

INSTITUT DE RECHERCHES SUR LE CAOUTCHOUC

IRCA

2, rue scheffer . 75016 Paris - tél.: 553-93-96

INSTITUT DE RECHERCHES SUR LE CAOUTCHOUC

IRCA

42, rue scheffer - 75016 Paris - tél.: 553-93-96

REGENERATION DU POUVOIR REDUCTEUR
NECESSAIRE A LA SYNTHESE ISOPRENIQUE

I. L' ENZYME MALIQUE -

*Caractéristiques,
Implications physiologiques.*

J.L. Jacob, J.C. Prévôt, B. Velasquez

Département de Biochimie et de Physiologie
Végétale,

Institut de Recherches sur le Caoutchouc,

Direction Générale :

42, rue Scheffer - 75016 PARIS.

IRCA - Centre GERDAT

B.P. 5035

34032 MONTPELLIER CEDEX France.

S O M M A I R E

	<u>Page</u>
1. <u>INTRODUCTION.</u>	1
2. <u>MATERIEL ET TECHNIQUES.</u>	2
2.1. <i>Matériel végétal</i>	2
2.2. <i>Dosages de l'enzyme malique</i>	2
2.2.1. <i>Mesures ponctuelles après incubation</i>	2
2.2.2. <i>Mesures cinétiques spectrophotométriques</i>	2
2.3. <i>Dosages de produits par méthodes enzymatiques</i>	3
2.4. <i>Dosages de produits par méthodes non-enzymatiques</i>	3
2.4.1. <i>Protéines</i>	3
2.4.2. <i>Dosages de cations divers</i>	3
2.4.3. <i>Dosage du phosphore minéral</i>	3
2.5. <i>Dosages d'activités enzymatiques diverses</i>	3
2.6. <i>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide</i>	3
2.7. <i>Détermination de la masse moléculaire de l'enzyme malique</i>	4
2.7.1. <i>Filtration sur gel moléculaire</i>	4
2.7.2. <i>Electrophorèse sur gel en gradient de polyacrylamide</i>	4
2.8. <i>Filtration de sérum cytoplasmique sur membrane AMICON PM 10</i>	4
2.9. <i>Produits utilisés</i>	5
3. <u>MISE EN EVIDENCE DE L' ENZYME MALIQUE.</u>	5
3.1. <i>Electrophorèses</i>	5
3.2. <i>Incubations</i>	5
4. <u>PURIFICATION DE L' ENZYME MALIQUE DU LATEX d' Hevea brasiliensis</u>	9
5. <u>PROPRIETES DE L' ENZYME MALIQUE DU LATEX.</u>	15
5.1. <i>Détermination de la masse moléculaire de l'enzyme malique du latex</i>	15

5.2.	<i>Stabilité thermique et énergie d'activation</i>	15
5.2.1.	Sensibilité de l'enzyme à la chaleur	21
5.2.2.	Energie d'activation de la réaction catalysée par l'enzyme	22
5.3.	<i>Substrats et cofacteurs de la réaction</i>	22
5.3.1.	Sens de la réaction	22
5.3.2.	Cations activateurs	25
5.3.3.	Cofacteurs de la réaction	27
5.3.4.	L' oxaloacétate	27
5.3.5.	Influence de différents tampons sur l'activité de l'enzyme	28
5.4.	<i>Conservation de l' enzyme malique</i>	28
5.5.	<i>Influence du pH sur l'activité enzymatique</i>	29
5.5.1.	Dans le sens Malate $\longrightarrow$ Pyruvate	29
5.5.2.	Dans le sens Pyruvate $\longrightarrow$ Malate	29
5.6.	<i>Affinités de l' enzyme malique pour les substrats, cofacteurs et cations nécessaires à son fonctionnement</i>	32
5.6.1.	Affinités pour Mg^{2+} et Mn^{2+}	32
5.6.2.	Affinités pour les substrats et les cofacteurs	38
5.7.	<i>Influence de divers effecteurs sur le fonctionnement de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis</i>	44
5.7.1.	Les ions minéraux	49
5.7.2.	Les nucléotides phosphates	51
5.7.3.	Les métabolites phosphorylés et quelques molécules biologiques importantes	51
5.7.4.	Les acides organiques	53
6.	<u>L' ENZYME MALIQUE DU LATEX - COMPARAISON AVEC CELLES D'AUTRES ORIGINES - RECAPITULATION DE SES CARACTERISTIQUES PRINCIPALES.</u>	62
7.	<u>L' ENZYME MALIQUE DANS SON CONTEXTE NATUREL.</u>	63
7.1.	<i>Fonctionnement de l'enzyme malique purifiée dans des conditions paraphysiologiques</i>	63
7.1.1.	Le milieu choisi	63

7.1.2.	Affinité de l'enzyme malique pour son cofacteur	64
7.1.3.	Activité de l'enzyme malique en fonction du pH	68
7.1.4.	Quelques remarques sur les fonctions physiologiques de l'enzyme malique au sein du latex	68
7.2.	<i>Activités de l'enzyme malique dans des sérums C de diverses origines</i>	71
7.2.1.	Dosages et électrophorèses sur des lyophilisats de sérums C	71
7.2.2.	Dosages dans des sérums C immédiatement après récolte du latex	72
7.2.3.	Dosages dans des sérums C de plusieurs arbres d'une parcelle monoclonale	72
7.2.4.	Activité potentielle de l'enzyme malique en fonction de la hauteur du panneau d'exploitation	74
7.2.5.	Influence de la stimulation sur l'activité potentielle de l'enzyme malique	75
7.2.6.	Activités potentielles et spécifiques de l'enzyme malique chez différents clones	76
7.2.7.	Caractéristiques de l'enzyme malique issue du latex de PR 107 et de PB 86	77
8.	<u>BIBLIOGRAPHIE.</u>	79

Liste des abréviations
utilisées dans le texte.:

ADP	:	adénosine diphosphate.
AMP	:	adénosine monophosphate.
AOA	:	acide oxaloacétique.
ATP	:	adénosine triphosphate.
CoA	:	coenzyme A.
D O	:	densité optique.
Ethrel	:	ou CEP acide chloroéthylphosphonique.
FNa	:	fluorure de sodium.
F-6-P	:	fructose 6 phosphate.
F-1,6-P	:	fructose-1,6-diphosphate.
GDP	:	guanosine diphosphate.
GMP	:	guanosine monophosphate.
G-6-P	:	glucose-6-phosphate.
GTP	:	guanosine triphosphate.
IDP	:	inosine diphosphate.
LDH	:	lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27).
MDH	:	malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37).
MSH	:	β mercaptoéthanol.
NAD	:	nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée.
NADH	:	nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite.
NADP	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée.
NADPH	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite.
PCMB	:	parachloromercuribenzoate.
PEP	:	phosphoénolpyruvate.
PEPcase	:	phosphoénolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31).
Pi	:	phosphate minéral.
PK	:	pyruvate kinase (EC 2.7.1.40).
PPi	:	pyrophosphate.
HMG-CoA	:	hydroxy- β -methyl glutaryle coenzyme A.
Serum B	:	serum de la fraction sédimentée lors de 10 centrifugations (elle contient lutoïdes et particules de FREY WYSLING).
Serum C	:	serum cytoplasmique (cytosol) du latex d'hévéa.
Serum L	:	serum lutoïdique du latex d'hévéa.
SLS	:	lauryl-sulfate ou dodecyl sulfate de sodium.

1. INTRODUCTION.

Un des problèmes essentiels de la synthèse du caoutchouc au sein des laticifères, est la production du pouvoir réducteur sous forme de NADPH (LYNEN, 1969). En effet, ce cofacteur réduit est nécessaire au bon fonctionnement d'une étape clef de l'anabolisme isoprénique catalysée par la HMG-CoA-réductase (EC 1.1.1.34), et qui transforme le β -hydroxy- β méthyle glutaryle coenzyme A en acide mévalonique (HEPPER et AUDLEY, 1969) :



Les processus de régénération du NADPH à partir de NADP sont donc d'une grande importance dans le cadre de la reconstitution du latex in situ après la saignée.

Certaines déshydrogénases capables de réaliser ce type de réaction ont déjà été mises en évidence dans le latex. JACOB et d'AUZAC (1972) ont montré l'existence d'une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase spécifique du NADP(H) (EC 1.2.1.13). ARREGUIN et al (1967) ont noté la présence de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49) et de la gluconate-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.99.3), qui appartiennent à la voie métabolique des pentoses.

Récemment, des études électrophorétiques ont permis de déceler dans le sérum C une enzyme malique (JACOB et al, 1978) susceptible de réduire le NADP en NADPH. Il était donc important, dans un premier temps, de vérifier et de préciser ce résultat.

Des expériences d'incubation ont montré qu'il s'agissait d'une enzyme spécifique du NADP (EC 1.1.1.40). Elle décarboxyle le malate en pyruvate, tout en régénérant du NADPH.



Cette déshydrogénase a, dans un deuxième temps, été purifiée, ce qui a permis d'étudier quelques unes de ses caractéristiques et d'apprécier les facteurs susceptibles de moduler sinon de réguler son activité.

Il a été possible, enfin, d'étudier son fonctionnement dans des conditions paraphysiologiques, et d'estimer son activité dans différentes conditions et chez différents clones.

Les résultats et les conclusions de ces travaux sont exposés dans ce rapport.

2. MATERIEL ET TECHNIQUES.

2.1. Matériel végétal.

Le matériel végétal utilisé a été préparé dans les mêmes conditions que lors des études de la phosphoénolpyruvate carboxylase (JACOB et al, 1977) et de la pyruvate kinase (JACOB et al, 1979).

2.2. Dosages de l'enzyme malique.

2.2.1. Mesures ponctuelles après incubation.

Les milieux réactionnels comprennent :

2.2.1.1. Dans le sens Malate $\longrightarrow$ Pyruvate :

Tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; Malate 5 ou 10 mM ; NADP 1 mM ;
MnSO₄ 1 mM et(ou) MgCl₂ 5 mM.

2.2.1.2. Dans le sens Pyruvate $\longrightarrow$ Malate :

Tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; Pyruvate 20 mM ; NaHCO₃ 10 mM ;
NADPH 0,13 mM ; MnSO₄ 1 mM.

Dans ces deux cas, les cations nécessaires (Mg²⁺ ou Mn²⁺) ou les différents effecteurs sont ajoutés à la concentration désirée, après que leur pH ait été ajusté.

La température d'incubation est de 30°C. La réaction est stoppée par addition de 0,2 ml d'acide perchlorique 6 N par ml de milieu réactionnel. On centrifuge à 10.000 x g pendant 10 minutes afin d'éliminer les protéines, et l'on neutralise le surnageant préalablement placé dans de la glace, avec de la potasse 6 M. On centrifuge à nouveau à 10.000 x g durant 10', ce qui permet d'éliminer le perchlorate de potassium insoluble. Les dosages des différents substrats ou produits qui participent à la réaction sont effectués sur le surnageant.

2.2.2. Mesures cinétiques spectrophotométriques.

2.2.2.1. Dans le sens Malate $\longrightarrow$ Pyruvate :

Le milieu réactionnel est identique à celui du paragraphe 2.2.1.1., et l'on ajoute 2 mM de NADP dont on suit la réduction en NADPH à 340 nm.

2.2.2.2. Dans le sens Pyruvate $\longrightarrow$ Malate :

Du NADPH à la concentration de 0,13 mM est ajouté au milieu indiqué au paragraphe 2.2.1.2., et l'oxydation du NADPH en NADP est suivie également à 340 nm.

Ces mesures sont réalisées dans des cuves de quartz de 1 cm de parcours optique et d'un volume de 3 ml à une température de 30°C. C'est toujours l'addition de la solution enzymatique qui démarre la réaction.

L'unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme malique qui transforme 1 μ mole de malate ou de pyruvate par minute. L'activité spécifique est l'activité enzymatique, rapportée au mg de protéines.

2.3. Dosages de produits par méthodes enzymatiques.

Un certain nombre de produits : acide oxalo-acétique, malate, pyruvate, ont été dosés enzymatiquement selon les méthodes décrites dans "Methods of enzymatic analysis", BERGMEYER, 1974.

2.4. Dosages de produits par méthodes non enzymatiques.

2.4.1. Protéines.

Les dosages de protéines ont été faits soit par mesures d'absorbance à 260 et 280 nm, en utilisant le coefficient de correction de CHRISTIAN et WARBURG (LAYNE, 1957), soit selon la méthode colorimétrique de LOWRY et al, 1951.

2.4.2. Dosages de cations divers.

Mg^{++} , Cu^{++} , K^+ , Mn^{++} et Na^+ ont été dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique. Mg^{++} a également été dosé par complexométrie (PUJARNISCLE, 1957).

2.4.3. Dosage du phosphore minimal.

Le Phosphore minimal a été dosé selon la méthode de CHEN et al, 1957.

2.5. Dosages d'activités enzymatiques diverses.

L'activité phosphatase acide a été dosée selon la méthode de BESSEY et al, 1946. Celle de la 2'-nucléotidase, suivant la méthode de JACOB et al, 1973. Les dosages de lactate déshydrogénase, malate déshydrogénase, catalase, aldolase, citrate lyase et fructose-6-phosphate kinase ont été réalisés selon les techniques exposées dans "Methods of enzymatic analysis" (BERGMEYER, 1974).

2.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide ont été réalisées, soit avec un appareil Polyanalyst Buchler à 12 postes, soit avec un appareil GE4 Pharmacia Fine Chemical, permettant l'utilisation de 4 plaques, selon les méthodes de DAVIS, 1964.

Les activités enzymatiques ont été révélées selon les techniques utilisées pour les déshydrogénases par WIEME, 1974, en présence de 5 mM de malate, 1 mM de NADP et 1 mM de $MnSO_4$.

2.7. Détermination de la masse moléculaire de l'enzyme malique.

Deux méthodes ont été employées :

2.7.1. Filtration sur gel moléculaire.

Cette méthode a été décrite par ANDREW (1965) ; nous l'avons mise en oeuvre en utilisant des colonnes de 90 cm de hauteur et de 1,5 cm de diamètre.

Deux types de gels ont été utilisés :

- . Ultrogel ACA 34 dont la gamme de fractionnement linéaire est comprise entre 20.000 et 350.000 daltons ; vitesse d'élution 10 ml/heure.
- . Ultrogel ACA22, dont la séparation effective est entre 100.000 et 1.200.000 daltons, avec un débit d'élution de 5 ml/heure.

Le tampon employé est du TEA 0,05 M pH 7,50 contenant 5 mM de β -mercaptoéthanol.

Les marqueurs ont été fournis par BOEHRINGER (calibration proteins combithek), comprenant de la ferritine (450.000), catalase (240.000), aldolase (158.000), albumine bovine du sérum (68.000) ; pour l'Ultrogel ACA 34, nous avons adjoint la citrate lyase (316.000) et la fructose-6-phosphate kinase (360.000).

2.7.2. Electrophorèse sur gel en gradient de polyacrylamide.

L'électrophorèse des échantillons traités au sulfate de lauryle (méthode de WEBER et OSBORN, 1969) a aussi été utilisée.

Les expériences ont été réalisées sur des plaques en gradient de gel de polyacrylamide étalonnées (PAA 4-30 Pharmacia Fine Chemical). L'étalonnage a été vérifié, grâce à des marqueurs fournis par BOEHRINGER (calibration proteins for SDS gel electrophoresis combithek).

Le tampon employé était du Tris-borate 0,09 M à pH 8,35, contenant 3 mM d'EDTA (sel sodique). La tension était de 125 volts par plaque durant 15 heures. La révélation protéique en fin de migration a été réalisée avec du "naphtol blue black" (0,7 %) dans de l'acide acétique à 7 %.

2.8. Filtration de sérum cytoplasmique sur membrane AMICON PM-10.

Un sérum cytoplasmique, repris dans de l'eau bidistillée à la concentration de 50 mg/ml⁻¹ et filtré sur membrane AMICON PM 10, à l'aide d'un appareil de même marque M-202, permet d'obtenir un filtrat très peu différent du sérum initial, exception faite de la fraction protéique et de certains produits à masse moléculaire supérieure à 10.000 daltons (JACOB et al, 1977).

Ce milieu ne contenant plus d'activité enzymatique pouvant gêner le fonctionnement de l'enzyme malique purifiée, mais contenant tous les effecteurs du cytosol, permet d'étudier cette enzyme dans des conditions paraphysiologiques, en ajustant le pH si nécessaire avec HCl ou KOH.

Ce type de filtration a été effectué également sur du sérum cytoplasmique frais en Côte d'Ivoire.

La filtration se fait sous pression d'azote R à 3,5 bars. L'appareil et le récipient qui récupère le filtrat sont maintenus dans de la glace pilée.

2.9. Produits utilisés.

Les gels de filtration Ultrogel ACA22 ou ACA34 sont vendus par Pharmindustrie. Le DEAE sépharose ainsi que les plaques étalonnées de gel de polyacrylamide en gradient PAA 4/30, proviennent de Pharmacia Fine Chemical.

Les enzymes et les produits biochimiques proviennent de BOEHRINGER.

Les différents effecteurs viennent de chez MERCK.

3. MISE EN EVIDENCE DE L' ENZYME MALIQUE.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour montrer l'existence d'une enzyme malique et la localiser au sein du latex.

3.1. Electrophorèses.

L'électrophorèse de sérum cytoplasmique a permis de mettre en évidence une activité enzymatique capable de réduire le malate en présence de NADP. Dans ce cas, une seule bande apparaît sur le gel de polyacrylamide (§ Matériels et Méthodes). Si l'on ajoute du NAD au milieu d'incubation, une deuxième bande se révèle qui correspond à la malate déshydrogénase du sérum C (JACOB, 1970).

L'analyse électrophorétique du sérum B ne montre pas d'activité en présence de malate et de NADP, mais seulement en présence de malate et de NAD ; dans ce cas, 2 bandes apparaissent, qui représentent les malates déshydrogénase de ce compartiment déjà trouvées par COUPE et al (1972).

3.2. Incubations.

Afin de vérifier que l'enzyme mise en évidence par électrophorèse n'est pas une malate déshydrogénase pouvant utiliser le NADP (EC 1.1.1.37), mais bien une enzyme malique (EC 1.1.1.40), des incubations ont été faites avec du sérum C filtré sur sephadex G50, de manière à ne conserver que le "pool enzymatique" de ce milieu.

Le malate n'est pas utilisé en présence de sérum lutoïdique et de NADP.

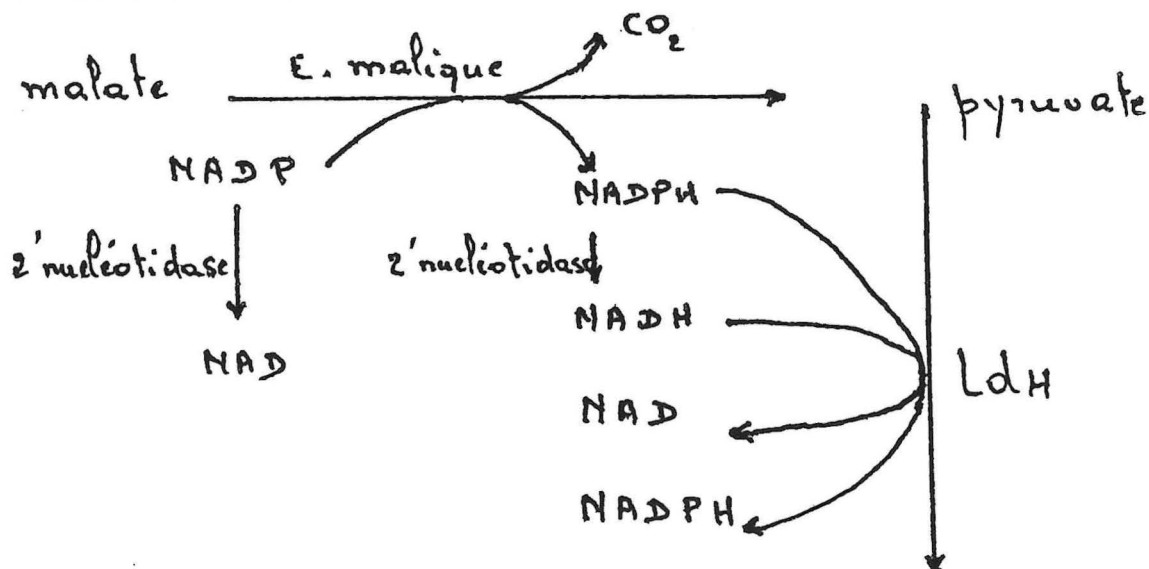
Par contre, dans les mêmes conditions (Tableau 1), le sérum cytoplasmique transforme cet acide organique en pyruvate et en lactate, d'une manière stoechiométrique, puisque les quantités de malate consommées correspondent aux quantités de nouvelles molécules produites. Aucune trace d'acide oxaloacétique n'étant décelable, aucune activité malate déshydrogénase n'a fonctionné ; il est donc démontré qu'une enzyme malique fonctionne bien dans le cytoplasme du latex ; elle produit du pyruvate qui, à son tour, donnera du lactate.

--

Cette dernière réaction peut, dans nos conditions d'expériences, surprendre, car la lactate déshydrogénase du latex (d'AUZAC et JACOB, 1967) fonctionne essentiellement avec du NADH. Or, il existe dans ce même milieu une 2'nucléotidase qui peut déphosphoryler le NADP(H) en NAD(H) (JACOB et SONTAG, 1973).

En outre, une purification assez poussée (Figure 1) de la LDH (100 fois), parallèlement à celle de l'enzyme malique, a permis de montrer récemment que cette déshydrogénase peut aussi fonctionner légèrement avec du NADPH. La courbe de saturation de l'enzyme par le cofacteur est d'ailleurs sigmoïde à pH 6,85, et présente un "S 0,5" de 0,35 mM environ (Figure 2). Il faut remarquer ici, compte tenu de ces résultats et des très faibles concentrations de NADPH trouvées in situ (ARCHER et al, 1969 ; JACOB, 1970), qu'il est peu probable que la LDH dans le latex soit capable de concurrencer efficacement les enzymes utilisant le NADPH - et notamment la HMG-CoA réductase.

Les réactions observées lors des incubations peuvent donc être schématisées ainsi :



Il apparaît donc que l'étude de l'enzyme malique du latex nécessite une purification permettant d'éliminer les systèmes enzymatiques susceptibles d'utiliser les cofacteurs, les substrats ou les produits participant à la réaction qu'elle catalyse.

Temps Produits mM	0	10	20	30	60	90	Sérum bouilli 90
Malate	1,43	1,25	1,19	1,11	0,88	0,79	1,41
Malate utilisé	-	0,18	0,24	0,32	0,55	0,64	-
Pyruvate produit	0	0,08	0,15	0,21	0,27	0,28	< 0,01
Lactate produit	0	0,02	0,06	0,13	0,28	0,32	< 0,02
Σ Pyruvate + Lactate	0	0,10	0,21	0,34	0,55	0,60	-
Σ Malate utilisé + Pyruvate + Lactate	1,43	1,35	1,40	1,45	1,43	1,39	-

Tableau 1 : Mise en évidence d'une enzyme malique dans du sérum cytoplasmique de latex. Incubation de lyophilisat de sérum C filtré sur Sephadex G50 ($0,55 \text{ mg ml}^{-1}$) dans un tampon tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, avec MnSO_4 1 mM, NADP 1 mM ; température 30°C .
Aucune réaction n'est observée avec le sérum bouilli 3 minutes.
Aucune trace d'acide oxaloacétique n'est décelée.

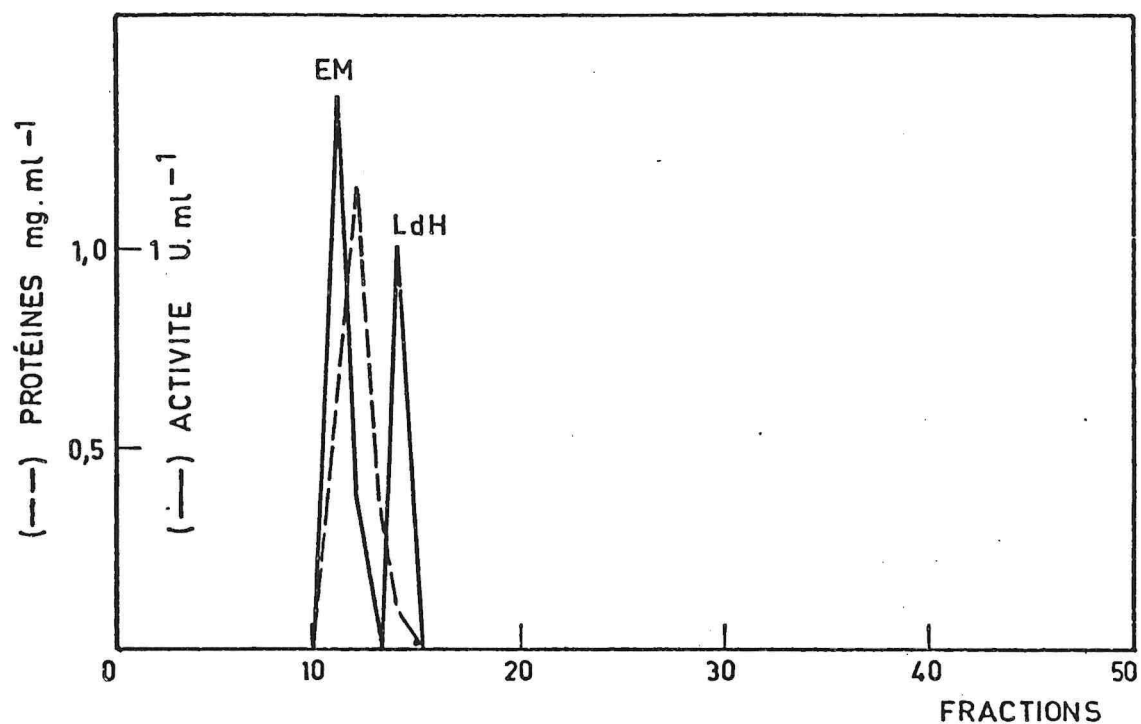


Figure 1 : Séparation de l'enzyme malique et de la lactate déshydrogénase par filtration moléculaire sur Ultrogel ACA22.

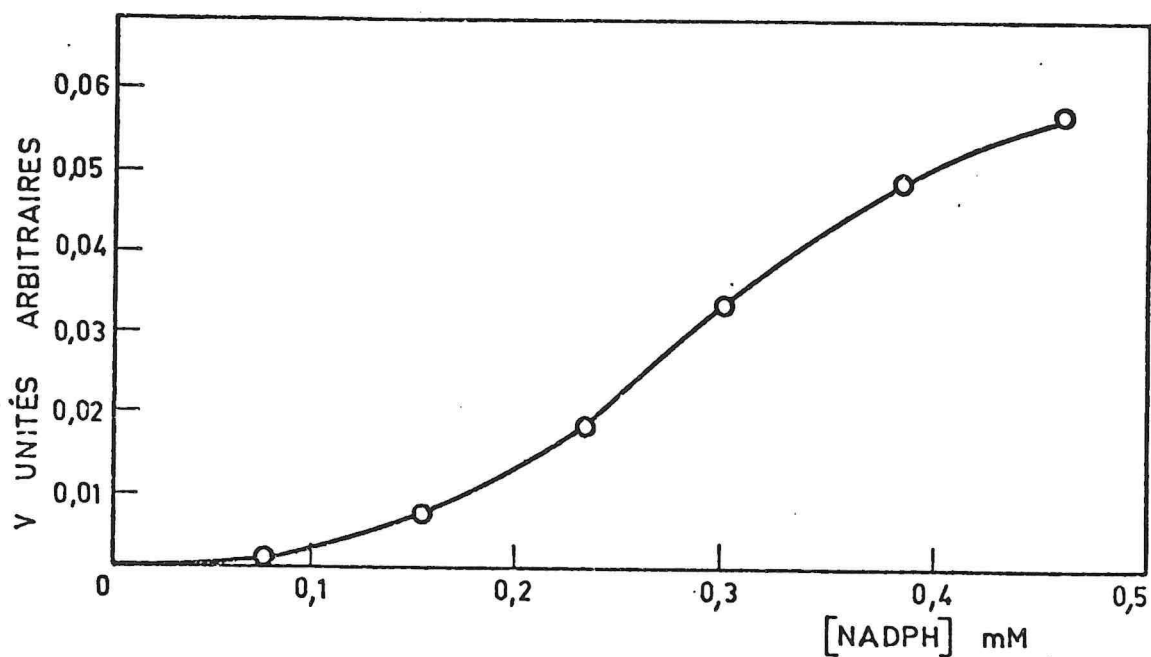


Figure 2 : Activités de la lactate déshydrogénase du latex d'*Hevea brasiliensis* en fonction de la concentration en NADPH. Tampon TES 0,1 M pH 6,85 ; Pyruvate 12 mM.

4. PURIFICATION DE L'ENZYME MALIQUE DU LATEX D' *Hevea brasiliensis*.

La méthodologie qui a été mise au point pour la purification, comporte un certain nombre d'étapes.

Etape 1 : 5 grammes de sérum cytoplasmique sont mis en solution dans du tampon TEA 0,05 M pH 7,50 contenant 0,02 % d'azide de sodium et 5 mM de β mercaptoéthanol. Le volume est amené à 100 ml, et homogénéisé en chambre froide durant 10'.

Etape 2 : Du sulfate d'ammonium est ajouté jusqu'à 40 % de saturation sous agitation maintenue, durant 15 minutes, au froid. Après une centrifugation de 10 minutes à 10.000 x g, le culot est éliminé, et le volume du surnageant est mesuré. On ajoute alors du sulfate d'ammonium pour arriver à 60 % de saturation. La solution maintenue à 4°C est agitée 15 mn puis centrifugée 15' à 10.000 x g.

Le culot est repris, après élimination du surnageant, par le tampon de départ (volume : 9 ml).

