l'ATP (1 mM); (3) activité vis à vis de l'ATP +  $MgCl_2$ : 5 mM + KCl: 50 mM; (4) activité vis à vis de l'ATP +  $MgCl_2$  + KCl +  $NH_4$  Molybdate: 0,1 mM; (5) activité vis à vis du PNPP +  $NH_4$  Molybdate: 0,1 mM.

magnésium est absent du milieu. En tampon TEA de pH 8,0 et en présence de 1 mM d'ATP, le rapport optimum ATP/ $Mg^{2+}$  est compris entre 0,5 et 1. Dans la même expérience réalisée dans un tampon phosphate de  $K^+$  0,1 M de pH 8,0 où l'activité phosphatase est normalement totalement inhibée, il apparaît que l'optimum de  $Mg^{2+}$  est légèrement supérieur.

Nous avons dans les expériences suivantes, utilisé systématiquement un rapport ATP/ $Mg^{2+}$  de 1. L'examen de la Fig. 3 ne laisse pas apparaître une action activatrice marquée du KCl vis à vis de l'ATP-ase. Dans un milieu TEA 0,1 M pH 8,0, ATP: 1 mM,  $MgCl_2$ : 1 mM, Mo: 0,1 mM on a constaté par ailleurs que l'apport de KCl à 50 mM n'augmentait que de 18% l'activité ATP-ase mesurée.

Rungie et Wiskich [4] ont montré que l'activation par KCl de certaines ATP-ase végétales peut être un effet de sel d'autant plus évident que la force ionique du milieu est faible. Il s'avère en être de même dans notre cas. En effet, dans un tampon Hepes-Tris 0,1 M de pH 8,0 l'apport de KCl a un effet négatif. Tandis que dans le même tampon à la concentration de 0,02 M, KCl possède au contraire une action positive marquée (Fig. 4).

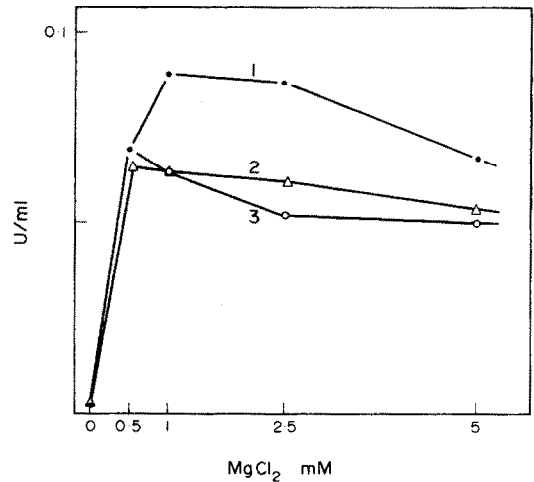


Fig. 3. Influence du  $Mg^{2+}$  sur l'activité ATP-ase d'un sédiment membranaire purifié. (1) Incubation en tampon K Phosphate 0,1 M pH 8,0, ATP: 1 mM; (2) incubation en tampon TEA-HCl 0,1 M pH 8,0, ATP: 1 mM + KCl: 50 mM +  $NH_4$  Molybdate: 0,1 mM. (3) incubation en tampon TEA-HCl, ATP, Molybdate, sans KCl.

#### Influence du molybdate sur l'activité ATP-ase

La mise en évidence d'une activité ATP-ase en présence d'une phosphatase acide repose donc en fait sur l'emploi d'un tampon phosphate inhibant la phosphatase acide ou sur l'emploi de molybdate possédant la même action. Le rôle inhibiteur du  $Mg^{2+}$  vis à vis de l'utilisation de l'ATP par la phosphatase et son rôle d'activateur indispensable pour l'ATP-ase constituent des éléments importants dans la mise en évidence simultanée des 2

