Etudes et Thèses

LA VACUOLE DANS L'HOMÉOSTASIE ET LA SÉNESCENCE DES CELLULES LATICIFÈRES D'HÉVÉA

Hervé CHRESTIN

Éditions de l'ORSTOM

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

(changement de patronyme de CRETIN en CHRESTIN) (Décret : J.O. Paris, du 3 août 1983)

LA VACUOLE DANS L'HOMÉOSTASIE ET LA SÉNESCENCE DES CELLULES LATICIFÈRES D'HÉVÉA

Éditions de l'ORSTOM INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION Collection ETUDES et THESES PARIS 1985 Cette étude a fait l'objet d'une thèse intitulée «Le compartiment vacuo-lysosomal (les lutoïdes) du latex d'*Hévéa Brasiliensis,* son rôle dans le maintien de l'homéostasie et dans les processus de sénéscence des cellules laticifères», soutenue à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, le 22 mars 1984, pour obtenir le titre de Docteur ès Sciences Naturelles.

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, « que les «copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées « à une utilisation collective» et, d'autre part, que les analystes et les courtes citations dans un but « d'exemple et d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le « consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayant cause, est illicite» (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une « contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal».

à PASCALE.

"Au Professeur Jean d'AUZAC, pionnier et découvreur des ATPase tonoplastiques chez les végétaux supérieurs, mon "père scientifique" devenu un véritable ami ; merci ! "

AVANT - PROPOS

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer, à Abidjan (Centre d'Adiopodoumé) en Côte d'Ivoire. Je remercie vivement les dirigeants et les instances scientifiques de l'ORSTOM, qui m'ont donné les moyens de mener ce travail à terme, et m'ont laissé la possibilité de rédiger et de soutenir cette thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de l'Institut de Recherche sur le Caoutchouc en Afrique (IRCA), dont je remercie vivement les instances dirigeantes. Une partie de ce travail a été réalisé en commun avec les chercheurs du Service de Physiologie et d'Agronomie de l'IRCA (Centre de Bimbresso). Qu'ils trouvent ici l'expression de ma vive reconnaissance pour leur collaboration.

Cette étude a bénéficié de l'appui du Ministère Ivoirien de la Recherche Scientifique et d'aides du CNRS et de la DGRST. Les produits radioactifs nous ont été fournis gracieusement par le CEA. J'exprime toute ma gratitude à l'ensemble de ces instances scientifiques.

Notre étude se situe dans le cadre du programme adopté par l'ORSTOM, sur la connaissance des "caractéristiques physiologiques et biochimiques du latex. Une partie de ce programme concernant les caractéristiques du tonoplaste lutoïdique a été menée parallèlement en Côte d'Ivoire (H. CHRESTIN) sur les lutoïdes intacts, fraichement isolés du latex, et en Europe (B. MARIN) sur les vésicules reconstituées à partir de lutoïdes lyophylisés. Ces travaux ont abouti, malgré l'utilisation de techniques et de matériel différents, indépendamment et dans le même temps, à des résultats convergents.

LE COMPARTIMENT VACUOLYSOSOMAL (les lutoïdes) DU LATEX D'HEVEA BRASILIENSIS : SON ROLE DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE ET DANS LE PROCESSUS DE SENESCENCE DES CELLULES LATICIFERES.

SOMMAIRE

INTRODUCTION :	21
LA CELLULE LATICIFERE ET LE LATEX	23
Résumé	29
LES LUTOIDES	31
I. Caractère vacuo-lysosomal II. La menbrane lutoïdique Résumé	31 37 48
LES FACTEURS LIMITANT LA PRODUCTION DU LATEX	51
I. Les facteurs généraux de la production	51
II. Regulation intra-laticifere de la production du latex Résumé	54 81
LA STIMULATION DE LA PRODUCTION EN HEVEACULTURE	87
 A. Effets de la stimulation sur l'écoulement du latex B. Effets de la stimulation sur les paramètres bio- chimiques et physiologiques du latex Résumé 	87 89 96
"L'ENCOCHE SECHE" : MALADIE PHYSIOLOGIQUE DE L'ECORCE ?	101
A. Symptômes et caractéristiques de l'encoche sèche B. Symptômes biochimiques au niveau du latex	
des encoches sèches	106
d'encoches sèches Résumé	108 111

DEGRADATION PEROXYDATIVE ET PROTECTION DES MEMBRANES BIOLOGIQUE 113

A.Im	portance de la stabilité de la membrane lutoidique	113
в.Pro (Bi	oduction de formes toxiques de l'oxygène bliographie)	114
C.Le	es "protecteurs" des membranes	118
Re	ésumé	125

.

MATERIELS ET METHODES

I. Sélect	on des hévéas et récolte du latex	131
II. Isolem	ent et purification des lutoïdes et du cytosol	133
III. Mesure	es des activités enzymatiques	135
[V. Mise e	n évidence electrophoretique des enzymes	142
V. Déterr	nination des teneurs de divers solutés	144
VI. Techni	ques d'incorporation des molécules	
radioa	ctives par les lutoïdes intacts	148
VII. Conce	ption et réalisation des appareils de dialyse	
à flot	continu	154

RESULTATS

.

PREMIERE PARTIE :

PARTICIPATION DES LUTOIDES AU MAINTIEN DE L'HOMEO- STASIE CYTOSOLIQUE AU SEIN DU LATEX D'HEVEA	167
Chapitre I : REGULATION DU pH CYTOSOLIQUE PAR LE TONOPLASTE LUTOIDIQUE	169
A – Nature et composantes du gradient de protons trans- tonoplastique	171
 I. La méthylamine : sonde lipophyle adéquate pour la mesure duu gradient de protons II. Estimation des gradients de potentiel électrique transtonoplastique lutoïdique III. Propriétés du tonoplaste et nature du gradient de protons transtonoplastiques des lutoïdes frais intacts, non énergisés Résumé 	171 177 186 196
B – Régulation du pH cytosolique par le compartiment vacuolaire au sein du latex	201
 I. Une ATPase pompe à protons sur le tonoplaste lutoïdique II. Efflux transtonoplastique de protons lors du fonc- tionnement d'un système transporteur d'électrons lutoïdique III. Autorégulation du double pH-stat tonoplastique et régulation du pH cytosolique Résumé 	201 225 241 249
Chapitre II : FLUX TRANSTONOPLASTIQUES ET COMPARTIMEN- TATION VACUOLAIRE DES IONS (CAS DU CALCIUM ET DU CITRATE)	257
A - Compartimentation vacuolaire et régulation des flux transtonoplastiques du calcium	261
B - Quasi-sequestration du citrate au sein des lutoïdes intacts du latex	281
 I. Accumulation irréversible du citrate radioactif par les lutoîdes intacts II. Sequestration intravacuolaire du citrate accumulé in vivo 	283 289
III. Conclusion : séquestration d'un pool unique de citrate au sein des lutoïdes intacts	294

C - Un aspect du rôle régulateur et détoxifiant des lutoïdes in vivo : Implications dans la régénération et la produc- tion du lateur	
To Angle	297
I. Analyse en composantes principales :	299
 1° Sélection des individus et paramètres pris en compte 2° Analyse de la matrice des corrélations par couple 3° Analyses multivariables en composantes principales 	299 300 302
II. Conclusions	306
Résumé	307
Chapitre III : PERTURBATION DE L'HOMEOSTASIE AU SEIN DES LATICIFERES, PAR UN TRAITEMENT HORMONAL (ACTION DE L'ETHREL)	313
I. Chronologie des effets induits par l'application de l'ethrel, au niveau de l'encoche de saignée	317
II. Augmentation des teneurs en nucléotides adényliques du latex, lors du traitement de l'écorce vierge (non exploitée) par l'ethrel	324
III. Conclusion	328
Résumé	331
Chapitre IV : CONCLUSION ET INTEGRATION DES RESULTATS : PARTICIPATION ACTIVE DES LUTOIDES DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE CYTOPLASTIQUE AU SEIN DES LATICIFERES D' <u>HEVEA</u>	335
DEUXIEME PARTIE :	
ROLE DU COMPARTIMENT VACUOLAIRE DANS LES PHENOMENES DE SENESCENCE ET DE DEGENERESCENCE DES CELLULES LATI- CIFERES (Cas du syndrome des encoches sèches chez <u>Hevea Brasiliensis</u>)	345
Chapitre I : MISE EN EVIDENCE D' UNE EMISSION D' ANIONS SUPER- OXYDES PAR UNE ACTIVITE NAD(P)H 02 OXYDEREDUC- TASE LUTOIDIQUE	349
A – Mise en évidence d'une consommation d'oxygène NAD(P)H dépendante au niveau du compartiment lutoïdique du latex	351
B - Mise en évidence de l'émission d'anions superoxydes lors du fonctionnement de la NADH/02 oxydase lutoidique	379
C - Discussion et conclusion	393
Résumé	395

•

Chapitre II : MISE EN EVIDENCE D'UNE PEROXYDATION DES LIPIDES INSATURES EXOGENES ET ENGOGENES LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH OXYDASE LUTOIDIQUE. IMPACT SUR LA STABI- LITE DES STRUCTURES MEMBRANAIRES DU LATEX	397
Résumé	417
Chapitre III : LES "PROTECTEURS" ENZYMATIQUES ET NON ENZYMATIQUES PRESENTS DANS LE LATEX FRAIS	419
A - Les Protecteurs enzymatiques agissant directement sur les formes toxiques de l'oxygène	421
 A. 1 Les superoxyde dismutases A. 2 Les catalases A. 3 Les peroxydases A. 4 Activités glutathion peroxydases 	421 427 430 439
B- Les Protecteurs chimiques "antioxydants"	442
B.1 L'acide ascorbique B.2 Les composés thiols réduits et leur "recyclage" B.3 Les composés phénoliques B.4 Les tocophérols et tocotriénols dans le latex	443 446 450 451
C - Les protecteurs du latex : discussion et conclusion	451
Résumé	455
Chapitre IV : DESTABILISATION PEROXYDATIVE DES MEMBRANES RELATIONS AVEC LA PRODUCTIVITE ET L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DES LATICIFERES (ENCOCHES SECHES)	457
 A - Sélection des arbres et caractéristiques biochimiques analysées 	460
B – Analyse des données	461
C – Discussion et conclusion	469
Résumé	473
Chapitre V : INDUCTION D' UN TYPE D'ENCOCHE SECHE LORS DE LA SURSTIMULATION DES HEVEAS PAR L'ETHREL	477
A - Sélection des arbres et protocole expérimental	480
B - Résultats	481
C - Discussion et conclusion	492
Résumé	496

.

-

Chapitre VI : CONCLUSIONS ET INTERGRATION DES RESULTATS DE LA DEUXIEME PARTIE

TROISIEME PARTIE :

CONCLUSIONS GENERALES	511
Références bibliographiques	525
Annexes	569

501

.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	: Analyse en Composantes Principales (normée)		
ADP	: Adénosine 5'-diphosphate.		
AFC	: Analyse Factorielle des Correspondances		
AMP	: Adénosine 5'-monophosphate.		
ANA	Acide Naphtalène acétique		
ATP	: Adénosine 5'-triphosphate.		
BP	: Bas-producteur.		
САН	: Classification Ascendante Hiérarchique.		
cpm	: Coups par minute (mesure de radioactivité)		
cyt.	: Cytochrome.		
2.4D	: Acide 2.4 Diphénoxyacétique		
DCPIP	: 2,6-dichlorophénol-indophénol.		
DMO	: Diméthyl-oxazolidine-2,4-dione.		
DNPH	: Dinitrophényl-hydrazone.		
DO	: Densité Optique.		
DOC	: Désoxycholate de sodium.		
DOPA	: Dihydroxy-3,4-phényl-alanine.		
DRC	: Dry Rubber Content (teneur en caoutchouc sec du latex).		
EDTA	: Acide (ethylène dinitrilo)-tetraacétique.		
ES	: Encoche Sèche.		
Ethrel	: Acide 2-chloroethylphosphonique.		
FAD(H)	: Flavine adenine dinucléotide oxydée (réduite)		
FMN(H ₂)	: Flavine mononucléotide oxydée (réduite).		
GSH	: Glutathion réduit		
GSSG	: Glutathion oxydé (disulfure).		
GTI	: Gondang Tappen (clône d' <u>Hevea brasiliensis)</u>		
g/a/s	: Gramme par arbre par saignée.		
HEPES	: Acide N-2-hydroxyéthyl-pipérazine-N'-2,éthane sulfonique.		
HOQNO	: Heptyl-hydroxyquinoléine-N-oxyde.		
НК	: Hexokinase		
HP	: Haut-producteur.		
HS	: Hautement significatif.		
IE	: Indice d'éclatement des lutoïdes.		

IP	: Indice de polymérisation des ribosomes (COUPE,1977).		
IRCA	: Institut de Recherches sur le Caoutchouc.		
Km	: Constante de Michaelis		
MDA	: Malondialdéhyde (di-aldéhyde malonique).		
MeA	: Méthylamine.		
MES	: acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique.		
MP	: Moyen-producteur.		
MS	: Matière sèche.		
$MTPP^+$: Méthyl-triphényl-phosphonium (cation).		
N.a.	: Nucléotides adényliques.		
NAD(H)	: Nicotinamide adénine dinucléotide, oxydée (réduite).		
NADP(H)	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, oxydée (réduite).		
NBT	: Nitroblue tetrazolium (bleu nitré de tétrazolium).		
NS	: Non significatif.		
ох	: oxydé.		
Pal	: Phosphatases acides libres.		
Pat	: Phosphatases acides totales.		
PCA	: Acide perchlorique.		
Perox	: Activités peroxydases.		
рН	: potentiel des ions hydroxonium.		
pmf	: Proton motive force (force motrice protonique).		
PNP	: Paranitrophénol.		
PNPP	: Paranitrophényl-phosphate.		
PM	: Poids moléculaire.		
PPox	: Activités polyphénols oxydases (o-diphénols oxydases).		
p/p	: Rapport poids/ poids.		
p/v	: Rapport poids / volume		
QO	: Fonction quinone.		
red.	: réduit.		
rédox	: oxydoréduction (oxydoréductase).		
RNA	: Acides Ribonucléiques.		
RSH	: Groupements thiols réduits.		
S	: Significatif.		
S	: Sain		
S. C.	: Sèrum cytosolique.		
S. L.	: Sèrum Lutoidique.		
Sti	: Stimulation (ou stimulé).		

SHAM	: Acide salicyl hydroxamique.
SOD	: Superoxyde dismutase
Т	: Témoin.
TCA	: Acide trichloracetique.
THS	: Très hautement significatif.
TPP^+	: Tétraphényl-phosphonium (cation).
Tris	: 2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol.
Triton	: Ether de polyoxyéthylène.
U	: Unité.
U.F.	: Ultra-filtré (ultra-filtration).
Val.	: Valinomycine.
Vm	: Vitesse initiale maximale.
Х	: Xanthine.
XOX	: Xanthine oxydase.
Δ	: Ecart pondéré.
∆ pH	: gradient transmembranaire de pH
$\Delta \Psi$: gradient transmembranaire de potentiel électrique.
$\Lambda \tilde{p} H^+$: gradient électrochimique de protons
5	: Somme de

PRESENTATICN

L'Hévéa (Hevea brasiliensis), arbre appartenant à la famille des Euphorbiacées, est doté d'un système de vaisseaux laticifères présents dans tous les tissus secondaires du <u>phloème</u> du tronc, des branches et des racines. Il produit un latex d'excellente qualité, qui, de part la structure en réseaux anastomosés de ses vaisseaux laticifères, s'écoule en quantité abondante par simple entaille de l'écorce. De fait, le latex d'Hevea brasiliensis constitue la principale source mondiale de caoutchouc naturel (3,8 millions de tonnes en 1982).

D'origine amazonienne, l'Hévéa est actuellement planté et exploité industriellement dans toutes les régions tropicales humides d'Asie, d'Amérique et d'Afrique. Sa culture, que ce soit sous forme de vastes exploitations industrielles, ou à l'échelle plus modeste de petites plantations villageoises, revêt une importance économique considérable, d'autant plus qu'elle se situe le plus souvent dans le cadre des ressources d'un certain nombre de "Pays du Tiers-Monde".

Cependant, bien que de qualité encore inégalée, le caoutchouc de latex se trouve confronté à la sérieuse concurrence présentée par le développement de l'industrie des caoutchoucs synthétiques. Cette concurrence n'a pu et ne peut être encore soutenue que par l'amélioration de la production du caoutchouc naturel.

De fait, depuis les débuts de l'Hévéaculture industrielle, la productivité des plantations a fortement augmenté, puisqu'elle est passée de moins de 0,5 à plus de 1,6 tonne de caoutchouc sec/ha/an. Elle est par ailleurs encore susceptible d'augmenter, et il est possible actuellement d'obtenir en plantations expérimentales des rendements dépassant 3,5 tonnes/ha.

Les progrès réalisés dans ce domaine l'ont été dans un premier temps grâce à la sélection massale de familles puis de clones hautsproducteurs, à l'étude des systèmes d'exploitation et de la nutrition minérale des arbres. S'il est vrai que ces recherches directement appliquées ont donné des résultats immédiats, les recherches à caractère plus fondamental, relevant des domaines de l'histocytologie, de la physiologie et de la biochimie, apportent les données nécessaires à la compréhension des mécanismes cellulaires régissant la production. Elles permettent d'en

définir les facteurs limitants et d'entrevoir des possibilités d'agir spécifiquement à leur niveau.

Ainsi, il est très vite apparu que deux facteurs essentiels limitent la productivité des Hévéas. Il s'agit de :

- l'arrêt prématuré de l'écoulement par suite d'une coagulation précoce du latex sur l'encoche de saignée ;
- la régénération au sein des vaisseaux laticifères. Celle-ci doit être suffisamment intense pour compenser la perte de latex entre deux saignées successives.

La mise au point des techniques de "stimulation" de la production de l'Hévéa, résultat des recherches en physiologie végétale, d'abord à l'aide de substances minérales, puis avec des hormones du type auxinométique, et actuellement au moyen de produits libérant directement de l'éthylène (Ethrel), a permis de lever partiellement les problèmes d'écoulement, et donne de ce fait une importance primordiale aux problèmes concernant la régénération du latex.

En corrolaire, l'amélioration des nouvelles techniques d'exploitation a sensibilisé les exploitants hévéicoles à un troisième facteur susceptible de devenir limitant à plus ou moins long terme. Il s'agit de l'équilibre entre la production optimale et l'état physiologique des tissus laticifères au niveau de l'écorce exploitée. En effet, la surexploitation des arbres aboutit fréquemment à un arrêt de la fonction laticigène. Ce phénomène est connu sous le nom d'"encoches sèches".

A terme, les recherches entreprises dans ces domaines plus fondamentaux de la biochimie et de la physiologie des tissus laticifères doivent permettre l'élaboration :

- d'une liste limitée de critères biochimiques permettant une sélection aussi précoce que possible des clones les plus performants au sein du grand nombre d'hybrides créés continuellement ;
- d'une typologie clonale caractérisant les facteurs limitants essentiels de chaque clone ;
- de tests susceptibles de définir l'état physiologique des tissus laticigènes et permettant de déterminer les seuils critiques correspondant à une exploitation optimum mais rationnelle, c'est-à-dire adaptée aux différents clones ;
- de nouveaux traitements stimulant la production, ou d'adjuvants aux substances stimulantes déjà existantes, dont la cible d'action devra être parfaitement définie.

Outre les motivations finalisées des recherches dans ces domaines, l'intérêt des physiologistes et biochimistes fondamentalistes s'est trouvé fortement exalté lorsqu'il a été définitivement démontré que le latex est en fait le contenu cytoplasmique des cellules laticifères. En effet, la possibilité d'obtenir facilement, sans traitement drastique, des quantités non limitées de cytoplasme végétal, constitue un avantage méthodologique considérable. Cette particularité permet d'envisager, entre autres, des études portant sur les inter-relations entre cytosol et organites cellulaires isolées à l'état intact.

Mettant à profit cet avantage, notre travail porte essentiellement sur quelques aspects des interactions vacuoles-cytosol. Il aboutit implicitement à l'étude des mécanismes contrôlant ces interactions au niveau de l'interface de ces deux compartiments cellulaires, c'està-dire au niveau du tonoplaste.

Nombre de paramètres biochimiques et physiologiques étudiés sont interprétés en relation avec la productivité et l'état physiologique des tissus laticifères. Nos résultats permettent de proposer des mécanismes biochimiques intralaticifères, à l'origine de certains facteurs limitant la productivité des arbres.