Etape 3 : Les 9 ml sont placés au sommet d'une colonne de 60 cm de haut et de 2,6 cm de diamètre de Sephadex G.50 et élués avec ce même tampon.

Les fractions contenant de l'activité de l'enzyme malique sont réunies (volume : 47 ml).

Etape 4 : La totalité de ces 47 ml sont mis sur une colonne de 40 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre de DEAE Sepharose CL 6 B. Après pénétration et rinçage, avec le même tampon, deux éluations sont effectuées, l'une étant constituée du tampon de départ contenant 0,05 M de NaCl, afin d'éliminer un certain nombre de protéines, puis une deuxième élution, contenant toujours le tampon de départ, mais avec 0,15 M de NaCl. Les tubes contenant l'enzyme malique sont réunis (20 ml) et précipités au sulfate d'ammonium entre 40 et 60 % de saturation. Après élimination du surnageant, le culot restant est repris par le tampon initial, sans NaCl (volume 1,6 ml).

Etape 5 : Ce volume est filtré sur gel moléculaire Ultrogel ACA22, colonne 90 cm de hauteur et 1,5 cm de diamètre, et élué avec le même tampon à la vitesse de 5,5 ml/heure. Les fractions actives sont réunies (volume 11 ml).

Etape 6 : On fait pénétrer ces 11 ml dans une colonne de 15 cm de haut et de 0,9 cm de diamètre, contenant du DEAE Sepharose CL 6 B et, après rinçage, avec le tampon initial, on élue avec ce même tampon contenant 0,1 M de NaCl. Les fractions contenant l'enzyme (7,5 ml) sont précipitées au sulfate d'ammonium à 70 % de saturation. Après élimination du surnageant, le culot est repris avec tampon sans NaCl (volume 0,36 ml).

Etape 7 : Une dernière filtration moléculaire de ces 0,36 ml est effectuée sur une colonne de 60 cm de hauteur et de 0,9 mm de diamètre et éluée avec le tampon de départ (vitesse d'élution 1,6 ml/heure), le volume des fractions contenant de l'activité de l'enzyme malique correspond à 4,3 ml.

Le tableau 2 et la figure 3 récapitulent les différentes étapes.

L'électrophorèse de la solution enzymatique obtenue ne montre plus qu'une seule bande protéique qui correspond à la bande d'activité enzymatique révélée selon la technique exposée dans le chapitre "matériels et techniques".

L'enzyme malique du latex a donc été purifiée jusqu'à l'homogénéité protéique, avec un rendement satisfaisant.

La purification de l'enzyme malique d'origine animale a souvent été très poussée (BERNSTINE, 1979, NUMATA NORIO, 1975).

Exceptée celle de la tomate qui met en jeu l'électrofocalisation et atteint 2500 (DAVIES et PATIL, 1974), la purification des enzymes maliques d'origine végétale ou microbienne n'est souvent que partielle (DILLEY, 1966, PUPILLO et BOSSI, 1979). GARNIER et QUEIROZ, 1974 ont cependant atteint pour l'enzyme malique de Bryophyllum daigremontianum, un coefficient de 125, et SESHADRI et al, 1978 pour l'enzyme de Mycobacteria, un coefficient de 120.

Compte tenu de la difficulté que nous avons rencontrée pour séparer l'enzyme malique d'autres déshydrogénases, telles que la lactate déshydrogénase, il semble très important pour étudier la malate NADP oxydoréductase de pousser sa purification suffisamment pour éviter toutes interférences enzymatiques pouvant fausser les résultats. A ce titre, certains travaux notant chez l'enzyme malique une certaine activité de lactate déshydrogénase (HSU et al, 1967) ne laissent pas d'être troublants.

En ce qui concerne l'enzyme malique du latex, aucune trace d'activité de ce genre n'a été décelée après sa purification.

Etapas	Volume ml	Protéines mg / ml ⁻¹	U / ml ⁻¹	Protéines totales	Unités totales	U I	Purification	Récupération
I. Sérum brut	100	21	0,25	2100	25	0,0119	0	100 %
II. (NH ₄) ₂ SO ₄ 40-60 %	9	73	2,55	657	23	0,035	x 2,9	92 %
III. Sephadex G-50	47	9,47	0,47	445	22	0,049	x 4,1	88 %
IV. DEAE Sepharose CL-6B	20	2,08	0,77	41,6	15,4	0,370	x 31,1	61,6 %
V. Ultrogel AcA22	11	0,68	0,86	7,5	9,5	1,267	x 105,4	38,0 %
VI. DEAE Sepharose CL 6B	7,5	0,45	1,04	3,4	7,8	2,294	x 192,8	31,2 %
VII. Ultrogel 7c722	4,3	0,36	0,92	1,5	4,0	2,667	x 224,1	16,0 %

Tableau 2 : Les différentes étapes de la purification de l'enzyme malique du latex.

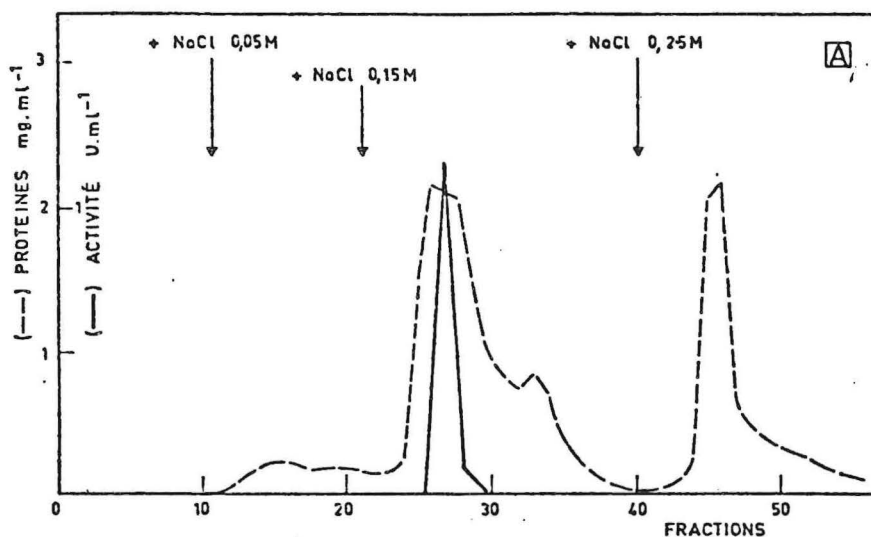
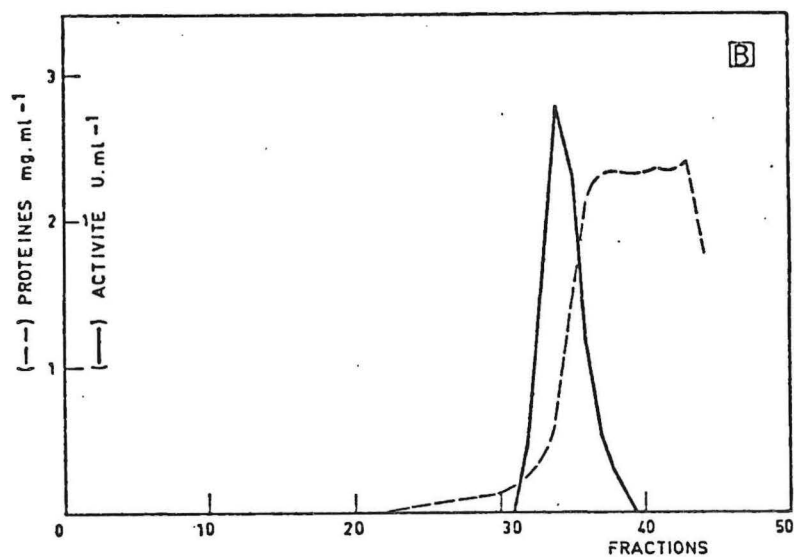
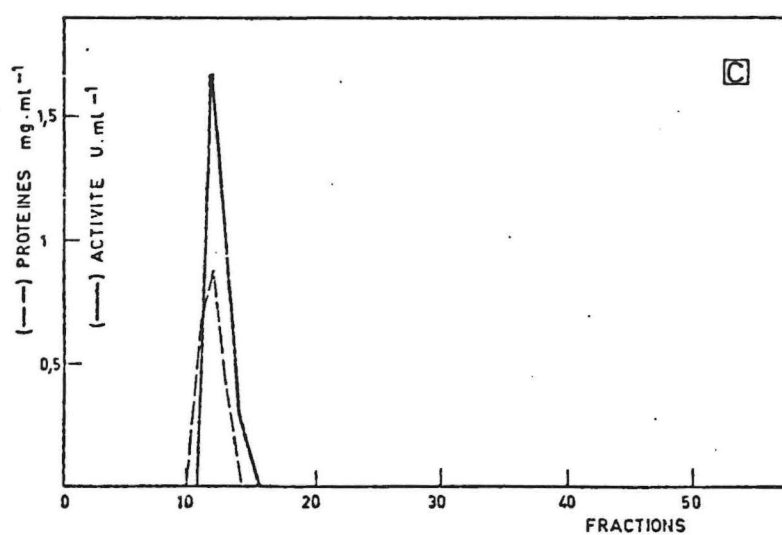


Figure 3 : Etapes de purification de l'enzyme malique d' *Hevea brasiliensis*.

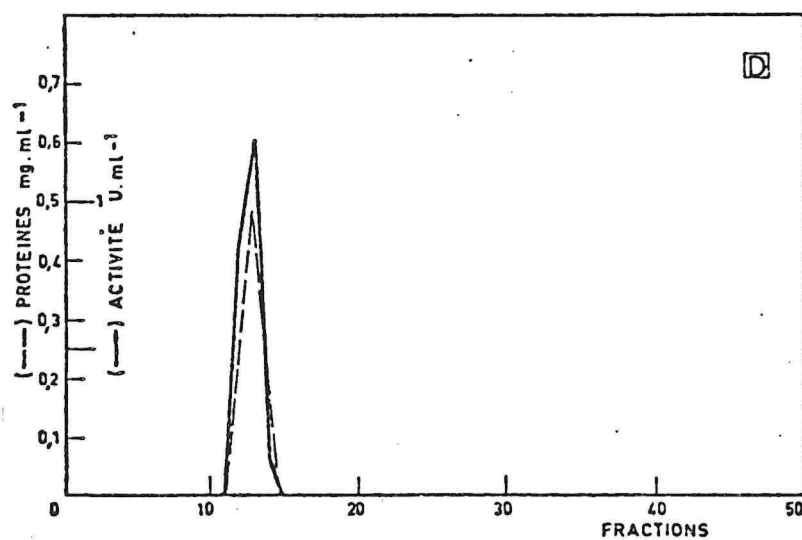
(A) Chromatographie sur colonne de DEAE Sepharose CL6B. Colonne 2,6 /40 cm
Elution par palier. Vitesse 30 ml/h.



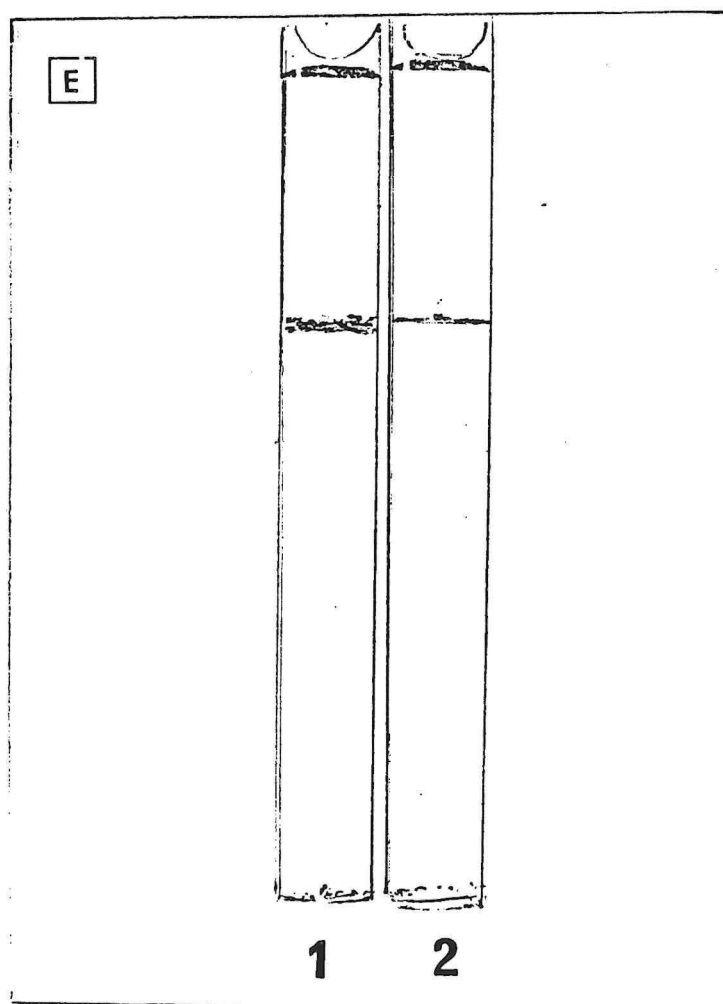
(B) Filtrations moléculaires sur Ultrogel AcA22.
Colonne 1,5/90 cm. Vitesse 5 ml/heure.



(C) Chromatographie sur colonne de DEAE
Sepharese CL6B. Colonne 0,9/20 cm.
Elution 0,1 M NaCl.



(D) Filtration moléculaire sur Ultrogel AcA22.
Colonne 0,9/60 cm. Vitesse 1,6 ml/h



(E) Electrophorèse de la solution enzymatique purifiée
1. Révélation de l'activité enzymatique.
2. Révélation protéique.

5. PROPRIETES DE L'ENZYME MALIQUE DU LATEX.

5.1. Détermination de la masse moléculaire de l'enzyme malique du latex.

Il a été possible de déterminer la masse moléculaire de l'enzyme par deux méthodes différentes.

L'électrophorèse sur gradient de gel de polyacrylamide donne des résultats compris entre 360.000 et 380.000 daltons (§ Figure 4).

La filtration sur gel moléculaire AcA34 ou AcA22 (Ultrogel) aboutit à des valeurs voisines de 355.000 $\pm$ 5.000 daltons (§ Fig. 5 et 6).

Le tableau 3 indique que l'enzyme malique est en général une grosse molécule protéique. Dans le règne animal, sa structure est probablement tétramérique et son poids moléculaire très voisin ; chez les diverses origines, son poids moléculaire est plus diversifié ; chez les végétaux, malgré les résultats de ZIEGLER, (1974) PUPILLO et BOSSI, (1979) pensent que sa structure doit aussi être tétramérique.

Il n'est pas possible de répondre à cette question pour l'enzyme du latex.

L'examen des données trouvées dans la littérature montre qu'elle est d'assez loin la plus lourde.

5.2. Stabilité thermique et énergie d'activation.

5.2.1. Sensibilité de l'enzyme à la chaleur.

L'influence de la température sur l'activité de l'enzyme malique du latex a été étudiée. Pour cela, une solution de l'enzyme contenant ou non différents effecteurs est préincubée durant 3' à la température désirée dans un bain-marie. Elle est ensuite immédiatement plongée dans de la glace. Le dosage de son activité est ensuite réalisée dans un milieu réactionnel comprenant :

Tampon TEA 0,1 M ; pH 7,50 ; MnSO_4 1 mM ; MgCl_2 5 mM ; Malate 10 mM et NADP 0,7 mM.

Quatre préincubations différentes sont faites :

-	Enzyme purifiée		
-	"	+	MnSO_4 1 mM
-	"	+	MgCl_2 5 mM
-	"	+	Malate 10 mM

Le tableau 4 et la Figure 7 résument les résultats obtenus.

Il apparaît que jusqu'à 50°C, l'enzyme est relativement stable, quelle que soit l'incubation faite (avec ou sans effecteur). Par contre, au-delà de 50°C, le MnSO_4 accélère sensiblement sa dénaturation et, à l'inverse, le malate a tendance à protéger l'enzyme efficacement.

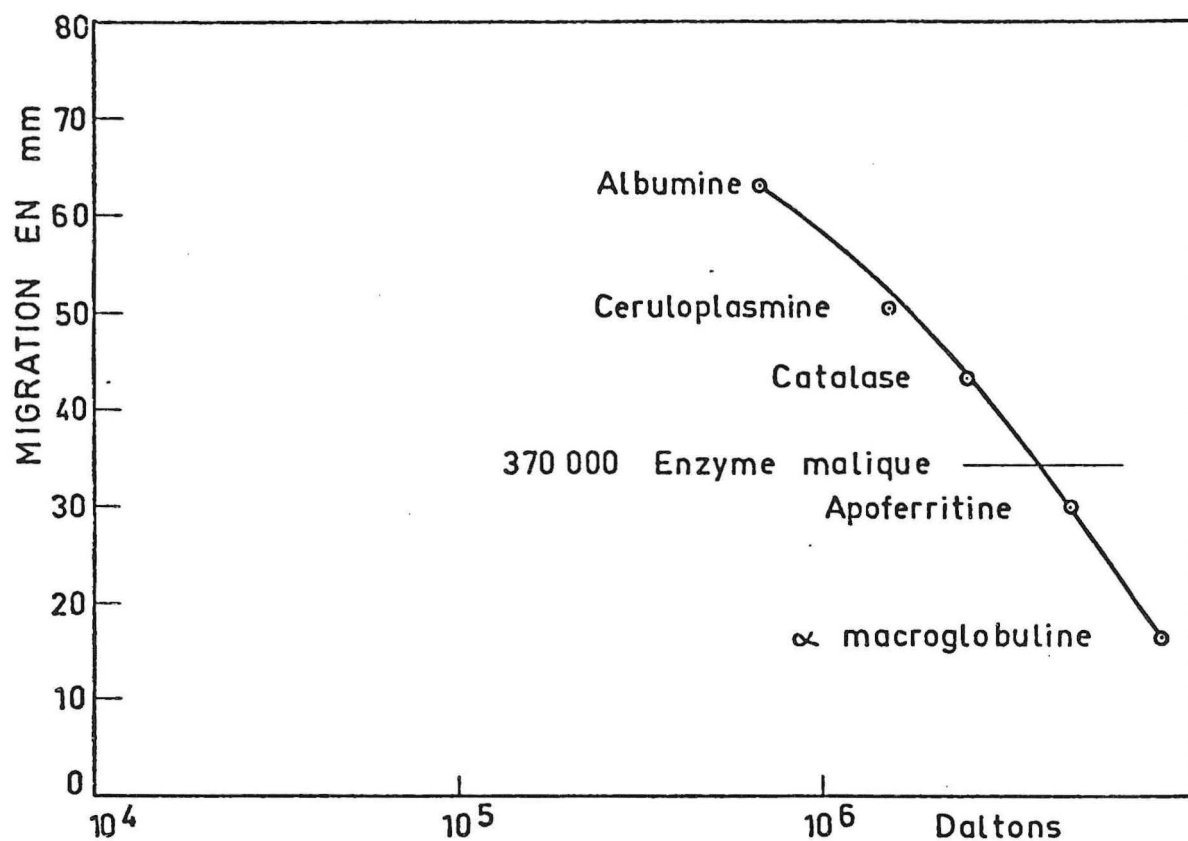


Figure 4 :

Evaluation de la masse moléculaire de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis par électrophorèse en gradient de polyacrylamide PAA 4/30 étalonné.

Migration 2 h 30 à 500 volts.

Tampon tris-borate EDTA pH 8,30.

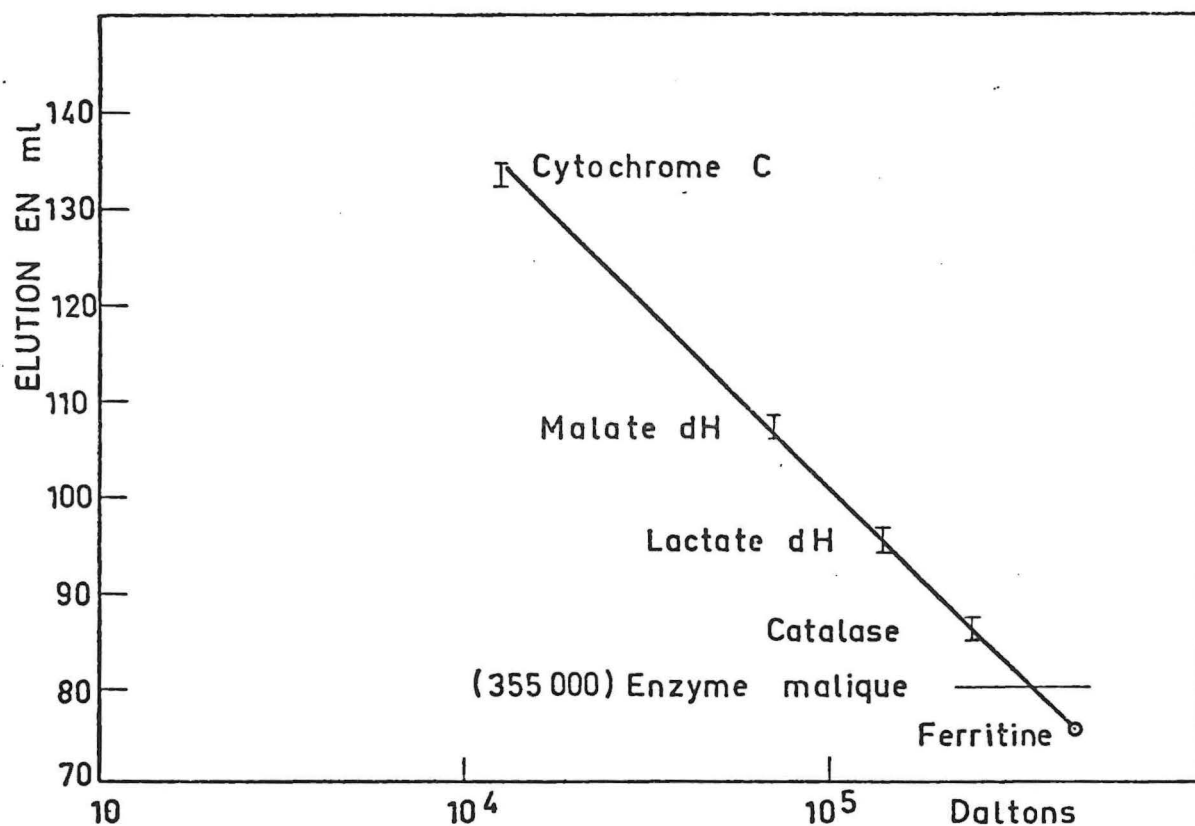


Figure 5 :

Evaluation de la masse moléculaire de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis en filtration moléculaire sur Ultrogel AcA34. Colonne K.15/90 éluee en tampon TEA 0,05 M pH 7,50. Vitesse 7,0 ml/heure.

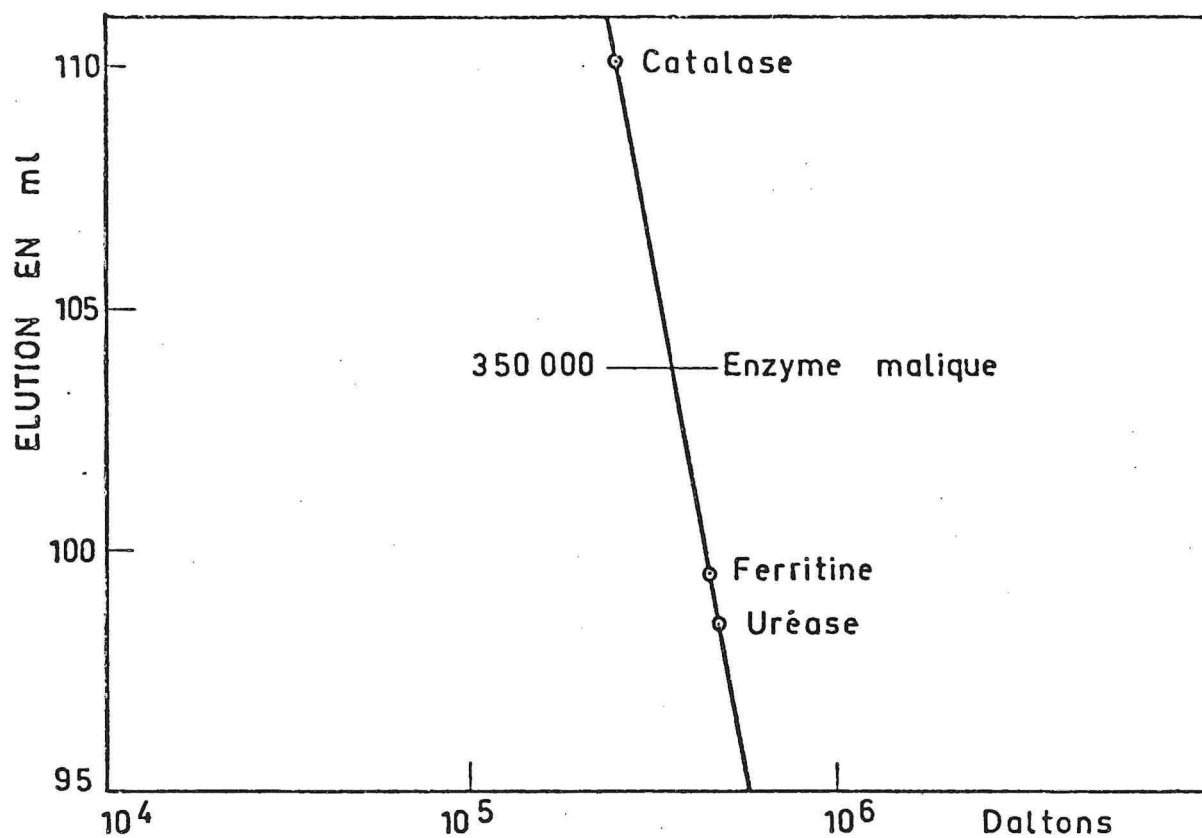


Figure 6 :

Evaluation de la masse moléculaire de l'enzyme malique du latex d' *Hevea brasiliensis* en filtration moléculaire sur Ultrogel AcA22. Colonne 1,5/90 cm éluee en tampon TEA 0,05 M pH 7,5. Vitesse 4,5 ml/heure.

Origine	Poids moléculaire (daltons)	Auteurs
Foie de rat	280 000 4	LI et al 1975
Coeur de lapin	270 000	LIN et DAVIS 1974
Cerveau de souris	252 000 4 monomères 62 000	BERSTINE 1979
Foie de pigeon	250 - 280 000 4 monomères 65 - 68 000	HSU et al 1967
Puppe de Bombyx	195 000	MUAKE FUMIO et al 1977
Cerise	180 000	HARTMAN et al 1977
Poire	224 000	" " "
Feuille de maïs 2 isoenzymes	280 000 + 1 composant mineur de 150 000	PUPILLO et BOSSI 1979
Feuille de maïs verte	330 000 avec des oligomères de tailles différentes	ZIEGLER 1974
Mycobacterium smegmatis	200 000	SESHADRI et al 1978
Bryophyllum	237 000	BRANDON et VAN BOEKEL MOL 1973

Tableau 3 : Poids moléculaires d'enzymes
maliques d'origines diverses.

		30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
1.	Enzyme seule DO % inhibition	0,199 0	0,203 0	0,192 4 %	0,162 19 %	0,100 50 %	0,005 97,5 %
2.	Enzyme MnSO4 % inhibition	0,210 0	0,188 6 %	0,192 4 %	0,138 31 %	0,089 90,5 %	0 100 %
3.	Enzyme + MgCl2 5mn % inhibition	0,200 0	0,197 1,5 %	0,185 7,5 %	0,132 34 %	0,092 54 %	0 100 %
4.	Enzyme + malate 10mn % inhibition	0,200 0	0,200 0	0,182 9 %	0,180 10 %	0,143 28,5 %	0,05 75 %

Tableau 4 : Influence de la température sur l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis.

Le dosage est précédé d'une préincubation de 3' de la solution enzymatique en présence ou non de différents effecteurs.