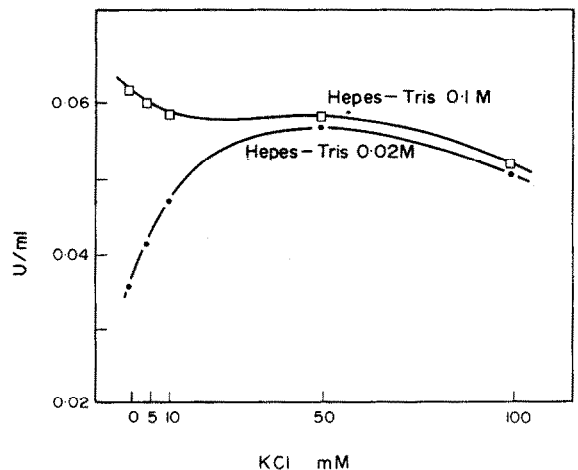


Fig. 4. Influence du KCl sur l'activité ATP-ase membranaire. Milieu d'incubation: tampon HEPES-Tris 0,1 ou 0,02 M pH 8,0; ATP: 1 mM,  $MgCl_2$ : 1 mM,  $NH_4$  Molybdate: 0,1 mM.

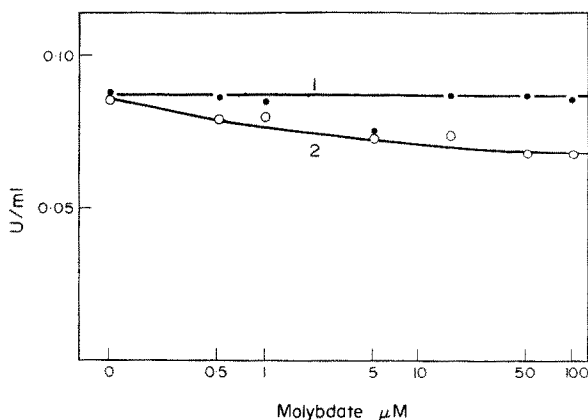


Fig. 5. Influence du molybdate d' $\text{NH}_4$  sur l'activité ATP-ase membranaire. L'échelle des concentrations en molybdate d' $\text{NH}_4$  est logarithmique. (1) Incubation d'ATP-Mg (1 mM) en tampon K phosphate 0,1 M à pH 8,0; (2) incubation d'ATP-Mg (1 mM) en tampon TEA-HCl 0,1 M pH 8,0 KCl (50 mM).

enzymes. Il convenait cependant de vérifier une possible inhibition de l'ATP-ase par le molybdate dans nos conditions opératoires.

On a donc déterminé l'influence d'une concentration croissante de molybdate lors de la mesure de l'activité ATP-ase réalisée en tampon phosphate et en tampon TEA-HCl 0,1 M de pH 8,0. La courbe 1 de la Fig. 5 illustre clairement l'absence totale d'action du molybdate sur l'activité ATP-ase déterminée en tampon phosphate. Ceci démontre que l'ATP-ase est la seule enzyme dosée dans ces conditions. La courbe 2 réalisée en tampon TEA et en présence d'ATP-Mg fait apparaître une diminution d'environ 20% de l'activité mesurée pour la concentration maximale de Mo. Cette inhibition de 20% correspond à l'activité phosphatasique subsistant à pH 8 pour l'ATP en présence de  $\text{Mg}^{2+}$ . Le fait que l'activité ATP-ase soit sensiblement supérieure en tampon phosphate qu'en tampon TEA-HCl a été observée régulièrement (Fig. 3 par exemple).

#### *Influence du Triton X-100*

L'examen en microscopie électronique des suspensions de sédiments membranaires a montré l'existence d'une forte proportion de vésicules et l'on pouvait se demander si une telle structure ne nuisait pas au contact entre l'enzyme et son substrat. Afin de détruire les vésicules, nous avons employé le Triton X-100. A la concentration finale de 0,01%, il réduit en moyenne d'environ 20% l'ac-

tivité ATP-ase. A la concentration de 0,05%, le Triton diminue en moyenne de 50% l'activité ATP-ase tandis qu'il augmente de 95% l'activité phosphatase mesurée à pH 8,0.