C'est dans cette voie où les recherches à caractère fondamental rejoignent les préoccupations plus appliquées des exploitants hévéicoles, que nous avons constamment orienté nos études.

Après quelques rappels bibliographiques nécessaires portant sur la morphologie et la physiologie des tissus laticifères, ainsi que sur la notion et le déterminisme des facteurs limitant la production de latex, nos résultats sont exposés en deux grandes parties.

Ia première partie traite de problèmes en relation directe avec la régénération du latex, au sein des laticifères, entre deux saignées successives.Ellemet en évidence la nécessité d'un maintien constant de "l'homéostasie" au sein des laticifères afin que le métabolisme intracellulaire soit constamment orienté dans un sens favorable à la synthèse du caoutchouc. Le rôle du compartiment vacuolaire (les lutoïdes) et en particulier du tonoplaste, dans le contrôle du métabolisme cytosolique est définitivement démontré.Quelques effets de la "stimulation" de l'Hévéa par l'Ethrel sur ces processus régulateurs sont mis en évidence.

Dans une deuxième partie , nous étudions les mécanismes biochimiques déterminant la stabilité du tonoplaste lutoïdique. Nous démontrons l'implication des mécanismes mis en évidence dans les processus conduisant à la coagulation précoce ou intralaticifère du latex, responsables des faibles productivités et de l'apparition d'encoches sèches. Le rôle du mode d'exploitation des arbres ainsi que des traitements stimulant la production du latex par l'Ethrel sont abordés.

INTRODUCTION

HEVEA, LATEX ET HEVEA-CULTURE

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

LA CELLULE LATICIFÈRE ET LE LATEX

I - ONTOGENESE ET ORGANISATION FONCTIONNELLE DES LATICIFERES

Le latex d'Hevea est le contenu cytoplasmique des cellules laticifères présentes dans tous les organes de la plante. Sa nature cytoplasmique l'oppose donc aux latex des Apocynacées, Asclépiadacées, Moracées et Urticacées ainsi que de certaines Euphorbiacées, mis à part l'Hévéa, qui se trouvent enfermés dans d'énormes vacuoles au sein de tubes laticigènes simples, au protoplasme très réduit (MARTY, 1968 ; SOUTHORN, 1961 et 1964).

Les vaisseaux laticifères d'Hevea font partie des formations du liber issues des cellules cambiales. Le fonctionnement rythmique de l'assise cambiale (HALLE et MARTIN, 1968 ; HEBANT et DE FAŸ, 1980) donne naissance, au sein de l'écorce du tronc, à des couches concentriques de cellules laticifères, séparées par d'autres formations libériennes telles les vaisseaux du phloème conducteur, les cellules compagnes et les cellules à tannins (planche I).

Emis à l'origine sous forme de cellules courtes, les jeunes laticifères fusionnent pour former des cellules très longues, au cytoplasme fusionné, contenant donc plusieurs noyaux. A maturité, ces tubes laticigènes constituent un système anastomosé appelé manteau laticifère (BOBILIOFF, 1923 ; ANDREW et DICKENSON, 1960 et 1961 ; DICKENSON, 1965).

Avec le temps, les manteaux laticifères les plus âgés`sont progressivement repoussés vers les parties externes dures de l'écorce, où ils se trouvent alors noyés et comprimés dans des massifs de cellules scléreuses. Les laticifères se désorganisent alors, puis dégénèrent.

Suite à leurs observations histologiques, HEBANT et DE FAY (1980) montrent que, d'une part, la majeure partie (70 à 90 %) des manteaux laticifères fonctionnels est située dans le phloème non conducteur constituant l'essentiel de l'écorce chez Hevea, et que, d'autre part, seule une bande très étroite de phloème conducteur située proche du cambium reste fonctionnelle pour assurer l'alimentation en photosyntats des laticifères (planche I). Ces auteurs proposent alors un "nouveau modèle d'organisation fonctionnelle de l'écorce", accordant un rôle primordial aux rayons libériens qui se trouvent être en continuité avec ceux du bois (DE FAY, 1981).



STRUCTURE ET ORGANISATION FONCTIONNELLE DES TISSUS SECONDAIRES (BOIS, LIBER, LATICIFERES,...) DE L'HEVEA

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ECORCE DE L'HEVEA



PLANCHE I

II - NATURE ET COMPOSITION DU LATEX

La nature du latex d'Hevea a fait l'objet de nombreuses controverses, certains auteurs le tenant pour un contenu vacuolaire, d'autres lui attribuant une nature cytoplasmique (SOUTHORN, 1969).

Tant l'examen des laticifères en microscopie électronique (ANDREW et DICKENSON, 1961 a et b ; COCKBAIN et SOUTHORN, 1962 ; DICKEN-SON, 1965 ; HEBANT et DE FAY, 1980) que les études d'ordre biochimique ont permis de conclure définitivement à la nature cytoplasmique du latex. Rappelons en particulier, la mise en évidence, au sein du latex, d'activités enzymatiques reconnues comme typiquement cytoplasmiques telles que celles catalysant la voie des hexoses monophosphates (BANCHI, 1966 ; ARREGUIN et ROCK, 1967) et celle de la glycolyse (d'AUZAC, 1964 ; TUPY et RESING, 1967 ; JACOB, 1970-a et b).

L'ultracentrifugation de ce cytoplasme permet de séparer trois phases majeures (planche II).

- une couche surnageante blanche, collante, constituée des particules de caoutchouc ;
- une phase aqueuse translucide, appelée serum cytoplasmique, correspondant en fait au cytosol des laticifères ;
- un sédiment gris-jaunâtre constitué par les organites du latex : les lutoïdes et les particules de FREY-WYSSLING.

Les observations en microscopie optique puis électronique ainsi que les analyses biochimiques effectuées sur les différents constituants particulaires du latex après leur séparation et purification, a permis de caractériser l'ensemble des organites contenues dans les cellules laticifères (planche II).

1) LES PARTICULES DE CAOUTCHOUC

Elles représentent entre 50 et 60 % du volume total du latex frais. Ce sont des particules de cis-polyisoprène, sphériques, de taille variant de 0,03 à plus de 3µm. Elles sont entourées d'une enveloppe complexe phospholipoprotéique (RICHES et GOODING, 1952) leur conférant une charge globalement électronégative, assurant la stabilité colloidale au latex.

PLANCHE II

COUPE SCHEMATIQUE D'UN VAISSEAU LATICIFERE D'HEVEA (d'après les microphotographies de DICKENSON, 1965)



DIFFERENTES PHASES SEPAREES PAR CENTRIFUGATION DU LATEX (55.000x g) (représentation schématique)



2) LES LUTOIDES

Découvertes par HOMANS et VAN GILS (1949), ces particules représentent 15 à 20 % du volume total du latex frais. Il s'agit d'organites sphériques de taille variant entre l et 15 μ m, limitées par une membrane simple d'environ 8 nm d'épaisseur (ANDREWS et DICKENSON, 1961 a et b ; DICKENSON, 1965 et 1969 ; GOMEZ et SOUTHORN, 1969)

Les lutoïdes constituent, dans le latex d'Hevea, un compartiment vacuolaire polydispersé (RIBAILLER, 1972) à caractère lysosomal (PUJARNISCLE, 1969).

L'importance de leur fonction dans le métabolisme de la cellule laticifère et dans les processus gouvernant la production du latex, nous a conduit à leur consacrer un chapitre spécial.

3) LES PARTICULES DE FREY-WISSLING

Ces organites découverts par FREY-WISSLING (1929) représentent l à 3 % du volume total du latex. Leur taille varie de l à 3 µm.Les inclusions de caroténoïdes qu'ils renferment leur donnent une couleur jaune-orangée caractéristique. Elles sont délimitées par une double membrane, dont le feuillet interne engendre des invaginations complexes. (DICKENSON, 1965 et 1969). Elles correspondraient en fait à des plastes dégénérés. Difficile à isoler intacts, leur équipement enzymatique est mal connu. On sait qu'elles peuvent transformer le ¹⁴C-mévalonate en carotène radioactif (DICKENSON, 1965). Elles compartimentent des activités polyphénol-oxydase (COUPE et al. 1972 ; BRZOZOWSKA-HANOWER et $a\ell$, 1978).

4) LES RIBOSOMES

COUPÉ et d'AUZAC (1972 et 1974-a) ont montré que les ribosomes isolés du latex sous forme de polysomes restent fonctionnels *in vitro*. Les traitements connus pour augmenter la production des hévéasse traduisent par une augmentation spectaculaire de leur polymérisation et, en conséquence, par une meilleure aptitude à assurer une protéosynthèse, du moins *in vitro* (COUPÉ et al. 1976 ; COUPE et LAMBERT, 1977 ; COUPÉ, 1977).

5) LES AUTRES ORGANITES DU LATEX

Selon DICKENSON, 1969), les laticifères j unes contiennent noyaux et mitochondries à l'état dispersé dans le cytoplasme. Au cours de la maturation et de la différenciation des jeunes cellules laticifères en vaisseaux anastomosés, ces organites dégénèrent et se raréfient.

Ceux qui restent se trouvent alors confinés dans le cytoplasme pariétal plus visqueux (HEBANT et DE FAY, 1980) et ne sont alors pas évacués lors de la saignée. De fait, le latex frais, tel qu'il est récolté lors de la saignée de l'écorce, ne contient que très peu d'ADN nucléaire (TUPY, 1969). Il est également pratiquement dépourvu de mitochondries, comme en témoignent les très faibles activités enzymatiques liées au cycle de KREBS de même que l'absence virtuelle d'activité cytochrome oxydase au sein du latex (d'AUZAC, 1965 ; PUJARNISCLE, 1968 et 1971). Notons cependant la présence de fortes activités malate déshydrogénèses, tant cytosoliques que sédimentables au sein du latex (COUPE et al. 1972).

6) COMPOSITION ORGANOMINERALE DU LATEX

La composition organiminérale du latex a fait l'objet de nombreuses études qui ont été résumées par d'AUZAC (1965-a) et JACOB (1970-a). Les protéines du latex ont été étudiées par TATA et MOIR (1964) et TATA et EDWIN (1970).

La répartition des éléments minéraux ainsi que de certains acides organiques (citrate, malate,...) entre le compartiment cytosolique et vacuolaire (les lutoïdes) isolés du latex par centrifugation a été étudiée par RIBAILLER (1972), et celle des acides aminés par BRZOZOWSKA et al. (1974). CELLULES LATICIFÈRES ET LATEX

RESUME

-

Tel qu'il est obtenu par la saignée de l'écorce, le latex d'Hevea brasiliensis correspond au cytoplasme fluide d'un réseau de cellules spécialisées dans la synthèse du caoutchouc.

Cette spécialisation aboutit entre autre à la présence, dans ce type de cellules de quelques organites spécifiques, telles les particules de FREY-WYSSLING, et à l'accumulation de particules de caoutchouc venant s'ajouter aux organites banalement présentes dans toute cellule végétale (noyaux, mitochondries, vacuoles,...).

La structure des tissus excréteurs sous forme de réseaux de tubes laticigènes anastomosés permet de récolter le latex en quantité abondante par simple entaille de l'écorce. Cette possibilité d'obtenir facilement, sans traitement drastique, des quantités non limitées de cytoplasme végétal constitue un avantage méthodologique considérable et permet, en particulier, d'isoler à l'état pur les deux principaux compartiments du cytoplasme laticifère : le cytosol et le compartiment vacuolaire (les lutoïdes). Nous mettrons à profit cet avantage pour étudier les relations cytosol-vacuoles, et leurs implications dans le métabolisme cellulaire et les processus biochimiques contrôlant la production du latex.

THE LATICIFEROUS CELLS AND LATEX

ABSTRACT

The latex of Hevea brasiliensis as produced by the tapping cut of the bark corresponds to the fluid cytoplasm of a network of cells specialized in the rubber synthesis.

This specialization leads, among other things, to the presence, in this type of cells, of a few specific organites such as the FREY-WYSSLING particles and to the accumulation of rubber particles in addition to the organites commonly observed in any plant cell (nuclei, mitochondria, vacuoles...).

The structure of the excretory tissues in the form of networks of anastomosed latex vessels allows to collect large amonts of latex by cutting the bark. Therefore, unlimited amounts of plant cytoplasm can be collected easily without any drastic treatment, which is a great advantage and allows, in particular, to isolate in the pure state the two main compartments of the laticiferous cytoplasm : the cytosol and the vacuolar compartment (lutoids). We will make use of this advantage in order to study the relations between the cytosol and the vacuoles and their consequences on the cell metabolism and the biochemical processes governing the latex production.

LES LUTOIDES

L'évolution des techniques de centrifugation différentielle, associées aux méthodes plus fines de séparation d'organites subcellulaires par centrifugation isopycnique a permis d'isoler et de purifier des quantités non limitantes de lutoïdes, afin d'en définir les caractéristiques biochimiques et physicochimiques.

I - CARACTÈRE VACUO-LYSOSOMAL DES LUTOIDES

Il a été ainsi démontré que les lutoïdes constituent, au sein du latex d'Hevea brasiliensis, un vacuome polydispersé à caractère lysosomal (PUJARNISCLE, 1965, 1966, 1968, 1971 ; RIBAILLIER et al. 1971, RIBAILLIER 1972). Cette dualité de la fonction vacuolaire longtemps controversée semble maintenant bien admise et vérifiée (MATILE, 1969, 1975, 1978 ; MATILE et WIEMKEN, 1967, 1976 ; GAHAN, 1973).

A) CARACTERE LYSOSOMAL

Les lutoïdes contiennent un large spectre d'hydrolases acides, susceptibles de dégrader la majorité des composés biologiques de la cellule. Les études initiées par SMITH (1953) caractérisant une activité phospholipase, ont été poursuivies par ARCHER *et al.* (1969) avec la mise en évidence d'une activité adénosine ribohydrolase lutoïdique. C'est à PUJARNISCLE (1965, 1966, 1968, 1971) que revient le mérite de formuler pour la première fois l'hypothèse, alors révolutionnaire, attestant l'identité entre vacuoles des végétaux supérieurs et les lysosomes animaux, suite à l'identification de tout un arsenal d'activités hydrolases acides strictement compartimentées au sein des lutoïdes (phosphatases, phosphodiestérases, β -glucosidase, β -galactosidase, β -N-acétyl-glucosaminidase, cathepsine, ribonucléase, déosyribonucléase, phospholipase D et différentes estérases non spécifiques). Depuis, des activités peroxydases (COUPE *et al.* 1972), lyzozymes (TATA *et al.* 1976) et récemment \sim -mannosidase solubles(d'AUZAC, 1981) ont été localisées à l'intérieur des lutoïdes.

S'il n'a pas encore été possible de mettre clairement en évidence des processus de phagocytose ou pinocytose jusqu'à ce jour, la

présence de RNA dépolymérisé, apparemment de nature cytosolique (MARIN et al. 1974 ; MARIN et TROUSLOT, 1975), à l'intérieur des lutoïdes, suggère l'existence de processus de dégradation au sein du compartiment lutoïdique, leur conférant ainsi une fonction lysosomale réelle.

Normalement, ces diverses hydolases ne sont pas, ou sont très difficilement accessibles à leurs substrats externes. Elles se trouvent donc présentes sous forme latente à l'intérieur de ces organites. Ces enzymes ne deviennent pleinement fonctionnelles que lorsque la membrane limitante qui les contient est rompue, soit parce qu'elle est particulièrement instable *in vivo*, soit à la suite d'une lyse expérimentale au moyen d'un détergent non ionique (TRITON X-100) ou d'un choc osmotique brutal lors d'une incubation dans un milieu hypotonique (PUJARNISCLE, 1968).

On pressent dès lors l'extrême importance que revêt in vivo, la stabilité de la membrane lutoïdique ; celle-ci détermine le maintien de l'intégrité de toutes les structures biologiques intracellulaires et conditionne, de ce fait, la vie de la cellule dans son ensemble.

B) CARACTERE VACUOLAIRE

Suite aux observations montrant que les lutoïdes accumulent les colorants vitaux, tel le rouge neutre, WIERSUM (1957) émet l'hypotèse selon laquelle ces organites peuvent constituer, au sein du latex d'Hevea, un vacuome polydispersé.

1) Compartimentation des ions :

Afin de vérifier le caractère vacuolaire des lutoïdes, la répartition des ions entre le milieu intralutoïdique et le cytosol a été déterminée. Dans un premier temps, SOUTHORN et EDWIN (1968) montrent que le contenu de ces organites est plus acide (pH moyen = 5,5) que le cytosol environnant (pH moyen = 6,9). RIBAILLIER et al. (1971) puis BRZOZOWSKA et al. (1974) précisent le caractère vacuolaire de ces organites et montrent qu'ils accumulent sélectivement, *in vivo*, certains constituants ioniques du cytosol laticifère.

<u>Tableau l</u>

Accumulation in vivo de divers solutés dans le compartiment lutoïdique du latex d'Hévéa.

Soluté	Concentration(mM)		Rapport	
	Lutoïdes	Cytosol	Lutoïdes/Cytosol	
Citrate	53,0	5,7	9,3	
Malate	17,3	14,6	1,2_	
Aminoacides acides	22,9	56,9	0,4	
neutres	21,1	36,4	0,6	
basiques	56,9	6,6	8,6	
Mg ²⁺	64,2	8,3	8,0	
Ca ²⁺	1,51	0,25	6,0	
Cu ²⁺	0,046	0,021	2,0	
к+	31,2	30,1	1,0	
Pi	76	9,1	8,7	
Saccharose	5,8	40,5	0,1	

D'après d'AUZAC et al.,1982-a

a) compartimentation des acides organiques (tableau 1)

Les acides citrique et malique représentent plus de 90 % du pool des acides organiques dans le latex d'Hevea (d'AUZAC et PUJARNISCLE 1959 ; d'AUZAC, 1965), mais seul l'acide citrique s'accumule dans les lutoïdes. Le rapport transtonoplastique de concentration en citrate est de l'ordre de 10 unités (RIBAILLIER et al. 1971 ; RIBAILLIER, 1972 ; d'AUZAC et al. 1982-a).

Contrairement aux vacuoles des plantes crassulacéennes (KLUGE et HEININGER, 1973 ; BUSER et MATILE, 1977 ...) les lutoïdes n'accumulent pas l'acide malique ; de ce fait, le rapport de la concentration en malate, entre les deux compartiments majeurs du latex reste sensiblement voisin de l'unité (RIBAILLIER et ál. 1971).

b) compartimentation des acides aminés

BRZOZOWSKA et al. (1974) ont montré que la concentration en acides aminés libres totaux dans les compartiments cytosoliques et vacuolaires du latex est du même ordre de grandeur. Cependant les acides aminés à caractère basique (arginine, lysine, $d - \delta$ diaminobutyrate et ornithine) s'accumulent, *in vivo*, essentiellement dans le compartiment lutoïdique, alors que les acides glutamique et aspartique sont, au contraire, essentiellement cytosoliques (tableau l). Les gradients transtonoplastiques de concentration sont de l'ordre de 5 à 20 selon l'aminoacide concerné.

Une compartimentation analogue des amino-acides a été mise en évidence chez Saccharomyces cerevisiae (INDGE, 1968; WIEMKEN et DURR, 1974; BOLLER et al., 1975), chez Neurospora crassa (MARTINOIA et al. 1979) ou Candida utilis (HUBER-WALCHI et WIEMKEN, 1979).

C) compartimentation des ions inorganiques

Bien que, selon 1a source des données (COOK et SEHKAR, 1955 ; RIBAILLIER et al., 1971 ; COUPE, 1977) il faille noter une certaine disparité des valeurs quantitatives concernant les rapports de concentration des ions entre cytosol et milieu intralutoïdique, il demeure évident que les cations divalents (Mg ⁺⁺, Ca ⁺⁺, Cu ⁺⁺) ainsi que le phosphore inorganique sont essentiellement accumulés à l'intérieur des lutoïdes. Par contre (tableau 1), le potassium se trouve distribué quasiment uniformément de part et d'autre du tonoplaste lutoïdique.

2) Compartimentation d'autres solutés :

Etudiant la composition du sérum lutoïdique TAN CHEE HONG et AUDLEY (1968) puis ARCHER et al. (1969), y démontrent une accumulation d'ergothionéine, d'hercynine ainsi que de trigonelline. Ces auteurs, en analysant le latex de différentes provenances, arrivent à la conclusion que l'ergothionéine est en fait d'origine fongique et qu'elle s'accumule dans les lutoïdes du latex, dans la seule mesure où le sol contient les champignons qui la secrète.