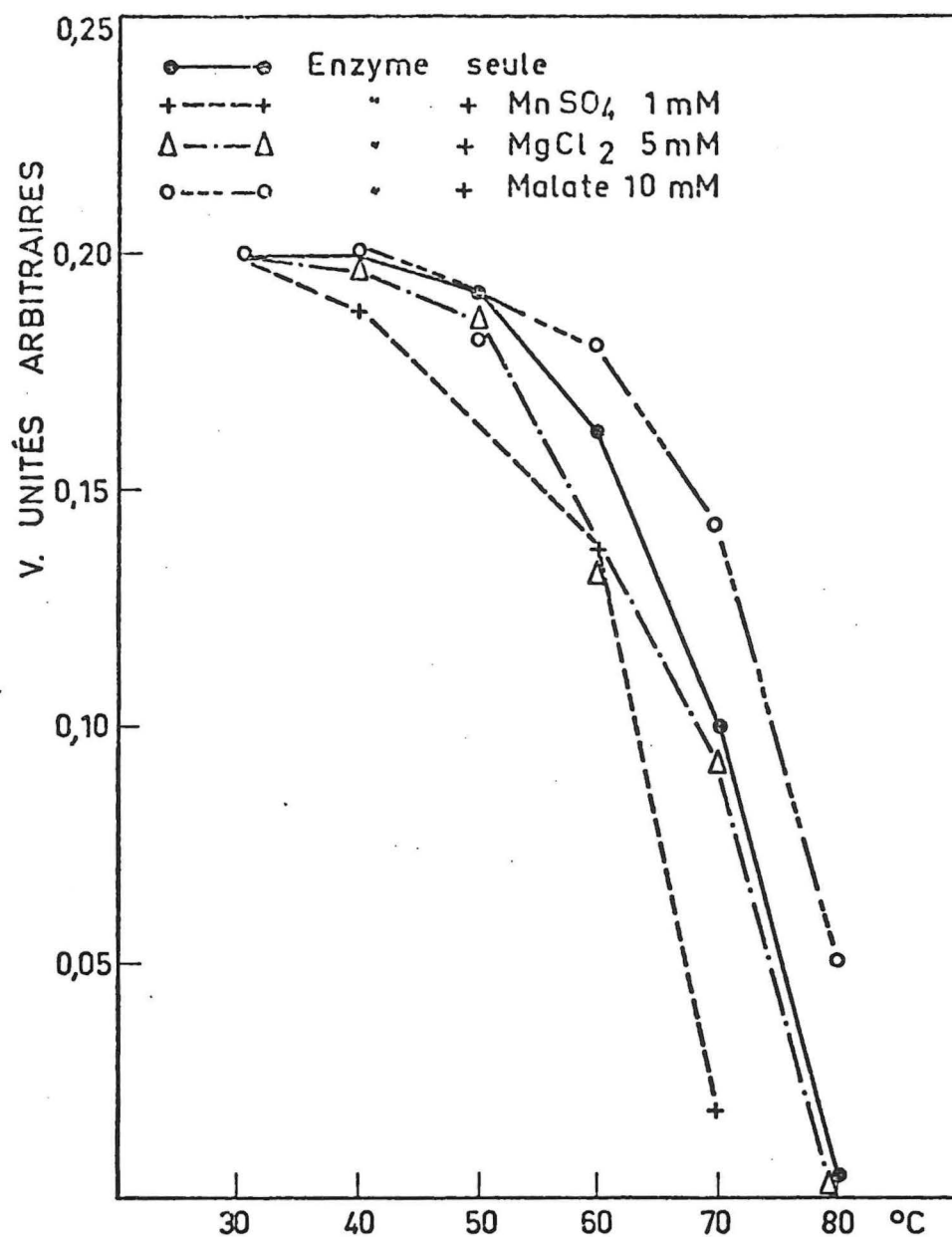


Figure 7 :

Action de la température sur l'activité de l'enzyme malique du latex d' *Hevea brasiliensis*, en présence ou non des ions activateurs ou de malate.

5.2.2. Energie d'activation de la réaction catalysée par l'enzyme.

L'énergie d'activation de la réaction catalysée par l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis a été mesurée par le dosage des produits formés après incubation à différentes températures (§ matériel et techniques). Le milieu réactionnel est composé de tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; Malate 10 mM ; MnSO_4 1 mM ; MgCl_2 5 mM ; NADP 0,7 mM.

Une fraction de 3 ml de ce mélange est prélevée et mise à la température désirée. Lorsque celle-ci est atteinte dans le milieu, la réaction est démarrée par l'enzyme purifiée. Après 10' d'incubation, 1 ml est prélevé et acidifié immédiatement par du PCA 6 N. Après neutralisation et centrifugation, le pyruvate qui a été formé est dosé sur le surnageant.

Le tableau 5 ci-après rend compte des résultats obtenus.

5.3. Substrats et cofacteurs de la réaction.

La réaction catalysée par l'enzyme malique est proportionnelle à la quantité d'enzyme introduite dans le milieu et au temps de la réaction.

Pour l'enzyme purifiée, il a été vérifié que les quantités de substrats utilisées correspondaient bien aux quantités de produits formés.

5.3.1. Sens de la réaction.

L'enzyme peut fonctionner dans les deux sens soit vers la décarboxylation du malate en pyruvate, soit vers la production de malate à partir du pyruvate.

Toutefois, cette dernière réaction, dans nos conditions expérimentales, représente toujours moins de 10 % de l'activité inverse.

Substrats Cations	Malate $\longrightarrow$ Pyruvate	Pyruvate $\longrightarrow$ Malate
	NADP 0,13 mM Malate 5 mM	NADPH 0,13 mM Pyruvate 5 mM NaHCO_3 10 mM
O	0,0224	0,0016
+ 1 mM Mg^{2+}	0,0550	0,0027
+ 1 mM Mn^{2+}	0,0755	0,0074

Tableau 6 : Fonctionnement de l'enzyme malique dans un tampon TES à pH 6,85, 0,1 M.

10 minutes	4°C	9°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
1/T273	0,00361	0,00355	0,00347	0,00341	0,00336	0,00330	0,00325	0,00319
Δ DO	0,012	0,030	0,033	0,075	0,068	0,098	0,145	0,190
μ moles pyruvate formées m_n^{-1}	0,0016	0,0040	0,0045	0,0101	0,0092	0,0132	0,0196	0,0257
Log. pyruvate formé	$\bar{2},80$	$\bar{2},40$	$\bar{2},35$	$\bar{1},99$	$\bar{2},04$	$\bar{1},88$	$\bar{1},71$	$\bar{1},59$

Tableau 5 : Influence de la température sur la vitesse de réaction catalysée par l'enzyme malique.

Le coefficient d'énergie d'activation de la réaction catalysée par l'enzyme malique a été évaluée à $11 \text{ K cal. mole}^{-1}$ (§ Figure 8)

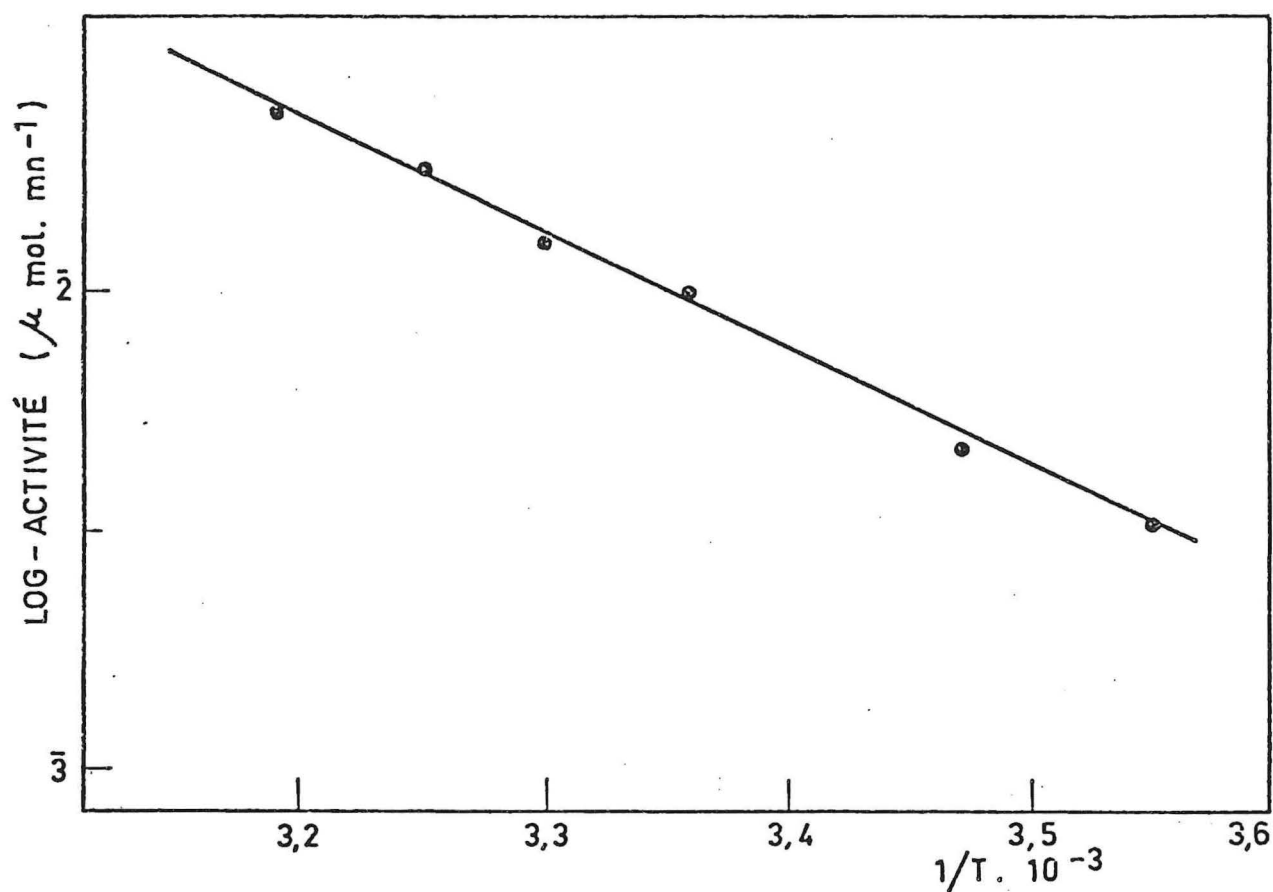


Figure 8 : Energie d'activation de la réaction catalysée
par l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis.

Pour une même quantité d'enzyme et pour des concentrations analogues de substrats (10 mM), de cofacteurs (0,25 mM) et de cations Mg^{2+} et Mn^{2+} (1 mM), le rapport d'activité dans le sens malate-pyruvate sur l'activité dans le sens inverse, ne descend jamais au-dessous de 10, quel que soit le pH (§ Figure 9).

L'addition de succinate (jusqu'à 10 mM) au milieu réactionnel ne modifie en aucun cas la vitesse de réaction dans un sens ou dans l'autre.

Sauf exception (STOREY et al, 1975), la réaction catalysée par l'enzyme malique est réversible ; c'est le cas dans le latex. Toutefois, l'équilibre réactionnel est en faveur de la décarboxylation du malate (RUTTER et LARDY, 1958). DAVIES et al. (1974) indiquent pour l'enzyme de pomme de terre, à pH 7,6, un rapport d'activité potentiel de 4 en faveur de la production de pyruvate. SHIMERLIK et CLELAND (1977, pour l'enzyme de foie de pigeon, notent un rapport de 3,3 à pH 7,2 ; FRENQUEL (1972 a), un rapport de 5 chez l'isoenzyme cytosolique du coeur de boeuf. Par contre, ce même auteur trouve une valeur très élevée (100) chez l'isoenzyme mitochondriale du même tissu (1972 b), et chez Trypanosoma cruzi (CAZZULO et al, 1977) elle est estimée à 40.

Une valeur également élevée, toujours plus grande que 10 et pouvant être supérieure à 30 à pH 7,5, est trouvée dans le cas du latex. Comme DAVIES et PATIL (1974), nous pensons qu' in situ cette valeur est encore plus forte et que probablement l'enzyme malique ne fonctionne et ne peut fonctionner efficacement que vers la production de pyruvate et de NADPH. Cette orientation physiologique à "quasi" sens unique est importante dans la mesure où elle joue un rôle dans le fonctionnement du "système pH stat" proposé par DAVIES (1973) et, dans le sérum C, où elle pourvoit essentiellement la régénération de NADPH nécessaire à la biosynthèse du caoutchouc.

5.3.2. Cations activateurs.

A première vue, ni le Mg^{2+} , ni le Mn^{2+} ne sont indispensables au fonctionnement de l'enzyme purifiée, mais leur addition - surtout celle du Mn^{2+} - accélère fortement la réaction dans un sens ou dans l'autre (§ Tableau 6).

Des auteurs (PARVIN et al, 1964 ; GARNIER-DARDART et QUEIROZ, 1974 ; COOMBS et al, 1973 ; SESHADRI et al, 1978) notent la nécessité absolue de Mn^{2+} ou de Mg^{2+} pour que l'enzyme malique soit active. Des résultats présentés ultérieurement montrent que la décarboxylase du latex doit fixer suffisamment un cation activateur, probablement du Mn^{2+} , pour qu'il ne soit pas totalement perdu lors de la purification, et puisse conserver à l'enzyme une certaine activité.

En outre, il faut remarquer (Tableau 7) la non efficacité du CO_3^{2+} , alors que chez d'autres enzymes maliques (PARVIN et al, 1964 ; DILLEY, 1966 ; CAZZULO et al, 1977), ce cation peut remplacer Mn^{2+} ou Mg^{2+} .

Le Mn^{2+} , enfin, semble inhibiteur à forte concentration, mais cette condition ne se trouvera jamais au plan physiologique au sein du latex.

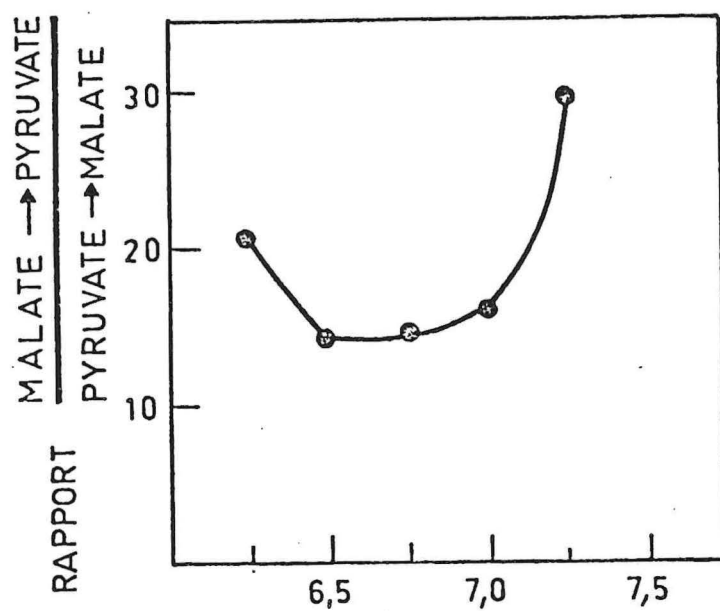


Figure 9 :

Rapport d'activité de la décarboxylation sur la synthèse du malate par l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis à différents pH.

Cations	Activations en % d'une teneur fonctionnant sous cations	
	Concentrations mM	
	1	10
Mg SO ₄	93	93
Mn SO ₄	123	79
Co Cl ₂	1	18

Tableau 7 :

Influence du Mg²⁺ Mn²⁺ et CO²⁺ sur l'activité de
l'enzyme purifiée du latex d' hévéa.

Tampon TEA, pH 7,5 ; malate 5 mM ; NADP 0,7 mM.

Contrairement à l'enzyme de la poire (DROUET et HARTMAN, 1977), le Mg^{2+} n'est pas inhibiteur pour des concentrations atteignant 10 mM.

5.3.3. Cofacteur de la réaction.

Une autre expérience (Tableau 8) montre que l'enzyme n'est pas absolument spécifique du NADP, mais elle n'utilise le NAD que difficilement, quel que soit le pH du milieu.

Cofacteur	x pH 7,5	xx pH 5,5
NADP 2 mM	0,182	0,016
NAD 2 mM	0,0075	0,0025
Rapport NADP/NAD	4,1 %	15,6 %

Tableau 8 : Spécificité de l'enzyme malique pour son cofacteur

x Tampon TEA 0,1 M
xx Tampon acetate 0,1 M

L'utilisation du NAD par l'enzyme malique pose le problème de l'existence conjointe des deux types de carboxylases fonctionnant soit avec le NAD (EC 1.1.1.38) ou le NADP (EC 1.1.1.40). Cette association a été notée chez les plantes C_3 et C_4 (DITTRICH, 1976). Ce n'est pas le cas pour le latex d'hévéa qui ne contient qu'une seule enzyme malique (EC 1.1.1.40) localisée dans son sérum cytoplasmique.

Certains auteurs ont noté des enzymes maliques strictement spécifiques du NADP (RUTTER et LARDY, 1958 ; DAVIES et PATIL, 1974). D'autres, pourtant, ont montré, comme dans nos travaux, une certaine activité de la carboxylase en présence de NAD, activité qui peut atteindre 20 % de celle induite par le NADP (PUPILLO et BOSSI, 1979 ; HATCH et MAU, 1977).

Toutefois, dans le latex, si l'enzyme malique n'est pas totalement spécifique du NADP, son activité due au NAD du milieu doit être négligeable et le NADP peut être considéré comme son seul cofacteur physiologique.

5.3.4. L'oxaloacétate.

Beaucoup - sinon la plupart - des enzymes maliques de diverses origines ont été rapportées comme étant susceptibles de décarboxyler aussi l'oxaloacétate, cette dernière réaction ayant un optimum de pH acide et différent de celui caractérisant l'utilisation du malate (HSU et al, 1967 ; JOHNSON et HATCH, 1970 ; KUN, 1963 ; MUAKE FUMIO et al, 1977 ; DITTRICH, 1976 ; DILLEY, 1966 ; HARARY et al, 1953).

En ce qui concerne l'enzyme malique du latex, l'acide oxaloacétique ne peut en aucun cas servir de substrat en remplacement du malate, que ce soit à pH acide (5,5 en tampon acétate) ou à pH plus alcalin (7,5 en tampon TEA). Elle est donc à ce titre un peu à part, comme celle de Mycobacteria smegmatis (SESHADRI et al, 1978).

5.3.5. Influence de différents tampons sur l'activité de l'enzyme. (§ Tableau 9).

L'essai de différents tampons montre que le TEA, le Tris-HCl et l'HEPES sont équivalents. Par contre, le cacodylate est quelque peu inhibiteur et le TES, en présence de Mn^{2+} paraît activer légèrement l'enzyme.

Tampons 0,1 M à pH 7,5	- Mn^{2+}	+ Mn^{2+} 1 mM
TEA	0,034	0,120
Tris-HCl	0,030	0,135
HEPES	0,038	0,121
TES	0,039	0,171
Cacodylate	0,020	0,105

Tableau 9 : Essai de l'enzyme malique dans différents tampons.

Le tampon phosphate, qui donne un précipité en présence de Mn^{2+} n'a pu être utilisé.

5.4. Conservation de l'enzyme malique.

Des solutions enzymatiques non purifiées (sérum C filtré sur Sephadex G.50) et purifiées ont été conservées 2 mois à 4°C en présence ou non de 1 mM de Mn^{2+} .

Le tableau 10 indique que le Mn^{+2} est un élément protecteur de l'activité enzymatique.

Tampon TEA 0,05 M pH 7,5	Enzyme brute (11 mg l ml ⁻¹)		Enzyme purifiée (0,4 mg l ml ⁻¹)	
	+ Mn^{2+}	- Mn^{2+}	+ Mn^{2+}	- Mn^{2+}
Perte d'activité en % après 2 mois de conservation à 4°C.	0	18	52	69

Tableau 10 : Conservation de l'enzyme malique purifiée ou non.

L'enzyme malique purifiée s'inactive beaucoup plus facilement que l'enzyme brute. La différence de concentration protéique peut expliquer en partie ce phénomène.

A 15°C l'enzyme non purifiée se conserve aussi bien qu'à 4°C. Elle est donc relativement stable, comme le notent PUPILLO et BOSSI (1979) pour la décarboxylase de la feuille de maïs, surtout en présence d'EDTA de MSH et de NADP. NUMATA NORIO, 1975 indique aussi l'effet protecteur des groupes SH en présence de Mg^{2+} seulement, et celui du NADP contre l'inactivation par dilution.

5.5. Influence du pH sur l'activité enzymatique.

5.5.1. Dans le sens Malate $\longrightarrow$ Pyruvate.

Il est apparu que la teneur en malate pouvait modifier l'optimum de pH de la réaction. La figure 10 montre clairement qu'une augmentation de la concentration en substrat décale vers la zone alcaline le point d'activité maximal. En outre, elle accentue nettement les pentes de ce même pic d'activité.

Compte tenu de la teneur en malate du sérum cytoplasmique (RIBAILLIER, 1972) supérieure à 10 mM, l'optimum réactionnel de l'enzyme malique se trouvera vraisemblablement au-delà de pH 7,4.

Il faut noter qu'entre les pH extrêmes du sérum cytoplasmique : 6,4 et 7,4 (BRZOZOWSKA et al, 1979) et pour des concentrations en malate analogue à celle du latex, l'activité potentielle de l'enzyme malique varie beaucoup. Dans nos conditions expérimentales, elle passe en effet de 0,014 à 0,036. Il est donc possible que dans certaines conditions, les modifications de pH soient un facteur de régulation de cette activité enzymatique, non négligeable.

5.5.2. Dans le sens Pyruvate $\longrightarrow$ Malate.

Avec une concentration en pyruvate et de $NaHCO_3$ de 10 mM, en présence de 0,25 mM de NADPH, de 1 mM de $MnSO_4$ et 2 mM de $MgCl_2$, l'optimum de pH se trouve situé vers 7,15 (§ Fig. 11).

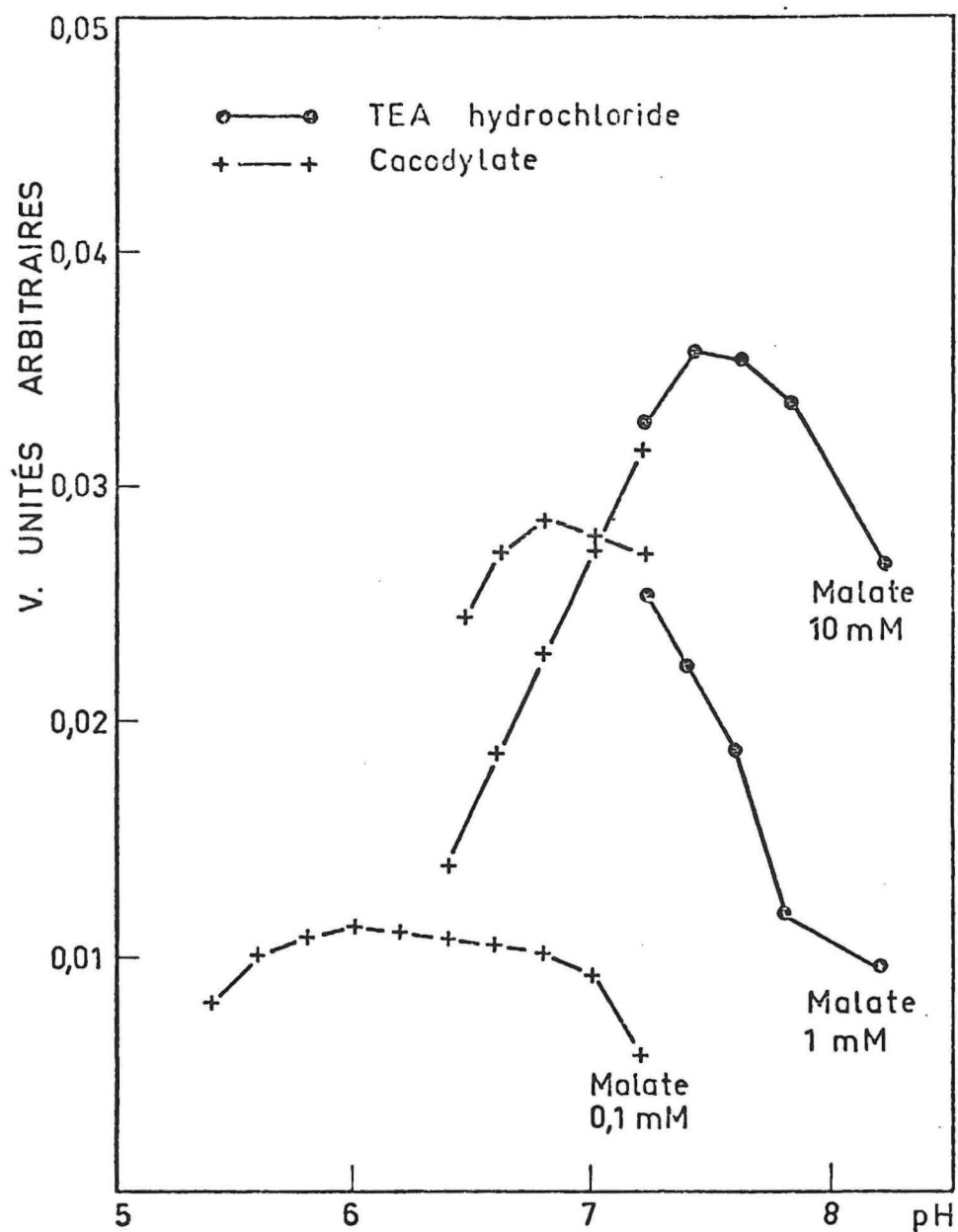


Figure 10 :

Activité de l'enzyme malique du latex d'Hevea brasiliensis en fonction du pH et de la concentration en malate.

NADP 0,7 mM ; Mn SO₄ 1 mM.

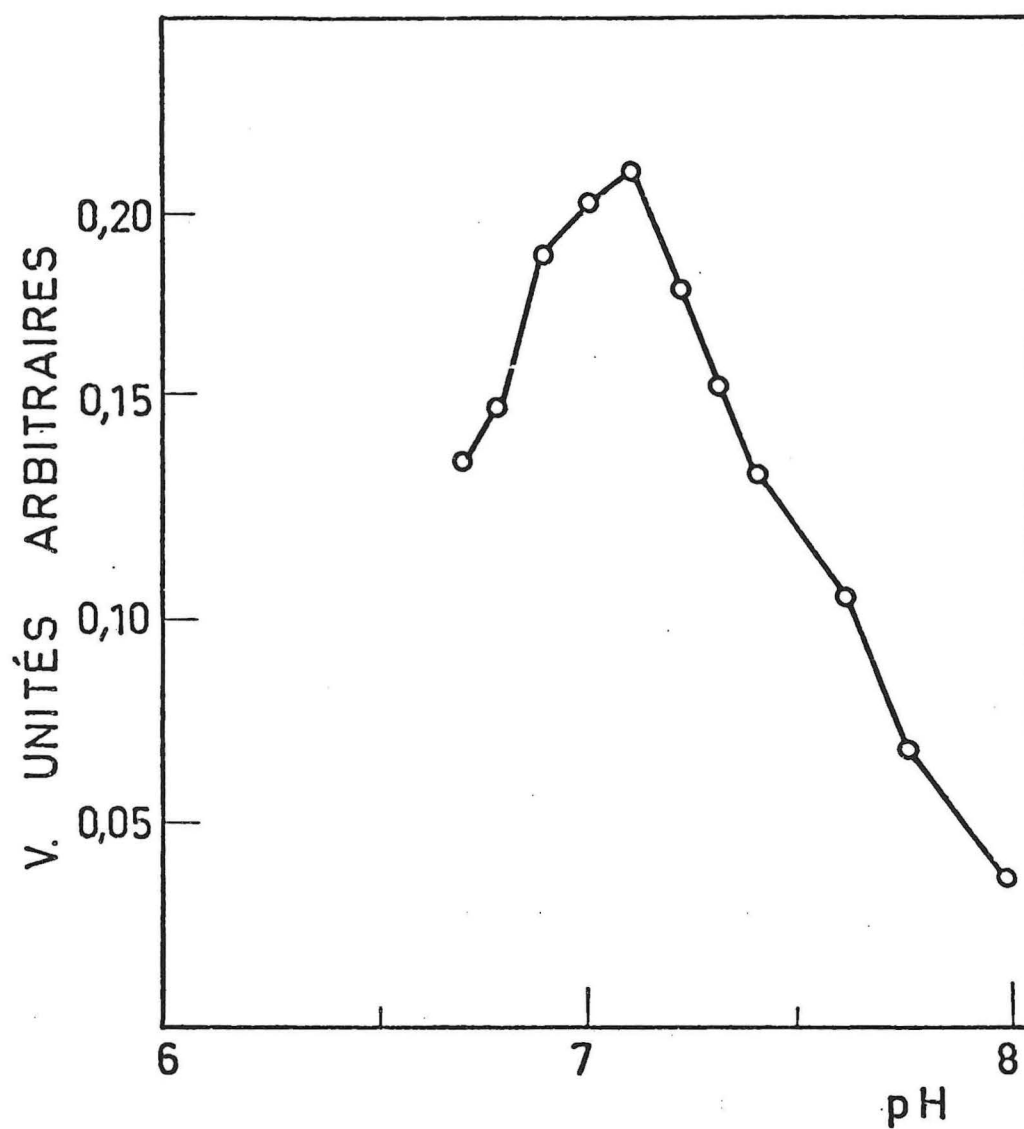


Figure 11 :

Activités de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis
en fonction du pH dans le sens de la synthèse de malate.

Pyruvate 10 mM ; NaH CO₃ 10 mM ; MnSO₄ 2 mM ;
MgCl₂ 2 mM.

L'optimum de pH de l'enzyme malique est très variable selon ses provenances.

Ainsi, il a été estimé à 6,8-7,0 chez le muscle d'écrevisse (STOREY et al, 1975), 7,5 chez les langoustes (SKORKOWSKI et al, 1977) et le Bombyx morri (MUAKE FUMIO et al, 1977). Il atteint 8,5 chez le Trypanosoma cruzi (CAZZULO et al, 1977).

Même variation pour les enzymes issues du règne végétal où il est mesuré à 6,5 chez les isoenzymes d'opuntia (MUKERJI et TING, 1968), 7,0-7,2 chez Bryophyllum tubiflorum (BRANDON et al, 1973), 8,0 chez l'enzyme malique de la feuille de blé (PERSANOV, 1976b)

La valeur de 8,8 est même donnée pour un micro-organisme (Mycrobacterium smegmatis (SESHADRI et al, 1978).

Toutefois, les résultats obtenus au cours de ce travail, montrent que les conditions du milieu de fonctionnement peuvent aussi beaucoup influencer sur cet optimum de pH, notamment la concentration malique du milieu, lorsque la réaction va dans le sens de la décarboxylation. Ceci recoupe les travaux d'un certain nombre d'auteurs (WALKER, 1960 ; JOHNSON et HATCH, 1970 ; DILLEY, 1966 ; DAVIES et PATIL, 1974 ; GARNIER-DARDART et QUEIROZ, 1974) qui notent, eux aussi, un déplacement de l'optimum vers une zone plus alcaline, lorsque la teneur en malate augmente.

Les concentrations en malate dans le sérum C du latex étant supérieures à 8 mM, on peut penser que l'optimum de pH se trouvera vers 7,4-7,5, valeur la plus élevée que peut avoir un sérum cytoplasmique de latex (BRZOZOWSKA et al, 1979).