Ces résultats peuvent montrer que l'ATP-ase est immédiatement disponible à son substrat. Tandis que la phosphatase acide qui montre une certaine latence, serait située à l'intérieur des vésicules dans la mesure où les résidus membranaires sont vésiculés.

#### *Activité de l'ATP-ase et de la phosphatase acide*

Les résultats précédents ayant permis de déterminer des conditions adéquates au fonctionnement de l'ATP-ase on a chiffré l'activité spécifique de cette enzyme et de la phosphatase acide sur des préparations membranaires issus de 6 lots différents de lutoïdes. Les lyophilisats provenaient de latex issus du clone PB 86 récoltés entre Février et Mai 1974 en Côte d'Ivoire. Le Tableau 1 montre la présence systématique des 2 enzymes dans les 6 lots considérés. L'activité ATP-ase paraît moins variable que l'activité phosphatase acide.

Tableau 1. Activité comparée de l'ATP-ase et de la phosphatase acide sur 6 lots différents de membranes lutoïdiques

Activité	Lot					
	1	2	3	4	5	6
ATP-ase	0.140	0.108	0.274	0.157	0.106	0.175
Phosphatase acide résiduelle pH 8,0	0.280	0.314	0.289	0.115	0.131	0.192

Les résultats sont exprimés en U.I. L'activité ATP-ase a été déterminée en tampon TEA-HCl 0.1 M de pH 8.0 en présence de ATP: 1 mM,  $\text{MgCl}_2$ : 1 mM  $\text{NH}_4$  molybdate: 0.1 mM.

L'activité phosphatase acide résiduelle a été déterminée en tampon TEA-HCl 0.1 M pH 8.0 en présence de PNPP: 5 mM et de Triton X-100 à la concentration finale de 0.05%.

#### DISCUSSION

La présence d'une ATP-ase sur la membrane lutoïdique paraît ainsi démontrée bien que l'on ne puisse dire si elle est absorbée ou constitutive. La dépendance de cette ATP-ase vis à vis du  $\text{Mg}^{2+}$  laisse prévoir que l'ATP-Mg serait le véritable substrat de cette enzyme alors qu'il constitue un mauvais substrat pour la phosphatase acide. Comme pour d'autres ATP-ases végétales, la présence de  $\text{K}^+$  n'est pas indispensable. C'est semble-t-il davantage une force ionique élevée que la présence

du  $K^+$  qui assure le fonctionnement optimal de l'enzyme.

Afin de distinguer la présence d'une ATP-ase neutre ou alcaline dans un milieu contenant une phosphatase acide, il apparaît que l'emploi de molybdate ou d'un tampon phosphate sont des moyens plus efficaces que la seule influence du pH. L'absence totale d'inhibition de l'ATP-ase par le molybdate permet une discrimination facile et on peut s'étonner que ce moyen n'ait pas été utilisé, à notre connaissance dans le passé. Le latex d'*Hévéa* permet donc sans ambiguïté la localisation d'une ATP-ase sur une membrane de type vacuolaire et ce malgré la présence d'une quantité non négligeable d'une phosphatase acide liée au caractère lysosomal des lutoïdes.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