Cette capacité des lutoïdes à accumuler ces substances toxiques (alcaloïdes) endogènes comme exogènes leur confère une fonction détoxifiante évidente. Cette caractéristique ne leur est pas spécifique. En effet, la sanguinarine est essentiellement localisée dans les vacuoles des iodoblastes de Macleaya cordota (NEUMANN et MULLER, 1967). L'essentiel de la morphine se trouve compartimentée à l'intérieur des vacuoles au sein du latex de Papaver somniáerum (FAIRBAIN et al., 1974). La nicotine se retrouve intégralement dans le compartiment vacuolaire de Nicotina nustica (SAUNDERS, 1979).

S'il ne semble pas exister de différence marquée, tant qualitative que quantitative, quant à la répartition des aglycones phénoliques libres entre les deux compartiments majeurs du latex. Les flavanes et tannins condensés se trouvent en majeure partie au sein des lutoïdes (HANOWER et al. 1979 ; CAVAGNE, 1983 ; CRETIN, résultats non publiés).

Signalons, en outre, que les lutoïdes contiennent des protéines cationiques spécifiques, en particulier l'hévéine. Cette protéine de faible poids moléculaire. (PM < 10 000) rendrait compte d'environ 70 % de la teneur en protéines totales du sérum intralutoïdique (ARCHER, 1960). Récemment, CAVAGNE (1983) a montré que cette protéine semblait adsorber fortement des substances réagissant au réactif de FOLIN. Cet auteur émet l'hypothèse que l'hévéine fixe des composés du type phénolique et lui attribue de ce fait un rôle détoxifiant. Ainsi, l'hévéine piègerait les composés polyphénoliques à l'intérieur des lutoïdes.

Par ailleurs, les protéines à point isoélectrique très élevé, mises en évidence dans le latex par ROE et EWART (1942), se sont avérées provenir des lutoïdes. Ainsi, deux protéines basiques ont été isolées des lutoïdes par ARCHER (1976). Il s'agit des hévamines A et B. D'après TATA et EDWIN (1970), ces deux protéines fortement cationiques seraient impliquées, pour partie, dans les processus conduisant à la coagulation du latex. Plus récemment, TATA *et al*. (1976) ont montré que les hévamines A et B sont en fait des lvsosymes.

3) Problème de l'équilibre des charges :

Des estimations même très approximatives de l'équilibre des charges portées par les différentes structures ioniques accumulées au sein des lutoïdes (tableau 1), montrent un déficit net de cations, de l'ordre de 80 à 150 charges positives, selon le pH considéré (5,0 à 6,5). Il y a donc un excès de charges négatives attribuables à l'accumulation d'anions de bas poids moléculaire. Le problème de la compensation des charges au sein des lutoïdes, et de leur rétention, se trouve donc posé. Le phosphore inorganique, fortement accumulé au sein du compartiment vacuolaire du latex, ne semble pas être accumulé sous la forme de polyphosphates, qui n'ont jamais pu être détectés au niveau des divers compartiments du latex (d'AUZAC, communication personnelle). Une part des anions (Pi et citrate) qui correspondent à l'essentiel de l'excédent des charges négatives intralutoïdiques, calculé à partir des valeurs du tableau l, pourrait être adsorbée et éventuellement immobilisée, sur des structures intralutoïdiques polycationiques. On pense en particulier à l'hévamine et aux autres protéines cationiques, spécifiquement localisées et concentrées dans les lutoïdes. Cependant une telle explication ne pourrait rendre compte d'une façon satisfaisante des phénomènes d'équilibre de DONNAN, responsables de l'accumulation de cations (H⁺ et Ca⁺⁺), qui seront discutés ultérieurement. Les problèmes de compensation de charges, que l'on veuille rendre compte du déficit de cations de bas poids moléculaires, ou des phénomènes de DONNAN (intérieur des lutoïdes chargés globalement négativement), restent donc difficilement explicables et non mutuellement conciliables, dans l'état actuel des connaissances acquises sur les caractéristiques des lutoïdes.

Notons enfin que l'équi-répartition du potassium entre les deux compartiments cellulaires, dans la mesure où l'on détermine des gradients de potentiel transtonoplastiques négatifs à l'intérieur des lutoïdes, pose également un problème d'interprétation. Ainsi le potassium semble a priori "sous accumulé" dans les lutoïdes, ou exclu, dans une certaine mesure, de ce compartiment. Le potassium pourrait donc jouer un rôle de contre ion, permettant l'accumulation électriquement compensée d'autres cations (H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, ...?). La non accumulation du malate pose un problème du même ordre.

II - LA MEMBRANE LUTOÏDIQUE

A) COMPOSITION LIPIDIQUE DU TONOPLASTE LUTOIDIQUE, ET SES CONSEQUENCES :

La composition lipidique et phospho-lipidique de la membrane lutoïdique a été étudiée par DUPONT *et al.*(1976). Elle est caractérisée par une teneur inhabituelle en acide phosphatidique (80 % de la masse totale) et l'absence de phospholipides azotés (phosphatidyl éthanolamine et phosphatidyl-choline), d'ordinaire bien représentés dans le règne végétal. De ce fait, la composition de la membrane lutoïdique contraste avec celle décrite pour la membrane vacuolaire de *Beta vulgaris* (MARTY et BRANTON, 1980). L'absence de ces phospholipides azotés constitue bien une caractéristique de la membrane lutoïdique. Ils sont pourtant synthétisés dans la cellule laticifère et présents dans l'enveloppe phospholipo-protéique entourant les particules de caoutchouc. Notons que les précautions prises par ces auteurs éliminent l'artefact possible dû à l'action d'une phospholipase, au cours de l'extraction.

Par ailleurs, la composition en acides gras de la membrane lutoïdique est originale. Elle est en effet caractérisée par sa forte teneur en acides gras saturés : environ 45 % des acides gras totaux. Ce sont essentiellement les acides palmitique et stéarique. Le pool lutoïdique des acides gras insaturés (55 % du total) est constitué de l'acide linoléique (C 18:2) qui a lui seul rend compte de 40 % des acides gras totaux membranaires, ensuite viennent l'acide oléique (C 18:1) et linolénique (C 18:3) (HANOWER, résultats non publiés) qui représentent respectivement 12 et 4 % des acides gras totaux tonoplastiques.

La composition de la membrane lutoïdique diffère en ce sens de celle du tonoplaste isolé de Saccharomyces cerevisiae, caractérisé par une beaucoup plus grande proportion en acides gras insaturés (KRAMER et al. 1978).

Par contre, l'abondance relative en acides gras saturés suggère des ressemblances entre le tonoplaste lutoïdique et d'autres membranes biologiques d'organites sub-cellulaires comme la membrane externe des mitochondries ou de l'enveloppe choloroplastique (DUPONT et al. 1976 ; DOUCE et al. 1973).

Cette composition originale du tonoplaste lutoidique peut rendre compte d'un certain nombre de propriétés connues de ces organites. Les teneurs relativement élevées en acides gras saturés (palmitique + stéarique)

peuvent expliquer en partie la relative rigidité de la membrane lutoïdique caractérisée par GOMEZ et SOUTHORN (1969), de même que la fragilité des lutoïdes lorsqu'ils sont exposés dans un milieu hypotonique (osmosensibilité) (PUJARNISCLE 1968 ; RIBAILLIER, 1972).

La richesse de la membrane lutoïdique en acide phosphatidique lui confère une charge globale électronégative. Cette caractéristique apparaît comme primordiale pour que soit maintenue la stabilité colloïdale des principaux éléments figurés du latex, en l'occurence particules de caoutchouc et lutoïdes, tous deux chargés négativement (DUPONT *et al.* 1976; d'AUZAC *et al.*, 1977). La neutralisation plus ou moins complète de ces charges serait à l'origine du processus aboutissant à la coagulation du latex (cf p.42-43).

B) ACTIVITES ENZYMATIQUES CONSTITUTIVES DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE

La présence de toute une gamme d'activités hydrolases acides solubles à l'intérieur des lutoïdes a largement contribué à la définition des vacuo-lysosomes végétaux. L'amélioration des techniques d'investigation ainsi que des techniques de séparation et de purification des structures membranaires a permis la mise en évidence d'activités constitutives, c'est-à-dire faisant partie intégrante de la membrane lutoïdique.

1) Présence d'une activité NADH-cytochrome c oxydoréductase et de cytochrome b sur le tonoplaste lutoïdique :

MOREAU et al. (1975) ont montré l'existence d'une activité NADH-cytochrome C (accepteur artificiel) oxydo-réductase au niveau des lutoïdes purifiés sur gradient de densité. Le choc osmotique, par exposition des lutoïdes dans un milieu hypotonique a permis de démontrer sans ambiguïté, la nature membranaire de ce système oxydo-réducteur.

Cette NADH cytochrome <u>c</u> oxydoréductase est insensible à l'antimycine A, écartant l'hypothèse d'une éventuelle contamination mitochondriale. Elle montre par ailleurs une forte spécificité vis-à-vis du NADH. Par contre, elle peut utiliser le ferricyanure de potassium en tant qu'accepteur d'électrons. Etudiée au niveau du tonoplaste lutoïdique purifié, elle ne peut directement transférer les électrons du NADH sur l'oxygène moléculaire.

Dans le cas du latex, ce système rédox est localisé sans ambiguïté au niveau du tonoplaste lutoïdique. Une telle activité a parfois été suggérée, voire signalée au niveau de la membrane vacuolaire de diverses origines (MATILE et WIEMKEN, 1967 ; MATILE, 1968 ; LEIGH et BRANTON, 1976; SAUNDERS, 1979). La localisation tonoplastique de cette activité enzymatique est par contre largement contestée par d'autres auteurs (METTLER et LEONARD, 1979 ; WAGNER, 1979).

MOREAU et al. (1975) ont parallèlement mis en évidence la présence de deux cytochromes du type <u>b</u>, au niveau de la membrane lutoïdique. L'un, partiellement réductible par le NADH, mais insensible au NADPH, correspond au cytochrome <u>b</u> 563. L'autre est un cytochrome <u>b</u> 561, et ne peut être réduit que par l'hydrosulfite.

L'absence totale de cytochrome P450 et d'activité NADPH cytochrome <u>c</u> réductase au niveau du tonoplaste lutoïdique (MOREAU *et al.* 1975) écarte l'hypothèse d'une contamination par des structures microsomales.

Ce système transporteur d'électrons présente donc quelques analogies avec ceux mis en évidence au niveau des microsomes animaux ou végétaux (STRITTMATER et VELICK, 1957). Cependant, la fonction de ce système transporteur d'électrons au niveau du tonoplaste lutoïdique reste obscure, d'autant qu'aucun accepteur endogène n'a pu être mis en évidence, jusqu'à ce jour. MOREAU *et al.* (1975) lui attribuent un rôle régulateur des teneurs en NADH dans le latex, qui, présent en trop fortes concentrations dans le cytosol des laticifères, orienterait le flux métabolique dans une direction défavorable à la synthèse d'acétate, précurseur du polyisoprène (JACOB, 1970).

2) Présence d'une activité ATPase constitutive :

Des considérations sur l'effet positif de l'apport d'ATP lors de l'absorption de certains solutés par une suspension de lutoïdes *in vitro* (d'AUZAC et LIORET, 1974) ont conduit à rechercher l'existence d'une activité ATPase sur le tonoplaste lutoïdique.

C'est à d'AUZAC (1975-1977) que revient le mérite d'avoir caractérisé, pour la première fois, sans ambiguïté, une activité ATPase membranaire, au niveau d'un compartiment vacuolaire végétal (les lutoïdes).

En général, la difficulté pour démontrer l'existence d'une activité ATPase tonoplastique réside dans le fait que les lutoïdes (PUJARNIS-CLE, 1971), comme tout compartiment vacuolaire des végétaux supérieurs,
contiennent de fortes activités phosphatase acide (NISHIMURA et BEEVERS, 1978 ; BOLLER et KENDE, 1979 ; BRISKIN et LEONARD, 1980,...). Celles-ci restent souvent partiellement adsorbées sur les membranes isolées, et masquent, de ce fait, toute activité ATPase spécifique.

L'addition de molybdate d'ammonium 0,1 mM à une suspension de membrane lutoïdique inhibe totalement l'activité phosphatase acide mesurée par l'hydrolyse du PNPP (JACOB et SONTAG, 1974), sans affecter l'hydrolyse de l'ATP. Cette dernière est attribuée à une activité ATP ase spécifique (d'AUZAC, 1975).

Cette méthode introduite par d'AUZAC (1975), qui utilise l'inhibition spécifique des activités phosphatases acides vacuolaires par le molybdate, a permis depuis, la mise en évidence d'activités ATPase au niveau du tonoplaste de *Beta vulgaris* (LEIGH et WALKER, 1980 ; ADMON *et al.* 1981). WAGNER (1981) semble obtenir des résultats analogues en inhibant les activités phosphatases acides par le fluorure, et a ainsi pu mettre en évidence une ATPase au niveau du tonoplaste isolé de pétales de *Hippeastrum*.

D'AUZAC (1977) montre que l'ATPase tonoplastique des lutoïdes est spécifique vis-à-vis de l'ATP. L'activité ATPase nécessite la présence de cations divalents, tels le Mg^{++} . Le Km de l'enzyme pour son substrat préférentiel, : l'ATP- Mg^{++} , se situe entre 0,4 et 0,8 mM selon les conditions d'incubation. Son pH optimum varie selon le tampon utilisé entre 6,6 (KH₂PO₄ et HEPES-Tris) et 7,75 (TEA-HCl ; Tris-HCl ; HEPES-NaOH).Son activité n'est pas affectée par la présence de Pi. Elle est par contre inhibée par l'ADP (Ki \approx 0,4 mM).

L'ATPase tonoplastique des lutoïdes est insensible à la présence de cations monovalents tels Na⁺ ou K⁺. Elle est par contre activée par certains anions tant minéraux (Cl⁻, HCO₃⁻) qu'organiques (malate, succinate, aspartate, fumarate), au même titre que l'ATPase de microsomes isolés des racines de navet (RUNGIE et WISCKICH, 1973). Enfin, l'ATPase lutoïdique est irréversiblement inhibée par les réactifs des groupes SH (NEM, PCMB, mersalyl) de même que par le DCCD, et ce, beaucoup plus efficacement lorsque les études sont réalisées sur des lutoïdes intacts et frais (GIDROL, 1984 ; GIDROL et CHRESTIN à paraître) que sur des lutoïdes lyophilisés (d'AUZAC, 1977 ; MARIN, 1981). Elle est, par ailleurs, fortement inhibée par le DIDS, les flavonols et le Cu⁺⁺ (GIDROL, 1984 ; GIDROL et CHRESTIN, à paraître).

L'activité ATPase tonoplastique des lutoïdes n'est pas affectée par les inhibiteurs classiques des ATPases mitochondriale (oligomycine, NaN3) ou plasmalemmique (vanadate, nystatine). Par contre, des résultats très récents rapportés par GIDROL (1983) et GIDROL et BLASCO (à paraître) montrent que, de part sa relative sensibilité au DES (Ki \simeq 300 µM), et une certaine reconnaissance antigénique par des anticorps isolés à partir d'une ATPase purifiée du plasmalemme de *Schizosaccharomyces pombe* et malgré son insensibilité au vanadate, l'ATPase tonoplastique des lutoïdes partage quelques similitudes de structure avec les ATPases d'origine plasmalemmique (GIDROL et BLASCO, à paraître).

Enfin, l'activité hydrolytique de l'ATPase étudiée sur des lutoïdes intacts frais se trouve significativement activée par les protonophores tels le FCCP ou le 2,4 DNP (< 50 μ M) ou certains ionophores comme la gramicidine ou la valinomycine (GIDROL 1984 ; GIDROL *et al.* 1984; GIDROL et CHRESTIN, à paraître).

La mise en évidence d'une activité ATPase associée aux membranes vacuolaires est primordiale, dans la mesure où celle-ci peut être impliquée dans des processus d'énergisation des transports au travers du tonoplaste.

De fait, <u>simultanément</u> aux résultats acquis par MARIN *et al.* (1979) et MARIN (1980, 1981), à partir de lutoïdes conservés 24 heures dans la glace ou de vésicules reconstituées à partir de lutoïdes lyophylisés, <u>indépendamment</u> et <u>en utilisant des techniques différentes, nous avons</u> démontré que l'<u>ATPase tonoplastique des lutoïdes intacts, frais, fonctionne</u> <u>comme une pompe à protons</u> (CRETIN, 1979-b et 1982 ; CRETIN *et al.* 1980 et 1982), catalysant l'acidification du compartiment lutoïdique. Le gradient transtonoplastique ainsi créé est capable d'énergiser l'absorption de certains solutés (MARIN, 1981 ; MARIN *et al.* 1982, 1983) selon un couplage énergétique correspondant à la théorie chemiosmotique proposée par MITCHELL (1976).

C) PRESENCE DE DIVERS TRANSPORTEURS TONOPLASTIQUES

L'existence même d'une compartimentation aboutissant à la mise en place de gradients transmembranaires de concentration implique un processus de transport assuré par des transporteurs (ou perméases) plus ou moins spécifiques, localiséssur le tonoplaste. Cependant, la mise en évidence de tels processus de transport et d'accumulation au niveau des divers compartiments subcellulaires des végétaux supérieurs est difficile, et les

données disponibles souvent fragmentaires résultent dans la majorité des cas, d'approches indirectes (Mac ROBBIE, 1975 ; GRIGNON, 1974 : PENNARUM, 1980).

Au même titre que les travaux effectués sur le vacuome de Saccharomyces cerevisiae et Neurospora Crassa, les études réalisées sur les lutoïdes ont permis d'identifier et de caractériser quelques processus de transport au niveau du tonoplaste d'une plante supérieure.

Les phénomènes d'accumulation et de compartimentation de certains solutés se déroulant *in vivo* ont été évoqués dans le paragraphe traitant du caractère vacuolaire des lutoïdes. Lorsque les lutoïdes sont isolés, il est possible de leur faire absorber, *in vitro*, certaines entités ioniques comme le calcium et le phosphore inorganique (RIBAILLIER, 1972), le citrate (RIBAILLIER, 1972 ; d'AUZAC et LIORET, 1974 ; MONTARDY et LAMBERT, 1977 ; MARIN, 1981,...) et des acides aminés de type basique (HANOWER et al. 1977), et ce, contre un gradient de concentration établi *in vivo*.

Deux types de transport ont été particulièrement étudiés au niveau du tonoplaste lutoidique. Il s'agit du transport des amino-acides, et de celui des acides organiques (essentiellement le citrate).

1) Le transport des amino-acides :

Etudiant les processus d'absorption des acides aminés par les lutoïdes, HANOWER et al. (1977) et NAIMIEN N'GORAN (1982) montrent que seuls les aminoacides basiques (arginine, lysine,...) ou neutres, dans une moindre mesure (alanine,...) s'accumulent dans les lutoïdes in vitro. Les acides aminés acides (acide glutamique, acide aspartique) ne sont pas accumulés.

Ainsi, en absence de toute source d'énergie métabolique, la lysine comme l'arginine sont transportées à l'intérieur des lutoïdes, selon un processus linéaire pendant au moins 20 à 30 minutes, et ce, contre un gradient de concentration établi *in vivo*. Ces processus de transport suivent, *in vitro*, une cinétique Michaelienne en fonction de la concentration en acide aminé dans le milieu extérieur. Ils sont en outre dépendants de la température et du pH (HANOWER *et al.*, 1977).

Ces auteurs montrent que la vitesse d'absorption des acides aminés accumulés par les lutoïdes est optimale aux valeurs de pH correspondant, pour chaque acide aminé, à la valeur du point isoélectrique caractérisant la molécule transportée. Ils en déduisent que les molécules à charges compensées traversent plus facilement le tonoplaste.

Les processus d'absorption sont inhibés par le N-éthyl-maleimide. L'arginine inhibe compétitivement l'absorption de la lysine, alors que leurs énantiomères D sont sans influence. Enfin, on n'observe aucune inhibition de l'absorption des acides aminés basiques lorsque les expériences sont réalisées en présence de L-amino-acides neutres, aliphatiques ou aromatiques.HANOWER et al.concluent que les acides aminés basiques (LYS et ARG) utilisent un même transporteur à stéréospécificité marquée, de type enzymatique.

De plus, HANOWER et al. (1977) montrent que cette accumulation des acides aminés basiques est fortement accrue lorsque les lutoïdes sont mis en présence d'ATP. Elle se trouve par contre nettement diminuée lorsque les incubations sont réalisées en présence de 2,4 DNP ou de chlorure d'ammonium. Ces auteurs établissent, d'autre part, une corrélation positive entre l'amplitude d'incorporation de la lysine et l'amplitude du gradient transmembranaire de concentration en protons. L'hypothèse d'un système de transport assuré par une perméase spécifique des acides aminés basiques et énergisé par un gradient de protons échangeables, est avancée.