5.6. Affinités de l'enzyme malique pour les substrats, cofacteurs et cations nécessaires à son fonctionnement.

5.6.1. Affinités pour Mg^{2+} et Mn^{2+} .

L'enzyme malique purifiée du latex peut fonctionner sans apport ni de Mg^{2+} ni de Mn^{2+} ; il est cependant nécessaire d'ajouter l'un ou (et) l'autre au milieu pour que son activité soit maximale.

Les figures 12 et 13 rendent compte d'une expérience faisant intervenir l'EDTA qui est un puissant chélatant des cations divalents.

Dans un milieu sans Mn^{2+} ni Mg^{2+} , de l'EDTA est ajouté en quantité croissante, et provoque une diminution de la vitesse initiale de la réaction. Dans nos conditions expérimentales, l'activité est pratiquement nulle en présence de $10 \mu M$ d'EDTA.

A cet instant, l'addition de $MnSO_4$ réactive progressivement l'enzyme malique. Elle retrouve pratiquement sa vitesse initiale de réaction, lorsque $10 \mu M$ de Mn^{2+} ont été injectés dans le milieu. Dans des conditions analogues, le Mg^{2+} réactive aussi l'enzyme, mais la vitesse initiale n'est retrouvée qu'en présence de 0,5 mM du cation.

HOECK et al, (1976) trouvent également qu'il faut 100 fois plus de Mg^{2+} que de Mn^{2+} pour que l'enzyme malique montre une activité équivalente.

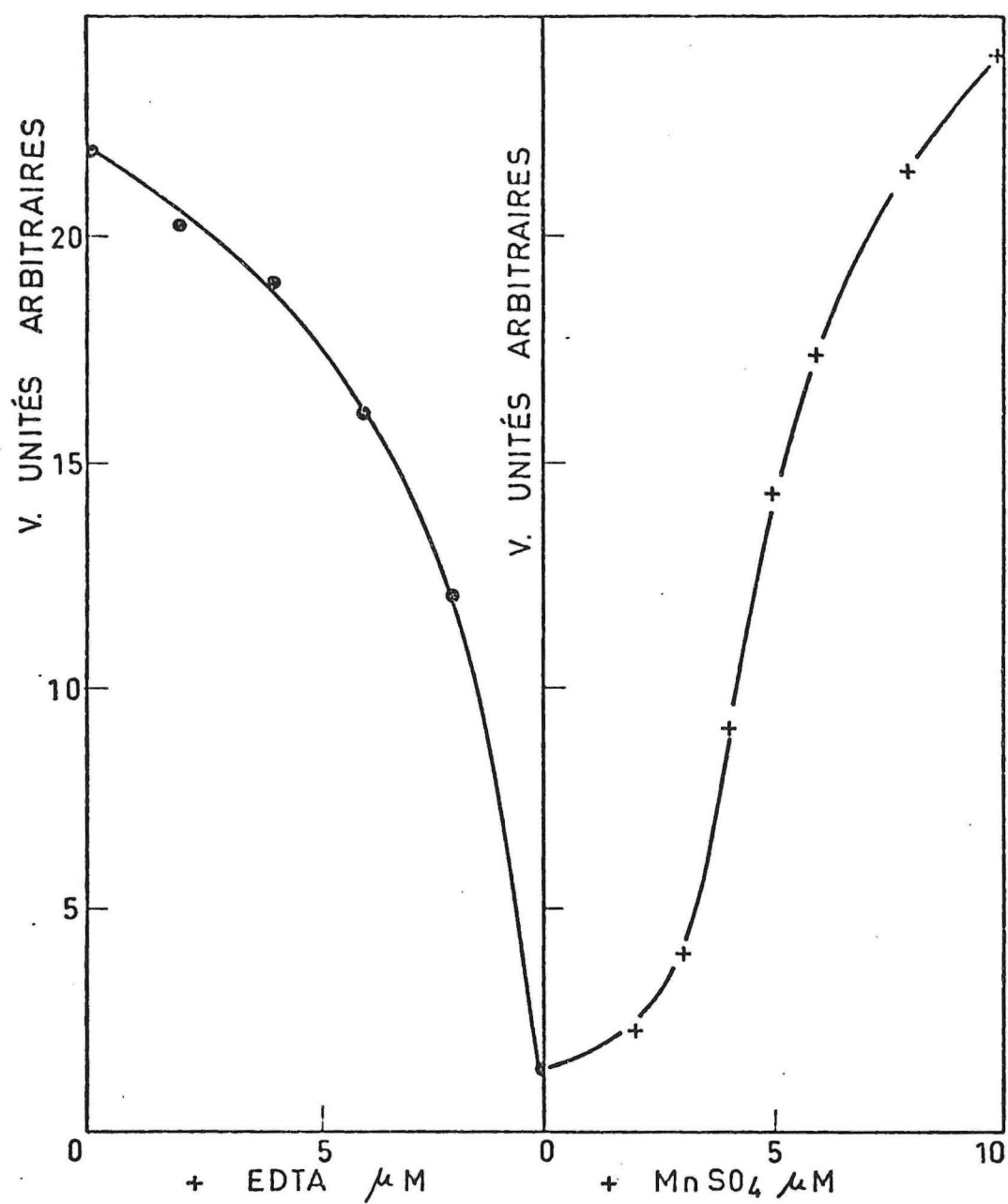


Figure 12 : Inactivation de l'enzyme malique par l' EDTA et réactivation par MnSO_4 en Tampon TEA 0,1M, pH 7,50, malate 5 mM, NADP 0,7 mM.

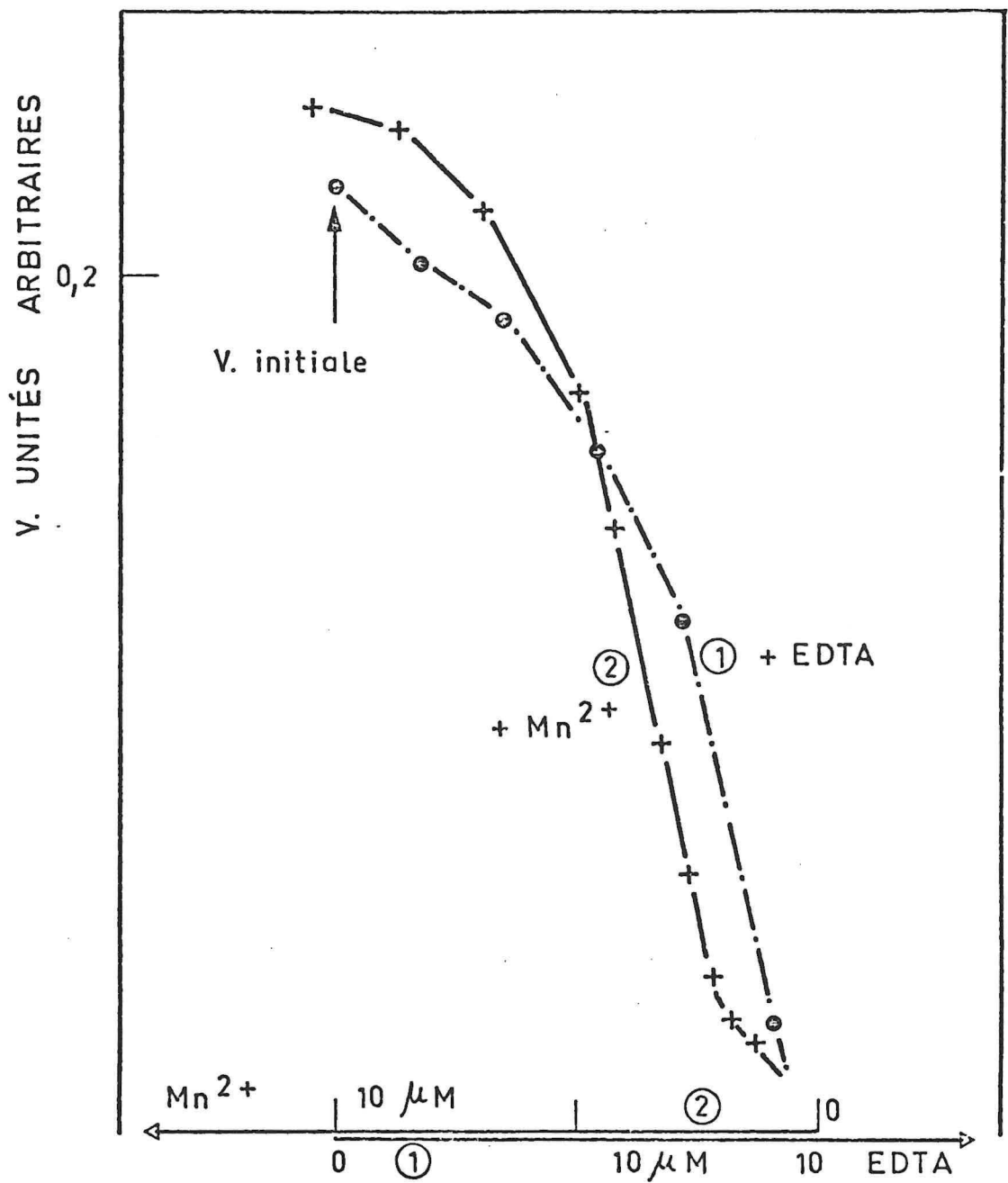


Figure 13 :

Désactivation de l'enzyme malique par addition d' EDTA (1),
et réactivation de la réaction par adjonction de $MnSO_4$ (2).
Tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; malate 5 mM ; NADP 0,7 mM.

Il est possible d'imaginer que l'enzyme purifiée contienne encore des cations, ce qui expliquerait son fonctionnement en absence de Mg^{2+} . L'EDTA en chelatant ce cation - relativement accessible - inactiverait l'enzyme malique. Toutefois, il est très difficile d'obtenir une inactivation absolue.

La vitesse optimale de la réaction est obtenue avec le Mn^{2+} ; la vitesse en présence de quantité saturante de Mg^{2+} ne représente en effet que 60 % de celle induite par Mn^{2+} .

Cette caractéristique que l'on retrouve, notée par différents auteurs (DROUET et HARTMANN, 1977 ; DILLEY, 1966 ; DAVIES et al, 1974 ; GARNIER-DARDART et QUEIROZ, n'est pourtant pas générale puisque JOHNSON et HATCH (1970) ont montré que le Mg^{2+} avait une plus grande efficacité que le Mn^{2+} pour le fonctionnement de l'enzyme malique des feuilles de maïs.

L'affinité de l'enzyme malique pour le Mn^{2+} est extrêmement élevée. Le K_m apparent du cation se situe en effet vers $5 \mu M \pm 2 \mu M$ seulement (Figure 14). Cette mesure est faite à partir d'une enzyme inactivée par une quantité adéquate d'EDTA.

Par contre, le K_m apparent du Mg^{2+} (§ Fig. 15) est très différent puisqu'il a été estimé à $0,6 \pm 0,10$ mM.

Le tableau 11 montre que l'addition de quantité croissante de Mg^{2+} à un milieu contenant déjà $5 \mu M$ de Mn^{2+} , aboutit dans un premier temps à une accélération de la vitesse réactionnelle. Cette accélération correspond probablement à une activation des molécules enzymatiques qui ne l'étaient pas encore. Dans un second temps, une certaine diminution de l'activité est observée. La teneur de Mg^{2+} (cation moins efficace) est alors suffisamment importante pour remplacer le Mn^{2+} par compétition au niveau du site enzymatique, et par conséquent expliquer cette décélération du fonctionnement.

Mg Cl_2 mM	100	200	500	1000
Mn Cl_2 μM	5	5	5	5
Activité en $U\ ml^{-1}$	0,128	0,144	0,131	0,114

Tableau 11 : Influence du rapport Mg^{2+}/Mn^{2+} sur l'activité de l'enzyme malique.

Un rapport trop élevé Mg^{2+}/Mn^{2+} (≥ 100 dans nos conditions expérimentales) peut donc entraîner une certaine diminution de l'activité potentielle de l'enzyme malique.

Les données brutes de teneurs en Mg^{2+} et Mn^{2+} du sérum C donnent des rapports de cet ordre de grandeur (JACOB et PREVOT, non publiés).

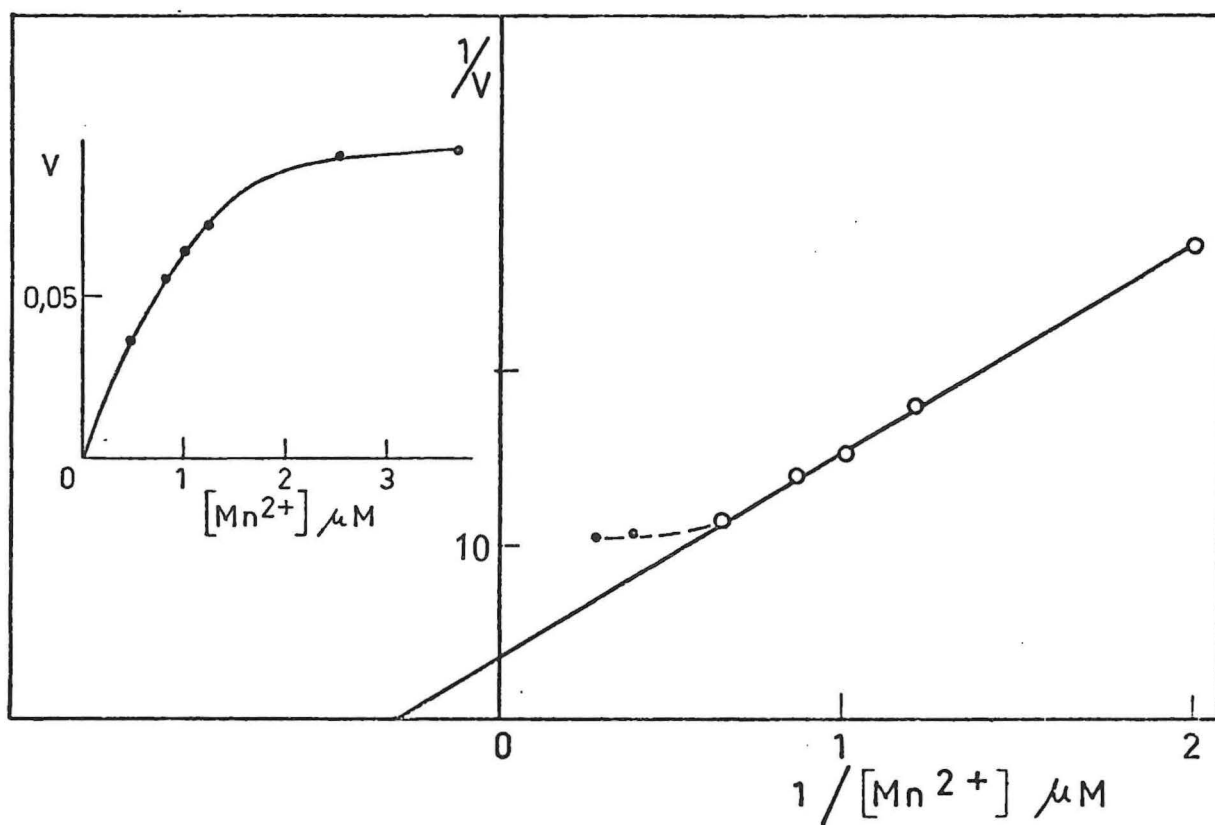


Figure 14 :

Affinité de l'enzyme malique pour le $MnSO_4$ après inactivation par l' EDTA.

Tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; malate 5 mM ; NADP 0,7 mM.

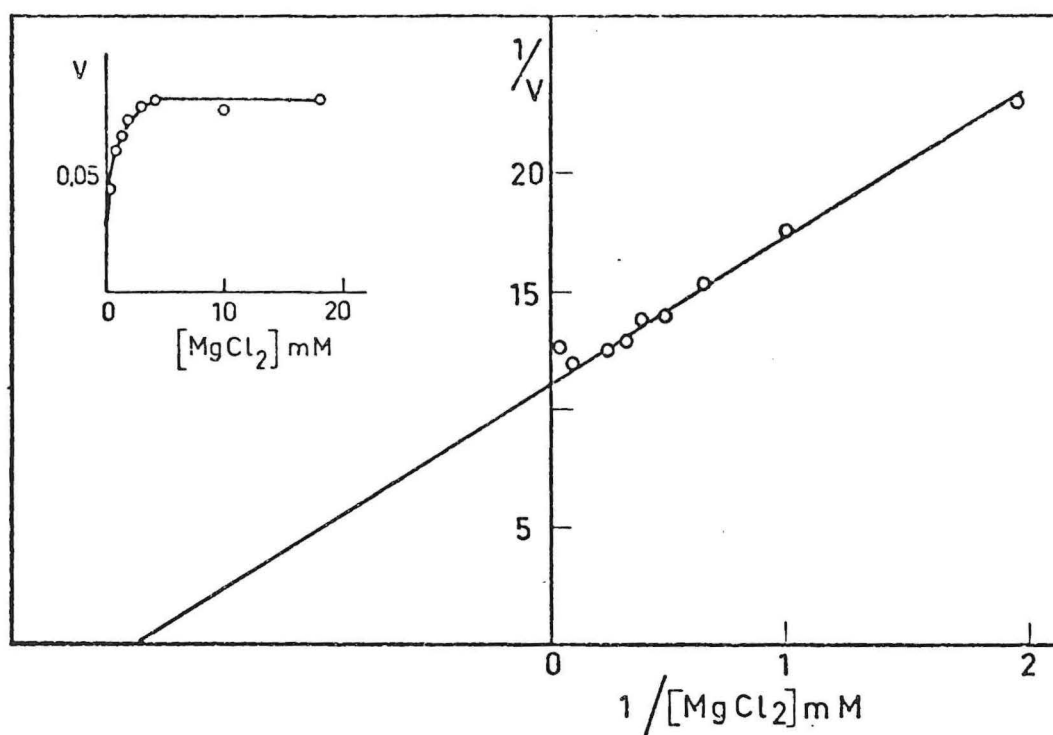


Figure 15 : Affinité de l'enzyme malique pour le $MgCl_2$.
 Tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; malate 5 mM ;
 NADP 0,7 mM.

A l'exception, toute relative d'ailleurs, du $K_m \text{Mn}^{2+}$ de l'enzyme malique de la pomme (DILLEY, 1966 supérieur à $90 \mu\text{M}$, les valeurs trouvées pour ce paramètre sont en général inférieures à $20 \mu\text{M}$ (COOMBS et al, 1973 ; DROUET et HARTMAN, 1977 ; JOHNSON et HATCH, 1970 ; DAVIES et PATIL, 1974 ; SKORSKOWSKY, 1977) et confirment la très grande affinité de la décarboxylase pour le cation.

Par ailleurs, les données de la littérature montrent aussi, comme dans le cas de l'enzyme de pomme de terre (DAVIES et PATIL, 1974) que l'affinité pour le Mg^{2+} est bien plus faible que pour le Mn^{2+} (160 fois en l'occurrence), et du même ordre de grandeur que celle caractérisant la décarboxylase du latex ($K_m : 800 \mu\text{M}$). Il faut pourtant noter un " $K_m \text{Mg}^{2+}$ " de $55 \mu\text{M}$ rapporté par JOHNSON et HATCH (1970) chez l'enzyme de feuille de maïs.

5.6.2. Affinités pour les substrats et les cofacteurs.

L'équilibre de la réaction est déplacée vers la production de pyruvate. La constante d'équilibre a été estimée à $4,4 \times 10^{-2}$; elle est proche de celle trouvée par RUTTER et LARDY 1958 pour l'enzyme de foie de pigeon ($5,1 \times 10^{-2}$).

5.6.2.1. Réaction orientée vers la production de pyruvate.

A pH 7,5 et à saturation de cofacteur, l'affinité pour le malate n'est pas la même en présence de Mg^{2+} ou de Mn^{2+} (§ Figure 16). Le K_m de ce substrat atteint 2 mM avec Mg^{2+} . Il n'est plus que de 0,60 mM $\pm$ 15 mM avec Mn^{2+} . La présence conjuguée des 2 cations donne un résultat intermédiaire. Ce phénomène résulte probablement de la différence d'affinité de l'enzyme pour Mn^{2+} et Mg^{2+} , et de la part qu'ils prennent dans la fixation "E-S".

En conditions semblables (pH optimum et saturation en malate), des résultats analogues sont observés pour le NADP. Avec le seul Mn^{2+} , le K_m du cofacteur est de l'ordre de $35 \mu\text{M} \pm 10 \mu\text{M}$. Le Mg^{2+} le fait passer à $125 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ (Figure 17).

L'influence de la nature du cation sur l'affinité de l'enzyme malique pour la malate ou le NADP a également été citée par PERSANOV, (1976b, enzyme de la feuille de blé), CAZZULO et al (1977, enzyme de *Trypanosoma cruzi*), PUPILLO et BOSSI (1979, enzyme de la feuille de maïs).

Ce phénomène - s'il n'a probablement pas d'importance physiologique pour la décarboxylase du latex en ce qui concerne le malate - peut, par contre, en avoir une, non négligeable, pour ce qui est du NADP. En effet, la faible concentration du cofacteur dans le sérum C (ARCHER et al, 1969 ; JACOB, 1970 et résultats non publiés) implique qu'il peut être facteur limitant de la réaction, et que l'activité de l'enzyme malique sera d'autant plus freinée par une faible teneur en NADP que son affinité pour lui aura tendance à être également plus faible.

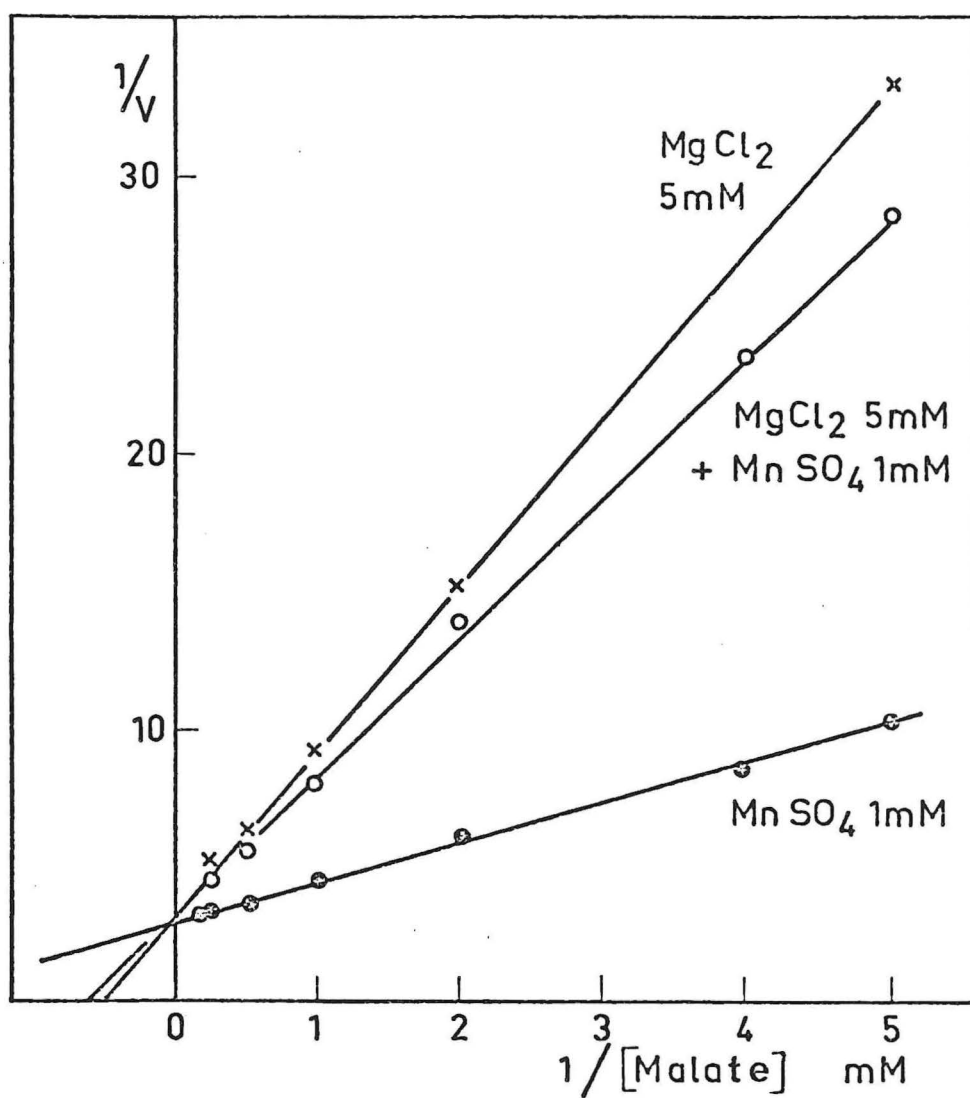


Figure 16 :

Affinité de l'enzyme malique du latex d' *Hevea brasiliensis* pour le malate, en présence des cations activateurs.

Tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; NADP 0,7 mM.

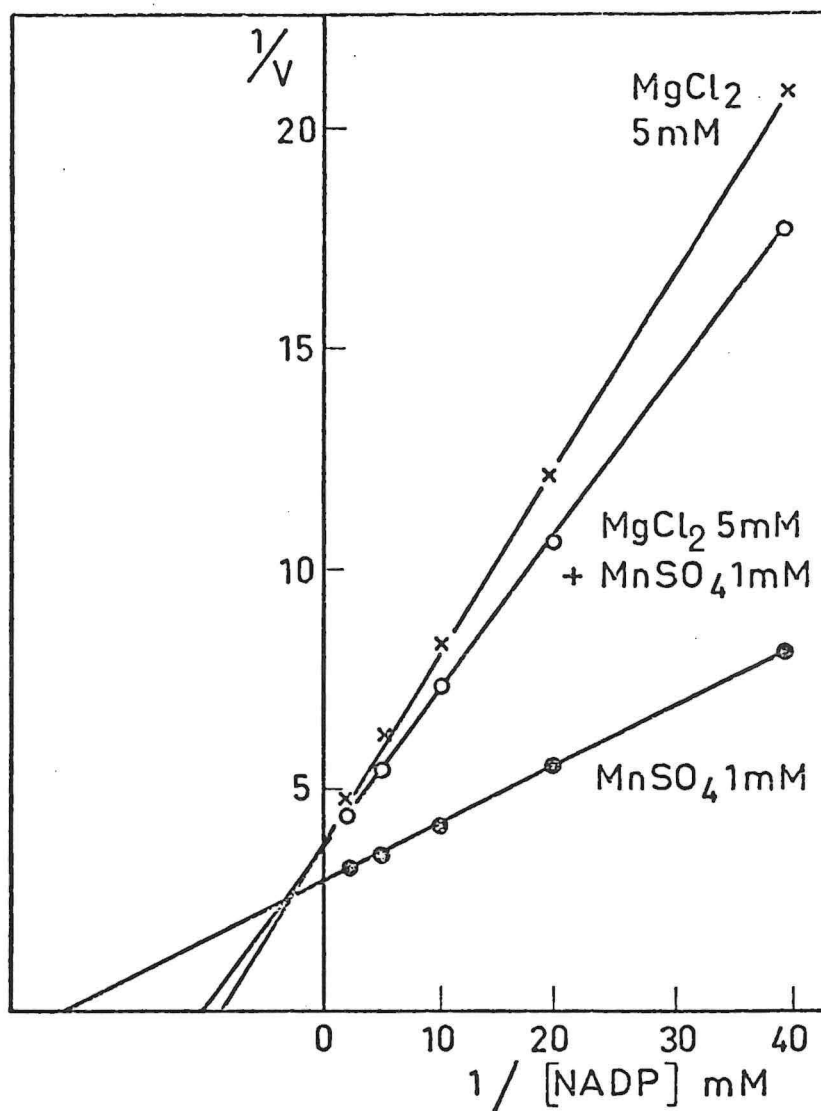


Figure 17 :

Affinité de l'enzyme malique pour le NADP, en présence des cations activateurs.

Tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; malate 5 mM.

Comme le montrent le tableau 12 et les figures 18 et 19, il n'y a pas de modification extrêmement importante de l'affinité de l'enzyme malique du latex pour le malate, dans les limites de variations de pH du sérum C : 6,6 à 7,4 en l'occurrence (BRZOZOWSKA et al, 1979), et en fonction de la teneur en cofacteur. Les différences de K_m pour le NADP sont un peu plus accentuées.

pH	Km Malate - mM		Km NADP - mM	
	NADP (1 mM)	NADP (0,1 mM)	Malate (10 mM)	Malate (1 mM)
pH 7,4	0,58	0,68	0,017	0,029
pH 6,6	0,70	0,40	0,029	0,022

Tableau 12 : Affinités de l'enzyme malique en fonction du pH et de la concentration en substrat et en cofacteur.
Tampon Tris maleate 0,1 M - $MnSO_4$ 1 mM.

Les valeurs du "Km NADP" de l'enzyme malique rapportées dans la littérature, sont toujours faibles. Elles sont parfois de l'ordre de quelques μ M seulement, surtout pour les décarboxylases d'origine animale.

Les "Km malate" sont dans tous les cas beaucoup plus élevés ; le rapport de leur valeur sur celle des Km NADP correspondant est, en général, fort ; estimé entre 20 et 30 pour l'enzyme du latex, il peut atteindre parfois plus de 130 chez Bryophyllum (GARNIER-DARDART et QUEIROZ, 1974), et même 200 chez Opuntia (MUKERJI et TING, 1968).

Un certain nombre d'auteurs ont montré que le pH était susceptible de modifier l'affinité de l'enzyme malique pour le malate et le NADP (JOHNSON et HATCH 1970, HARTMAN et al 1977, PUPILLO et BOSSI 1979, DAVIES et PATIL 1974, GARNIER-DARDART et QUEIROZ 1974).

JOHNSON et HATCH, 1970 ont montré l'effet inhibiteur de l'acide malique sur l'enzyme de feuille de maïs, lorsque à pH 7,0 sa teneur est supérieure à 1 mM. Ce phénomène, noté également par PARVIN et al (1964) se retrouve très atténué pour la carboxylase du latex, et seulement à pH acide. Ainsi, à pH 6,6, 10 mM d'acide malique induisent une inhibition de 30 % par rapport à l'activité optimale obtenue vers 1,5-2 mM.