En Côte d'Ivoire, le latex est récolté dans la glace, puis traité sur champ par 6% v/v de TEA M pH 7,5 contenant 0,1 M de mercaptoéthanol (MSH). Au laboratoire, le latex est séparé en fraction blanche et jaune par centrifugation (10000 g, 10 min). La fraction jaune, représentant de 10 à 20% en volume du latex est constituée essentiellement de lutoïdes et accessoirement de particules de Frey-Wissling. Les lutoïdes sont séparés des particules de Frey-Wissling par 3 lavages et centrifugations successives comme cela a été précédemment décrit [3]. Les lutoïdes ainsi lavés sont congelés à  $-20^\circ$ , puis lyophilisés et expédiés en France par avion. Au laboratoire, 0,5 g de lyophilisat sont homogénéisés au Potter dans 40 ml de tampon TEA-HCl 0,1 M de pH 7,5 contenant 2 mM de MSH. La suspension obtenue est centrifugée à 40000 g pendant 10 min. On élimine une faible quantité de surnageant constitué de beaucoup de caoutchouc et d'une petite quantité de membranes lutoïdiques. Le sédiment comprenant l'essentiel des membranes lutoïdiques est remis en suspension au Potter puis traités 3 fois encore de la même façon. Après la 4ème centrifugation, le sédiment est repris par 2,5 ml du même tampon dilué au 1/4 puis homogénéisé au Potter. La recherche de l'activité ATP-ase a été réalisée sur cette suspension qui peut être conservée 1 à 2 jours dans la glace en perdant cependant une part de son activité.

L'activité phosphatase acide de cette suspension membranaire est dosée en présence de *p*-nitrophenylphosphate de Na (PNPP) (5 mM) dans un tampon acétate 0,1 M de pH 5,0 ou TEA-HCl 0,1 M de pH variable (6,5–8,5) dans un volume de 1 ml. L'incubation réalisée à  $25^\circ$  est arrêtée par 0,2 ml de  $HClO_4$  1,25 M contenant 8% d'acide silicotungstique; ce dernier permet l'obtention d'un serum clair. Après centrifugation, on ajoute 1 ml du surnageant clair à 2 ml de KOH 0,2 N avant de mesurer l'absorption à 400 nm.

L'activité ATP-ase est déterminée par dosage enzymatique de l'ADP formé après incubation dans un milieu 1 mM en ATP qui est décrit dans chaque expérience. L'incubation est arrêtée par 0,2 ml de  $HClO_4$  6 M lequel est ensuite neutralisé en présence de rouge de méthyle par KOH 6 M. Après centrifugation, la solution obtenue sert au dosage enzymatique de l'ADP en présence de phosphoenolpyruvate, pyruvate kinase et lactate deshydrogenase [9]. Des dosages d'azote protéique ont été effectués sur les sédiments membranaires selon la méthode de Nessler [10]. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ moles de substrat transformés par min. et par ml de solution (U/ml) ou par mg de protéines (U.I.).

*Remerciements*—Nous remercions J.-L. Jacob de l'Institut Français du Caoutchouc pour l'aimable fourniture de phosphatase acide lutoïdique pure. Nos vifs remerciements vont également au laboratoire de Physiologie végétale de la Faculté des Sciences de l'Université d'Abidjan pour l'envoi de lyophilisats de lutoïdes.

#### REFERENCES

1. Pujarniscle, S. (1968) *Physiol. Vég.* **6**, 27.
2. Ribaillier, D., Jacob, J.-L. et D'Auzac, J. (1971) *Physiol. Vég.* **9**, 423.
3. D'Auzac, J. et Lioret, C. (1974) *Physiol. Vég.* Tous presse.
4. Rungie, J. M. et Wiskich, J. T. (1973) *Plant Physiol.* **51**, 1064.
5. Atkinson, M. R. et Polya, G. M. (1967) *Austr. J. Biol. Sci.* **20**, 1069.
6. Jacob, J. L. et Sontag, N. (1974) *Biochimie*, sous presse.
7. Alexander, A. G. (1965) *J. Agr. Univ. Puerto Rico* **20**, 1069.
8. Jacob, J. L., Ribaillier, D. et D'Auzac, J. (1970) *Physiol. Vég.* **8**, 247.
9. Adams, H. (1963) dans *Methods in Enzymatics Analysis* (Berg-Meyer, H. U. ed.), pp. 573–580. Academic Press, New York.
10. Umbreit, W. W. et Burris, R. H. (1964) dans *Manometric Techniques* (Umbreit, W. W., Burris, R. H. et Stauffer, J. F. eds.), pp. 208–209. Burgess, Minneapolis.