La présence d'un transporteur de nature protéique, catalysant le transport de l'arginine a également été démontré au niveau du tonoplaste de Saccharomyces cerevisiae (BOLLER et al. 1975 ; DURR et al. 1976 et 1979) et de Neurospora crassa (MARTINOIA et al. 1979). Il s'agit dans ces deux cas d'une perméase peu spécifique, commune à tous les acides aminés basiques, dont les caractéristiques diffèrent complètement des transporteurs d'acides aminés plasmalemmiques.

En fait, des expériences de double marquage effectuées sur des vacuoles de Saccharomyces cerevisiae (BOLLER et al. 1975) ou de Strepto-COCCUS &OCCUS &OCUS &O

de l'arginine au sein de ces vacuomes peuvent donc s'interpréter en terme d'équilibre de DONNAN.

Selon DURR et al. (1979), l'hydrolyse de l'ATP cytosolique se traduirait par une translocation de phosphate et la formation d'un polyanion vacuolaire. Il en résulterait un couplage électrique indirect entre activité ATPase-polyphosphate synthétase, et l'influx net d'arginine au sein de ce vacuome.

Il semble donc exister une différence fondamentale dans les mécanismes de l'accumulation des acides aminés basiques entre le vacuome du latex (le transport de lysine et d'arginine sont liés à l'existence d'un gradient de protons) et le compartiment vacuolaire de Saccharomyces cerevisiae (l'accumulation d'arginine est liée à la synthèse de polyphosphates).

Notons à ce propos que les recherches menées jusqu'à ce jour n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de polyphosphates au sein des lutoïdes, le compartiment vacuolaire du latex (d'AUZAC, communication personnelle).

B) LE TRANSPORT DES ACIDES ORGANIQUES

Les lutoïdes "compartimentent", au sein du latex, un pool élevé de citrate. D'AUZAC et LIORET (1974) ont étudié un certain nombre de propriétés du mécanisme de l'accumulation du citrate par les lutoïdes.

Dans un milieu dépourvu de toute source d'énergie métabolique, les lutoïdes absorbent des quantités considérables de citrate, et ce, contre un important gradient de concentration. La cinétique d'incorporation est linéaire pendant au moins 30 minutes. La cinétique de saturation Michaelienne (Km \approx 5mM), la thermo-dépendance de ce transport ainsi que son inhibition par le N-éthyl-maléimide permettent de conclure à l'existence d'une perméase spécifique, contrôlant le transport du citrate au niveau du tonoplaste lutoïdique.

Le citrate, le succinate et le malate (MONTARDY et LAMBERT, 1977) sont accumulés dans les lutoïdes suivant des cinétiques d'absorption analogues. Les valeurs de Km pour les 3 acides sont quasiment identiques. Ces observations, associées à la caractérisation d'inhibitions intercompétitives, sont compatibles avec l'existence d'un système transporteur unique. Les différences de pH optimum observées pour le transport de ces 3 acides organiques (MONTARDY et LAMBERT, 1977), peuvent s'expliquer en terme de différence d'affinité du transporteur pour les différents degrés d'ionisation que présentent ces acides et le récepteur lui-même, selon le pH du milieu.

Par ailleurs, d'AUZAC et LIORET (1974) montrent que l'addition d'ATP à une suspension de lutoïdes, exalte fortement leur vitesse d'absorption du citrate, sans toutefois modifier le Km apparent du récepteur. Par contre, les agents dissipateurs des gradients de protons transmembranaires comme le 2,4-DNP inhibent l'accumulation du citrate à l'intérieur des lutoïdes. Ces auteurs suggèrent alors qu'il doit exister un couplage entre le transport du citrate et le gradient transtonoplastique de pH. L'ATP, en catalysant une acidification intralutoïdique (LAMBERT, 1975) amplifierait le gradient transmembranaire de protons et "énergiserait" ainsi le transport du citrate.

Plus récemment, le travail approfondi de MARIN (1981) a permis de proposer un modèle cohérent, expliquant le fonctionnement du transporteur tonoplastique du citrate, au niveau des lutoïdes. Selon cet auteur, le citrate serait transporté sous sa forme deux fois dissociées (RH^{2^-}), et s'accumulerait dans les lutoïdes en se partageant en deux "Pools cinétiques". L'un, de taille réduite, serait composé de la forme perméante (RH^{2^-}), l'autre contenant l'essentiel du citrate sous forme R^{3^-} , non perméante, éventuellement complexé par les cations divalents comme le Mg^{2^+} .

L'incorporation du citrate étant fortement inhibée en présence de protonophores, ou d'agents connus pour dissiper les potentiels membranaires, conduit MARIN *et al.* (1981) à considérer que le gradient transtonoplastique de pH n'intervient pas seul dans les processus d'accumulation du citrate, mais que celle-ci dépendrait également du potentiel membranaire ($\Delta\Psi$). Les résultats indiquent que l'accumulation du citrate correspond à un transport actif (au sens de LÜTTGE et HIGINBOTHAM, 1979) faisant intervenir la force protomotrice

$$\Delta \tilde{\mu}H = \Delta \Psi - 2,3 \frac{RT}{F} \times \Delta_{P}H$$

Après estimation de cette force protomrice pour des vésicules tonoplastiques reconstituées à partir de lutoïdes lyophilisés, MARIN (1981) aboutit à la conclusion originale selon laquelle le transporteur de citrate catalyse un antiport (citrate) ²⁻/H⁺, éventuellement suivi d'un flux, partiellement électriquement compensatoire, de magnésium, toujours présent dans le milieu.

Enfin, toujours selon cet auteur, et en accord avec nos résultats, le fonctionnement de l'ATPase en tant que pompe à protons électrogène, en dépolarisant la membrane lutoïdique, favoriserait le transport du citrate, et lui apporterait l'énergie nécessaire pour lui permettre de s'effectuer contre un gradient transmembranaire de concentration.

Le mécanisme de transport du citrate au niveau du tonoplaste lutoïdique diffère donc sensiblement du mécanisme du transport du malate au niveau du tonoplaste de Kalanchoë daigremontiana proposé par LÜTTGE et BALL (1979). Prenant en compte des données théoriques concernant les gradients électrochimiques des différents ions, résultant des différentes formes de dissociation de l'acide malique (mal.ⁿ⁻), ces auteurs montrent qu'il existe un transport actif de H⁺ et de Hmal⁻, du cytosol vers la vacuole, alors que mal.²⁻ doit se distribuer passivement de part et d'autre du tonoplaste.

Ainsi, chez les plantes à métabolisme crassulacéen, l'accumulation active du malate dans la vacuole correspondrait à un <u>transport actif</u> <u>de protons</u> couplé à un <u>mouvement passif</u> de mal.²⁻ grâce à l'existence d'un transporteur tonoplastique spécifique. Ce dernier catalyserait une diffusion facilitée du malate ²⁻. Au pH intravacuolaire, il y aurait séquestration du malate sous forme H-mal.⁻, non librement perméante (LÜTTGE et BALL, 1979).

L'existence de transporteurs fonctionnels, au moins in vitro, localisés sur le tonoplaste lutoïdique est donc vérifiée. Il reste à caractériser les modalités de leur fonctionnement et les conditions régulant les flux transtonoplastiques des solutés pour des lutoïdes intacts, frais, et ce, dans des conditions aussi proches que possible des conditions physiologiques existant à l'intérieur de la cellule laticifère. Il sera en particulier intéressant de déterminer les conditions susceptibles de conduire à un influx ou un efflux net des solutés absorbés par les lutoïdes, afin de définir plus précisément le rôle de ces organites, et de faire ainsi la part entre leur fonction de détoxification ou leur fonction d'accumulation de réserves mobilisables.

In vitro, les lutoïdes absorbent de nombreux solutés contre un gradient de concentration (acides amines basiques, citrate,...). L'énergie nécessaire semble être fournie par une force motrice protonique entretenue par l'ATPase tonoplastique lutoïdique. Cette ATPase a été caractérisée comme une pompe à protons tonoplastique,

LES LUTOÏDES

RESUME

Les lutoïdes constituent au sein du latex d'Hevea brasiliensis, un vacuome polydispersé à caractère lysosomal.

Ils "compartimentent" donc à l'état latent, un large spectre d'hydrolases acides, capables de dégrader la majorité des composés biologiques cellulaires. A ce propos, la stabilité de la membrane lutoïdique apparaît comme une nécessité primordiale pour que soient assurées toutes les conditions compatibles avec l'intégrité de structures macromoléculaires et subcellulaires, et donc la vie de la cellule laticifère.

Comme toutes les vacuoles végétales, les lutoïdes compartimentent *in vivo* de nombreux solutés inorganiques (H⁺; Mg⁺⁺; Ca⁺⁺; Cu⁺⁺; Pi) et organiques (citrate, acides aminés basiques) ainsi que des alcaloïdes (trigonelline et hercynine).

La membrane lutoïdique (tonoplaste) est caractérisée par une forte teneur en acides gras saturés (45 %)(qui pourrait être à l'origine de la relative osmosensibilité de ces organites). Une teneur élevée en acides phosphatidiques lui confère une charge électrique négative, assurant une stabilité colloïdale au latex.

Le tonoplaste lutoïdique porte des enzymes constitutives dont une activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase (associée à deux cytochromes <u>b</u>563 et <u>b</u>561) ainsi qu'une activité ATPase dépendante de Mg⁺⁺.

Le tonoplaste lutoïdique est également doté de transporteurs spécifiques des acides aminés basiques (ARG et LYS) et d'acides organiques (citrate en particulier) expliquant l'accumulation de ces solutés, à l'intérieur des lutoïdes, *in vivo*.

THE LUTOIDS

ABSTRACT

The lutoids represent a polydisperse vacuome of lysosomal-type within the latex of Hevea brasiliensis.

Therefore, they partitionate at the latent stage a wide range of acid hydrolases likely to degrade most of the cellular biological compounds. For this purpose, it is of prime importance that the lutoidic membrane must be stable so that the integrity of the macromolecular and subcellular structures should be secured and the laticiferous cell could exist.

The lutoids like all the plant vacuoles accumulate in vivo numerous inorganic (H^+ ; Mg^{++} ; Ca^{++} ; Cu^{++} ; Pi) and organic solutes (citrate, basic amino acids) as well as some alkaloids (trigonelline and hercynine).

The lutoidic membrane (tonoplast) is characterized by a high percentage of saturated fatty acids (45%) (which could result in the relative osmotic sensitivity of these organites). A high percentage of phosphatidic acids supplies it with a negative load, thus securing a colloidal stability to the latex.

The lutoidic tonoplast includes some constituent enzymes among which there are NADH-cytochrome <u>c</u> oxidoreductase activity (associated with two cytochromes \underline{b}_{563} and \underline{b}_{561} and Mg⁺⁺ dependent ATPase activity.

The lutoidic tonoplast is also composed of carriers specific of the basic amino acids (ARG and LYS) and of organic acids (particularly citrate) which account for the accumulation of these solutes within the lutoids in vivo.

In vitro, the lutoids uptake numerous solutes despite a concentration gradient (basic amino acids, citrate...). The required energy seems to be supplied by a proton motive force maintained by the lutoidic tonoplastic ATPase which has been characterized as a tonoplastic proton pump. LES FACTEURS LIMITANT LA PRODUCTION DU LATEX

Les recherches tous azimuts en vue d'améliorer la productivité des plantations d'hévéa ont permis de dégager assez clairement ce que peuvent être les facteurs limitant la production de latex. On peut schématiquement distinguer des facteurs anatomiques et climatiques, et des facteurs intéressant directement la physiologie des laticifères.

I - LES FACTEURS GÉNÉRAUX DE LA PRODUCTION

A) LES FACTEURS ANATOMIQUES DE L'ECORCE

Selon GOMEZ et al. (1982), le nombre de manteaux laticifères et la densité des vaisseaux à l'intérieur des manteaux sont liés à la production. Des corrélations dans ce sens ont été établies par divers auteurs (NARAYANAN et HO, 1973 ; NARAYANAN et al.1973; HO, 1975).

Par ailleurs, selon le modèle d'organisation fonctionnelle de l'écorce d'Hevea, proposée par HEBANT et de FAY (1980), l'équipement en phloème conducteur et en rayons vasculaires assurant la nutrition des laticifères, doit logiquement être considérée comme un facteur anatomique limitant possible.

B) LES FACTEURS CLIMATIQUES

L'eau est considérée comme le facteur limitant le plus classique de la croissance et de la production chez de nombreuses plantes cultivées. Les facteurs climatiques et plus généralement écophysiologiques interviennent directement sur la productivité de l'hévéa (NINANE, 1970). Ceux-ci seraient essentiellement impliqués dans la phase lente de l'écoulement du latex (cf. p 40). Cette dernière est en effet liée à un flux d'eau vers l'intérieur des laticifères. Elle se prolongera donc d'autant que la disponibilité en eau du système sol-plante-atmosphère sera grande.

Il apparaît globalement (NINANE, 1970) que tout évènement climatique conduisant à une transpiration foliaire trop élevée se traduit par une réalimentation en eau des laticifères difficile lors de la saignée, et donc par une durée d'écoulement limitée. A l'opposé, les facteurs conduisant à une faible évapotranspiration potentielle, favoriseront un bon équilibre hydrique de l'arbre et une production élevée (NINANE, 1970 ; CRETIN, 1979-c,MONTENY et al. 1983).

Par ailleurs, la variation saisonnière de la disponibilité en eau et de l'ensoleillement, se traduit, au niveau du latex d'Hevea, par une variation saisonnière de sa teneur en matière sèche (TSC) (GOODING, 1952 ; COMPAGNON, 1953 ; REISING, 1955 ; CRETIN, 1979-c ; BRZOZOWSKA -HANOWER *et al.*, 1979). Un TSC élevé conduit logiquement à une viscosité élevée du latex, laquelle limite l'écoulement et partant, la production. Une corrélation curvilinéaire étroite a été démontrée entre teneurs en caoutchouc sec du latex et la production saisonnière des arbres (CRETIN, 1979-a ; BRZOZOWSKA-HANOWER *et al.* 1979).

C) LES FACTEURS ECO-PHYSIOLOGIQUES

Ils concernent la : Physiologie de l'alimentation de l'arbre

1) Alimentation en eau et sels minéraux :

Bien que fort peu de résultats expérimentaux soient disponibles à ce sujet, il ne fait guère de doute que l'absorption racinaire des éléments minéraux et les processus commandant l'absorption de l'eau soient une caractéristique clonale.

L'équilibre des teneurs en divers éléments minéraux utilisables dans les sols constitue également un facteur limitant classique de la croissance et de la production chez tous les végétaux. La fumure de l'*Hevea* fait varier les teneurs en N, K, Mg, Pi, Ca⁺⁺, ... et leurs rapports dans le latex (PUSPARAJAH *et al* 1975). Les effets observés au niveau du latex sont liés positivement (K⁺) ou négativement (Pi, Mg⁺⁺) à la production des arbres. Ils peuvent s'interpréter par leur action sur les paramètres de l'écoulement du latex (stabilité du latex...) et/ou, sur l'alimentation optimale des vaisseaux laticifères

2) Photosynthèse et alimentation glucidique des laticifères :

a) Photosynthèse chez l'Hévéa :

A côté de la croissance végétative et de la fructification, la production de latex constitue ches l'Hévéa "une zone d'appel" particulière (effet SINK). La photosynthèse semble être dans une certaine mesure une caractéristique clonale et un facteur limitant potentiel (SAMSUDDIN et IMPENS, 1978 et 1979 ; SAMSUDDIN, 1980 ; MONTENY et al., 1983).

b) Alimentation glucidique des laticifères :

Le saccharose issu de la photosynthèse est le précurseur de la quasi-totalité des constituants cellulaires et, en particulier, du caoutchouc naturel.

On peut admettre que le saccharose, produit par les cellules chlorophyliennes, diffuse dans l'apoplaste des feuilles. Il est alors "pompé" et accumulé dans les micro-vaisseaux phloémiques selon un processus actif, faisant intervenir classiquement un symport proton + saccharose, couplé au fonctionnement des ATPases, pompes à protons plasmalemmiques. Les vaisseaux du phloème ainsi chargés en sucre assureraient alors le transport vertical selon un processus diffusionnel (Théorie de MUNCH et KRAFT (1930).

Le problème se pose alors des modalités de transfert du saccharose du phloème, vers l'intérieur des laticifères. En effet, le phloème conducteur fonctionnel forme un manchon très étroit (1 mm d'épaisseur maximum) à proximité du cambium alors que les laticifères fonctionnels se répartissent en manteaux étalés sur plus de 0,5 à 1 cm à l'extérieur de la zone cambiale.

Selon HEBANT et DE FAY (1980) il existe un transport horizontal par l'intermédiaire des rayons vasculaires, reliant l'intérieur du bois à l'écorce tendre. Le processus du transfert des vaisseaux du phloème aux rayons vasculaires reste inconnu à ce jour.

Au niveau des rayons, des plasmodesmes mettent en communication le contenu de ces rayons avec le cytoplasme des cellules parenchymateuses entourant les laticifères. Par contre, il a été impossible jusqu' à ce jour de déceler la présence de tels plasmodesmes entre cellules parenchymateuses et laticifères. Il existerait donc un transport actif assurant l'alimentation glucidique des laticifères. On peut raisonnablement penser que ce transport implique le fonctionnement d'une pompe à protons (ATPase ?) au niveau du plasmalemme des laticifères.

Quoi qu'il en soit, l'efficacité photosynthétique du couvert d'Hevea ainsi que les différentes étapes du transport du saccharose, depuis les feuilles jusqu'au sein des laticifères constitue autant d'étapes susceptibles de limiter l'alimentation glucidique des laticifères, et partant, la production du latex.

Le caractère limitant que présentent les processus d'alimentation glucidique, minérale et hydrique des tissus laticigènes ne nous échappe pas. Notre travail portera cependant sur les phénomènes se déroulant plus en aval, au niveau de la régulation intralaticifère des processus physiologiques liés à la synthèse et à l'écoulement du latex, et contrôlant donc la productivité des Hévéas.

II - RÉGULATION INTRALATICIFÈRE DE LA PRODUCTION DU LATEX

Nous décrivons ici les facteurs limitants inhérents au fonctionnement interne des laticifères. Ils concernent donc la physiologie de la cellule laticifère adulte, et les mécanismes physico-chimiques et biochimiques contrôlant la synthèse et l'écoulement du latex.

Il est très rapidement apparu que la production du caoutchouc après une saignée dépend, en premier lieu de la durée de l'écoulement du latex. Dans un deuxième temps, cependant, la régénération du contenu des laticifères entre deux saignées successives est susceptible de limiter à son tour la quantité de latex récoltée. L'écoulement et la régénération du latex constituent donc bien les deux facteurs limitants intralaticifères les plus importants de la production de l'Hevea.

A) ECOULEMENT ET COAGULATION DU LATEX :

1) La saignée de l'Hévéa :

La saignée est l'opération qui permet la récolte du latex. Elle consiste à sectionner les laticifères selon une incision hélicoïdale effectuée dans l'écorce du tronc de l'hévéa (planche I). A chaque opération, le saigneur enlève environ l à 2 mm d'écorce. L'encoche ainsi ravivée périodiquement sépare sur le tronc une zone d'écorce vierge d'une zone d'écorce en voie de régénération. Deux paramètres principaux caractérisent la saignée. Il s'agit de :

- la longueur de l'encoche qui peut faire le tour de l'arbre (spirale entière : S), ou seulement la moitié (demi-spirale : (S/2), voire moins (S/3, S/4,...)
- la fréquence : définie par le nombre de saignées effectuées par intervalle de temps. On la note J/n, ou n représente le nombre de jours séparant 2 saignées successives. La fréquence J/3 J/4, la plus usitée en hévéaculture, correspond à 2 saignées par semaine, séparées par des intervalles de 3 et 4 jours respectivement.

Classiquement, la saignée sectionne le nombre maximum de vaisseaux laticifères. Elle se fait donc le plus profondément possible sans toutefois atteindre le cambium (1 mm).

2) L'écoulement du latex :

Le sectionnement des vaisseaux laticifères provoque l'écoulement et permet donc la récolte du latex. Ce flot, rapide au moment où l'incision est pratiquée, ralentit, puis s'arrête au bout d'un temps plus ou moins long (fig. 1-a). La physiologie de ce phénomène a fait l'objet de nombreuses recherches qui ont été résumées par SOUTHORN (1969), NINANE (1970), RIBAIL-LIER (1972), COUPE (1977) et LIORET et al. (1978).