En outre, contrairement aux enzymes maliques de la feuille étiolée de maïs (PUPILLO et BOSSI, 1979) dont les Kms sont indépendants des concentrations des autres substrats de la réaction, le tableau fait ressortir une certaine variation du Km NADP et malate, en fonction de la teneur respective en diacide et en cofacteur.

Il apparaît que l'affinité la plus forte de l'enzyme du latex pour le cofacteur se situe à pH 7,4 pour 10 mM de malate, teneur physiologique du sérum cytoplasmique (RIBAILLIER et al, 1971).

Une remarque importante doit être faite sur l'apparition de courbes sigmoïdes caractérisant l'activité de l'enzyme malique, notamment en fonction de la concentration en malate, lorsque le pH du milieu devient alcalin (ce phénomène a été mis en évidence chez la cerise (HARTMAN, 1975 ; HARTMAN et al, 1977), et chez la pomme de terre (DAVIES et PATIL, 1974).

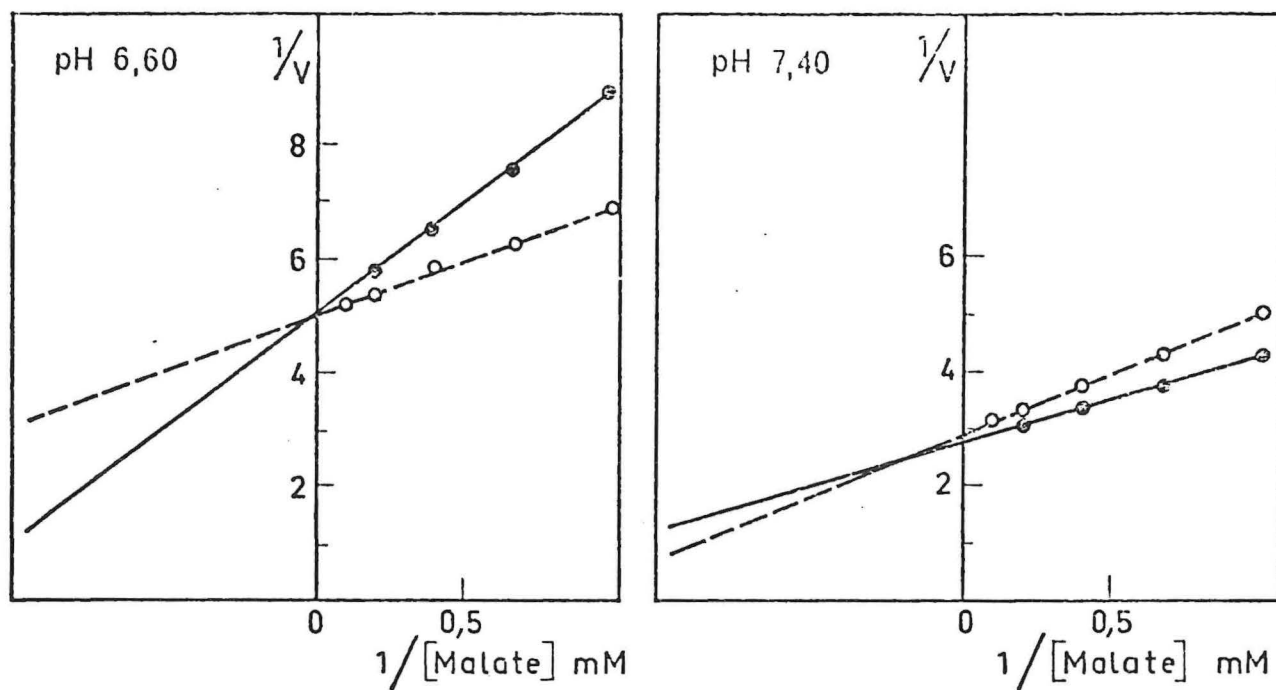


Figure 18 :

Affinité de l'enzyme malique du latex d' *Hevea brasiliensis* pour le malate en présence de 1 mM (O) ou de 0,1 mM (●) de NADP.
 Tampon Tris Maléate 0,05 M pH 6,6 et 7,4 ; $MnSO_4$ 1 mM.

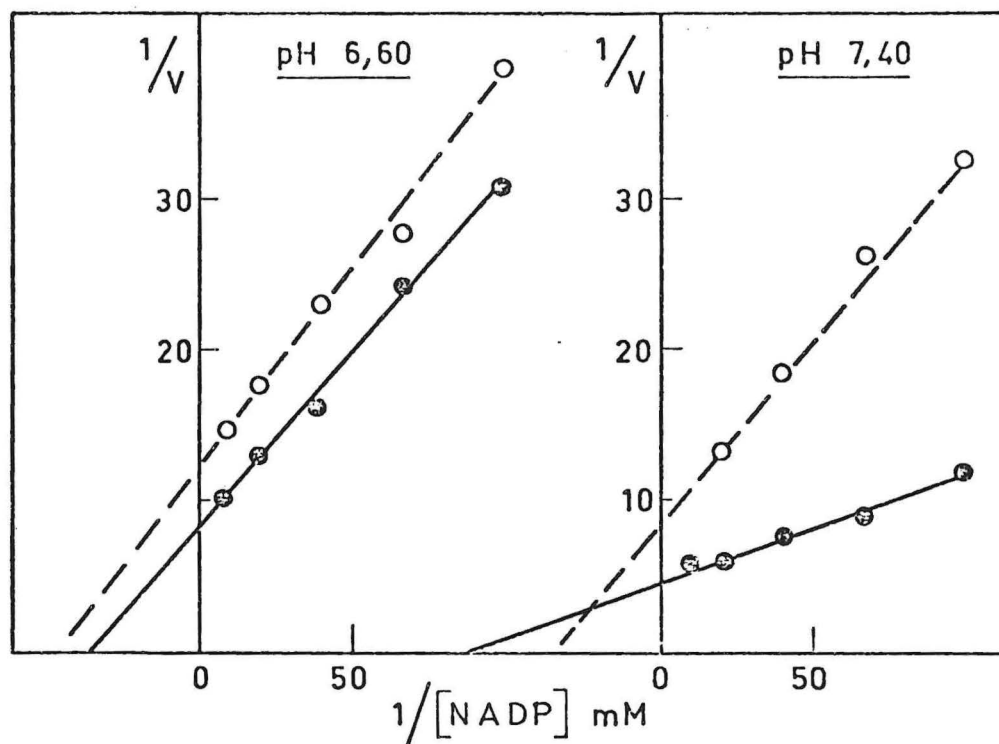


Figure 19 :

Affinité de l'enzyme malique du latex d' *Hevea brasiliensis* pour le NADP en présence de 10 mM (O) ou de 1 mM (●) de malate.

Tampon Tris maléate 0,05 M pH 6,60 et 7,40 ; MnSO_4 1 mM.

Rien de semblable n'a été observé pour l'enzyme du latex qui ne montre, quels que soient le pH et les concentrations de substrat ou de cofacteur utilisées, que des cinétiques classiques de type Michaelien. DAVIES et PATIL (1974) notent que certaines propriétés peuvent être perdues lors de la purification enzymatique ; des essais ont été réalisés sur des solutions de sérum C, uniquement filtrées sur G50. Les résultats obtenus ont confirmé que l'enzyme malique du latex ne présente pas de propriétés de type allostérique, ce qui la rapproche de la décarboxylase de *Pennisetum purpureum* (COOMBS et al, 1973).

5.6.2.2. Réaction orientée vers la production de malate.

L'affinité de l'enzyme pour le pyruvate et la NADPH en présence de Mg^{2+} et Mn^{2+} , a été mesurée à pH 7,5 (optimum de la vitesse de la réaction inverse) et à pH 7,1 qui correspond à son optimum de fonctionnement.

Il apparaît (§ tableau 13 et Figures 20 et 21) que le K_m de ces deux substrats est plus faible à pH 7,1, tout en restant relativement très élevé compte tenu de leur concentration *in situ* (JACOB, 1970).

pH	Pyruvate	NADPH
7,5	15 mM	0,6 mM
7,1	5,7 mM	0,28mM

Tableau 13 : Valeurs des K_m pyruvate et du NADPH à deux pH.

Tampon TEA 0,1 M, $NaHCO_3$ 10 mM, $MnSO_4$ 1 mM,
 $MgCl_2$ 2 mM.

Le K_m du CO_2^- sous forme $NaHCO_3$ a été estimé à 10 mM environ (Fig. 22) ; ce substrat devient légèrement inhibiteur à forte concentration (Fig. 23).

A titre de comparaison, DAVIES et PATIL (1974) notent pour l'enzyme malique de pomme de terre un K_m pyruvate de 3,3 mM et un K_m de NADPH de 13 μ M, à pH 7,0. A pH 7,6, la cinétique de la réaction tend à devenir sigmoïde en fonction de la concentration en pyruvate. Les valeurs du K_m CO_2 , trouvées dans la littérature, sont peu nombreuses : 13 mM pour l'enzyme de foie de pigeon (HSU et al, 1967) et de coeur de boeuf (FRENKEL, 1972c).

5.7. Influence de divers effecteurs sur le fonctionnement de l'enzyme malique du latex d' *Hevea brasiliensis*.

Beaucoup de travaux sur l'enzyme malique de diverses origines ont montré qu'elle est sensible à de nombreux effecteurs. En outre, beaucoup d'auteurs ont noté qu'elle pouvait présenter :

- soit chez les végétaux supérieurs (DILLEY, 1966 ; DROUET et HARTMAN, 1977 ; DAVIES et PATIL, 1974 ; GARNIER-DARDART et QUEIROZ, 1974 ; HARTMAN et al, 1977 ; DAVIES et al, 1974,

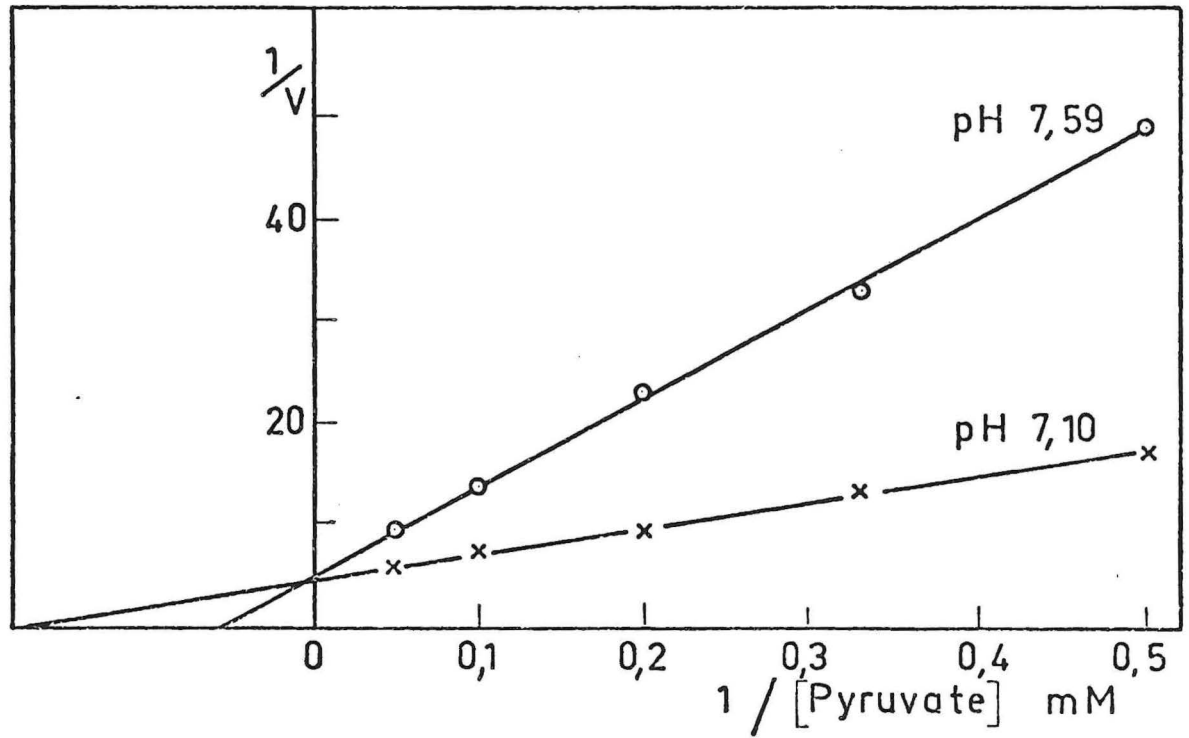


Figure 20 :

Affinité de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis pour le pyruvate, dans le sens de la synthèse de malate Tampon TEA 0,1 M ; NaHCO_3 10 mM ; MnSO_4 1 mM ; MgCl_2 2 mM ; NADPH 0,1 mM.

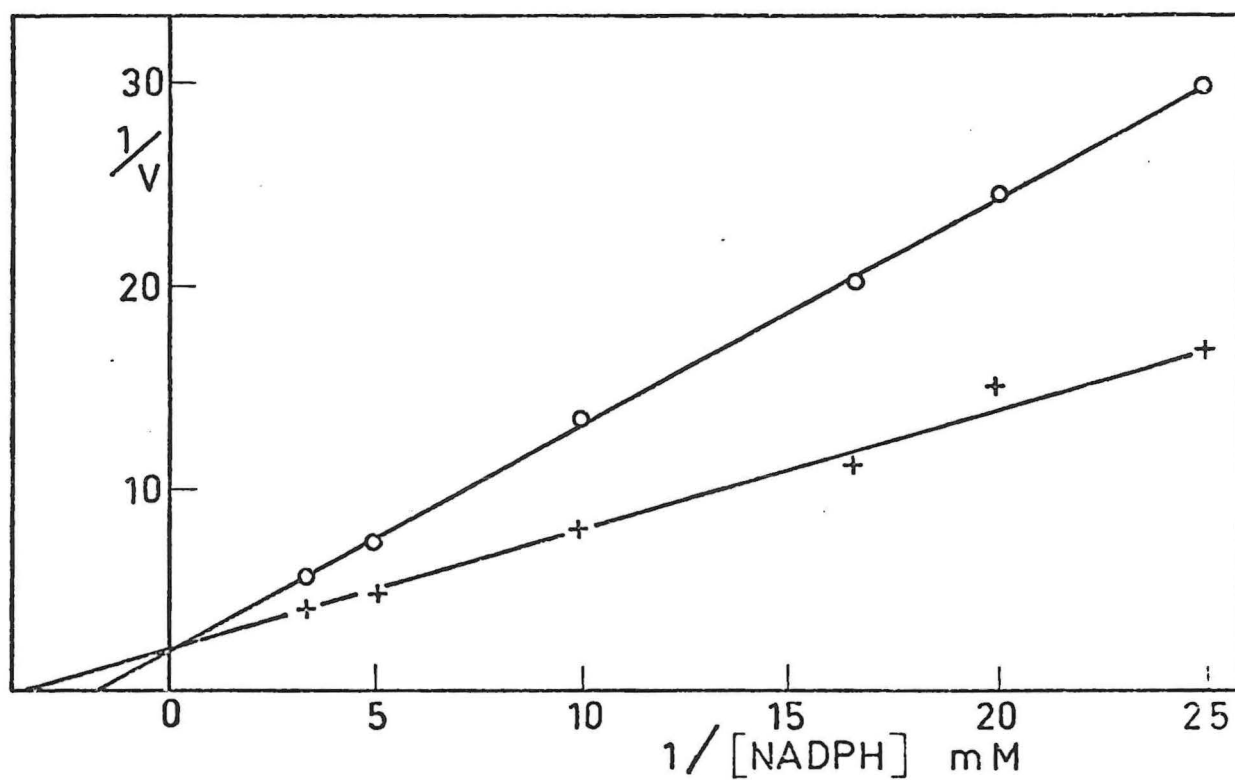


Figure 21 :

Affinité de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis pour le NADPH dans le sens de la synthèse de malate.

Tampon TEA 0,1 M pH 7,10 (+) et 7,50 (O) ; pyruvate 20 mM ;
 NaHCO₃ 10 mM ; MnSO₄ 1 mM ; MgCl₂ 2 mM.

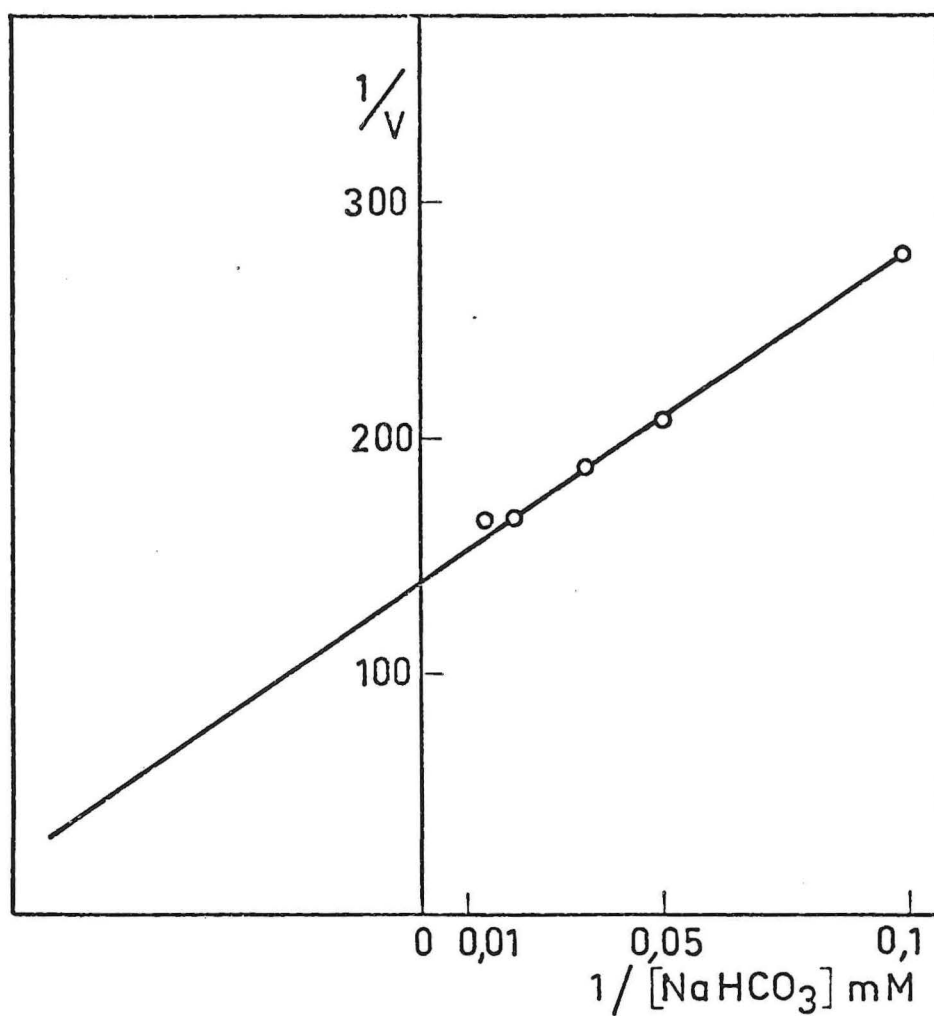


Figure 22 :

Affinité de l'enzyme malique pour le $NaHCO_3$ dans le sens de la synthèse de malate.

Tampon TEA 0,1 M pH 7,50 ; Pyruvate 20 mM ;
NADPH 0,1 mM, $MnSO_4$ 1 mM ; $MgCl_2$ 2 mM.

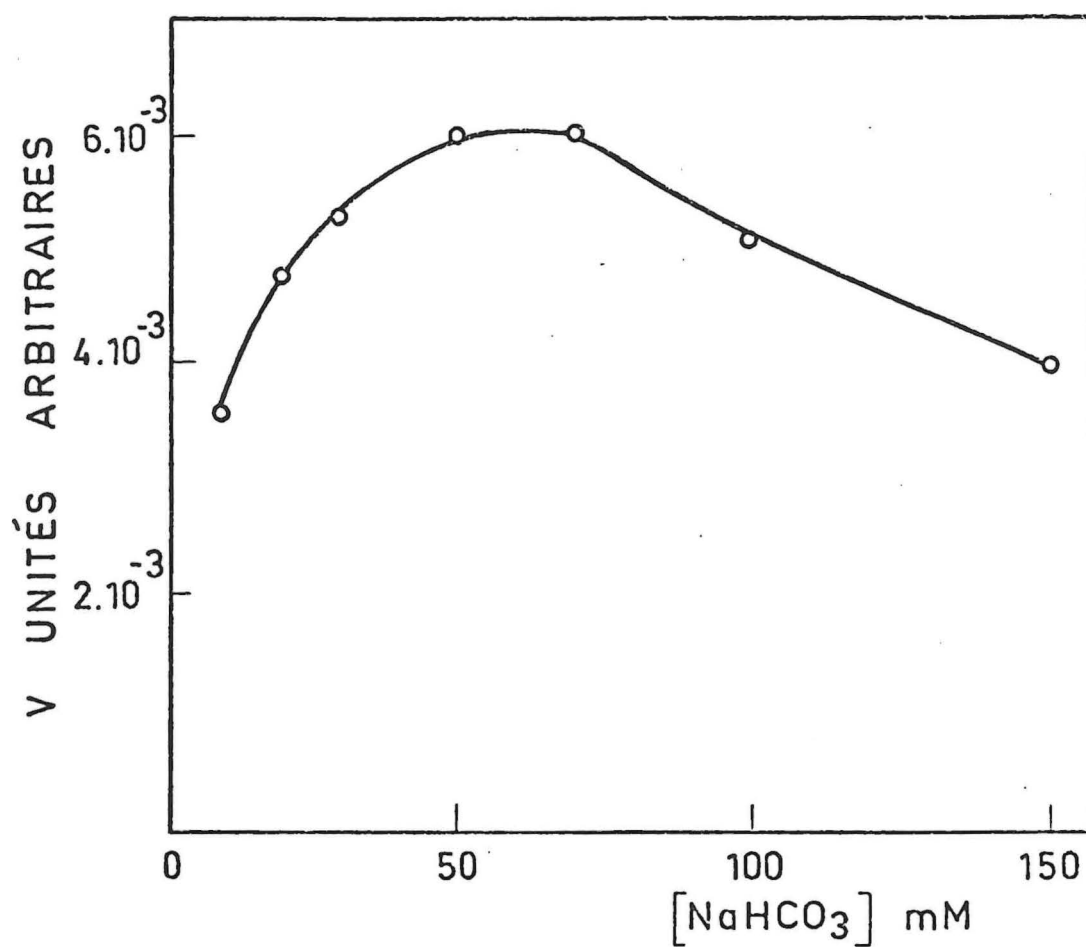


Figure 23 :

Action de la concentration en NaHCO₃ sur l'activité de l'enzyme malique dans le sens de la synthèse de malate.

- . soit chez les microorganismes (SANWAL et al, 1968 ; SANWAL et SMANDO, 1969),
- . soit chez les animaux (FRENKEL, 1972 a,b),

des propriétés allostériques. La décarboxylase du latex ne possède pas de telles caractéristiques, même en présence des nombreuses molécules dont nous avons testé l'influence.

5.7.1. Les ions minéraux.

A l'exception du Mn^{2+} ou Mg^{2+} qui sont nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme du latex, aucun des autres ions minéraux testés n'a montré d'effets importants sur le fonctionnement de la décarboxylase (tableau 14).

Si DAVIES et PATIL, pour l'enzyme de pomme de terre (1974) trouvent un effet inhibiteur des phosphates et des sulfates, ces ions ont une action négative faible vis-à-vis de la décarboxylase du latex.

Le chlorure d'ammonium est indiqué comme activateur par MASSARINI et CAZZULO (1976 a,b) et SCABAS et WATHLEY, 1973. Bien que légèrement favorable au fonctionnement de l'enzyme malique du latex, il ne semble pas avoir d'effet réellement significatif ; le chlorure de potassium est, quant à lui, trouvé légèrement inhibiteur.

En ce qui concerne les cations, le Cu^{2+} et le Zn^{2+} sont sans conteste des inhibiteurs, mais pour des concentrations supra-physiologiques.

Il faut noter le peu d'effet de l'arseniate, du molybdate et du calcium pour des teneurs élevées (10 mM).

Effecteurs	Activité en % par rapport à un témoin sans effecteur.	
	1 mM	10 mM
Ammonium chlorure	+ 12	+ 12
" nitrate	+ 8	- 10
" sulfate	- 16	- 22
Sodium arseniate	- 3	- 30
" bicarbonate	- 1	- 11
" carbonate	+ 4	- 20
" chlorure	- 6	- 14
Nitrate	- 6	- 35
" sulfate	- 5	- 18
" sulfite	- 6	- 41
Potassium bicarbonate	- 1	- 13
" carbonate	+ 1	- 11
" chlorure	- 13	- 15
" nitrate	- 5	- 13
" phosphate	- 1	- 30
Calcium chlorure	-	- 28
Cuivre chlorure	- 22	- 58
" sulfate	- 16	- 53
Fer sulfate	- 17	-
Lithium oxyde	0	0
Zinc chlorure	- 18	- 75

Tableau 14 : Influence de divers ions minéraux sur l'enzyme malique d'*Heyea brasiliensis*.

Tampon₂₊ TEA 0,1₂₊^M pH 7,5, malate 5 mM, NADP 0,7 mM,
ni Mg²⁺, ni Mn²⁺ n'est ajouté au milieu.

Les mêmes essais réalisés à un pH plus acide : 6,8 n'ont pas donné de résultats très différents.

Ainsi, sauf en ce qui concerne le phosphate de K dont la concentration in vivo peut probablement atteindre des valeurs effectivement inhibitrices, il est peu probable in situ que l'enzyme malique soit sous la dépendance régulatrice d'ions minéraux.

5.7.2. Les nucléotides phosphates.

Certaines enzymes maliques sont inhibées par les adénosines phosphates : c'est le cas de la décarboxylase de pomme de terre, qui semble d'ailleurs pouvoir être "régulée" par la charge énergétique de la cellule (DAVIES et PATIL, 1974) ou celle de Paracoccus denitrificans (SCABAS et WATHLEY, 1977).

Les adénosines et les guanosines phosphates, dans les conditions expérimentales utilisées (§ Tableau 15), n'ont montré que très peu d'influence sur le fonctionnement de l'enzyme malique du latex, et n'ont vraisemblablement pas d'action physiologique.

Effecteurs 3 mM	Tampon TEA 0,1 M pH 7,5	Tampon TES 0,1 M pH 6,85
	Activité en % d'un témoin sans effecteur	
ATP	+ 5	- 22
ADP	- 1	- 19
AMP	- 8	- 10
AMP cyclique	- 14	
GTP	+ 3	
GDP	- 5	
GMP	- 10	

Tableau 15 : Influence des adénosines et guanosines phosphates sur le fonctionnement de l'enzyme malique du latex.

NADP : 0,7 mM ; MnSO_4 : 1 mM ; Malate : 5 mM

En outre, dans des conditions analogues, le NADPH, ni le NADH n'ont d'effet sur la décarboxylation du malate, alors qu'ils sont inhibiteurs de l'enzyme de la feuille de blé (PERSANOV, 1976), d'*Acinetobacter* (KLEBER, 1975). La décarboxylase d'encornet (SOOREY et al, 1975) et de l'*Holobactérium cutirubrum* (VIDAL et CAZZULO, 1976) étant inhibées plus particulièrement par le NADPH.

5.7.3. Les métabolites phosphorylés et quelques molécules biologiques importantes.

Un certain nombre de molécules phosphorylées ont été testées, à deux pH ainsi que le glucose, la fructose, le saccharose et d'autres produits dont l'influence biologique peut être importante : biotine, coenzyme A, acétyl CoA, glutathion oxydé et réduit (Tableau 16).

Effecteurs 5 mM	% d'activité par rapport à un tampon sans effecteur	
	Tampon TEA 0,1 M pH 7,50	Tampon TES 0,1 M pH 6,85
Fructose-6-phosphate	- 12	
Fructose-1,6-diphosphate	- 10	- 17
Glucose-6-phosphate	- 12	- 8
Glucose-1-phosphate	- 12	- 8
Ribose -5-phosphate	- 13	- 18
Galactose-6-phosphate	- 20	- 17
D. Glycéaldehyde - 2 - phosphate	- 21	- 12
Glycérate-2-phosphate	- 12	- 4
Glycérate-2,3-diphosphate	- 21	
B-glycérophosphate	- 21	- 7
6-phosphogluconate	- 16	- 25
Phosphoglycolate	- 11	- 14
Dihydroxyacétone-phosphate	- 10	- 9
Naphtyl-phosphate	- 21	- 29
Carbamyl phosphate	- 19	- 21
Glucose	0	0
Fructose	0	0
Saccharose	0	0
Biotine	0	0
Glutathion oxydé	0	0
Glutathion réduit	0	0
Coenzyme A (1 mM)	- 29	- 38
AcetylCoA (1 mM)	- 24	- 22

Tableau 16 :

Influence de produits phosphorylés et de quelques métabolites importants sur l'enzyme malique du latex d' Hévéa.

NADP : 0,7 mM ; MnSO₄ 1 mM ; MgCl₂ 5 mM ; malate 5 mM.

Malgré un effet dépressif dans presque tous les cas, on peut considérer, compte tenu des concentrations utilisées, que les produits essayés ont très peu d'influence sur l'enzyme malique de l'hévéa, que ce soit au pH optimum de la réaction, ou dans un milieu plus acide représentant une moyenne du pH cytoplasmique du latex.

Notons que le CoA ou l'acétyl-CoA semble plus efficace pour freiner la réaction, mais a une concentration probablement trop forte pour être physiologique. Parmi tous ces produits testés, peu sont cités dans la littérature comme effecteurs de l'enzyme malique ; nous avons trouvé dans ce cas :

- l'acétyl coenzyme A (MASSARINI et CAZZULO, 1976a, SCABAS et WATHLEY, 1977, VIDAL et CAZZULO, 1976, VALENTI et PUPILLO, 1981),
- le fructose-1,6-diphosphate (PERSANOV, 1976),
- et les trioses phosphates (DAVIES et PATIL, 1974).