Dès 1929, FREY-WYSSLING propose un modèle expliquant l'écoulement du latex, qui, après quelques remaniements (FREY-WYSSLING, 1932, 1952) demeure toujours actuel.

Grâce à la turgence des tissus de l'écorce tendre (liber, vaisseaux laticifères, tissus parenchymateux,...) l'ouverture des laticifères entraîne, par un phénomène de détente élastique, l'expulsion d'une part du latex qu'ils contiennent. <u>Cette turgescence constitue donc le moteur de</u> l'écoulement du latex après le coup de gouge du saigneur.

Chronologiquement, les évènements s'enchaînent en deux phases aux caractéristiques différentes : une phase initiale à écoulement rapide, une phase secondaire à écoulement plus ou moins lent (LIORET et al. 197°)

a) La phase initiale à écoulement rapide :

- Avant la saignée, il règne dans les tissus laticifères, une pression de turgescence élevée. Mesurée à l'aide de différentes techniques (ARISZ, 1928 ; BUTTERY et BOATMAN, 1964, 1966, 1967) celle-ci varie entre 8 et 15 atmosphères selon les conditions climatiques instantanées (NINANE, 1970). Figure 1-a/ Cinétiques des évolution des gradients de pression de turgescence intra-laticifères et de l'écoulement du latex après une saignée:comparaison entre les Clones Tjl et RRIM 501 (Millford et al.,1966).



Figure 1-b/ Courbes des cinétiques de l'écoulement du latex lors de saigneés répétées en demi-spirale ou en microsaignée (1 inch). Les valeurs sont exprimées en g. de latex min⁻¹ écoulé sur la totalité de l'encohe (courbes supérieures) et en mg.min⁻¹.mm⁻¹ d'encoche ouverte (courbes inférieures).On note une obturation plus intense des laticifères pour les encoches les plus courtes (Southorn and Gomez,1969)



Sous l'influence de la saignée, la pression de turgescence dans les laticifères au voisinage de l'encoche chute de 10-15 atmosphères à 1,5-2 atmosphères dans la première minute de l'écoulement, puis remonte plus ou moins rapidement (BUTTERY et BOATMAN, 1967).

Cette chute de pression provoque une contraction de la paroi des laticifères, qui expulsent alors leur latex (PYKE, 1941 ; GOODING, 1952 BOATMAN, 1966 ; LUSTINEC et al., 1966 ; NINANE, 1970). Il en résulte une diminution du diamètre du tronc de 25 à 75 μ m, et donc une diminution d'environ 20 % de la surface de section des laticifères (BOATMAN, 1966 ; MON-TENY et al., 1983).

- La chute de pression rend le potentiel hydrique des tissus laticifères plus négatifs; il en résulte un transfert d'eau (et probablement de solutés) à partir des tissus voisins vers l'intérieur des laticifères lésés. Ce transfert d'eau est appelé réaction de dilution (ARISZ, 1920) et se traduit par une chute significative de la teneur en matière sèche du latex, au cours de l'écoulement.

Cette première phase de l'écoulement, correspondant à une expulsion élastique du latex, semble peu affectée par les problèmes d'obstruction des laticifères. Les micro-coagulums qui peuvent se former durant cette phase sont rapidement évacués du fait de la vitesse du flot.

b) La phase secondaire à écoulement lent :

Après la phase de détente élastique, il apparaît une phase plus longue, correspondant à un débit régulièrement décroissant. L'étalement dans le temps de cette deuxième phase est la caractéristique qui déterminera la quantité de latex récoltée pour un arbre donné.

Cette phase est encore sous la dépendance du gradient de pression existant dans les laticifères, entre leurs extrémités ouvertes et les parties les plus éloignées de l'encoche. Elle obéit approximativement à la loi de POISEUILLE qui tient compte, outre du gradient de pression, de la viscosité du latex, du nombre et du diamètre moyen des tubes d'où s'écoule le fluide.

Divers auteurs ont montré que la valeur du gradient de pression, mesuré entre l'extrémité sectionnée des vaisseaux laticifères et les parties les plus éloignées de l'encoche, diminue après la saignée. Il est légèrement affecté par les traitements de l'écorce stimulant la production et passe de 10 à 8 bar .cm⁻¹ chez les arbres non traités et de 11 à 6 bar .cm⁻¹ chez les arbres stimulés. La diminution de la vitesse d'écoulement ne peut donc

pas s'expliquer par la seule chute du gradient de pression, car chez les arbres stimulés on constate que le ralentissement de l'écoulement est le plus faible, alors que la chute du gradient de pression est en moyenne la plus rapide et la plus élevée (BUTTERY et BOATMAN, 1967).

Dans le cas des arbres non stimulés, l'influence de la pression hydrostatique dans les laticifères est plus nette. Cette pression chute au milieu de la journée, et s'accompagne d'une baisse du rendement de la saignée (BUTTERY et BOATMAN, 1966; NINANE, 1970). Cette chute de pression intralaticifère correspondrait à la compétition vis-à-vis de l'eau disponible dans la plante, entre l'évapotranspiration, le potentiel de turgescence des tissus de l'écorce, et la réaction de dilution au sein des laticifères favorisant normalement l'écoulement du latex (NINANE, 1970).

La viscosité du latex est une fonction croissante de sa teneur en matière sèche (VAN GILS, 1951). Celle-ci diminue précisément au cours de l'écoulement du latex (réaction de dilution). L'écoulement se trouve donc normalement favorisé par la dilution. L'importance de ca paramètre a été vérifiée par ailleurs (BRZOSOWSKA-HANOWER, *et al*.1979; CRETIN, 1979-a). Enfin, la stimulation des arbres se traduit toujours par une diminution systématique des teneurs en matière sèche du latex, et facilite donc son écoulement.

La chute de pression engendre une contraction des laticifères, et se traduit par une diminution du diamètre des laticifères. Cependant, les expériences de BOATMAN (1966) ont montré une contraction significativement plus importante chez les arbres stimulés que chez les arbres témoins. Cette observation indique que la diminution du diamètre des laticifères ne peut expliquer l'arrêt de l'écoulement du latex.

- Le nombre de laticifères sectionnés

Le nombre des laticifères sectionnés à partir desquels s'épanche le latex diminue plus ou moins rapidement au cours de l'écoulement. L'obturation des vaisseaux laticifères a été mise en évidence par les expériences de saignées répétées de BOATMAN (1966) puis MILFORD *et al.*(1969).Ainsi, lorsqu'un arbre à écoulement difficile est resaigné 10 à 15 minutes après une saignée initiale, on observe une augmentation immédiate du débit de latex (figure 1-b). L'écoulement suit alors une cinétique en deux phases, analogues à celle observée lors de la saignée précédente, et le ravivement de l'encoche effectué à plusieurs reprises réinitie l'écoulement.

Ces expériences indiquent qu'il existe un phénomène d'obturation des vaisseaux laticifères. Cette obturation, plus ou moins rapide selon

les clones, est localisé à proximité des extrémités sectionnées des laticifères, puisque l'élimination d'1 ou 2 millimètres d'écorce par le couteau de saignée suffit à rétablir l'écoulement du latex.

MILFORD *et al.* (1969) ont ainsi défini un indice d'obstruction des laticifères (plugging index) pour lequel la vitesse initiale de l'écoulement est généralement calculée à partir de la production de latex dans les cinq premières minutes.

Io = $\frac{\text{Vitesse initiale d'écoulement (mLmin⁻¹)x100}}{\text{Production totale (ml)}}$

Cet indice d'obstruction est une caractéristique clonale (MILFORD et al. 1969 ; PAARDEKOOPER et SANIT-SAMOSORN, 1969).

Chez les clones à faible indice d'obstruction, le ravivage de l'encoche ne provoque qu'une très faible augmentation du débit de latex. De même, la stimulation des arbres (au 2,4,5 T) supprime l'effet des saignées répétées.

3) La coagulation du latex :

L'examen de sections longitudinales des vaisseaux laticifères à proximité de l'encoche de saignée montre qu'ils sont obstrués par des coiffes de caoutchouc coagulé, et qu'ils renferment souvent, plus en amont, des "bouchons" internes plus ou moins importants. Dans tous les cas, ces bouchons sont constitués de caoutchouc coagulé, amalgamé à des lutoïdes endommagés et vidés de leur contenu (SOUTHORN, 1968).

a) Rôle déstabilisant des lutoïdes :

L'implication des lutoïdes dans les processus de floculation et de coagulation du latex est soupçonnée depuis longtemps (PATON, 1953). SOUTHORN (1961) montre que le latex frais, recueilli au champ, contient toujours des microfloculats dans lesquels sont systématiquement associés particules de caoutchouc et lutoïdes endommagés. Par la suite, le rôle des lutoïdes dans les processus de coagulation a été précisé par une série d'expériences initiées par les chercheurs du Rubber Research Institute of Malaysia (RRIM).

SOUTHORN'et EDWIN (1968) montrent que le contenu des lutoïdes (le "sérum intra-lutoïdique" : SL) seul, est capable de catalyser rapidement la floculation, puis la coagulation d'une suspension aqueuse de particules de caoutchouc in vitro. SOUTHORN et YIP (1968) montrent que sil'on fait passer du latex dans un capillaire, dont le diamètre interne est comparable à celui des laticifères (environ 30 μ m), la vitesse d'écoulement est proportionnelle au gradient de pression dans la mesure où celui-ci reste modéré (inférieur à 2 ou 3 bar .cm⁻¹). Pour des gradients de pression plus élevés, on observe un arrêt de l'écoulement consécutif à une coagulation brutale du latex. Par contre, lorsque le latex est débarrrassé de ses organites par centrifugation, des gradients de pression dépassant 130 bars. cm⁻¹ peuvent être appliqués sans obstruction des capillaires. Ces auteurs en concluent que les lutoïdes éclatent lorsque la pression atteint un niveau critique, et que leur contenu, libéré au sein du latex, catalyse des micro-coagulations localisées qui conduisent à l'obstruction des capillaires.

Il est ainsi suggéré que, *in vivo*, tout processus susceptible de léser la membrane des lutoïdes conduit à la libération, au sein du latex, des agents coagulants que ces organites compartimentent, et aboutit à l'arrêt de l'écoulement.

* Théorie enzymatique de la déstabilisation du latex :

Pour expliquer l'action coagulante du contenu lutoïdique, on peut admettre que la libération des hydrolases (cathepsine, phosphohydrolases,...) provoque la dégradation des membranes phospholipoprotéiques particulaires, et casse ainsi la stabilité colloïdale des particules de caoutchouc. De plus, les lutoïdes accumulent des ions Ca⁺⁺. Leur libération entraînerait l'activation d'une phospholipase cytosolique (JACOB, 1976) qui viendrait amplifier les effets des hydrolases lutoïdiques sur les enveloppes protectrices des particules de caoutchouc.

TATA et YIP (1968) ainsi que RIBAILLIER (1972-b) ont effectivement isolé, à partir du sérum lutoïdique, un groupe de protéines responsable de l'activité déstabilisante des lutoïdes. Enfin HANOWER *et al.* (1976) ont montré que l'adjonction de trypsine ou de phospholipase C accélère significativement la coagulation du latex. Par contre, la phospholipase D reste sans effet.

* Théorie non enzymatique :

Cependant, selon SOUTHORN et YIP (1968), l'action coagulante du sérum intra-lutoïdique serait trop rapide pour être entièrement enzymatique. Sans écarter totalement la participation de certaines activités enzymatiques dans les processus aboutissant à la coagulation, la plupart des auteurs attribuent un rôle majeur aux mécanismes non enzymatiques conduisant à la neutralisation des charges électronégatives des particules du latex, qui garantissent normalement la stabilité colloïdale de ce cytoplasme.

Le sérum intralutoïdique renferme des teneurs élevées en matériaux cationiques : Mg^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} , des protons (pH ~ 5,5) et des macromolécules protéiques à caractère basique (TATA et EDWIN, 1970).

Par contre, le cytosol contient essentiellement des protéines de type anionique et peu de cations métalliques. Cette différence de charge des protéines de chacun de ces compartiments a pu être vérifiée à de nombreuses reprises par électrophorèse (MOIR et TATA, 1960 ; KARUNAKA-RAN et al., 1961 ; TATA et MOIR, 1964 ; TATA et YIP, 1968 ; TATA et EDWIN, 1970).

La décompartimentation de ces sustèmes électriquement antagonistes aboutirait à la rupture de l'équilibre des charges garantissant la stabilité colloïdale du latex. Il s'ensuivrait la coprécipitation des particules et autres structures macromoléculaires aboutissant à la coagulation du latex.

* Existence d'une coagulase ?

Cependant, le rôle capital des cations métalliques libres reste très contesté. En effet, si ceux-ci sont éliminés par dialyse, le sérum lutoïdique conserve encore la plus grande partie de son pouvoir coagulant, alors que le dialysat n'a pas d'activité appréciable (SOUTHORN et EDWIN, 1968). Par contre, la dénaturation thermique des protéines lutoïdiques supprime la majeure partie de son pouvoir coagulant. Les protéines du sérum lutoïdique jouent donc un rôle déterminant. TATA et YIP (1968) ont montré que l'activité coagulante lutoïdique est attribuable à une protéine cationique particulière, mise en évidence par électrophorèse. Ces auteurs ont pu séparer des quantités suffisantes de ce matériaux pour démontrer qu'il était doué d'une forte capacité coagulante.

En définitive, il semble très probable que tous les processus décrits jusqu'à ce jour, ne sont pas mutuellement exclusifs et qu'ils participent probablement de façon synergique à la coagulation rapide du latex.

b) Rôle des particules de FREY-WYSSLING et de l'oxygène :

L'hypothèse d'un rôle de l'oxygène dans les processus aboutissant à la coagulation du latex a été formulée par HANOWER et al. (1976) Ces auteurs font remarquer que la coagulation est un phénomène qui intervient essentiellement au niveau de l'encoche, lorsque le latex atteint

l'air libre. Ils mettent en évidence un rôle de l'oxygène en démontrant, d'une part, que lorsque l'arbre est saigné sous atmosphère d'azote, l'écoulement du latex est prolongé d'une manière significative, et, d'autre part, que le latex conservé sous azote coagule beaucoup plus lentement que sous atmosphère d'oxygène.

Selon ces auteurs, l'action de l'oxygène serait attribuable, au moins partiellement, à des activités phénol-oxydases endogènes. Celles-ci sont essentiellement compartimentées à l'intérieur des particules de FREY-WYSSLING, qui lors de simples centrifugations différentielles, sédimentent en majeure partie avec les lutoïdes. HANOWER *et al.* (1976) démontrent que les antioxydants retardent la coagulation tandis que l'adjonction de tyrosinase exogène au latex, active sa coagulation. La coagulation est également accélérée par les substrats des o-diphénol-oxydases endogènes (catéchol, DOPA,...).

L'oxygène, les phénoloxydases particulaires et des phénols endogènes du latex pourraient donc participer également aux processus aboutissant à la coagulation, probablement grâce à la libération de noyaux quinoniques, de phlabophènes et de tannins oxydés, agents éminemment précipitants des macromolécules biologiques (protéines,...).

c) Rôle stabilisant du cytosol :

Le rôle du cytosol dans les processus aboutissant à la coagulation du latex a fait l'objet de nombreuses controverses.

A l'encontre des expériences de WOO (1973), qui, réalisées dans des conditions opératoires (pH : 4,5 ; Ca ⁺⁺ 6mM) très éloignées des conditions physiologiques (pH 5,5 à 7 ; Ca ⁺⁺ 0,25 à 1,5 mM) montraient une action déstabilisante du cytosol"activé"par le calcium, HANOWER *et al.* (1976) montrent que le cytosol, non seulement n'a aucun pouvoir coagulant à pH physiologique, mais au contraire, affaiblit l'action déstabilisante des cations divalents. Le facteur stabilisant ("anticoagulant") cytosolique, étant thermostable, n'est probablement pas une protéine.

4) Déstabilisation des organites du latex et coagulation :

Toutes les études menées jusqu'à ce jour montrent donc que le latex contient, <u>à l'état latent</u>, son propre système interne de coagulation, capable d'arrêter l'écoulement. Les agents coagulants apparaissent tous être compartimentés à l'intérieur d'organites limitées par une membrane simple (lutoïdes) ou double (particules de FREY-WYSSLING). <u>C'est</u>

donc de la stabilité de ces membranes que dépendra la précocité et l'induction des processus conduisant à <u>la coagulation</u> du latex et l'obstruction des laticifères.

Suite aux résultats de PUJARNISCLE (1968) démontrant la stricte localisation des activités phosphatases acides à l'intérieur des lutoïdes, RIBAILLIER (1972) estime l'intégrité de la membrane lutoïdique en mesurant leur indice d'éclatement. Cette mesure simple consiste à déterminer le pourcentage d'activité phosphatase acide libre dans le cytosol (en tampon isotonique), par rapport à l'activité phosphatasique acide totale déterminée en présence d'un détergent (Triton X-100).

De fait, RIBAILLIER (1972), CRETIN et BANGRATZ (1983) et ESCHBACH et al. (1983) mettent en évidence une corrélation inverse entre cet indice d'éclatement des lutoïdes et la productivité des hévéas. De même YEANC et PARANDJOTHY (1982) établissent une corrélation directe entre ce même indice d'éclatement lutoïdique et l'indice d'obstruction défini plus haut (MILFORD et al. 1969). Ces résultats démontrent sans ambiguïté l'importance de la stabilité de la membrane lutoïdique dans les processus conduisant à l'obstruction des laticifères et à la cessation de l'écoulement du latex.

SOUTHORN (1969) a répertorié quatre causes majeures susceptibles de déstabiliser les membranes de ces organites. Elles sont d'origine électriques, osmotiques, mécaniques et chimiques.

a) Causes électriques :

Selon LIM *et al*. (1969), la saignée provoque un potentiel électrique de blessure limité strictement à la zone de l'encoche. Ce potentiel pourrait entraîner une dépolarisation de la membrane des organites arrivant à l'extrémité sectionnée des vaisseaux.

Celle-ci engendrerait, d'une part, localement une agglomération des organites, et, d'autre part, les sensibilités vis-à-vis d'autres facteurs déstabilisants, évoqués ci-dessous.

Ce potentiel de blessure peut être temporairement aboli par des anesthésiques (chloroforme,éther,...) qui ont, par ailleurs, selon BANCHI, une action stimulante sur la production (BANCHI, 1967).

Cependant, l'absence d'effet de substances stimulant la production, telles le 2,4,5-T ou l'oxyde d'éthylène, limite la portée de ce type d'explication. b) Causes osmotiques :

Les lutoïdes sont, comme tout organite cellulaire, osmosensibles (PAKIANATHAN *et al.* 1966 ; PUJARNISCLE, 1968). Les conditions osmotiques créées par une solution de mannitol 0,3 à 0,4 M, sont considérées comme optimales pour la préservation des lutoïdes séparés du latex frais

SOUTHORN (1969) propose que les réactions de dilution consécutives à la chute de turgescence, dès les premières minutes de l'écoulement, peuvent entraîner une certaine déstabilisation des organites.

L'osmolarité du latex diminue effectivement au cours de l'écoulement du latex, mais les valeurs les plus basses des concentrations osmotiques (-10 %) enregistrées ne peuvent pas entraîner à elles seules une dégradation des lutoïdes, aussi sévère que celle que l'on peut constater par ailleurs (PAKIANATHAN, 1967 ; PUJARNISCLE, 1969-a). Des recherches sur l'osmosensibilité des particules de FREY-WISSLING, dans le domaine des variations physiologiques, pourraient cependant redonner un intérêt à cette théorie du choc osmotique.

c) Causes mécaniques :

Les microphotographies optiques et électroniques des vaisseaux laticifères montrent une certaine distorsion des particules dans le flux du latex, lors de son écoulement (SOUTHORN, 1968-a). Ces observations indiquent que les contraintes de laminage semblent importantes. Les expériences décrites précédemment (p. 42) montrent que l'écoulement forcé du latex entier dans des capillaires, provoque sa coagulation. Enfin, des passages successifs au"Potter"d'une suspension lutoïdique provoquent leur éclatement (RIBAILLIER, 1972-a). Ces résultats, transposés à la réalité, suggèrent que les effets de laminage doivent jouer un rôle important dans l'obstruction des laticifères. Les effets de laminage pourraient, dans une certaine mesure être localisés à l'extrémité des laticifères sectionnés, où les gradients de pression sont les plus élevés, au moins pendant une courte période, immédiatement après l'ouverture des laticifères.

La combinaison des effets osmotiques et électriques pourait sensibiliser la membrane des organites à la détérioration provoquée par les effets de laminage.

d) Causes chimiques :

La gouge du saigneur sectionne non seulement les vaisseaux laticifères, mais également les autres cellules de l'écorce, dont les cellules à tannins. Celles-ci libèrent sur l'encoche, des substances connues pour activer la coagulation du latex. Cependant, cet effet chimique devrait être maximum dans les premières minutes suivant l'ouverture de l'écorce. Malgré les travaux effectués en Malaisie (YIP et GOMEZ, 1978), cette hypothèse ne semble pas pouvoir être retenue comme un phénomène majeur intervenant dans les processus de la coagulation sur l'encoche, et encore moins lors de la coagulation du latex à l'intérieur des laticifères.

5) Déterminisme biochimique de la stabilité membranaire :

Les effets électriques, osmotiques, mécaniques et chimiques proposés par SOUTHORN (1969) contribuent sans aucun doute, à la déstabilisation des membranes des organites du latex. Cependant, il ne semble pas que ces phénomènes individuels, ou même leur conjonction, puissent expliquer l'énorme variabilité, inter ou intraclonales, constatée lorsque sont effectuées des comparaisons des cinétiques d'écoulement, des mesures d'indices d'obstruction, des mesures d'indice d'éclatement des lutoïdes, la vitesse de coagulation du latex et leur résultante : la production des arbres.

D'autre part, l'absence d'effets positifs de la stimulation hormonale, sur les phénomènes décrits précédemment, mis à part un effet global sur l'écoulement, nous incite à penser que <u>la théorie proposée</u> par SOUTHORN est incomplète.

Nous proposerons dans la suite de ce travail des mécanismes biochimiques, déterminant *in vivo*, la stabilité des membranes des organites, au sein du latex.

B) POTENTIALITES LATICIGENES ET REGENERATION DU LATEX

Implicitement, plus l'écoulement du latex sera prolongé, plus la production sera élevée, mais en corrolaire, plus importante devra être la régénération du matériel cellulaire exporté.

La sélection de clones à écoulement facile, et surtout l'emploi quasi généralisé d'agents stimulant la production, comme l'éthrel, lève partiellement le facteur limitant primaire (l'écoulement) et donne, de ce

fait, une acuité nouvelle aux problèmes liés à la régénération du latex entre deux saignées successives.

La régénération du latex au sein des laticifères constitue, de ce fait, le second facteur limitant la productivité de l'Hevea.

1) Généralités sur la biosynthèse du caoutchouc :

La cellule laticifère est spécialisée dans la synthèse du caoutchouc qui constitue plus de 90 % de la matière sèche de son contenu cellulaire.

Le caoutchouc du latex d'Hevea brasiliensis est une macromolécule constituée par l'enchaînement d'unités isopréniques à cinq carbones, de configuration Cis. Le maillon unitaire : le pyrophosphate d'isopentenyle (IPP) (précurseur de nombreux autres produits terpéniques naturels) est produit *in situ* (CHAYKIN *et al.* 1958 ; LYNEN *et al.* 1958 ; LYNEN, 1963), avant que d'être polymérisé pour donner des molécules de cis-polyisoprène, dont le poids moléculaire peut atteindre plusieurs millions(SCHULZ et MULA,1961).

Les travaux menés tant sur le Guayule (ARREGUIN ct al. 1951) que sur le latex d'Hevea (BANDURSKI et TEAS, 1957 ; HARRIS et KECKWICK, 1961 ; d'AUZAC, 1965) ont montré que l'acétate radioactif est incorporé dans le poly-isoprène, et constitue de ce fait, le précurseur du caoutchouc.

L'enchaînement métabolique aboutissant à la production d'acétate correspond au catabolisme des sucres. Il apparaît que le saccharose d'origine photosynthétique constitue le précurseur essentiel de l'acétate et par conséquent du caoutchouc (LYNEN, 1969).

Très schématiquement, l'élaboration du cis-polyisoprène peut être divisée en deux phases distinctes :

- la première rend compte de la transformation du saccharose en acétate. Il s'agit de la glycolyse, et de son prolongement direct ;

- la seconde correspond à l'anabolisme isoprénique lui-même.

a) Généralités concernant la glycolyse dans le latex :

Toutes les enzymes du catabolisme glucidique sont localisées dans le cytosol du latex (d'AUZAC, 1965 ; d'AUZAC et JACOB, 1969 ; JACOB, 1970). Elles rendent compte de la transformation de la molécule de saccharose (à 12 carbones) en molécules d'acétate (2 carbones), utilisées préférentiellement dans de nombreux processus de biosynthèse. En outre, par l'intermédiaire de la phosphoglycérate kinase et de la pyruvate kinase, le

fonctionnement de la glycolyse assure une synthèse d'ATP.

Le passage de la glycolyse vers l'anabolisme isoprénique, en l'occurrence: la transformation du pyruvate en acétyl coenzyme A est encore très mal connue. Le fonctionnement d'une pyruvate décarboxylase, au sein du latex, suggère que l'acétyl-CoA, constitue bien une étape intermédiaire (JACOB, 1975 ; TUPY, 1976). Cependant, le fait que l'incorporation dans le caoutchouc, *in vitro*, de ¹⁴C-pyruvate soit toujours beaucoup plus faible que celle de l'acétate, et surtout de l'acétyl-CoA, indique que cette étape est vraisemblablement limitante dans la biosynthèse du polyisoprène (BANDURSKI et TEAS, 1957 ; HARRIS et KECKWICK, 1961 ; d'AUZAC, 1965).

b) L'anabolisme isoprénique :

La plupart des enzymes catalysant la synthèse du maillon unitaire, isopentényl-pyrophosphate, ont été localisés dans le cytosol du latex (LYNEN *et al.* 1958 ; WILLIAMSON et KECKWICK, 1965 ; CHERTERTON et KECKWICK, 1966 ; LYNEN, 1969 ; d'AUZAC et JACOB, 1969...). Par contre, la β -hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) réductase (ARCHER et AUDLEY, 1967 ; HEPPER et AUDLEY, 1969) est localisée sur la membrane d'un des organites lourds du latex (HEPPER, 1967 ; SIPAT, 1982). La polymérase catalysant l'allongement de la chaîne isoprénique serait localisée à la périphérie des particules de caoutchouc elles-mêmes (ARCHER *et al.*, 1963-b ; LYNEN, 1967 et 1969).

Il est important de rappeler que la synthèse d'un maillon isoprénique à partir de 3 acétyl-CoA, nécessite l'apport de 2 NADPH et de 3 ATP.

2) Quelques problèmes métaboliques liés à la biosynthèse du caoutchouc :

Parmi les problèmes liés à la biogénèse du caoutchouc, quatre au moins apparaissent comme cruciaux. Il s'agit :

- du fonctionnement de l'enchaînement métabolique et la régulation des étapes qui le constituent ;

- de la fourniture de l'énergie nécessaire à la biosynthèse (disponibilité en ATP) ;

- de la régénération du pouvoir réducteur (NAD (P)/NAD (P)H) et de l'équilibre redox au sein du cytosol laticifère ; - de la protéinogénèse qui doit être suffisamment intense pour compenser la perte des protéines cellulaires, lors de la récolte du latex.

a) Les étapes clefs de la biosynthèse du caoutchouc :

Disponibilité en saccharose et fonctionnement de l'invertase au sein des laticifères :

Les travaux de TUPY (1969, 1973 a, b, c, d, et 1982) ont souligné l'importance de la disponibilité en saccharose, au sein des laticifères. Cependant la teneur en sucre, dosée au niveau du latex, est en fait la résultante de l'alimentation (flux entrant) en saccharose des tissus laticifères, et de son utilisation cellulaire (intensité du métabolisme). De ce fait, les corrélations entre teneurs en sucre du latex et productivité des arbres peuvent être positives ou négatives. Notons par contre que <u>l'utilisation du saccharose</u> reflète l'activité métabolique globale. Celle-ci est sous le contrôle de l'invertase dont l'intensité de fonctionnement, extrêmement sensible à de faibles variations de pH (TUPY, 1969),a pu être corrélée à la production de latex (TUPY, 1969 et TUPY et PRIMOT, 1976).

* Le carrefour phosphoénol-pyruvique :

Il constitue une déviation possible de la glycolyse. A son niveau, le phosphoénolpyruvate (PEP) issu de la transformation des sucres peut être soit déphosphorylé en pyruvate, précurseur de l'acétate et, partant, du caoutchouc, soit carboxylé en acide oxaloacétique d'où dérivent les acides du cycle de KREBS, sans lien <u>direct</u> avec la synthèse isoprénique. La première orientation est catalysée par une pyruvate kinase (PK) et s'accompagne d'une production d'énergie sous forme d'ATP, la seconde, par une phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPcase) et peut aboutir à l'accumulation d'un acide fort, l'acide malique par l'intermédiaire de la malate déshydrogénase.

Les travaux de JACOB *et al*. (1977 et 1979 a et b) ont montré que l'orientation de ce carrefour métabolique vers la synthèse d'acide malique, en relation directe avec la régulation fine du pH cytosolique, ou vers le pyruvate, est essentiellement sous le contrôle du pH et de la disponibilité en ADP du milieu.

Toutefois, ces auteurs démontrent que dans des conditions physiologiques normales de pH et de teneurs en ADP et malate du cytosol, la réaction catalysée par la PK est largement favorisée par rapport à

celle dépendant de la PEPcase. Ils concluent ainsi que le "fonctionnement du carrefour phosphoénol-pyruvique est tel que la dérivation de la glycolyse vers les acides du cycle de KREBS au détriment du métabolisme isoprénique est sous un contrôle biochimique sévère, et que "*la voie de synthèse*" du caoutchouc est protégée très efficacement contre une trop forte compétition".

b) La disponibilité en ATP dans le compartiment cytosolique :

Les processus anaboliques au sein des laticifères, et notamment la synthèse isoprénique nécessite un apport d'énergie sous forme d'ATP. Il est également très probable que les échanges intercellulaires, et en particulier l'alimentation glucidique des laticifères font intervenir des transports actifs utilisant de l'ATP.

Le fonctionnement de la glycolyse, quoique très intense (d'AUZAC, 1965 ; JACOB, 1970) ne peut fournir la totalité de l'énergie nécessaire à l'ensemble des processus de transports actifs, des voies anaboliques et de la protéinogénèse, constamment sollicités pour la régénération du latex, au moins au sein des laticifères exploités. Les processus de phosphorylation oxydative mitochondriale doivent donc intervenir. Cependant, il est impossible d'en estimer l'activité dans le latex, parce que les mitochondries déjà rares au sein des laticifères matures, adhèrent au plasmalemme des laticifères exploités, et ne sont donc pas expulsées avec le latex, tel qu'il est récolté lors de la saignée (DICKENSON, 1964 ; HEBANT et de FAŸ, 1980).

La disponibilité en ATP, au sein du cytosol laticifère revêt donc une importance certaine. De fait, BANGRATZ *et al.* (1982) ont mis en évidence une relation significative directe entre teneur en ATP cytosolique et production de latex. La corrélation devient hautement significative lorsque l'on tient compte du rapport ATP/ADP.

c) Disponibilité en NADP(H) et équilibre redox cytosolique :

* Disponibilité en NADPH

Le fonctionnement de la HMG-CoA réductase, enzyme potentiellement limitante dans l'anabolisme isoprénique (LYNEN, 1969) est lié à la disponibilité en son côfacteur : le NADPH, dans le latex (AUDLEY et HEPER, 1969).

Cette disponibilité en cofacteur réduit dépend de la régénération du NADPH à partir du NADP, et d'autre part des processus impli-

qués dans la synthèse ou la destruction par hydrolyse de la molécule de NADP.

- La régénération du NADPH se fait au niveau du cytosol essentiellement grâce au fonctionnement de la glucose 6-phosphate déshydrogénase, de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (JACOB, 1970)dela glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase à NADP (JACOB, 1973) et de l'enzyme malique (JACOB *et al.* 1978).

- L'hydrolyse du NADP(H) est liée à la présence d'une 2'-nucléotidase cytosolique très active (JACOB et al. 1973), sans doute responsable des faibles teneurs en ce cofacteur, dans le latex. Cette enzyme est inhibée compétitivement par des teneurs physiologiques en Cu⁺⁺.

- Par contre on ne connaît rien de la synthèse du NADP dans le latex, où aucune activité NAD-kinase n'a pu encore être mise en évidence jusqu'à ce jour, *in vitro*.

* Maintien de l'équilibre redox intralaticifère :

Certaines étapes clefs régulant la biogénèse du caoutchouc nécessitent un équilibre oxydoréducteur favorable (glutathion, cystéine) Ainsi l'invertase (JACOB *et al.*, 1983), la pyruvate kinase (JACOB *et al.* 1981) et la HMG-COA réductase (SIPAT, 1982) sont activées par des concentrations physiologiques de thiols dans le latex (glutathion, cystéine). La régénération des groupements thiols sous forme réduite est classiquement dépendante d'enzymes utilisant le NADPH comme la glutathion réductase qui est présente au sein du latex.(Cf. Résultats, 2ème Partie).

d) Acides nucléiques et biosynthèse protéique :

La récolte du latex se traduit, entre autre, par une exportation massive des protéines (enzymatiques et "de structure") cytoplasmiques des laticifères. Celles-ci doivent donc être régénérées en priorité, puisque c'est d'elles que dépendra l'activité métabolique et la régénération intralaticifère.

C'est TUPY (1969-a) qui le premier a observé une certaine corrélation entre les teneurs en acides nucléiques dans le latex, et les potentialités productrices des hévéas. Cet auteur a montré par ailleurs que l'exploitation intensive des arbres induisait, à terme, une élévation des teneurs en RNA totaux du latex.





LATEX D'HEVEA.

pH cytosolique : (pH.C), pH lutoïdique : (pH. L) (d'après BZROZOWSKA et al., 1979; CRETIN, 1979-a)

COUPÉ (1977) a démontré que la productivité des arbres était en fait liée au degré de polymérisation des ribosomes sur les ARN messagers de leur latex. Ces polysomes isolés restent fonctionnels et peuvent donc assurer une protéosynthèse *in vitro* (COUPÉ et d'AUZAC, 1972). Les traitements effectués au niveau de l'écorce des Hévéas, dans le but de stimuler leur production de caoutchouc, induit une augmentation rapide de l'indice de polymérisation des ribosomes au sein de leur latex, et plus tardivement un accroissement de leurs teneurs en ARN totaux (COUPÉ et d'AUZAC, 1974-a,b:COUPÉ *et al.* 1976; COUPÉ, 1977).

L'activité protéosynthétique au sein des laticifères revêt donc une importance primordiale, et elle peut constituer un facteur limitant essentiel de la régénération intralaticifère. Notons cependant que ce facteur est lui-même sous la dépendance d'un apport d'énergie (ATP et GTP) et de la disponibilité en divers nucléosides et acides aminés.

3) Quelques aspects importants de la régulation métabolique au sein des laticifières : Notion d'homéostasie :

Un certain nombre de facteurs ont un rôle important dans la régulation du métabolisme des laticifères. Ils mettent en jeu les modifications des caractéristiques biochimiques et biophysiques des compartiments cellulaires du latex, notamment du cytosol où se réalise la quasi totalité de la synthèse isoprénique.

a) Importance du pH cytosolique au sein du latex :

Il a été démontré par différents auteurs que la production de latex est directement liée au pH de son cytosol (fig. 2-a) (COUPE, 1977 ; CRETIN, 1979-a;PRIMOT et al. 1978 ; BZROZOWSKA et HANOWER et al.1979).Les amplitudes de variations maximales (saisonnières ou inter-arbres) sont de l'ordre de 0,25 à 0,3 unité autour d'un pH cytosolique moyen de 6,9 (6,6 à 7,2). Il se pose donc un problème de régulation du métabolisme intralaticifère par le pH, et probablement des problèmes de régulation du pH par le métabolisme.

L'absorption de solutés et le métabolisme des plantes aboutit à la production ou à la consommation d'H⁺ (ou OH⁻), tant à l'intérieur de la cellule qu'au sein de leur environnement. Par ailleurs, il existe classiquement des transferts de protons entre les divers compartiments cellulaires, et entre la cellule et son environnement (SMITH et RAVEN, 1979).



<u>Figure 3</u> : EFFETS DU pH (Fig. 3 a-d) OU DE CERTAINS IONS (Fig. 3 e-g) SUR LES ACTIVITES DE QUELQUES ENZYMES CLEFS DU METABOLISME, AU SEIN DES CELLULES LATICIFERES D'HEVEA.

Les cellules végétales, plus exposées aux fluctuations et variations des caractéristiques de leur environnement que leurs homologues d'origine animale, doivent donc développer un certain nombre de processus biochimiques et biophysiques, capable de réguler leur pH interne dans des limites restreintes, compatibles avec la vie.

Les effets réversibles des variations de pH sont attribuables aux variations du degré d'ionisation qu'elles engendrent au niveau des groupes dissociables des enzymes et (ou) de leur substrat. Ces modifications sont directement impliquées dans le "<u>turn-over</u>" des complexes enzymessubstrats.

Au sein du latex, un certain nombre d'enzymes "clefs" du métabolisme isoprénique sont extrêmement sensibles aux variations physiologiques de pH du milieu. Il est maintenant bien démontré que, notamment par le biais de l'invertase dont l'optimum de pH est très marqué (fig. 3-a), de faibles variations de pH du cytosol entraînent une activation du métabolisme glucidique, et une augmentation de la production de latex (TUPY, 1969, 1973 a-b). D'autres enzymes voient également leur activité modifiée dans des proportions considérables, pour des variations physiologiques du pH. C'est le cas, par exemple, de la PEP-carboxylase (JACOB *et al.* 1977), de la pyruvate décarboxylase (JACOB, 1970) et de la GAP-déshydrogénase (JACOB et d'AUZAC, 1972) (fig. 3,b,c,d).

En modifiant l'activité de ces enzymes, les variations de pH cytosolique, même de faible amplitude, influent donc efficacement sur le métabolisme conditionnant la régénération du latex, et donc la production de caoutchouc.

La régulation du pH cytosolique intra-laticifère, s'avère donc d'une importance capitale dans les processus conduisant à la biogénèse du caoutchouc.

On peut schématiquement considérer qu'il existe deux types de processus permettant d'éliminer un soluté (acide ou base forte, H⁺, OH⁻,...) susceptibles de modifier hors des limites vitales le pH d'un compartiment cellulaire. Le premier est un processus <u>chimique ou biochimique</u>, il implique la transformation d'un ou plusieurs solutés, en une autre forme moléculaire chimiquement différente à l'intérieur de ce même compartiment. Un second processus qualifié de <u>biophysique ou bioosmotique</u>, fait intervenir la translocation de ce soluté au travers d'une membrane délimitant un compartiment voisin.

Ces deux types de processus ne s'excluent pas mutuellement et interviennent simultanément ou successivement dans les différentes voies métaboliques. Ils dépendent l'un de l'autre, ou au moins s'influencent mutuellement, et peuvent dans certains cas, être couplés énergétiquement l'un à l'autre (théorie chimiosmotique de MITCHELL, 1961, 1966).

b) Un pH stat biochimique au sein du latex : le carrefour phosphoénol-pyruvique :

Le rôle central du carrefour phosphoénol-pyruvique dans la régulation du pH et du métabolisme des végétaux a été proposé par DAVIES (1973 a et b ; 1977, 1979,...). La théorie de DAVIES fait intervenir l'équilibre entre systèmes de carboxylation et décarboxylation, dont le carrefour phosphoénol-pyruvique en constitue un exemple fondamental. Il peut être schématisé ainsi :



Ce schéma fait intervenir la sensibilité au pH des diverses enzymes de la chaîne.

JACOB et al. (1977, 1979) ont étudié, in vitro, le fonctionnement du carrefour phosphoénol-pyruvique du latex. Ces auteurs ont ainsi démontré que, dans des conditions aussi proches que possible des conditions physiologiques existant in vivo (cytosol du latex ultrafiltré), le PEPcase du latex est effectivement extrêmement sensible aux fluctuations physiologiques de pH. Pratiquement inactive à pH 6,6, la PEPcase voit son activité fortement augmentée, pour une <u>alcalinisation</u> du milieu, de quelques dixièmes d'unité (fig. 3b). Dans le cas où les acides forts (malate, citrate) qui dérivent de son fonctionnement s'accumulent dans le milieu, ceux-ci vont tendre à réacidifier le cytosol dont le pouvoir tampon est faible (JACOB et al. 1979) et en contre-partie inhiber la PEPcase qui initie leur production. L'utilisation, ou la compartimentation ultérieure de ces acides forts, ou encore l'apparition de substances alcalinisantes réinitie le processus.