5.7.4. Les acides organiques.

5.7.4.1. Réaction orientée vers le pyruvate.

De très nombreux acides organiques sont notés comme effecteurs de l'enzyme malique. DAVIES et PATIL (1974) indiquent chez la décarboxylase de pomme de terre que certains acides dicarboxyliques sont activateurs à basse concentration, et inhibiteurs à forte concentration.

Cette caractéristique est aussi rapportée par HARTMAN et al (1977) pour le succinate et le fumarate chez la cerise. DAVIES et al (1974) indiquent également ce phénomène pour le succinate chez des enzymes de mono et dicotyledones.

Toutefois, la plupart des travaux dans ce domaine, ont montré un effet inhibiteur des acides organiques (le tableau 17 en donne quelques exemples).

Un nombre relativement important d'acides organiques a donc été testé dans le cadre du fonctionnement de l'enzyme malique du latex (tableau 18), à deux pH, pour percevoir éventuellement l'influence de ce facteur sur la sensibilité de la décarboxylase à certains effecteurs, phénomène trouvé par HARTMAN et al (1977) chez la décarboxylase de la cerise.

Les résultats montrent que seuls l'ox-cétoglutarate à pH 6,85, l'oxaloacétate à pH 7,5, le glyoxylate, le malonate et surtout l'oxalate aux 2 pH ont un pouvoir inhibiteur non négligeable. Ils se trouvent d'ailleurs tous dans le tableau récapitulatif.

Pyruvate	SKORSKOWSKI et al	1977	Ecrevisse (muscle)
"	HARTMAN et al	1977	Cerise
"	COOMBS et al	1973	<u>Pennisetum purpureum</u>
Dihydroxytartrate	DILLEY	1966	Pomme
Dihydroxymalate	DILLEY	1966	Pomme
Malonate	DILLEY	1966	Pomme
Maleate	DAVIES et PATIL	1974	Pomme de terre
"	DILLEY	1966	Pomme
"	SCHIMERLIK et CLELAND	1977	Foie de pigeon
Mesotartrate	DILLEY	1966	Pomme
"	SCHIMERLIK et CLELAND	1977	Foie de pigeon
Phosphoglycérate	DAVIES et PATIL	1974	Pomme de terre
Citrate	DAVIES et PATIL	1974	Pomme de terre
"	HARTMAN et al	1977	Cerise
"	SCABAS et WATHLEY	1977	<u>Paracoccus denitrificans</u>
Aspartate	DAVIES et PATIL	1974	Pomme de terre
"	SCABAS et WATHLEY	1977	<u>Paracoccus denitrificans</u>
Oxalate	SARAWKS et DAVIES	1976	Pomme de terre
"	HARTMAN et al	1977	Cerise
"	PERSANOV	1976	Feuille de blé
Cétoglutarate	HARTMAN et al	1977	Cerise
"	PERSANOV	1976	Feuille de blé
Succinate	DAVIES et al	1974	Mono et dotyledons
"	SCHIMERLIK et CLELAND	1977	Foie de pigeon
Oxaloacétate	SCHIMERLIK et CLELAND	1977	Foie de pigeon
"	MASSARINI et CAZZULO	1976	Pseudomonas
"	PERIANOV	1976	Feuille de blé

Oxaloacétate	KLEBER et AURICH	1976	Acinetobacter
"	SHESHADRI et al	1978	Mycobacteria 50
"	SKORKOWSKI et al	1977	Ecrevisse (muscle)
"	CAZZULO et al	1977	Trypanosoma C.
"	VIDAL et CAZZULO	1976	Holobactorium C
Oxamate	SCHIMERLIK et al	1977	Foie de pigeon
Mesotartrate	SCHIMERLIK et al	1977	Foie de pigeon
Ketomalonate	SCHIMERLIK et al	1977	Foie de pigeon
Hydroxymalonate	SCHIMERLIK et al	1977	Foie de pigeon
Cétobutyrate	SCHIMERLIK et al	1977	Foie de pigeon
Tartrate	SCHIMERLIK et al	1977	Foie de pigeon
Glyoxylate	MASSARINI et CAZZULO	1976	Pseudomonas
"	PERSANOV	1976	Blé (feuille)
"	KLEBER et AURICH	1976	Acuratobacter
"	SCABAS et WATHLEY	1977	<u>Paracoccus denitrificans</u>
"	VIDAL et CAZZULO	1976	<u>Holobactorium cutirubrum</u>
Glycolate	PERSANOV	1976	Blé (feuille)

Tableau 17 :

acides organiques inhibiteurs de l'enzyme
malique de diverses origines.

Effecteurs 10 mM	% d'activité par rapport à un tampon sans effecteur	
	Tampon TEA 0,1 M pH 7,50	Tampon TES 0,1 M pH 6,85
Acide cis-aconitique	0	0
" ascorbique	0	- 4
" borique	0	- 6
" DL aspartique	- 4	- 2
" citrique	- 17	- 12
" formique	0	
" fumarique	0	+ 7
" D (+) galacturonique	0	+ 1
" D - gluconique	0	+ 6
" glucuronique (Na)	+ 6	+ 3
" L-glutamique	+ 7	+ 1
" hydroxymethylglutarique	- 20	
" glutarique	+ 9	
" cetoglutarique	- 24	- 62
" glycollique		- 40
" glyoxylique	- 76	- 78
" isocitrique	+ 9	
" D.L. lactique	- 24	
" maléique	+ 7	- 11
" malonique	- 60	- 63
" oxalique	- 100	-100
" oxaloacétique	- 62	- 12
" phosphoénolpyruvique	+ 10	- 18
" o-phthalique	+ 9	0
" pyruvique	+ 4	+ 2
" sorbique	+ 9	- 3
" succinique	+ 9	- 24
" tartrique	- 5	- 4

Tableau 18 : Influence des acides organiques sur l'activité de l'enzyme malique du latex.

NADP 0,7 mM ; MnSO₄ 1 mM ; malate 5 mM.

Les figures 24 et 25 montrent les courbes d'inhibitions de ces effecteurs. Il est d'ailleurs intéressant de voir que le pH a une influence sur l'efficacité de l'oxaloacétate, du cetoglutarate, de l'oxalate, mais pas sur celle du glyoxylate ou du malonate.

Afin de mieux percevoir le fonctionnement de la décarboxylase, une rapide étude a été faite sur le mécanisme d'action de l'oxalate, du glyoxylate et du malonate.

L'oxalate, qui est un inhibiteur physiologique très puissant de l'enzyme de pomme de terre (SARAWEK et DAVIES, 1976), l'est également pour la décarboxylase du latex. Comme le montre la figure 25, son efficacité est fonction du pH. Elle est bien moindre à pH 7,5 qu'à pH 6,85.

L'inhibition observée est incompétitive vis-à-vis du NADP et mixte vis-à-vis du malate (§ Fig. 26 et 27).

Les K_i mesurés sont relativement faibles à pH 7,2 (Tableau 19) et doivent l'être plus encore lorsque l'acidité du milieu croît.

Le glyoxylate et le malonate n'ont pas d'action sensible à la variation de pH (Fig. 24). De même que l'oxalate, ils sont des inhibiteurs incompétitifs vis-à-vis du cofacteur, et mixtes vis-à-vis du malate.

Les K_i mesurés (Tableau 19) sont relativement élevés.

	Effecteurs	Oxalate	Malonate	Glyoxylate
NADP	Type d'inhibition	incompétitive	incompétitive	incompétitive
	K_i	0,12 mM	6,5 mM	4,0 mM
Malate	Type d'inhibition	mixte	mixte	mixte
	K_i	0,04 mM	0,83 mM	2,0 mM

Tableau 19 : Type d'inhibition et K_i de l'oxalate du malonate et du glyoxylate vis-à-vis du cofacteur et du substrat de la réaction catalysée par l'enzyme malique du latex.

5.7.4.2. Réaction orientée vers la production de malate.

La réaction orientée vers la production de malate est activée dans certains cas par les acides organiques, et surtout le succinate (DAVIES et PATIL, 1974 ; FRENKEL, 1972). Aucun effet de ce genre n'a pu être observé chez l'enzyme malique du latex d'Hevea.

En conclusion, l'enzyme malique du latex est peu sensible, exception faite de l'oxalate, aux acides organiques, dont aucun, en outre, ne montre d'effets d'activations. Compte tenu de leurs concentrations in situ (JACOB, 1970 ; JACOB, résultats non publiés), il est peu probable qu'ils aient une influence physiologique importante sur le fonctionnement de la décarboxylase au sein du sérum cytoplasmique.

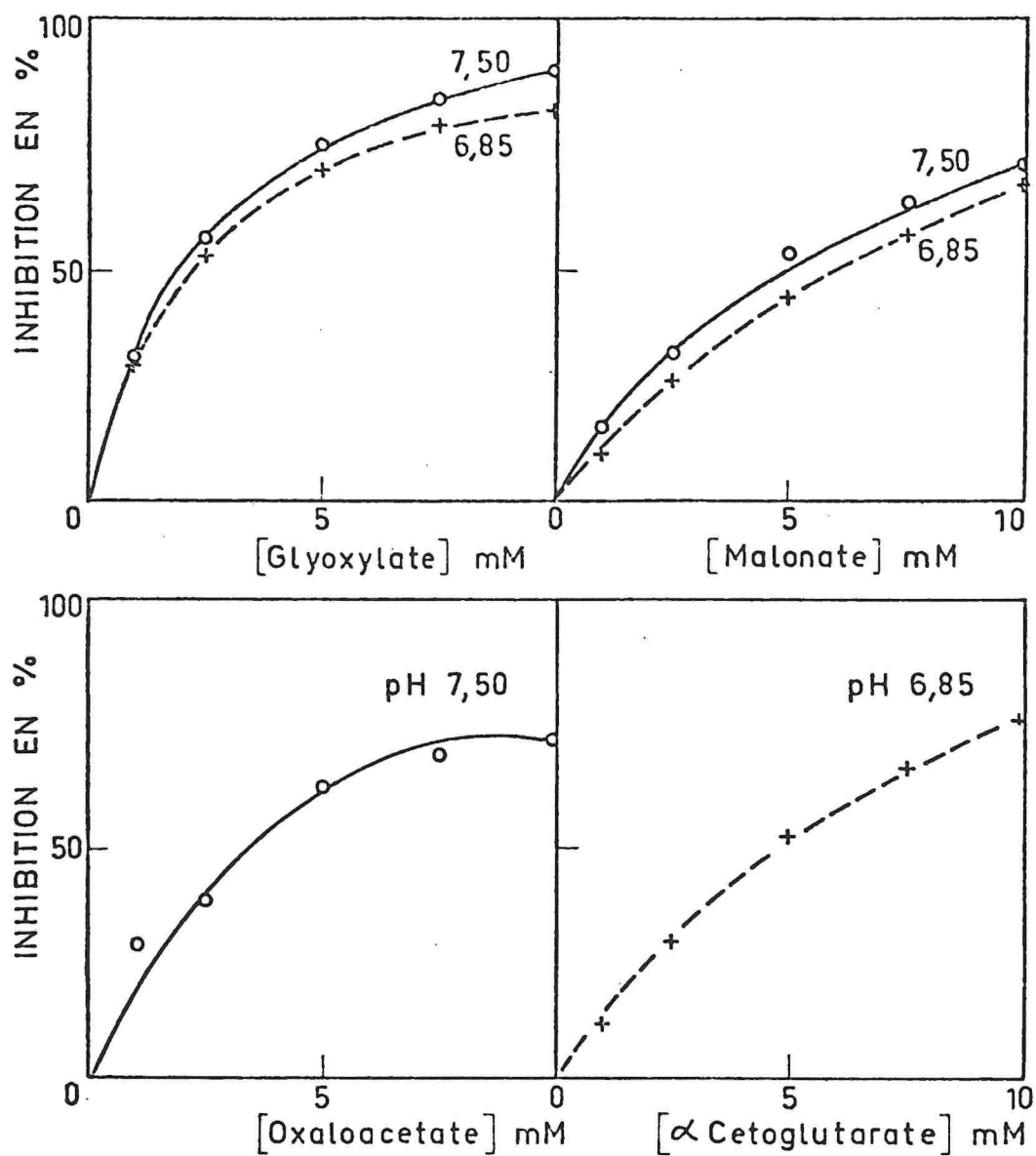


Figure 24 :

Effet inhibiteur de différents acides organiques sur l'activité de l'enzyme malique du latex d'Hevea brasiliensis.

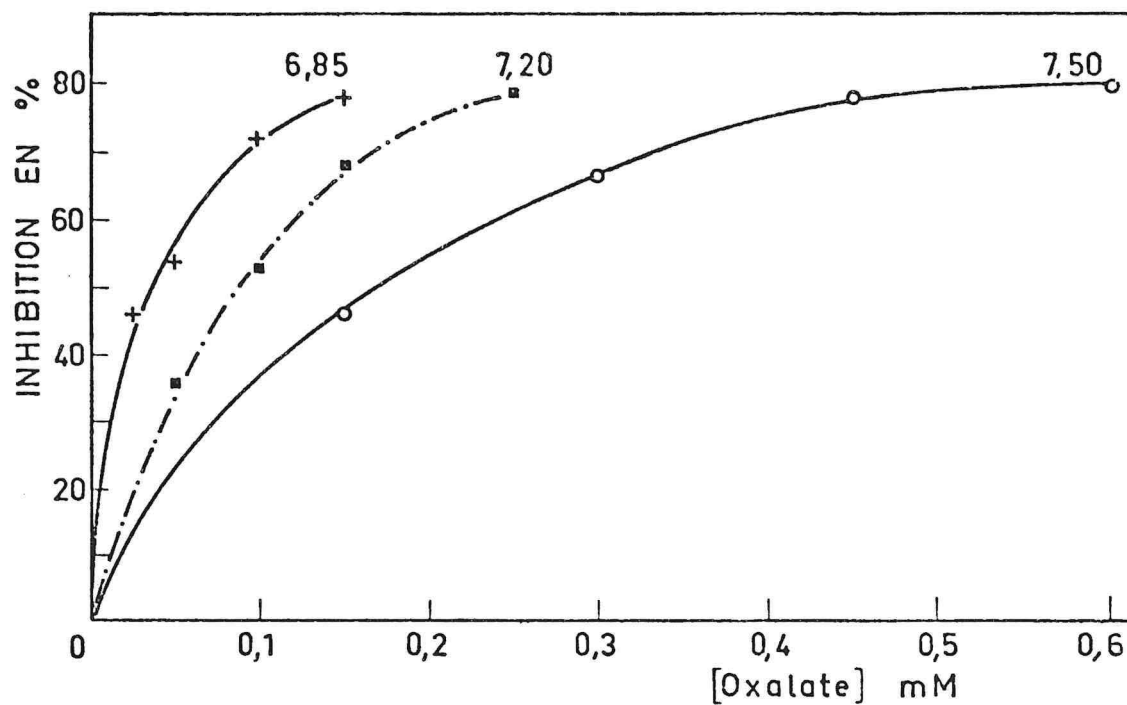


Figure 25 :

Action de l'oxalate sur l'activité de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis à différents pH.

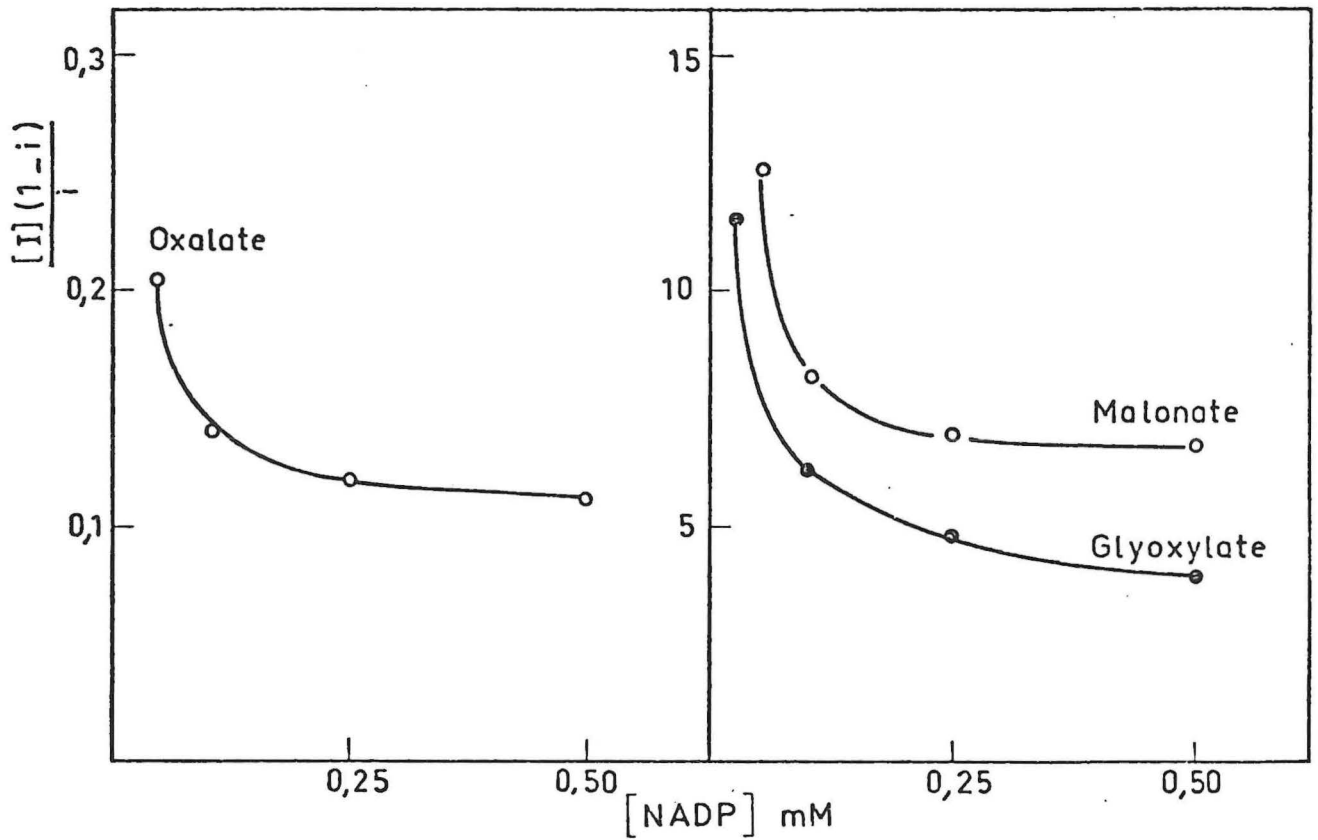


Figure 26 :

Constantes d'inhibition de certains acides organiques vis-à-vis du NADP, de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis.

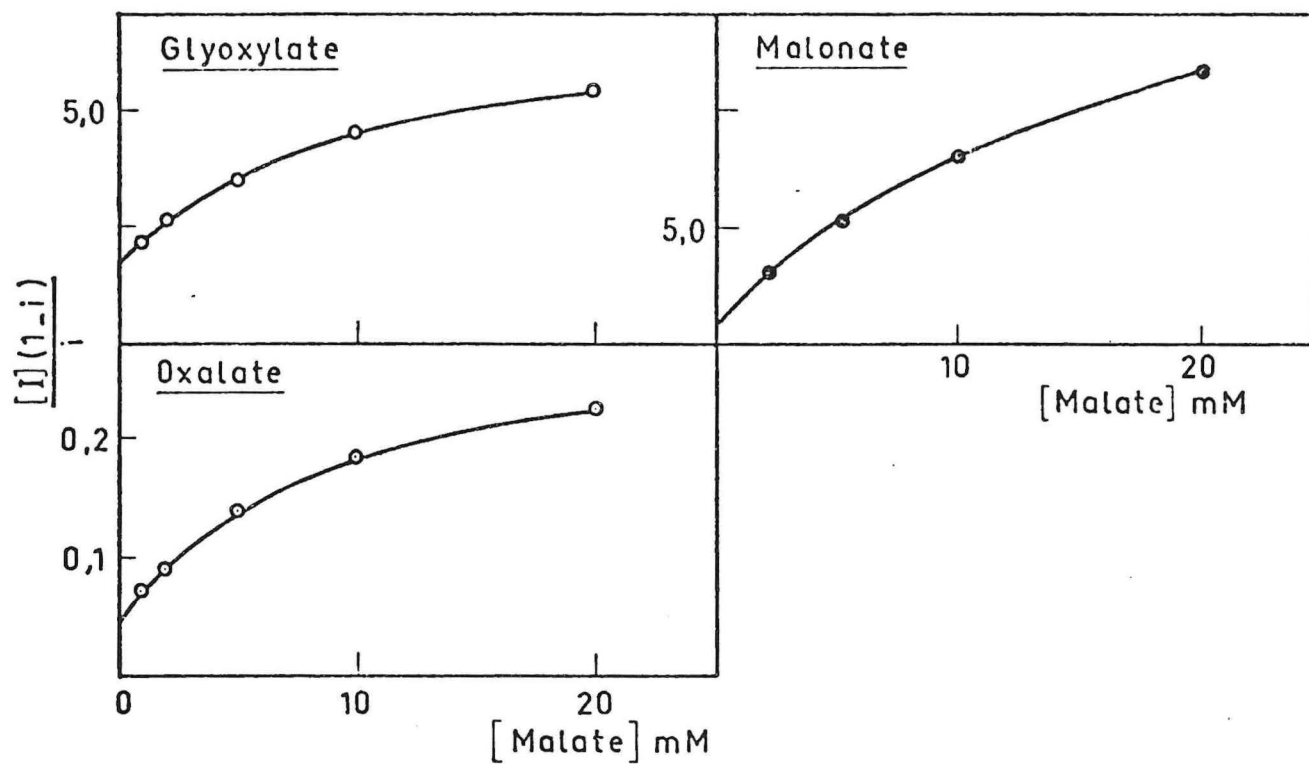


Figure 27 :

Constantes d'inhibition de certains acides organiques vis-à-vis du malate, de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis.

6. L' ENZYME MALIQUE DU LATEX - COMPARAISON AVEC CELLES D'AUTRES
ORIGINES - RECAPITULATION DE SES CARACTÉRISTIQUES PRINCIPALES.

L'enzyme malique est représentée dans le règne végétal, animal et micro-bien, et les exemples sont nombreux dans la littérature pour illustrer la diversité des origines des décarboxylases étudiées.

Dans les végétaux, elle a été mise en évidence dans les feuilles (SLACK et al, 1969 ; ASAMI et al, 1979 et PERSANOV et al, 1976), dans les tiges (MUKERJI et TING, 1968), dans la pulpe des fruits (HOBSON, 1974 ; BAQUI et al, 1974 ; GARCIA, 1975 ; HARTMAN et al, 1977 ; KRISHNAMURTY, 1971 ; SPETOLLI et al, 1980 ; KLEIN, 1970 ; SAUPHANOR DEBEST, 1981), dans les graines de blé (OCHOA, 1955), dans les épicotyles et les racines (DAVIES et al, 1974 ; DANNER et TING, 1967), dans les tubercules (DAVIES et PATIL, 1974).

Il s'agit donc d'une enzyme qui fait partie de l'arsenal biologique essentiel des tissus.

Sa localisation intracellulaire est également multiple : elle être chloroplastique (JOHNSON et HATCH, 1970, BRANDON, 1967 ; BLACK, 1973 ; GARNIER DARDANT, 1965), mais aussi mitochondriale (BRANDON, 1967 ; MUKERJI et TING, 1968 ; LIN et DAVIES, 1974 ; PUPILLO et BOSSI, 1979 ; LI et al, 1975 ; FRENKEL, 1972 ; SKORKOWSKI, 1977 ; MACRAE, 1971 et MANDELLA et SAUER, 1975), dans le cytosol (DANNER et TING, 1967 ; LI et al, 1975 ; FRENKEL, 1972 ; WINTER et al, 1982), ce qui est le cas de l'enzyme malique du latex.

Un classement a été tenté (NISHIKIDO et WADA, 1974) qui distingue, d'une part les enzymes maliques appartenant aux plantes en C₄, avec un faible Km pour le malate (0,05 à 0,15 mM), un optimum de pH basique (> 8), et d'autre part celles se trouvant dans les végétaux "en C₃" et CAM, avec un "Km malate" plus fort (0,3 à 1 mM) et un optimum de pH proche de 7,0. Cette dernière catégorie serait analogue aux décarboxylases des tissus végétaux non photosynthétiques (ERANDON et VAN BOECKEL MOL, 1975 ; DAVIES et PATIL, 1974) et des tissus de vertèbres (OCHOA, 1955 ; RUTTER et LARDY, 1958 ..). Compte tenu des résultats, l'enzyme du latex rentre bien dans ce classement.

Toutefois, elle a ses caractéristiques propres qu'il est utile de rappeler :

C'est une très grosse molécule (PM : 350.000), localisée dans le sérum cytoplasmique du latex, sans forme isoenzymatique. Elle est relativement stable.

Si son fonctionnement nécessite Mg^{2+} ou Mn^{2+} , elle semble fixer assez fortement ce dernier qui est très probablement son activateur physiologique. Cette remarque répond à la question posée par DAVIES et al (1974) de savoir lequel de ces deux cations était susceptible d'être utilisé par l'enzyme malique in situ.

Alors que la grande majorité des enzymes maliques d'origine végétale présentent des propriétés allostériques (DAVIES et al, 1974), il n'en est rien pour la décarboxylase du latex. Aucun phénomène de ce type n'a pu être mis en évidence dans son cas, et les cinétiques observées à différents pH et en présence de divers effecteurs ont toujours été de type michaelien..

L'enzyme du latex fonctionne essentiellement vers la régénération de NADPH et la production de pyruvate. Eu égard à la valeur de ses Km pour le pyruvate et le cofacteur réduit et à la teneur de ces produits in situ, il est plus que probable que la réaction ne se fera pas dans le sens pyruvate $\longrightarrow$ malate au sein du latex, et sera, de ce fait, pratiquement irréversible.

Elle ne fonctionne pas avec l'oxaloacétate, même en milieu acide.

Bien qu'elle ne soit pas strictement spécifique du NADP, son activité induite par le NAD est très réduite, et doit être négligeable in situ. Par contre, son affinité pour le NADP est extrêmement forte. Compte tenu des faibles teneurs en cofacteur dans ce milieu, nous pensons - contrairement à GARNIER-DARDART et QUEIROS (1974) qui travaillaient sur l'enzyme de Bryophyllum daigremontianum - que le NADP peut être l'élément limitant de l'activité de la décarboxylase. Par contre, le malate sera toujours en concentration saturante dans le sérum C (RIBAILLIER et al, 1974).

Aucun activateur de l'enzyme malique du latex n'a pu être mis en évidence.

S'il existe un bon nombre de produits qui l'inhibent légèrement, seuls le malonate, le glyoxylate, le glycolate, l'oxaloacétate et surtout l'oxalate, pour les molécules organiques, et le PO_4 pour les ions minéraux peuvent freiner efficacement son activité.

Dans un contexte physiologique, il est peu probable que les acides organiques cités aient une influence sur l'enzyme malique du latex ; quant au phosphore minéral, son effet sera toujours très limité du fait de sa teneur dans le sérum cytoplasmique (RIBAILLIER, 1972).

Notons qu'un excès de malate cité comme inhibiteur pour l'enzyme des feuilles de maïs (JOHNSON et HATCH, 1970) n'a, dans ce cas, pas d'effet important. Toutefois, les fortes concentrations de cet acide organique déplace l'optimum de pH vers une zone alcaline. Enfin, les variations de pH susceptibles de se produire in situ (CRETIN et al, 1980) peuvent modifier l'activité de l'enzyme malique presque du simple au double.

7. L' ENZYME MALIQUE DANS SON CONTEXTE NATUREL.

7.1. Fonctionnement de l'enzyme malique purifiée dans des conditions paraphysiologiques.

7.1.1. Le milieu choisi.

Pour mieux apprécier l'importance de l'enzyme malique au plan physiologique, il était nécessaire d'étudier son fonctionnement dans des conditions proches de celles qui caractérisent le compartiment cellulaire où elle est localisée au sein du latex, c'est-à-dire le sérum cytoplasmique.

Dans ce but, du sérum cytoplasmique a été filtré sur membrane Amicon PM 10 et a servi de milieu réactionnel à l'enzyme malique purifiée.

Comme l'on montré des travaux antérieurs (JACOB et al, 1977 ; JACOB et al, 1979a), ce sérum filtré, à l'exception des grosses molécules à poids moléculaire supérieur à 10.000 et par conséquent à ses protéines (et à son pool enzymatique), possède une composition organo-minérale analogue au sérum initial (§ Tableau 20).

Ce milieu est donc effectivement proche du contexte naturel dans lequel se trouve l'enzyme malique. Il permet d'obtenir des informations sur son fonctionnement dans ces conditions paraphysiologiques, en l'absence de toutes autres enzymes pouvant utiliser les mêmes substrats ou cofacteurs (Malate dH, LdH, phosphatases acides, 2'nucléotidase) et interférer sur les dosages.

L'analyse de sérums C filtrés montre effectivement qu'aucune des activités enzymatiques précédemment citées n'est décelable et que les mesures d'activités de la décarboxylase peuvent être suivies sans inconvénient au spectrophotomètre.

En outre, la teneur en malate, toujours supérieure à 8 mM et celle de Mg^{2+} , comprises entre 5 et 10 mM, sont, compte tenu des résultats précédents, en concentration saturante pour l'enzyme malique.

La concentration en Mn^{2+} est bien plus faible puisqu'elle est de l'ordre de 0,1 mM dans le sérum C (JACOB et al, résultats non publiés), mais saturante également dans la mesure où le cation se trouve sous forme ionique.