La théorie du pH stat intégral de DAVIES (1973) prévoyait cependant une activité alternée de la PEPcase et de l'enzyme malique en

fonction du pH, la première fonctionnant mieux en milieu alcalin, la deuxième étant activée aux pH plus acides. Or tel n'est pas le cas de l'enzyme malique du latex, qui, comme la PEPcase, est activée par un accroissement du pH, dans la zone des variations physiologiques. Cette particularité décrite également pour l'enzyme malique des coléoptiles d'avoine (SMITH et BROWN, 1981), évite toute accumulation d'acide malique grâce à sa décarboxylation immédiate en acide pyruvique (acide faible) dans le mesure où la teneur en NADP, cofacteur de cette enzyme,n'est pas limitante.

Rappelons cependant que les travaux de JACOB et al. (1977,1979, 1983) sur le carrefour phosphoénol-pyruvique du latex, ont montré que, dans des conditions physiologiques "<u>normales</u>", la formation directe de pyruvate par l'intermédiaire de la PK est largement favorisée par rapport à celle dépendant de la PEP-carboxylase, et "shunte" dans une certaine mesure les possibilités d'intervention de ce pH-stat biochimique potentiel, coûteux en énergie (le coût énergétique de la régulation du pH cytosolique par le pH-stat biochimique équivaut à 8 kcal par H⁺).

Il n'en demeure pas moins, que malgré son activité réelle faible, la voie métabolique catalysée par la PEPcase et l'enzyme malique peut constituer un pH-stat efficace, de par le faible pouvoir tampon du cytosol laticifère.

> c) Le compartiment vacuolaire : un pH stat biophysique au sein du latex ?

* pH-stat biophysique plasmalemmique ?

A côté du pH-stat biochimique de DAVIES les processus d'élimination des protons, par leur translocation au travers des membranes limitant le cytosol, constituent un mécanisme majeur intervenant dans la régulation du pH intracellulaire à plus grande échelle. D'ailleurs, le transport deH⁺ ou OH⁻, entre la cellule et son environnement a été démontré tant chez les végétaux que chez les animaux et microorganismes. Les processus les plus importants mis en jeu dans ces flux transplasmalemmiques de protons (OH⁻ ou autres ions) chez les végétaux, ainsi que leur implication dans le métabolisme, ont fait l'objet de revues complètes (SMITH et RAVEN, 1979 ; SLAYMAN, 1974 ; SPANSWICK 1981 ; POOLE, 1978). Chez les végétaux, l'intervention d'ATPases plasmalemmiques dans les processus d'extrusion de protons, libérés en excès par le métabolisme cellulaire, a pu être démontrée d'une manière irréfutable chez *Neurospora* (SLAYMAN et SLAYMAN
1974 et 1975) chez Chlorella (TANNER et al.1977) et Chara (WILLSON, 1977). En ce qui concerne les végétaux supérieurs les démonstrations sont plus récentes (VARA et SERRANO, 1982 ; MANDALA et al., 1982 ; SZE, 1982 ; CHURCHILL et SZE, 1983).

On imagine ainsi aisément chez l'hévéa, l'existence d'une ATPase pompe à protons,localisée sur le plasmalemme des cellules laticifères,impliquée dans la régulation du pH cytosolique ainsi que dans les processus contrôlant l'alimentation glucidique et minérale des laticifères.

* pH-stat biophysique tonoplastique ?

La mise en évidence de corrélations hautement significatives directes reliant le gradient transtonoplastique de protons (cytosol-lutoïdes) dans le latex à la productivité des arbres, et d'une corrélation hautement significative <u>inverse</u> reliant le pH intravacuolaire (lutoïdique) et la production de latex par les hévéas (COUPÉ, 1977 ; CRETIN, 1979-a; BRZOZOWSKA-HANOWER et al. 1979) a été déterminante pour la suite de nos travaux.

En effet, la corrélation directe, bien établie, liant le pH cytosolique à la production, peut être facilement expliquée grâce à l'activation de la glycolyse induite par l'alcalinisation du latex (TUPY, 1969, 1973 a et b). Par contre, l'interprétation des corrélations reliant pH intralutoïdique, ou gradient transtonoplastique de pH, à la production de latex, est moins évidente. Nous avons montré dans le même temps (CRETIN, 1979-a, BRZOZOWSKA-HANOWER et al. 1979) que le pH vacuolaire du latex évolue toujours dans le sens inverse de celui du cytosol (fig. 2-b), suggérant l'existence, au niveau du tonoplaste lutoïdique, de systèmes translocateurs de protons, fonctionnels in vivo.

Se basant sur les données bibliographiques, il était alors logique de rechercher si l'ATPase tonoplastique caractérisée par d'AUZAC (1975, 1977)pouvait réellement fonctionner comme une pompe à protons, rôle pressenti par d'AUZAC et LIORET (1974) et appuyé depuis par quelques arguments expérimentaux (LAMBERT, 1975 ; HANOWER et al. 1977).

En outre, par analogie avec la capacité des chaînes de transport d'électrons membranaires mitochondriales (PADAM et ROTTENBERG, 1973 ; SIEGEL et CARAFOLI, 1978,...) chloroplastiques (NEUMAN et JAGENDORF, 1964 ; TELFER et EVANS, 1972 ; HELDT *et al.* 1973 ; GRABER et WITH, 1976,...) ou bactériennes (REEVES, 1971 ; RAMOS *et al.* 1976 ; KELL *et al.* 1978, ELEMA *et al.* 1978,...) à convertir un flux d'e en énergie protonique (gradient électrochimique de H^+) nous avons recherché si le système transporteur d'e

situé sur le tonoplaste lutoïdique (MOREAU et al. 1975) était impliqué dans les processus de transfert de protons, au sein du latex d'Hévéa.

Si la présence de systèmes translocateurs de protons était démontrée au niveau du tonoplaste lutoïdique, il en découlerait que le compartiment vacuolaire participe activement à la régulation du pH cytosolique et, par voie de conséquence, à l'orientation et l'intensité du métabolisme intralaticifère.

Nos résultats acquis dans ce domaine, et leurs conséquences, seront exposés dans la première partie de ce mémoire.

d) Equilibre ionique, inhibitions enzymatiques et processus de leur "détoxification" :

Au sein du cytosol laticifère, certains ions (autres que H^+) ou certaines molécules inhibent très efficacement des étapes clefs du métabolisme isoprénique, lorsque leur teneur dépasse un certain seuil. C'est le cas, par exemple, du Mg²⁺ vis-à-vis de l'invertase, du citrate vis-à-vis de la fructose-6-P kinase et dans une moindre mesure de la PEPcarboxylase. Le Ca²⁺ inhibe également la PEP-carboxylase (fig. 3 : e,f,g) et le cuivre est inhibiteur de la pyruvate kinase ainsi que de la PEP-carboxylase (JACOB et d'AUZAC, 1967, 1969, 1972; d'AUZAC et JACOB, 1969; JACOB, 1970; JACOB et al. 1977 et 1979).

Dans tous les cas, les modifications de la composition du milieu ont plus d'influence que la variation de l'activité spécifique des enzymes dans le cytosol du latex. L'équilibre ionique du cytosol régule donc efficacement l'orientation et l'intensité du métabolisme, au sein des laticifères.

Comme dans le cas de la régulation du pH, si les rapports entre cellules voisines des laticifères et le cytoplasme laticigène, par l'intermédiaire des flux transplasmalemmiques de solutés, ont dans ce domaine, une influence certaine, celles-ci restent difficiles à apprécier expérimentalement. Par contre, la répartition moyenne de ces ions et solutés dans les deux compartiments majeurs du latex a été déterminée (RIBAIL-LIER, 1972). Il apparaît que la plupart des ions concernés sont compartimentés à l'intérieur des lutoïdes (tableau 1).

Ces organites jouent donc au moins un rôle détoxifiant vis-àvis du métabolisme cytosolique, et leur efficacité dans cette fonction doit dépendre à la fois de la stabilité de leur membrane et de leur capacité à accumuler et à réguler les flux (éventuellement bidirectionnels) de ces

solutés, au travers de leur tonoplaste.

Le stockage intravacuolaire implique un phénomène d'accumulation <u>réversible</u> (organite de réserve). Les processus de détoxification devraient correspondre à des accumulations essentiellement <u>irréversibles</u>.

En ce qui concerne les lutoïdes, bien que ceux-ci accumulent divers solutés contre un gradient de concentration, il est impossible, actuellement, d'affirmer si ces accumulations correspondent à un processus de stockage ou de détoxification stricte.

- Ainsi, le Mg⁺⁺, qui s'accumule fortement dans les lutoïdes peut être considéré comme néfaste à la stabilité colloïdale du latex. Par ailleurs, au-delà d'un certain seuil, le Mg⁺⁺ peut inhiber certaines enzymes (Invertase...). Par contre, il apparaît nécessaire à l'activité d'autres enzymes telles que celles catalysant les réactions de phosphorylation mais aussi d'isomérisation telle que l'énolase (JACOB, 1970). Enfin, sa chélation par certains anions cytoplasmiques (citrate, ATP, Pi...) peut aboutir à des carences apparentes en cet ion libre dans ce milieu, capables de modifier profondément l'activité de certaines enzymes glycolytiques (JACOB, 1970).

- Le citrate, inhibiteur de l'invertase dans certaines conditions peut être piégé sous forme de sel magnésien dans les vésicules lutoïidiques reconstituées (MARIN, 1981). Selon cet auteur, ce phénomène pourrait expliquer sa rétention au sein des lutoïdes intacts, évoqué par les expériences du MONTARDY et LAMBERT (1977). A l'encontre de cette simple détoxification, rappelons que le ¹⁴C-citrate peut être incorporé, *in vitro*, dans les molécules de C*is*-polysoprène, ce qui pourrait lui conférer un rôle de réserve carbonée (d'AUZAC, 1965).

- Le piégeage apparemment irréversible des acides aminés basiques au sein des lutoïdes du latex, montré par les expériences simples (mais peut-être incomplètes) rapportées par HANOWER et al. (1977), pose un problème du même ordre.

- Enfin, on ne connaît rien des processus conduisant à l'absorption et l'éventuelle remobilisation du Ca⁺⁺, accumulé au sein des lutoïdes. Celui-ci est à la fois un effecteur classique de nombreuses enzymes dont la PK et un puissant agent déstabilisant de la suspension colloïdale que constitue le latex.

Ces quelques exemples soulignent l'importance de l'équilibre ionique" au sein de la cellule laticifère et la dualité de la fonction vacuolaire des lutoïdes.

Quelques aspects des problèmes évoqués ci-dessus seront abordés dans l'exposé de nos résultats.

e) Notion d'homéostasie. Importance des fonctions vacuolaires :

Le fonctionnement optimum du métabolisme, et surtout son orientation préférentielle vers la synthèse isoprénique, dans le cas particulier des cellules laticifères, nécessite des conditions de pH et "d'équilibre ionique" extrêmement strictes. Cette régulation doit aboutir à un équilibre subtil entre la forme libre et les formes complexées des divers ions au sein du cytosol. Elle suppose l'existence de processus actifs contrôlant les flux des divers solutés au niveau des systèmes membranaires limitant le cytosol, et en particulier au niveau du tonoplaste lutoïdique.

Cette tendance des systèmes biologiques à maintenir constantes leurs caractéristiques biochimiques et physicochimiques, en un mot, leurs caractéristiques physiologiques, est classiquement appelée <u>homéos</u>tasie.

Chez les végétaux, les mécanismes participant au maintien de l'homéostasie cytosolique sont encore mal discernés. Certains auteurs accordent une importance primordiale, par exemple au contrôle du pH par un pH-stat biochimique (DAVIES, 1973 a et b). Pour la majorité des auteurs, le maintien de l'homéostasie est essentiellement attribué aux échanges au niveau du plasmalemme (SLAYMAN, 1974 ; SMITH et RAVEN, 1979 ; POOLE, 1978 ; SPANSWICK, 1981 ; RAVEN, 1983). La participation <u>active</u> du compartiment vacuolaire dans les processus de régulation, du pH et l'équilibre ionique du cytosol est le plus souvent négligé.

Les lutoïdes pourraient constituer un modèle intéressant, démontrant la participation active d'une structure vacuolaire dans le maintien de l'homéostasie cytosolique et le contrôle du métabolisme cellulaire.

LES FACTEURS LIMITANT LA PRODUCTION DU LATEX

RESUME

Outre des facteurs anatomiques (écorce), les facteurs climatiques et écophysiologiques (liés à la bonne alimentation hydrique, minérale et glucidique des tissus laticigènes) deux facteurs internes aux laticifères régulent d'une façon déterminante, la production du latex chez Hevea brasiliensis : la durée de l'écoulement du latex et sa régénération in situ.

1) L'ECOULEMENT DU LATEX LIMITE PAR SA COAGULATION :

 a) <u>La pression de turgescence</u> des tissus de l'écorce tendre de l'Hévéa et en particulier le <u>gradient de pression</u> existant entre les extrémités sectionnés des laticifères et les parties les plus éloignées de l'encoche de saignée s'avère être le moteur de l'écoulement du latex.

La durée de l'écoulement est limitée par la coagulation plus ou moins précoce du latex, qui en formant des microbouchons de caoutchouc, obture l'extrémité incisée des vaisseaux laticifères et arrête de ce fait son écoulement.

b) Le latex contient à l'état latent, son propre système interne de coagulation. Cette coagulation s'explique par la rupture de l'équilibre des charges, garantissant normalement la stabilité colloïdale du latex. Celle-ci est provoquée par la décompartimentation de deux systèmes chimiquement et électriquement antagonistes. La totalité des facteurs coagulants répertoriés jusqu'à ce jour sont strictement compartimentés à l'intérieur d'organites tels les lutoïdes et les particules de FREY-WYSSLING.

De la stabilité de la membrane de ces organites dépendra l'initiation des processus conduisant à la coagulation du latex et à l'arrêt de son écoulement.

Les causes électriques, osmotiques, mécaniques et chimiques invoquées par SOUTHORN (1969) pour expliquer la déstabilisation des organites du latex et la libération des agents coagulants qu'elles compartimentent, nous apparaissent insuffisantes pour expliquer la variabilité des phénomènes observés.

2) POTENTIALITES LATICIGENES ET REGENERATION DU LATEX

L'écoulement du latex constitue une exportation massive d'un cytoplasme cellulaire dont le caoutchouc représente plus de 90 % du poids sec. Celui-ci doit être régénéré entre deux saignées successives, et les capacités de régénération du cytoplasme laticifère constituent, de ce fait, un facteur limitant primordial de la production de latex par l'Hevea.

La biosynthèse du caoutchouc, du saccharose à l'isopenténylpyrophosphate est maintenant connuepour l'essentiel.

Le fonctionnement de cet enchaînement biochimique dépend surtout, semble-t-il, de facteurs susceptibles de moduler l'activité de quelques enzymes clefs du métabolisme cytosolique. Il s'agirait essentiellement de l'invertase, du carrefour phosphoénol pyruvique et de l'étape catalysant la transformation du pyruvate en acétate. L'anabolisme isoprénique, quant à lui, nécessite, outre de l'acétyl-CoA, un apport de NADPH et d'énergie sous forme d'ATP, et un bon fonctionnement de la HMG-CoA réductase.

Des facteurs modifiant la composition et les caractéristiques physico-chimiques du cytosol, où se réalise la quasi-totalité de la synthèse isoprénique, jouent à priori un rôle majeur.

L'activité protéosynthétique et surtout l'alimentation glucidique des cellules laticifères ont également un rôle déterminant dans la régulation du métabolisme régénératif au sein des laticifères. Cependant, deux facteurs essentiels : le pH cytosolique et l'équilibre ionique, semblent jouer un rôle de premier ordre.

a) Le pH cytosolique :

Il a été mis en évidence des corrélations très hautement significatives entre la production et le pH du latex ou de son cytosol. Celles-ci s'expliquent par la sensibilité de certaines enzymes clefs du métabolisme isoprénique vis-à-vis des variations physiologiques du pH (invertase, PEPcase, GAPdh, pyruvate décarboxylase). Les mécanismes de régulation du pH au sein des laticifères revêtent donc une importance capitale. Hormis les échanges de protons au niveau du plasmalemme, on postule l'existence de deux mécanismes intralaticifères.

- un pH-Stat biochimique, tel que celui proposé par DAVIES (1973 a et b) a pu être mis en évidence au sein du latex par JACOB et al. (1977, 1979). Il correspond à l'équilibre d'un système de carboxylation-décarboxylation au niveau du carrefour phosphoénol pyruvique. Ce pH-Stat biochimique est fonctionnel dans le cytosol du latex, mais sa portée semble être limitée.
- un pH-Stat biophysique (bioosmotique) au sens de RAVEN et SMITH (1976). En effet il existe une corrélation directe, hautement significative, entre la production et le gradient transtonoplastique de pH au sein du latex. Par ailleurs, nous avons montré que le pH du cytosol varie toujours en sens inverse de celui du milieu intravacuolaire dans le latex. Ces résultats suggèrent l'existence de flux transtonoplastiques de protons. L'ATPase (d'AUZAC, 1975, 1977) et (ou) le système transporteur d'électrons NADH cytochrome c oxydoréductase (MOREAU et al., 1975) localisés sur le tonoplaste lutoïdique nous semblent, a priori, les meilleurs "candidats" en tant que pompes à protons tonoplastiques. Le tonoplaste jouerait ainsi le rôle de pH Stat biophysique (bioosmotique), et participerait activement à la régulation du pH cytosolique.

b) Equilibre ionique du cytosol, inhibition enzymatique et processus de leur détoxification :

Dans le cytosol, certains ions inhibent très efficacement des étapes importantes du métabolisme isoprénique, lorsque leur teneur dépasse un certain seuil (Mg²⁺ pour l'invertase, le citrate pour la PK et la PFK, le Ca²⁺ et le Cu²⁺ pour la PEPcase). Tous ces ions sont normalement accumulés et compartimentés au sein des lutoïdes qui auraient donc une fonction détoxifiante vis-à-vis du métabolisme. Leur fonction de réserve, supposant des flux réversibles de solutés (le citrate est un précurseur possible du caoutchouc), reste à éclaircir.

On sera amené à considérer la participation active des lutoïdes, compartiment vacuolaire du latex, dans le maintien de l'homéostasie du cytosol laticifère, et dans la régulation du métabolisme au sein de la cellule laticifère.

THE FACTORS LIMITING THE LATEX PRODUCTION

ABSTRACT

Apart from the anatomical (bark), climatic and ecophysiological factors (related to the normal water, mineral and glucidic supply of the latex tissues), two factors inherent to the laticifers, namely the duration of the latex flow and its regeneration in situ, regulate the latex production in Hevea brasiliensis.

I. THE LATEX FLOW LIMITED BY ITS COAGULATION

a) The turgor pressure of the tissues in the soft bark of the *Hevea* and particularly the pressure gradient between the cutoff ends of the laticifers and the parts most distant from the tapping cut proves to be the driving force of the latex flow.

The duration of the flow is limited by the more or less early coagulation of the latex which seals the tapped end of the latex vessels and stops its flow by forming rubber microplugs.

b) The latex contains its own system of coagulation at the latent stage. This coagulation is accounted for by the upsetting of the load equilibrium which normally secures the colloidal stability of the latex. It results from the decompartmentation of two chemically and electrically different systems. The whole coagulants which have been observed up to the present day are strictly compartmented within organites such as the lutoids and the FREY-WYSSLING particles.

The processes leading to the caogulation of the latex and to the stoppage of its flow will depend on the stability of the membrane of these organites.

The electrical, osmotic, mechanical and chemical causes put forward by SOUTHORN (1969) in order to account for the destabilization of the latex organites and for the release of the compartmented coagulants seem to be insufficient to account for the variability of the phenomena observed.

II. THE LATEX POTENTIALITIES AND REGENERATION

The latex flow is a massive extrusion of a cellular cytoplasm whose rubber represents more than 90% of the dry weight. The latter must be regenerated between two successive tapping cuts and therefore, the regenerative capacities of the laticiferous cytoplasm are a limiting factor of prime importance in the latex production by *Hevea*.

Nowadays the biosynthesis of rubber from saccharose to isopentenylpyrophosphate is well known.

The biochemical sequence seems to depend mainly on factors likely to modify the activity of a few key enzymes of the cytosolic metabolism such as the invertase, the PEP pathways and the catalytic activity which transforms pyruvate into acetate. The isoprane anabolism requires, in addition to acetyl-CoA, a supply of NADPH and of energy in the form of ATP as well as a good HMG-CoA reductase activity.