Par contre, il y a très peu de NADP(H) dans le milieu, du fait vraisemblablement de la présence de la 2'nucléotidase (JACOB et SONTAG, 1973).

Confirmant ces remarques, l'enzyme malique du latex est capable de fonctionner dans le sérum C filtré, sans autre apport que celui de NADP ; ni l'addition de Mg^{+2} ou de Mn^{2+} , ni celle de malate, n'accélère la réaction.

La réaction inverse : Pyruvate $\rightarrow$ Malate n'a pu être mise en évidence. Par contre, malgré un apport de 0,125 mM de NADPH, une teneur en pyruvate de 0,1 à 0,2 mM, et en CO_2 de 2 mM ; l'affinité de l'enzyme pour les différents agents de la réaction, d'après les résultats obtenus, n'est pas suffisante pour que la formation de malate et la régénération de NADP soit décelable dans les conditions expérimentales utilisées.

L'enzyme malique, au sein du sérum C, sera donc essentiellement orientée vers la décarboxylation du malate en pyruvate, et la régénération du NADPH à partir de NADP.

7.1.2. Affinité de l'enzyme malique pour son cofacteur.

Le substrat et les ions nécessaires au fonctionnement de l'enzyme étant en concentration saturante, il n'est pas possible d'évaluer leur K_m au sein du sérum filtré. Par contre, celui du NADP a pu être mesuré facilement (§ Fig. 28). Il est de l'ordre de $20 \mu M \pm 5 \mu M$. Cette valeur est un peu plus faible que celle trouvée en milieu tampon ne contenant que du Mn^{2+} .

Constituants analysés	Avant filtration	Après filtration
Protéines mg.ml^{-1}	22,6	< 0,4
Mg^{2+} mM	5,7	5,1
K^{+} mM	90	90
Na^{+}	traces	traces
HCO_3^{-}	# 2 mM	# 2 mM
Activités : LdH, MdH, énolase, 2'nucléotidase phosphatase acide pyruvate kinase, enzyme malique	+	0
Malate mM	12,7	11,8
Citrate mM	1,5	1,35
NAD mM	0,039	0,040
ATP mM	0,148	0,125
ADP mM	0,146	0,131
pH	6,96	7,10
Lactate mM	0,161	0,123
Pyruvate mM	0,110	0,100
PEP mM	< 0,01	< 0,01
Oxaloacétate mM	< 0,01	< 0,01

Tableau 20 :

Effet de la filtration de sérum C du latex d' Hevea brasiliensis, à l'aide d'une membrane AMICON PM 10.

(Cette membrane arrête toutes les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 000).

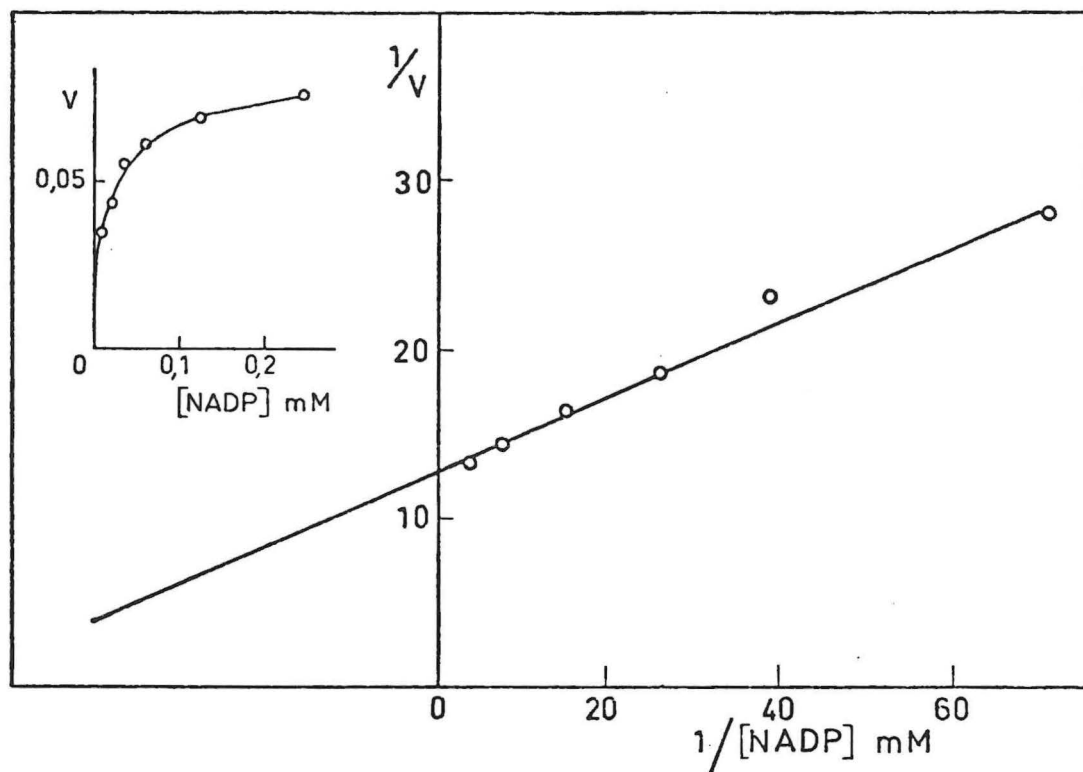


Figure 28 :

Affinité de l'enzyme malique du latex d' Hevea brasiliensis pour le NADP dans un sérum filtré sur membrane AMICON PM 10.

Cette forte affinité de l'enzyme malique pour son cofacteur en milieu paraphysiologique est à souligner, du fait même des faibles concentrations du NADP in situ.

En effet, il est possible de conclure que la déshydrogénase, disposant toujours de malate et d'ions activateurs en quantité non limitante, et ayant une affinité élevée pour le NADP, sera susceptible d'utiliser efficacement, dans le sérum C, le cofacteur disponible, même en très faible quantité, pour régénérer du NADPH dont il faut rappeler l'importance dans la synthèse isoprénique (HEPPER et AUDLEY, 1969 ; LYNEN, 1969).

Il est donc probable que, malgré l'activité potentielle assez faible de l'enzyme malique, celle-ci représente au sein du latex un système régénérateur de pouvoir réducteur spécifique (NADPH) d'importance physiologique certaine.

Si l'on considère l'activité potentielle de l'enzyme à des pH proches de son optimum, c'est-à-dire à 7,25 et 7,10, en tampon et en sérum C filtré (§ Tableau 21), on constate que la déshydrogénase fonctionne mieux dans le filtrat que dans un milieu artificiel ; la différence, de l'ordre de 10 %, n'est pas significative, mais indique que le filtrat employé ne contient pas d'inhibiteurs de l'enzyme malique.

pH Acitivités	7,10		7,25	
	Tampon	Filtrat	Tampon	Filtrat
U ml ⁻¹	0,686	0,733	0,725	0,790
Δ		+ 7 %		+ 9 %

Tableau 22 : Activité potentielle de l'enzyme malique en tampon TEA 0,1 M et en sérum C filtré sur membrane Amicon PM 10 - Malate 12 mM ; NADP 0,7 mM dans le tampon MnSO₄ 1 mM.

Compte tenu des résultats obtenus en tampon et en sérum filtré, il apparaît que dans ce dernier, l'enzyme malique fonctionne essentiellement grâce au Mn²⁺. En effet, son affinité pour le NADP ainsi que son activité potentielle, toutes conditions étant égales par ailleurs, sont analogues dans le filtrat et dans le tampon ne contenant que du Mn²⁺.

L'effet dépressif du Mg²⁺ sur la valeur de ces deux paramètres qui sont observés lorsque ce cation est ajouté au tampon (l'affinité pour le NADP et la vitesse potentielle diminuent), ne se retrouve pas dans le sérum filtré. Ceci indiquerait que le Mg²⁺ serait surtout sous forme chelaté au sein de ce milieu. La présence d'acide citrique en quantité relativement importante (RIBAILLIER et al, 1971) peut expliquer ce phénomène qui est encore une preuve des conditions optimales dans lesquelles se trouve l'enzyme malique pour jouer son rôle de régénérateur de NADPH.

7.1.3. Activité de l'enzyme en fonction du pH.

Il a été possible (§ Fig. 29) de tracer une courbe d'activité de l'enzyme malique en fonction du pH du filtrat amené à la valeur voulue par addition de micro-quantités de KOH ou HCl 1 N.

Les valeurs extrêmes qui sont à peu près celles du sérum C, se situent entre 6,4 et 7,4 (BRZOZOWSKA et al, 1979). La courbe obtenue correspond très bien à celle trouvée en tampon pour une concentration de malate (10 mM), analogue à celle du sérum C filtré utilisé. L'optimum d'activité se trouve dans les 2 cas vers pH $7,40 \pm 0,1$.

En outre, le rapport de l'activité potentielle entre 7,4 et 6,4 est voisin de 2,5 dans le cas du tampon, 2,3 dans le cas du filtrat. Il en résulte que les modifications de pH qui peuvent se produire in situ, sont capables de modifier d'une manière non négligeable l'activité de l'enzyme malique dans son milieu, et représenter de ce fait un moyen de régulation de la réaction physiologique.

7.1.4. Quelques remarques sur les fonctions physiologiques de l'enzyme malique au sein du latex.

Le rôle de l'enzyme malique dans le métabolisme cellulaire a été depuis longtemps évoqué, et il diffère selon l'origine et la localisation de la décarboxylate. Ainsi :

- Elle semble jouer un rôle important dans la maturation des fruits (HARTMAN, 1975 ; KLEIN, 1970), notamment en régénérant le NADPH nécessaire aux synthèses cellulaires, lorsque la photosynthèse et la voie des pentoses fonctionnent mal.
- Elle a probablement une relation avec les mécanismes d'ouverture des stomates, en permettant une utilisation très rapide du malate observée dans les cellules de garde (OUTLAW et al, 1981).
- Elle produit du pouvoir réducteur et du CO_2 pour des carboxylations chez des plantes en C_4 (BLACK, 1973).
- Elle peut s'intégrer dans un système régulateur de pH (pH Stat); auquel participent la PEPcase et la malate déshydrogénase (DAVIES, 1973 ; DAVIES et PATIL, 1974).
- Elle serait susceptible d'imposer par le rythme d'approvisionnement en pyruvate l'allure générale du fonctionnement du cycle tricarboxylique (MOREL, 1979) ...

En ce qui concerne le latex, l'enzyme malique apparaît être un des facteurs importants de la régénération du NADPH, condition essentielle du bon fonctionnement de la synthèse isoprénique (LYNEN, 1969 ; HEPPEL et AUDLEY, 1969).

En effet, cette déshydrogénase (décarboxylante) possède une très grande affinité pour le NADP, propriété qui compense les faibles teneurs du cofacteur in situ (ARCHER et al, 1969 ; JACOB et al, 1970) ; son substrat, le malate, est toujours en concentration saturante (JACOB, 1970 ; RIBAILLIER et al, 1971) ; son cation activateur physiologique essentiel paraît être le plus efficace, à savoir le Mn^{2+} ; le Mg^{2+} ne présente pas à son égard de compétitivité qui induirait des effets dépressifs sur le potentiel de fonctionnement de la réaction.

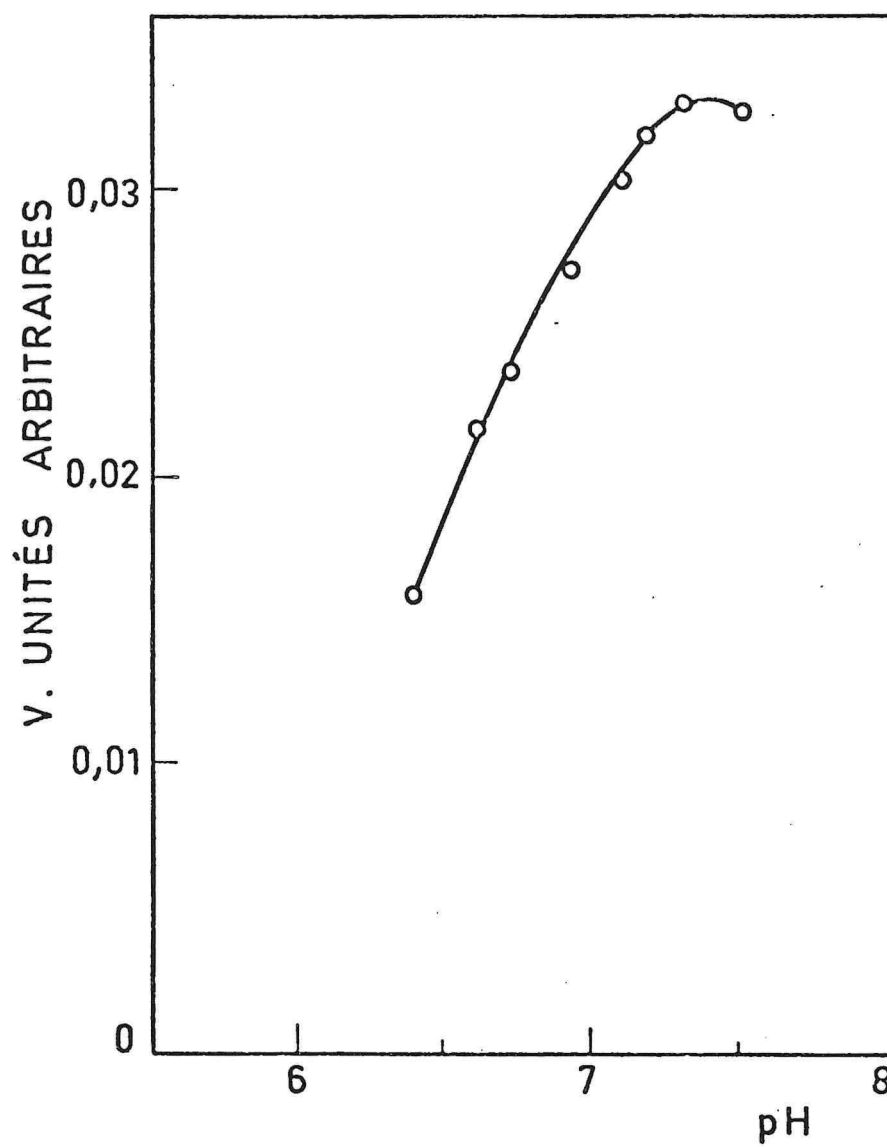


Figure 29 :

Activités de l'enzyme malique du latex d'Hevea brasiliensis dans un filtrat, en fonction du pH.

Si certains acides organiques peuvent inhiber efficacement la déshydrogénase (acide oxalique notamment), ceux-ci ne se trouvent apparemment pas dans le sérum C du latex qui ne contient donc aucun effecteur négatif en concentration suffisante pour freiner la réaction. Seules les variations de pH que l'on peut observer au sein du latex (CRETIN et al, 1980) et la disponibilité en NADP peuvent vraisemblablement modifier efficacement l'activité de l'enzyme malique.

Il faut rappeler, en ce qui concerne le pH, que des travaux antérieurs (JACOB et al, 1977 ; JACOB et al, 1979) ont permis de mettre en évidence dans le latex la fonction probablement importante de régulateur de pH (pH Stat) de la phosphoénolpyruvate carboxylase du sérum C.

L'existence d'une enzyme malique fonctionnelle dans ce même compartiment du latex, conduit à penser que cette déshydrogénase décarboxylante peut aussi jouer un rôle dans le cadre de la régulation du pH cytoplasmique.

En effet, elle peut transformer continuellement, dans la mesure où son cofacteur n'est pas trop limitant, le malate, acide fort issu du fonctionnement de la PEPcase et de la malate déshydrogénase, en acide pyruvique faible (monocarboxylique) et en CO_2 , ce qui devie vers la gauche l'équilibre $\text{H}_2\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ et entraîne une réalcalinisation du milieu.

Un tel schéma de pH stat cytosolique avait été proposé par DAVIES, (1973) mais cet auteur prévoyait une activité alternée de la PEPcase et de l'enzyme malique en fonction du pH, la première fonctionnant mieux en milieu alcalin et la seconde en milieu acide.

Or, tel n'est pas le cas de la décarboxylase du latex qui, comme la PEPcase, est activée par un accroissement du pH dans une zone physiologique (son affinité pour le NADP augmentant d'ailleurs dans ces conditions). SMITH et BOWN (1981) ont observé un phénomène analogue chez le coléoptile d'avoine et s'associent à l'hypothèse de MARRE (1979) suivant laquelle l'activité de la PEPcase et de l'enzyme malique augmentent avec le pH, de manière à ce que les teneurs en malate, pyruvate, CO_2 , NADPH et NADH se maintiennent le plus possible à leur niveau d'équilibre.

En outre, en synthétisant du malate, la PEPcase et la MDH dérivent une fraction des produits intermédiaires de la glycolyse, vers d'autres voies de synthèses que celle du polyisoprène qui passe par le pyruvate et l'acétate (LYNEN, 1969). Cette déviation dans certaines conditions peut être très importante, et représente une concurrence non négligeable pour la régénération du caoutchouc (TUPY et PRIMOT, 1976). A ce titre, l'enzyme malique peut atténuer cette compétition en décarboxylant le diacide et en réintroduisant sous forme de pyruvate, dans la voie biochimique de la production du caoutchouc, une partie des éléments carbonés qui lui avait été soustraite par la PEPcase.

Il faut noter que l'activation de l'enzyme malique par l'augmentation physiologique du pH, de 6,6 à 7,4 (BRZOZOWSKA et al, 1979), va de pair avec celle de la PEPcase ; plus la synthèse de malate sera forte, plus sa décarboxylation en pyruvate sera active dans les limites de NADP disponible.

Il faut, ici, rappeler que les fortes concentrations en malate augmentent en pH alcalin l'affinité de l'enzyme malique pour le cofacteur, ce qui peut être un autre élément qui favorise le fonctionnement de la décarboxylase.

Régénérateur de pouvoir réducteur, nécessaire à l'anabolisme isoprénique, élément d'un système régulateur de pH, facteur limitant les effets de déviation du catabolisme des sucres vers d'autres voies que la synthèse du caoutchouc, l'enzyme malique, au sein du sérum cytoplasmique, joue donc vraisemblablement un rôle important dans le métabolisme du latex et de sa régénération.

7.2. Activités de l'enzyme malique dans des sérums C de diverses origines.

Des analyses ont été réalisées dans le sérum C de diverses origines, pour estimer l'activité de l'enzyme malique chez des individus de même clone et de clones différents, afin d'apprécier la variabilité de cette réaction enzymatique probablement importante dans le métabolisme des laticifères.

7.2.1. Dosages et électrophorèses sur des lyophilisats de sérums C.

A partir d'échantillons différents de lyophilisats de sérums C préalablement filtrés sur Sephadex G 50, des électrophorèses visualisant l'activité de l'enzyme malique et des dosages permettant de chiffrer plus précisément cette activité, ont été réalisés.

Le tableau 22 montre une excellente relation entre l'intensité des bandes électrophorétiques révélées (§ matériel et techniques) et la valeur des activités correspondantes mesurées par dosage.

Il faut noter que, dans tous les cas, une seule bande "réactionnelle" apparaît sur l'électrophorégramme, et que la migration observée est identique. Dans les clones analysés, il n'y a donc qu'un seul type moléculaire d'enzyme malique.

On constate, en outre, que les échantillons de mêmes clones mais d'origines différentes, présentent des valeurs d'activité très voisines. Par contre, il peut y avoir une forte différence entre clones. Ainsi, les PB 86 ont une activité potentielle d'enzyme malique très supérieure à celle des PR 107. GT 1 et IAN 717 possèdent des valeurs intermédiaires.

A première vue, il se dégagerait donc l'idée que l'activité potentielle de l'enzyme malique a un certain caractère clonal.

Clones		Activité U ml^{-1}	Protéines mg.ml^{-1}	Activité spécifique UI	Intensité des bandes élec- trophorétiques
PB 86	No. 1	0,390	9,8	0,039	++++
PB 86	No. 2	0,320	10,7	0,029	++++
PR 107	No. 1	0,136	9,8	0,014	+
PR 107	No. 2	0,095	10	0,009	+
IAN 717		0,236	11,6	0,020	++
GT 1		0,220	10,5	0,021	+++

Tableau 22 : Activité de l'enzyme malique dans le sérum C de divers clones.

Les dosages sont réalisés au Tampon TEA 0,1 M pH 7,5, en présence de 5 mM de malate, 5 mM de MnSO_4 et 1 mM de NADP.

7.2.2. Dosages dans des sérums C immédiatement après récolte du latex.

Dans le but de vérifier la précédente remarque, des dosages d'enzyme malique ont été faits, en Côte d'Ivoire même, sur des sérums cytoplasmiques de latex fraîchement récoltés.

La réaction se fait en tampon TEA 0,1 M à pH 7,1 ou 7,5, contenant initialement du NADP (1 mM) et du malate (5 mM). Elle est démarrée par addition de 50 μl de sérum cytoplasmique fraîchement préparé.

La cinétique observée dans les premières minutes est courbe (Fig. 30). La solution enzymatique introduite contient en effet d'autres déshydrogénases "NADP dépendantes" et - bien qu'en faible quantité - des substrats de ces enzymes qui vont être utilisés en présence de NADP. C'est notamment le cas de la GGPdH et du glucose-6-phosphate (JACOB, 1970).

Lorsque ces substrats sont épuisés, seule l'enzyme malique dont les agents réactionnels (malate et cofacteur) sont en concentration saturante, va continuer à fonctionner et la cinétique enregistrée devient linéaire. A cet instant, du MnSO_4 (1 mM) est ajouté pour que la réaction se poursuive, si besoin est, dans des conditions optimales.

7.2.3. Dosages dans des sérums C de plusieurs arbres d'une parcelle monoclonale.

Le tableau 23 montre les résultats obtenus avec le latex d'arbres GT 1, choisis au hasard dans une parcelle monoclonale de 12 ans (encoche à 75 cm du collet, exploitée d'une manière classique : S/2, J/3, J/4).

La principale remarque concerne la valeur d'activité potentielle de l'enzyme malique qui est comparable chez tous les individus.

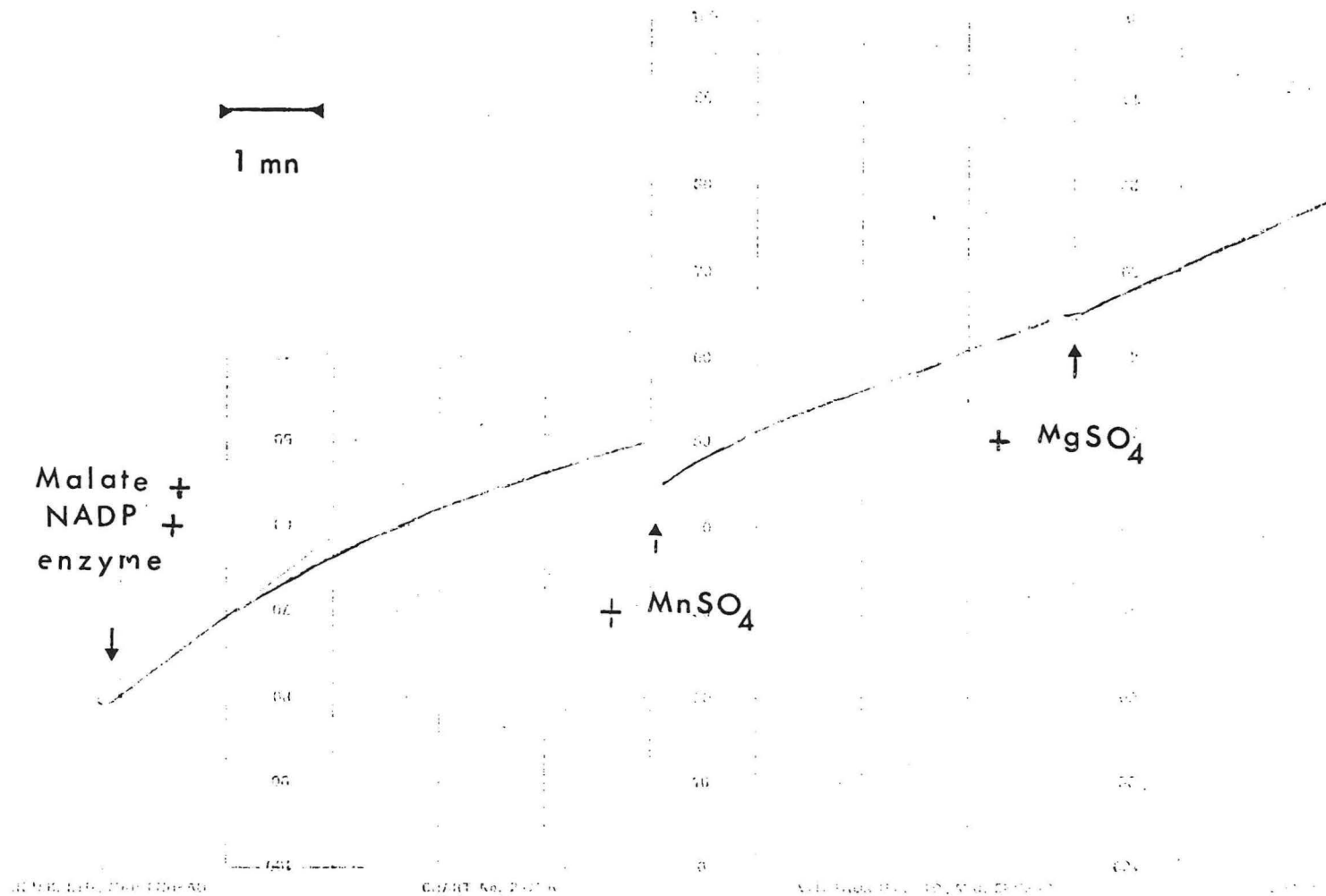


Figure 30 : Cinétique de la réduction du NADP en NADPH ; mesure de l'activité de l'enzyme malique dans du sérum cytoplasmique frais.

Tampon TEA 0,1 M pH 7,1 ; NADP 1 mM ; sérum 50 l ; malate 5 mM.

L'addition de MnSO₄ (1 mM) active très peu la réaction.

L'addition de MgSO₄ (5 mM) n'a pratiquement aucun effet.

Arbres	Vitesse à l'origine en D.O. mn^{-1}	Accélération par addition de Mn^{2+} , en % de la vitesse initiale	Activité de l'enzyme malique U ml^{-1} de sérum C
1	0,034	23	0,274
2	0,026	20	0,275
3	0,054	0	0,264
4	0,036	20	0,299
5	0,040	20	0,279
6	0,121	62	0,289
Moyenne			0,280

Tableau 23 : Activité de l'enzyme malique dans le latex de 6 arbres
GT 1 (moyenne de 2 mesures).

En deuxième lieu, la vitesse à l'origine qui est en quelque sorte le reflet des produits intermédiaires pour les déshydrogénases à NADP au sein du sérum à analyser, est assez variable d'un individu à l'autre. Chez le sixième, notamment, la valeur observée est très élevée. Il est possible que ce latex n'ait pas été conservé suffisamment au froid avant l'analyse, et que son métabolisme intermédiaire ait légèrement fonctionné, en donnant par exemple du G6P.

La modeste accélération induite par l'apport de Mn^{2+} (à l'exception de l'échantillon No. 6 dont on a noté déjà une caractéristique particulière) indique que l'enzyme malique a, dans ces conditions expérimentales, presque suffisamment de cation activateur pour bien fonctionner. Il est probable, compte tenu, d'une part du faible volume que représente l'aliquote de solution enzymatique par rapport au volume de la cuve où se déroule la réaction ($50 \mu\text{l}$ contre $3000 \mu\text{l}$), et d'autre part de la teneur du sérum C en Mn^{2+} et Mg^{2+} (0,05 à 0,1 mM et 5 à 10 mM respectivement) que le(s) cation(s) activateur(s), probablement surtout le Mn^{2+} compte tenu des caractéristiques de fonctionnement de l'enzyme malique dans le sérum filtré, est(sont) fixé(s) sur la déshydrogénase et fonctionnel(s) sous cette forme.

Un essai analogue a été réalisé avec des arbres PR 107 dans des conditions analogues.

Le tableau 24 permet de constater également l'homogénéité des valeurs d'activité de l'enzyme malique chez tous les individus et la variabilité de la vitesse initiale.

S'il apparaît qu'il y a peu de variabilité entre individus en ce qui concerne l'activité de leur enzyme malique, par contre la variabilité interclonale de ce paramètre se précise.

Arbres	Vitesse à l'origine en D O.mn ⁻¹	Activité de l'enzyme malique U.ml ⁻¹ sérum C
1	0,015	0,150
2	0,025	0,162
3	0,014	0,178
4	0,007	0,173
5	0,033	0,160
6	0,026	0,185
Moyenne :		0,168

Tableau 24 : Activité de l'enzyme malique dans le sérum C du latex de 6 arbres PR 107.

Les résultats obtenus confirment en effet que les GT 1 possèdent une enzyme malique dont l'activité potentielle est presque deux fois plus forte que celle des PR 107.

7.2.4. Activité potentielle de l'enzyme malique en fonction de la hauteur du panneau d'exploitation.

Compte tenu du peu de variabilité de l'activité de l'enzyme malique entre individus d'un même clone choisis dans des conditions écologiques identiques, il était intéressant de voir l'influence d'un paramètre important de l'exploitation : la position de l'encoche par rapport au collet.

Dans ce but, des arbres GT 1 exploités de la même manière, mais saignés à 3 hauteurs différentes (140, 80 et 30 cm du collet) ont été utilisés. Pour chaque essai, les dosages ont été faits sur 2 répétitions de 3 arbres dont le latex a été mélangé, volume pour volume (le latex des 5 premières minutes est éliminé, l'aliquote utilisée correspond à l'écoulement des 20 minutes suivantes).

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau 25.

Plusieurs remarques peuvent être faites :

- Plus l'encoche est basse, plus la vitesse à l'origine diminue. Ce phénomène qui indique une teneur plus faible des substrats des déshydrogénases à NADP en bas de panneau, est en concordance avec une diminution d'activité métabolique induite par une alimentation hydrocarbonée plus difficile des tissus (TUPY, 1973 a, b, c, d.).

Essais	Position de l' encoche par rapport au collet en cm	Vitesse à l'origine D O.mn ⁻¹	Activité potentielle U.ml ⁻¹ sérum C	Protéines mg ml ⁻¹ sérum C	Activité spécifique de l'enzyme malique U.I.
1	140	0,049	0,285	19	0,015
2	140	0,053	0,310	21	0,015
5	80	0,035	0,290	17	0,017
6	80	0,030	0,300	17	0,018
7	30	0,019	0,210	16	0,013
8	30	0,019	0,210	16	0,014

Tableau 25 : Activité potentielle de l'enzyme malique en fonction de la position de l'encoche sur le tronc.

- . L'activité de l'enzyme malique exprimée en unité ml⁻¹ de sérum C est peu différente sinon semblable pour les 2 positions hautes, mais elle décroît sensiblement pour la position basse.
- . La teneur en protéine, elle aussi, diminue mais plus discrètement en fonction de la "hauteur de l'encoche" ; ce phénomène est vraisemblablement à rapprocher de la modification métabolique en bas de panneau, déjà évoquée précédemment.
- . Il en résulte que l'activité spécifique de l'enzyme malique varie donc beaucoup moins que l'activité potentielle exprimée par ml⁻¹ de sérum C. La diminution de cette dernière ne serait pas spéciale à la déshydrogénase (décarboxylante), mais correspondrait plus à une "dépression" globale du potentiel de régénération au sein des laticifères situés en bas de panneau (TUPY, 1973, c,d).

7.2.5. Influence de la stimulation sur l'activité potentielle de l'enzyme malique.

Une expérience a été faite sur des arbres GT 1, pour voir si la stimulation à l'Ethrel avait une influence sur l'activité potentielle de l'enzyme.

Le tableau 26 montre que, apparemment, le traitement n'a aucun impact significatif sur l'activité potentielle de l'enzyme malique.

Cet essai étant trop ponctuel, ne peut permettre de tirer des conclusions définitives. Toutefois, la cohérence des résultats indique que dans les conditions expérimentales utilisées, il est peu probable que l'agent stimulant, l'éthylène en l'occurrence, ait une action particulière sur la potentialité de la décarboxylase, ce qui recoupe des travaux réalisés sur les enzymes de la glycolyse (JACOB et d'AUZAC, résultats non publiés). Ceci n'empêche pas que les variations de conditions de milieu induit par la stimulation (pH, teneurs en effecteurs ...) peuvent, par contre, avoir une influence certaine sur l'activité de la réaction catalysée par la décarboxylase.

		Activité en $U \cdot ml^{-1}$ sérum C		
		saignée avant stimulation	première saignée après stimulation	deuxième saignée après stimulation
Arbres témoins non stimulés	1	0,300	0,328	0,210
	2	0,274	0,272	0,270
	3	0,286	0,300	0,290
Arbres stimulés	4	0,274	0,335	0,290
	5	0,310	0,345	0,295
	6	0,390	0,310	0,320

stimulation

Tableau 26 : Recherche de l'influence de la stimulation sur l'activité de l'enzyme malique du latex GT 1 de 12 ans, saigné en J3/J4, S/2 ; tous les arbres n'avaient pas été stimulés depuis 4 mois.
Stimulation à l'Fthrel : 100 mg de matière active par arbre, sur écorce grattée de 2 cm sous encoche.

7.2.6. Activités potentielles et spécifiques de l'enzyme malique chez différents clones.

Dans le but de mesurer des activités potentielles et spécifiques de l'enzyme dans le latex d'arbres d'origines différentes mais de même âge cultivés et exploités dans des conditions analogues (saignée S/2 J/3 J/4, 4 stimulations/an), des analyses ont été faites sur des hévéas d'un champ polyclonal.

Deux échantillons pour chaque clone correspondant au mélange du latex de 3 arbres ont été analysés.

Le tableau 27 montre une bonne analogie entre deux répétitions, tant en ce qui concerne l'activité potentielle exprimée en $U \cdot ml$ de sérum C que l'activité spécifique.

La grande différence entre l'activité potentielle de l'enzyme malique chez PR 107 et PB 86 est confirmée.

Toutefois, il y a toute une gradation de valeur entre ces deux extrêmes, et il n'est pas possible de faire des groupes tranchés haute et basse activité, mais le nombre d'essais est trop limité pour permettre une étude statistique.

Il n'en reste pas moins que cette activité de l'enzyme malique doit correspondre à un caractère clonal particulier. Il est possible d'imaginer qu'elle puisse éventuellement et ponctuellement servir de marqueur enzymatique dans le cadre d'études génétiques.

Clones		U.ml ⁻¹ sérum C	Protéine mg.ml ⁻¹ sérum C	Activités spécifiques U I
PB 86	1	0,463	15,00	0,030
	2	0,482	16,25	0,030
TJ1	1	0,366	16,25	0,022
	2	0,385	19,25	0,020
GT 1	1	0,347	18,75	0,018
	2	0,299	18,75	0,016
RRIM 623	1	0,217	×	×
	2	0,234	16,25	0,014
IR 22	1	0,175	×	×
	2	0,221	16,25	0,014
PR 107	1	0,120	16,20	0,007
	2	0,115	15,00	0,008

Tableau 27 : Activités potentielles et spécifiques de l'enzyme malique dans le sérum du latex de différents clones.

× 4 dosages, à la suite d'incidents techniques, n'ont pas été possibles.

Cette caractéristique a d'ailleurs été retrouvée chez l'enzyme malique du cerveau de souris (BERNSTINE, 1978) ; il existe 2 souches d'animaux : l'une dont les cellules cérébrales présentent une décarboxylase à haute activité potentielle, et l'autre dont les mêmes cellules ont une décarboxylase à basse activité. Les hybrides, en ce qui concerne ce paramètre, présentent un caractère moyen.

L'utilisation d'anti-sérums a bien montré que les différences d'activité étaient dues à des différences du nombre de molécules enzymatiques. L'analyse génétique indique que l'enzyme malique du cerveau de souris est déterminée par un simple locus, qui existent dans deux formes alléliques. Il faut souligner aussi que ce phénomène ne se retrouve pas chez l'enzyme malique du coeur de ce même animal.

7.2.7. Caractéristique de l'enzyme malique issue du latex de PR 107 et de PB 86.

L'activité potentielle de l'enzyme malique étant très différente chez PR 107 et PB 86, il était intéressant de voir si la déshydrogénase présentait dans ces deux cas des caractéristiques d'affinités analogues ou non.

Dans ce but, une purification a été réalisée à partir de lyophilisats de sérum C de PR 107 et PB 86.

Le tableau 28 montre que l'affinité de l'enzyme malique pour le NADP ou le malate sont très comparables. En outre, la migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide est la même dans les 2 cas. Ces résultats indiquent que l'enzyme malique, dans PR 107 ou PB 86 se trouve bien sous une forme moléculaire identique, mais en quantité différente, ceci est d'ailleurs confirmé par la différence d'intensité des bandes spécifiques révélées sur électrophorèse (§ 8.1.), puisque par cette méthode aucun inhibiteur du milieu ne peut intervenir.

Cette caractéristique est donc bien analogue à celle notée par BERNSTINE (1978), et doit effectivement correspondre à une expression génique particulière.

	Malate	NADP
PB 86	0,74	0,036
PR 107	0,62	0,029

Tableau 28 :

Affinités de l'enzyme malique purifiée de PR 107 et de GT 1

Conditions expérimentales : Tampon TEA 0,1 M - pH 7,5 - Mn SO₄ 5 mM - NADP 1,4 mM - Malate 5 mM.

8. BIBLIOGRAPHIE

- ANDREW P., 1965.
The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range.
Biochem. J., 96, 595-606.
- ARCHER B. ; AUDLEY B.G. ; MCSWEENEY G.P. et TAN CHEE HONG, 1969.
Studies on composition of latex serum and "bottom fraction" particles.
J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, (4), 560-569.
- ARREGUIN B. et ROCK M.C., 1967.
Ciclo de las pentosas en el latex de Hevea brasiliensis.
Bol. Inst. Quim. Univ. Noc. Mexico, 19, 58-73.
- ASAMI S. ; INOUE K. ; MATSUMOTO K. ; MURACHI A. et AKAZAWA T., 1979.
NADP malic enzyme from maize leaf: purification and properties.
Arch. Biochem. Biophys. (USA), 194, 503-510.
- ASAMI S. ; INOUE K. et AKAZAWA T., 1979.
NADP malic enzyme from leaf: regulatory properties.
Arch. Biochem. Biophys. (USA), 196, 581-587.
- BAQUI S.M. ; MATTOD A.K. and MUDI W., 1974.
Mitochondrial enzymes in mango fruit during ripening.
Phytochem. 13, 2045-2055.
- BERGMEYER H.U., 1974.
Methods of enzymatic analysis.
Springer-Verlag. Pub. Berlin, Heidelberg, New York ; 6 vol.
- BERNSTINE E.G., 1979.
Genetic control of mitochondrial malic enzyme in Mouse Brain.
J.B.C. 254, 83-87.
- BESSEY O.A. ; LOWRY O.H. and BROOK M.J., 1946.
Method for the determination of alkaline phosphatase of serum.
J.B.C., 164, 321-325.
- BLACK C.C., 1973.
Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake.
Ann. Rev. Plant. Physiol., 24.
- BRANDON P.C., 1967.
Temperature features of enzymes affecting crassulacean metabolism.
Plant Physiol., 42, 577-804.
- BRANDON P.C., VAN BOEKEL MOL. T.N., 1973.
Properties of purified malic enzyme in relation to crassulacean acid metabolism.
Eur. J. Biochem., 35, 62-69.
- BRZOZOWSKA-HANOWER J. ; CRETIN H. ; HANOWER P. et MICHEL P., 1979.
Variations de pH entre compartiments vacuolaires et cytoplasmique au sein du latex d' Hevea brasiliensis. Influence saisonnière et action du traitement par l'ethrel générateur d'éthylène. Répercussion sur la production et l'apparition d'encoches sèches.
Physiol. Vég., 17, 851-867.
- CAZZULO J.J. ; JUAN S.M. and SEGURA E.L., 1977
The malic enzyme from trypanosoma cruzi.
J. Gen. Microbiol., 99, 237-241.

- CHAPMAN K.S.R. and HATCH M.D., 1977.
Regulation of mitochondrial NAD-malic enzyme involved in C4 pathway photosynthesis.
Arch. Biochem. Biophys., 184, 298-306.
- CHEN P.S. ; TORIBARA T.Y., and WARNER H., 1957.
Microdetermination of phosphore.
Annal. Chem., 28, 1756-1758.
- COLEMAN J.D. and PALMER J.M., 1972.
The oxidation of malate by isolated plant mitochondria.
Eur. J. Biochem., 26, 499-509.
- COOMBS J. ; BALDRY C.W. and BUCKE C., 1973.
The C-4 pathway in Pennisetum purpureum. II-Malate dehydrogenase and malic enzyme.
Planta, 110, 109-120.
- COUPE M. ; PUJARNISCLE S. and d'AUZAC J., 1972.
Compartmentation de diverses oxydoréductases (peroxydases-o-diphénoloxydase et malate déshydrogénase) dans le latex d' Hevea brasiliensis.
Pjysiol. Veg., 10, 459-480.
- CRETIN H. ; JACOB J.L. ; PREVOT J.C. et d'AUZAC J., 1980.
pH du latex : son influence sur la production et les éléments de sa régulation.
Communication au Symposium International "Natural Rubber: towards the year 2000" de Saltillo, 7-11 Juillet 1980 et:
Rev. Gen. Caout. Plast., 603, 111-115.
- DANNER J. et TING I.P., 1967.
CO₂ métabolisme in corn roots. II-Intracellular distribution of enzymes.
Plant Physiol., 42, 719-724.
- d'AUZAC J. et JACOB J.L., 1967.
L' ATP inhibiteur allostérique de la lactate déshydrogénase du latex d' Hevea brasiliensis.
C.R. Acad. Sci. Paris (série D), 264, 2007-2010.
- DAVIES D.D., 1973.
Control of and by pH.
Symp. Soc. Exp. Biol., 27, 513-529.
- DAVIES D.D. and PATIL K.D., 1974.
Regulation of "malic" enzyme of solanum tuberosum by metabolites.
Biochem. J., 137, 45-53.
- DAVIES D.D. ; NASCIMENTO K.H. and PATIL K.D., 1974.
The distribution and properties of NADP malic enzyme in flowering plants.
Phytochem., 13, 2417-2425.
- DAVIES D.D. and PATIL K.D., 1975.
The control of NAD specific malic enzyme from bud mitochondria by metabolites.
Planta, 126, 197-211.
- DAVIS A.J., 1964.
Disc electrophoresis. II-Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sc., 121, 404-427.

- DILLEY D.R., 1966.
Purification and properties of apple fruit malic enzyme.
Plant Physiol., 41, 214-220.
- DITTRICH P., 1976.
Nicotinamide adenine dinucleotide-specific "malic" enzyme in Kalanchoë daigremontiana and other plants exhibiting crassulacean acid metabolism.
Plant Physiol., 57, 310-314.
- DROUET A.G. and HARTMANN C.J.R., 1977.
Activity of pear fruit malic enzyme ; its regulation by metabolites.
Phytochem., 16, 505-508.
- FRENKEL R., 1972a.
Allosteric characteristics of bovine heart mitochondrial malic enzyme.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 47, 931-937.
- FRENKEL R., 1972b.
Isolation and some properties of a cytosol and a mitochondrial malic enzyme from bovine brain.
Arch. Biochem. Biophys., 152, 136-143.
- FRENKEL R., 1972c.
Bovine heart malic enzyme. II-Reversibility of the reaction.
J.B.C., 247, 5569-5572.
- GARCIA P., 1975.
Contribution à l'étude de l'enzyme malique du raisin.
Thèse de Doctorat de 3^e cycle. U.S.T. Montpellier, 52 p.
- GARNIER-DARDART J., 1965.
Activités enzymatiques des chloroplastes isolés de feuilles de Bryophyllum daigremontianum Berger : oxydations des hexoses, formation et dégradation d'acide malique.
Physiol. Veg., 3, 215.
- GARNIER-DARDART J. et QUEIROZ O., 1974.
Malic enzyme in the leaves of Bryophyllum daigremontianum.
Phytochem., 13, 1695-1702.
- HARARY I. ; KOREY S.R. and OCHOA S., 1953.
Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation.
VII-Equilibrium of malic enzyme reaction.
J.B.C., 203, 595-604.
- HARTMANN C.J.R., 1975.
Maturation and respiratory behaviour of cherries harvested at regular intervals after flowering and stored at constant temperature.
Colloque International CNRS, No. 238, 235-240.
- HARTMANN C.J.R. ; BOULAY M.P. and DROUET A.G., 1977.
Some properties of malic enzyme extracted from the cherry.
Physiol. Veg., 15, 567-574.
- HATCH M.D. and MAU S.L., 1977.
Association of NADP and NAD-linked malic enzyme activities in Zba mays: relation to C-4 pathway of photosynthesis.
Arch. Biochem. Biophys., 179, 361-369.

- HEPPER C.M. et AUDLEY B.G., 1969.
The biosynthesis of rubber from hydroxy methylglutaryl coenzyme A in Hevea brasiliensis latex.
Biochem. J., 114, 379-386.
- HOBSON G.E., 1974.
Electrophoretic investigation of enzyme from developing lycospernum esculentum fruit.
Phytochem., 13, 1383-1390.
- HOEK J.B. ; PEARSON D.J. and OLEMO N.K., 1976.
Nicotinamide-adenine dinucleotide-linked "malic" enzyme in flight muscle of the Tse-tse fly (*Glossina*) and other insects.
Biochem. J., 160, 253-262.
- HSU R.Y. ; LARDY H.A. and CLELAND W.W., 1967.
Pigeon liver malic enzyme. V-Kinetic studies.
J.B.C., 242, 5315-5322.
- HULME A.C. and RHODES M.J.C., 1971.
Pome fruits in the biochemistry of fruits and the products.
HULME A.C., ed.2, p. 303. Acad. Press London.
- JACOB J.L., 1970.
Particularités de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'Hevea brasiliensis.
Thèse de Doctorat d'Etat de Sciences Naturelles, Faculté des Sciences d'Orsay, soutenue le 11.5.1970 Ao No. 4129.
- JACOB J.L. ; RIBAILLIER D. et d'AUZAC J., 1970.
La NADP phosphatase du latex d' Hevea brasiliensis, interférence sur l'anabolisme isoprénique.
Physiol. Veg., 8, 247-262.
- JACOB J.L. et d'AUZAC J., 1972.
La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase du latex d' Hevea brasiliensis, comparaison avec son homologue phosphorylante.
Eur. J. Biochem., 31, 255-265.
- JACOB J.L. et SONTAG N., 1973.
Une enzyme nouvelle : la 2'nucléotidase du latex d' Hevea brasiliensis.
Eur. J. Biochem., 40, 207-214.
- JACOB J.L. ; PREVOT J.C. et PRIMOT L., 1977.
Métabolisme du latex d' Hevea brasiliensis. Le carrefour phosphoénol-pyruvique. I-La phosphoénolpyruvate carboxylase.
Rapport de Recherches No. 14/77, 112p., 39 fig.
- JACOB J.L. ; NOUVEL A. et PREVOT J.C., 1978.
Electrophorèse et mise en évidence d'activités enzymatiques dans le latex d'Hevea brasiliensis.
Rev. Gen. Caout. Plast., 582, 87-90.
- JACOB J.L. ; PREVOT J.C. et PRIMOT L., 1979a.
Métabolisme du latex d' Hevea brasiliensis. Le carrefour phosphoénol-pyruvique. II-La Pyruvate kinase.
Rapport de Recherches No. 35/79, 96p., 28 fig.
- JACOB J.L. ; PREVOT J.C. et PRIMOT L., 1979b.
Purification et étude de la phosphoénolpyruvate carboxylase du latex d' Hevea brasiliensis.
Physiol. Veg., 17, 501-516.

- JOHNSON H.S. and HATCH M.D., 1970.
Properties and regulation of leaf malate dehydrogenase and malic enzyme in plant with C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis.
Biochem. J., 119, 273-280.
- KLEBER H.P., 1975.
Inhibition of the malic enzyme from Acinetobacter calisaceticus by NADPH and NADH.
Acta Biol. Med. Ger., 34, 1739-1743.
- KLEBER H.P. and AURICH H., 1976.
Regulation of the activity of Acinetobacter malic enzyme by organic acids.
Z. Allg. Mikrobiol., 16, 91-95.
- KLEIN I., 1970.
Malic enzyme in pome - D - fruits some properties and relation to fruit ripening.
Diss. Abstr. Int. B, Sci. Ing., 30, 4865-B.
- KRISHNAMURTHY S. and PATWARDHAN M.V., 1971.
Properties of malic enzyme decarboxylating from pulp of mango - D - fruit mangifera indica-D.
Phytochem., 10, 1811-1815.
- KUN E., 1963.
In the Enzymes. Vol.7, p. 149. Ed. by Boyer ed., LARDY H. and MYRBACH K., New-York ; Academic Press Inc.
- LARDY H.A. ; FOSTER D.O. ; SHRAGO E. and RAY P.D., 1964.
Advance Enzyme Regul., 2, 39.
- LAYNE E., 1957.
In "Methods in enzymology".
Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins.
COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O., ed., Vol. 3, 447-454.
Acad. Press. Inc., Pub., New-York.
- LI J.J. ; ROSS C.R. ; TEPPERMAN H.M. and TEPPERMAN J., 1975.
NADP malic enzyme of rat liver ; purification and properties and immunological studies.
J.B.C., 250, 141-148.
- LIN R.L. and DAVIS E.J., 1974.
Malic enzyme of rabbit heart mitochondria.
J.B.C., 249, 3867-3875.
- LOWRY O.H. ; ROSEBROUGH N.J. ; FARR A.L. and RANDALL R.J., 1951.
Proteins measurement with Folin phenol reagent.
J.B.C., 193, 265-275.
- LYNEN F., 1969.
Biochemical problems of rubber synthesis.
J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 389-406.
- MACRAE A.R., 1971.
Isolation and properties of a malic enzyme from cauliflower bud mitochondria.
Biochem. J., 122, 495-501.

- MANDELLA R.D. and SAUER L.A., 1975.
The mitochondrial malic enzymes: I-Submitochondrial localization and purification and properties of the NAD(P)^+ -dependent enzyme from adrenal cortex.
J.B.C., 250, 5877-5884.
- MASSARINI E. and CAZZULO J.J., 1976(a).
NADP linked malic enzyme from a marine pseudomonas.
I-Effect of monovalent cation.
- MASSARINI E. and CAZZULO J.J., 1976(b).
NADP linked malic enzyme from a marine pseudomonas.
II-Effect of divalent cation.
- MASSARINI E. and CAZZULO J.J., 1976(c).
NADP linked malic enzyme from a marine pseudomonas.
III-Effect of divalent cations on metabolites inhibition.
Ann. Assoc. Quim. Argent. 64 (a), 29-39, (b) 40-50, (c) 51-59.
- MOREL C., 1979.
Rôle coordinateur du CAM dans le métabolisme intermédiaire.
I-Fonction anaplérotique de l'enzyme malique et cycle des acides tricarboxyliques.
Physiol. Veg., 17, 697-712.
- MUAKE FUMIO, TORIKATA TAKAO, HANADA SHUICHI, KOGA KATSUMI, and HAYASHI KATSUYA, 1967.
Isolation and characterization of malic enzyme from the pupa bombyx mori.
J. Biochem., Tokyo, 82, 853-858.
- MUKERJI S.K. and TINK I.P., 1968.
Malate dehydrogenase (decarboxylating) (NADP) isoenzymes of opuntia stem tissue. Mitochondrial, chloroplast and soluble forms.
Biochim. Biophys. Acta, 167, 239-249.
- NISHIKIDO T. and WADA T., 1974.
Comparative studies of NADP-malic enzyme from C-4 and C-3 plants.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 243-249.
- NUMATA NORIO, 1975.
Crystallisation and some properties of rat liver malic enzyme.
OSAKA DAIGAKU IGAKU ZASSHI, 27, 99-104.
- OCHOA S., 1955.
Malic enzyme, in "Methods in enzymology", vol.I
Colowick S.P. and Kaplan N.O. eds. Academic Press, New-York, 739-753.
- OUTLAW W.H. and MANCHESTER J., 1981.
High levels of malic enzyme activities in Vicia faba L. epidermal tissue.
Plant Physiol., 68, 1047-1051.
- PARVIN R. ; PANDE S.V. and VENKITASUBRAMANIAN T.A., 1964.
Purification and properties of malate dehydrogenase (decarboxylating) from mycobacterium.
Biochem. Biophys. Acta, 92, 260-277.

- PERSANOV V.M. ; VORONOVA E.A. ; OPARINA L.A. and KARPILOV Y.S., 1976(a).
Isolation and purification of the NADP dependent malic enzyme from corn leaves.
Biokhimiya, 41, 921-925.
- PERSANOV V.M., 1976(b).
Study of the properties of NADP malate dehydrogenase (1.1.1.4) from corn leaves.
Biokhimiya, 41, 1014-1022.
- PUJARNISCLE S., 1957.
Le magnésium dans le latex et son dosage par le sequestrène.
Bull. Caout., (série Indochine), 16, 41-46.
- PUPILLO P. and BOSSI P., 1979.
Two forms of NADP-dependant malic enzyme in expanding maize leaves.
Planta, 144, 283-289.
- PUPILLO P. and DEL GROSSO E., 1981.
A possible plasma membrane particle containing malic enzyme activity.
Planta, 151, 506-511.
- RIBAILLIER D. ; JACOB J.L. et d'AUZAC J., 1971.
Sur certains caractères vacuolaires des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis.
Physiol. Veg., 9, 423-437.
- RIBAILLIER D., 1972.
Quelques aspects du rôle des lutoïdes dans la physiologie et l'écoulement du latex d' Hevea brasiliensis.
Thèse de Doctorat d'Etat de Sciences Naturelles. Abidjan.
- RUTTER W.J. and LARDY H.H., 1958.
Purification and properties of pigeon liver malic enzyme.
J.B.C., 233, 374-382.
- SANWAL B.D. ; WRIGHT J.A. and SMANDO R., 1968.
Allosteric control of the activity of malic enzyme in *Escherichia coli*.
Biophys. Biochem. Res. Comm., 31, 625-
- SANWAL B.D. and SMANDO R., 1969.
Malic enzyme of *Escherichia coli*. Possible mechanism for allosteric effects.
J.B.C., 244, 1824-
- SARAWEK S. and DAVIES D.D., 1976.
The identification and properties of a naturally occurring inhibitor of malic enzyme.
Phytochem., 15, 479-481.
- SAUPHANOR DEBEST B., 1981.
Contribution à l'étude de l'enzyme malique de la tomate. L-malate NADP oxydoréductase EC-1.1.1.40.
Thèse de 3° cycle. U.S.T.L. Montpellier.
- SCABAS A.R. and WHATLEY F.R., 1977.
Metabolic regulation of malic enzyme activity from *paracoccus denitrificans* by glyoxylate and acetyl CoA.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 74, 116-124.

- SCHIMERLIK M.I. and CLELAND W.W., 1977(a).
Inhibition and alternate substrate studies on the mechanism of malic enzyme.
Biochemistry, 16, 565-583.
- SCHIMERLIK M.I. ; GRIMSHAN C.E. and CLELAND W.W., 1977(b).
Determination of rate limiting steps for malic enzyme by the use of isotope effects and other kinetic studies.
Biochemistry, 16, 571-575.
- SESHADRI R. ; MURTHY P. ; SURYANARAYAMA and VENKITASUBRAMANIAN T.A., 1978.
Role of malic enzyme in mycobacteria. Part II - Purification and properties of malic enzyme from mycobacterium senegmatis.
Indian J. Biochem. Biophys., 15, 282-285.
- SKORKOWSKI E.F. ; SWIERCZYNSKI J. and ALEKSANDROWICZ Z., 1977.
High activity of NADP dependent malic enzyme in mitochondria from abdomen muscle of the crayfish Gronectus limosus.
Comp. Biochem. Physiol. B., 58, 297-301.
- SLACK C.R. ; HATCH M.D. and GOODCHILD D.J., 1969.
Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the C4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis.
Biochem. J., 114, 489-498.
- SMITH C.E. and BOWN A.W., 1981.
The regulation of eat coleoptile phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme activities by H⁺ and metabolites. Kinetic evidence for and against a metabolic pH stat.
Can. J. Bot., 8, 1397-1404.
- SPETTOLI P. ; BOTTACIN A. and ZAMORANI A., 1980.
Purificazione per cromatografia di affinita dell' enzima malico estratto da uva.
Vitis, Deu, 19, 4-12.
- STOREY K.B. ; MUSTAFA T. and HOCHACHKA P.W., 1975.
Squid muscle malic enzyme.
Comp. Biochem. Physiol. B., 52, 183-185.
- TUPY J., 1973 (a).
Influence de la stimulation hormonale de la production sur la teneur en saccharose du latex d' Hevea brasiliensis.
Rev. Gen. Caout. Plast., 50, 311-314.
- TUPY J., 1973 (b).
The regulation of invertase activity in the latex of Hevea brasiliensis. The effects of growth regulators bark wounding and latex tapping.
J. Exp. Bot., 24, 516-524.
- TUPY J., 1973 (c).
The level and distribution pattern of latex sucrose along the trunk of Hevea brasiliensis to affected by the sink region induced by latex tapping.
Physiol. Veg., 11, 1-11.

- TUPY J., 1973 (d).
The sucrose mobilizing effect of auxins in Hevea brasiliensis
Dependence of the metabolic activity of the treated tissue.
Physiol. Veg., 11, 12-23.
- TUPY J. and PRIMOT L., 1976.
Control of carbohydrate metabolism by ethylene in latex vessels
of Hevea brasiliensis in relation to rubber production.
Biologia Plantarum, 18, 373-384.
- VALENTI V. and PUPILLO P., 1981.
Activation kinetics of NAD dependent malic enzyme of cauliflower
bud mitochondria.
Plant Physiol., 68, 1191-1196.
- VIDAL M.C. and CAZZULO J.J., 1976.
On the regulatory properties of a halophilic malic enzyme from
halobacterium cultirubrum.
Experimentia, 32, 441-442.
- WALKER D.A., 1960.
Physiological studies on acid metabolism. VII-Malic enzyme
from Kalanchoë crenata: effects of carbon dioxide concentration.
Biochem. J., 74, 216-230.
- WEBER K. and OSBORN M., 1969.
The reliability of molecular weight determination by dodecyl-
sulfate, polyacrylamide gel electrophoresis.
J.B.C., 844, 4406-4412.
- WIEME R.J., 1974.
In "Methods of enzymatic analysis" 2° ed. H.U. Bergmeyer ed.
Acad. Press, Inc. New York and London. Vol.2, 618.
- WINTER K. ; FOSTER J.G. ; EDWARDS G.E. and HOLTOM A.M., 1982.
Intracellular localization of enzymes of carbon metabolism in
Mesembryanthemum crystallinum exhibiting C₃ photosynthetic
characteristics or performing crassulacean acid metabolism.
Plant Physiol., 69, 300-307.
- YEUNG KWOK KAM and CARRICO R.J., 1976.
Purification of malic enzyme affinity chromatography on
immobilized N⁶ (6-aminohexyl) adenosine 2'5' diphosphate
(Chicken liver).
Anal. Biochem., 74, 369-375.
- ZIEGLER I., 1974.
Malate dehydrogenase in Zea mais. Properties and inhibition
by sulfite.
Biochim. Biophys. Acta., 364, 28-37.