Some factors which modify the composition and the physicochemical characteristics of the cytosol where almost the whole isoprene synthesis occurs play a priori a major role.

The proteosynthetic activity and mainly the glucidic supply of the laticiferous cells also play a decisive role in the regulation of the regenerative metabolism within the laticifers. However, two main factors such as the cytosolic pH and the ionic balance seem to play a first-rate role.

a) The cytosolic pH

Some highly significant correlations have been revealed between the production and the pH of the latex or its cytosol. They can be accounted for by the sensitivity of certain key enzymes of the isoprene metabolism to the physiological variations in pH (invertase, PEPcase, GAPdh, pyruvate, decarboxylase). Therefore, the regulatory mechanisms of Ph within the laticifers are of great importance. Apart from the proton exchanges in the plasmalemma, one assumes the existence of

two intralaticiferous mechanisms.

- <u>a biochemical pH-Stat</u> as suggested by DAVIES (1973 a and b) could be revealed within the latex by JACOB et al. (1977, 1979). It corresponds to the equilibrium of a carboxylation-decarboxylation system in PEP-pathways. This biochemical pH-Stat is functional in the cytosol of the latex, but its action seems to be limited.

- <u>a biophysical pH-Stat</u> (bioosmotic) as described by RAVEN and SMITH (1976). There is a direct and highly significant correlation between the production and pH transtonoplastic gradient in the latex. Moreover, we showed that the cytosolic ph always varies against that of the intravacuolar medium in the latex, which suggests the existence of transtonoplastic proton fluxes. ATPase (d'AUZAC, 1975, 1977) and (or) the NADH cytochrome <u>c</u> oxidoreductase electron transport system (MOREAU et al., 1975) located on the lutoidic tonoplast seem to us to be <u>a priori</u> the most likely to function as tonoplastic proton pumps. Thus, the tonoplast would play the role of biophysical pH Stat (bioosmotic) and it would contribute actively to the regulation of the cytosolic pH.

b)The ionic balance of the cytosol, the enzyme inhibition and their detoxification process

In the cytosol, some ions inhibit very effectively some significant phases of the isoprene metabolism when their content exceeds a determined threshold $(Mg^{2+}$ for invertase, citrate for PK and PFK, Ca^{2+} and Cu^{2+} for PEPcase). All these ions are generally accumulated and compartmented within the lutoids which, therefore, would play a detoxifying role towards the metabolism. Their storage function involving reversible fluxes of solutes (citrate is a possible precursor of rubber) remains to be defined.

One will be induced to consider the active role played by the lutoids, the vacuolar compartment of the latex, in the maintenance of homeostasis in the laticiferous cytosol and in the regulation of metabolism within the laticiferous cell.

LA STIMULATION DE LA PRODUCTION EN HEVEACULTURE

Dès le début du siècle, des traitements visant à stimuler la production de l'Hevea ont été recherchés par les planteurs. On se réfèrera, pour un historique complet, aux bibliographies de BAPTISTE et DE JONGE 1955), d'ABRAHAM et TAYLER (1967) et d'ABRAHAM et al. (1968 a et b), résumées par COUPÉ (1977) et JACOB *et al.* (1983).

Ainsi, des injections d'oligoéléments (CuSO4, borate,...), au niveau de l'écorce de saignée (COMPAGNON et TIXIER, 1950), ou des enductions du panneau de saignée par des auxinominétiques (2,4-D ; 2,4,5-T ; ANA,...) (CHAPMAN, 1951)sont utilisées depuis longtemps pour améliorer la production de latex par l'hévéa.Des réponses très spectaculaires ont été également obtenues par des traitements stimulants gazeux, au moyen d'oxyde d'éthylène (TAYSUM, 1961-a), d'éthylène ou d'acétylène (BANCHI, 1968 ; BANCHI et POLLINIERE, 1969 ; ABRAHAM *et al.* 1968). Cependant, certaines de ces substances conduisaient à des chutes spectaculaires des teneurs en matière sèche du latex, et souvent à l'apparition "d'encoches sèches".

Ces produits sont maintenant remplacés par l'acide 2-chloro éthylphosphonique (CEP,Ethephon, Ethrel), générateur d'éthylène, appliqué généralement par enduction d'une émulsion d'Ethrel (50 mg matière active/ arbre) dans un support visqueux telle que l'huile de palme, sur une bande d'écorce grattée en-dessous et le long de l'encoche de saignée (ABRAHAM et al. 1968 ; d'AUZAC et RIBAILLIER, 1969).

Il est apparu rapidement que l'action de tous les produits stimulants, qui semblent avoir en commun la capacité de produire de l'éthylène *in situ* (COUPÉ, 1977), aboutissait à une augmentation de la durée de l'écoulement du latex, et favorisait sa régénération au sein des laticifères. Il en résulte une très forte augmentation du volume de latex produit.

A) EFFETS DE LA STIMULATION SUR L'ECOULEMENT DU LATEX

La stimulation de l'Hevea se traduit, dans tous les cas, par une prolongation considérable de la durée de l'écoulement du latex (CHAP-MAN, 1951 ; DE JONGE, 1953 ; SCHWEIZER, 1953 ; HO et PAARDEKOOPER, 1965). La durée de l'écoulement est ainsi souvent multipliée par deux, ou plus.

La vitesse d'écoulement du latex lors de la phase initiale ne semble pas augmentée par la stimulation. Elle peut, par contre, légèrement diminuer dans certains cas (PAARDEKOOPER et SANIT-SAMORSON, 1969).

L'effet sur l'écoulement s'observe dès la première saignée après le traitement stimulant, et peut durer plus d'un mois. Par contre, les mécanismes intimes de cette action sur l'écoulement restent encore mal expliqués.

1) Stimulation et rhéologie du latex :

- La stimulation n'augmente pas la pression de turgescence des laticifères (BUTTERY et BOATMAN, 1967), et ne fait que très peu varier l'osmolarité du latex (une diminution inférieure à 10 % a parfois été observée) (BOATMAN, 1966 ; RIBAILLIER, 1970).

- Par ailleurs, BOATMAN (1966) écarte successivement une action des stimulants sur la contraction du tronc après la saignée, sur une variation du "collapse" des vaisseaux laticifères, sur une chute marquée de la viscosité, malgré une baisse sensible de la teneur en matière sèche du latex, confirmée par ailleurs (BRZOZOWSKA-HANOWER *et al.*, 1979).

ABRAHAMet TAYLER (1967) considèrent que l'effet stimulant est attribuable à une dilution du latex, à une augmentation de la vitesse de son écoulement et surtout à un retard dans l'obstruction des vaisseaux laticifères. Ce dernier facteur semble raisonnablement, aujourd'hui, être considéré comme l'un des points d'impact de l'action hormonale, de par son action sur la durée de l'écoulement.

2) Stimulation et stabilité des lutoïdes :

RIBAILLIER (1972) montre que, pour les dix premières saignées après la stimulation, l'indice d'éclatement des lutoïdes d'arbres stimulés est inférieur de 45 % à celui des témoins non traités, et que, corrélativement, l'indice d'obstruction après la stimulation chute de 31 %. Diverses considérations conduisent également à penser que la stimulation modifie les caractéristiques, en particulier la perméabilité, de la membrane lutoïdique (COUPÉ et LAMBERT, 1977 ; HANOWER *et al.* 1977) et améliore leur stabilité (RIBAILLIER, 1972, COUPÉ, 1977).

RIBAILLIER (1972) montre en outre que les lutoïdes d'arbres stimulés sont moins denses que ceux provenant d'hévéas témoins, et que

leur profil de sédimentation sur gradient de densité en est affecté. Enfin, cet auteur observe que les lutoïdes d'arbres stimulés ont une résistance accrue au choc osmotique. COUPÉ (1977) montre que la stimulation n'affecte d'une manière significative, ni la pression osmotique du cytosol, ni celle du sérum intralutoïdique. Le mécanisme de protection osmotique des lutoïdes ne peut donc être expliqué par l'action de phénomènes de ce type. Enfin, l'analyse biochimique de la membrane lutoïdique (composition lipidique) n'a pas permis de comprendre la raison de l'apparente variation des propriétés de la membrane lutoïdique, sous l'effet de la stimulation (HANOWER et al. ; résultats non publiés).

Notons cependant que PAKIANATHAN *et al.* (1966) ont observé que, dans certains cas, les laticifères d'arbres stimulés contiennent un nombre plus élevé de lutoïdes endommagés, provoquant parfois la formation de microcoagulats internes. Ainsi que nous le préciserons plus loin, ces observations, en apparente contradiction avec celles décrites par ailleurs, pourraient correspondre à un cas limite d'apparition d'encoche sèche dans certaines circonstances.

B) EFFETS DE LA STIMULATION SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET PHYSIO-LOGIQUES DU LATEX

Il convient de distinguer deux types de phénomènes. Les phénomènes précoces, induits par l'agent stimulant lui-même, sont détectables dès la première saignée, ou même lorsque cela est possible, dans l'intervalle de temps séparant l'application du stimulant et la première saignée. Les modifications de la composition du latex lors des saignées suivantes sont la résultante des effets directement attribuables au stimulant, additionnés des effets induits par les phénomènes de renouvellements cellulaires particulièrement intenses, engendrés par l'exportation anormalement forte du cytoplasme cellulaire (augmentation de l'écoulement) dès la première saignée après la stimulation. Ces derniers effets ne sont donc pas forcément directement attribuables aux produits stimulants.

1) Effets sur les paramètres physiologiques du latex :

a) Effets sur la composition organominérale du latex :

L'existence dans le latex de deux compartiments quantitativement importants et de composition différente (cytosol et lutoïdes) conduit à considérer avec réserve les analyses ne tenant pas compte de cette compartimentation, qui en l'occurrence peut êtrc largement affectée par les traitements stimulants.

Le potassium, considéré comme constant dans le latex (BEAUFILS, 1961) ne semble pas affecté par la stimulation. Par contre, les traitements stimulants induisent la variation de la concentration de nombreuses molécules et ions au sein du latex.

On constate une augmentation des teneurs en cuivre (COM-PAGNON et TIXIER, 1950 ; de JONGE, 1955 ; LOWE, 1964 ; d'AUZAC, 1965-a ; RIBAILLIER, 1972 ; COUPÉ, 1977), en phosphore acidosoluble (d'AUZAC, 1965) et en particulier en phosphore minéral intralutoïdique (RIBAILLIER, 1972 ; COUPÉ, 1977). Par contre, la stimulation entraîne le plus souvent une diminution des teneurs en Mg⁺⁺ total dans le latex, associée cependant à un changement dans sa compartimentation se traduisant par une plus forte accumulation du Mg⁺⁺ à l'intérieur des lutoïdes (RIBAILLIER, 1972 ; COUPÉ, 1977).

Une augmentation transitoire du citrate parallèle à une augmentation du Mg peut être observée durant les 24 premières heures suivant l'application de l'Ethrel (PRIMOT *et al.* 1979). D'AUZAC (1965) et HANOWER *et al.* (non publié) signalent une augmentation de la teneur en acides aminés, tandis que CRETIN (1979-a) montre une augmentation en 2 vagues des composés phénoliques du latex sous l'influence de la stimulation.

Les différents traitements stimulants augmentent les teneurs en glucides (d'AUZAC et PUJARNISCLE, 1961), lesquels sont essentiellement représentés (90 %) par le saccharose (TUPY, 1969, 1973 ; RIBAILLIER, 1972). Cependant, TUPY (1973) constate qu'à long terme la stimulation hormonale de la production et la surexploitation diminue la teneur en saccharose du latex, ce qui peut être considéré comme l'indice d'un certain "épuisement" de l'arbre.

Enfin, la stimulation induit une augmentation des teneurs en RNA dans le latex (COUPÉ et d'AUZAC, 1974) et surtout une forte augmentation précoce de l'indice de polymérisation des ribosomes (COUPÉ, 1977).

b) Effets sur le pH du latex :

TUPY (1973 a et b) et RIBAILLIER (1972) mettent en évidence une augmentation notable du pH du latex sous l'influence de divers traitements stimulants (fig. 4). Par la suite, le pH du cytosol, celui du sérum intralutoïdique et le gradient de pH entre ces deux compartiments ont été considérés. C'est ainsi qu'il est montré que la stimulation à l' éthrel induit une acidification vacuolaire concomitante à l'alcalinisation du cytosol (COUPÉ, 1977 ; CRETIN, 1979-a). En fait, le pH cytosolique et le gradient transtonoplastique de pH sont les plus affectés. Dès lors, des corrélations directes entre pH cytosolique ou le gradient transtonoplastique de protons sont établies avec la production (COUPÉ, 1977 ; CRETIN, 1979-a ; PRIMOT et al.1978 ; BRZOZOWSKA -HANOWER *et al.*,1979).

Les variations en sens inverse des pH compartimentaux suggèrent alors une activation de flux transtonoplastiques de protons sous l'effet des stimulants hormonaux (COUPÉ, 1977 ; CRETIN, 1979-a).

c) Action sur des activités enzymatiques et le métabolisme du latex :

C'est d'AUZAC (1965-a) qui, le premier, démontre des changements importants intervenant dans le métabolisme du latex, après stimulation. Il constate l'augmentation de la biosynthèse du caoutchouc in vitro, de la synthèse de l'ATP, du catabolisme glucidique et de la carboxylation du PEP.

Par ailleurs, la décarboxylation de l'acide glutamique est augmentée sous l'effet de traitements stimulants (LUSTINEC et al., 1967).

On a vu précédemment que certaines enzymes du latex sont finement régulées par le pH. Il semble démontré aujourd'hui que l'alcalinisation du cytosol (quelques dixièmes d'unité pH) induite par les traitements stimulants, se traduit par une exaltation du catabolisme glucidique (activation de l'invertase,...) et une certaine dérive de celui-ci vers la synthèse d'acides organiques forts. On est en droit de penser que globalement la régénération du latex est ainsi favorisée.

Selon TUPY et PRIMOT (1982) l'exaltation du catabolisme glucidique n'est pas le seul fait de l'activation de l'invertase induite par l'alcalinisation du cytosol. Ces auteurs ont montré que la stimulation inhibe la saccharose synthétase du latex, qui normalement s'oppose à l'action de l'invertase en resynthétisant le saccharose à partir de fructose + UDP-glucose. Cette inhibition des réactions concurrentes vis-à-vis du catabolisme des



Figure 4 : CHRONOLOGIE DES EFFETS DE LA STIMULATION A L'ETHREL SUR L'AUGMENTATION DE LA PRODUCTION ET L'ALCALINISATION DU LATEX (d'après COUPE, 1977).

hexoses amplifie donc de phénomène d'activation directe de l'invertase, lors de la stimulation.

Dans le domaine de l'activation du métabolisme, COUPÉ (1977) a montré que la stimulation engendrait une forte augmentation des teneurs en polysomes dans le latex. Cet effet, très précoce, est perceptible dans les 12 premières heures après le traitement stimulant et les teneurs en polysomes peuvent être multipliées par 5 à 6 entre le premier et le 4ème jour suivant la stimulation. Ces observations suggèrent qu'une activation de la protéosynthèse est induite *in situ*, lors des traitements stimulants.

Signalons enfin la diminution des activités ortho-diphénol oxydases, que l'on sait en partie impliquées dans les processus de coagulation, sous l'effet des traitements à l'Ethrel (HANOWER et al. 1976; CRETIN, 1979-a).

2) Chronologie des effets et réponses précoces, induites par la stimulation :

Afin de préciser les premiers sites d'action de l'éthylène, et de discriminer les causes primaires des effets secondaires, certains auteurs ont tenté de discerner le plus précocement possible les premiers effets de la stimulation, sur la composition biochimique du latex, lors de la première saignée. La méthode consiste alors à décaler dans le temps les traitements stimulants de groupes d'arbres homogènes, ceux-ci étant alors tous saignés le même jour.

Les expériences de ce type ont été initiées par COUPÉ (1977) et PRIMOT et $a\ell$.(1979). Nous en rapportons les faits les plus marquants :

- Selon les expériences, la production augmente immédiatement (12 heures après le traitement) ou un peu plus tard. L'effet est maximum entre 48 et 96 heures après le traitement, puis la production diminue plus ou moins progressivement. Ceci traduit bien le caractère transitoire de la stimulation (figure 4).

- La <u>teneur en matière sèche</u> du latex subit une baisse progressive décelable dès la première saignée. Il y a donc sous l'effet direct du stimulant, une entrée d'eau dans les laticifères et dilution du latex. Cet effet est décelable dans les 24 premières heures suivant le traitement.

- Les <u>teneurs en citrate et magnésium cytosolique</u>s montrent des réponses parallèles en deux temps : une augmentation très nette, maximum 24 heures après le traitement, suivie d'une chute progressive aboutissant au niveau de départ entre 5 et 6 jours après le traitement. Cette brusque

augmentation du citrate cytosolique peut s'expliquer soit par une modification du métabolisme, soit (ou simultanément à) par une modification des propriétés de perméabilité des membranes lutoïdiques (efflux de citrate?).

- Les <u>teneurs en saccharose</u> du latex augmentent significativement (30 %) dès 24 heures et pendant deux saignées après la stimulation, traduisant probablement un influx de saccharose au sein des laticifères. On constate très souvent par la suite une très forte chute des teneurs en saccharose au sein du latex. Cette deuxième phase proviendrait, selon TUPY (1969, 1973), d'une utilisation accélérée de ce substrat par les laticifères, accompagnée d'une baisse des réserves glucidiques immédiatement utilisables.

- L'indice de polymérisation des ribosomes (polysomes) est fortement augmenté (de 5 à 6 fois) après un traitement stimulant. L'effet est déjà largement perceptible dès 12 heures après la stimulation (+ 200 à 300 %), suggérant une activation de la protéosynthèse sous l'effet de la stimulation. Celle-ci précède légèrement, puis suit fidèlement l'évolution de la production.

- Le pH du latex (mesuré sur champ) augmente dans les 24 heures suivant la stimulation et atteint un maximum entre 2,5 et 5 jours après le traitement stimulant, selon les expériences (figure 4).

Il a été également montré que le pH des deux compartiments majeurs du latex s'alcalinisait simultanément dans un premier temps entre les 12 et 36 premières suivant le traitement, puis évoluait en sens inverse par la suite (COUPÉ, 1977 ; CRETIN, 1979-a ; BRZOZOWSKA-HANOWER et al.1979).

C) CONCLUSION et PERSPECTIVES

Tous les auteurs s'accordent pour suggérer que les traitements stimulants augmentent la production par la conjonction des processus suivants :

- Stabilisation de la membrane lutoïdique aboutissant à une meilleure compartimentation des effecteurs négatifs des enzymes cytosoliques, et surtout à une diminution de la vitesse de coagulation et de l'obstruction ;

- Modification des perméabilités membranaires favorisant d'une part les échanges d'eau, de sucre et de divers solutés au niveau du plasmalemme (alimentation) et les échanges contrôlés par le tonoplaste lutoïdique;

- Alcalinisation du cytosol exaltant l'activité d'enzymes clefs, impliquées dans la régénération du latex ;

- Activation de la protéosynthèse intralaticifère.

Les effets les plus précoces décelés jusqu'à ce jour correspondent à l'alcalinisation du cytosol et à l'activation de la protéosynthèse détectables dans les l2 premières heures consécutives au traitement stimulant. Cependant, le mécanisme d'induction de ces processus précoces demeure quelque peu mystérieux.

Dans l'exposé de nos résultats, nous préciserons la chronologie de quelques évènements biochimiques induits précocement, au niveau du latex, par la stimulation des hévéas à l'Ethrel.

D) LIMITES ET DANGERS DE LA STIMULATION

La stimulation constitue donc un moyen de choix pour réduire les facteurs limitant l'écoulement et/ou certains facteurs limitant la régénération du latex.

Les clones ou les arbres présentant une propension élevée à la coagulation précoce sur l'encoche, caractérisés donc par un fort indice d'obstruction, des lutoïdes instables, des teneurs en matière sèche et de Mg⁺⁺ trop élevées dans le latex sont particulièrement justiciables de la stimulation hormonale. De même, la stimulation sera efficace sur des arbres dont le latex est acide et riche en saccharose (catabolisme glucidique limitant).

Employé à mauvais escient, l'effet bénéfique de la stimulation hormonale sur la production s'estompe avec des traitements répétés, surtout lorsqu'ils sont effectués trop fréquemment et avec de trop fortes doses de matière active. A la longue, ils peuvent entraîner des perturbations profondes du système laticifère conduisant au "tarissement" de l'écorce exploitée, phénomène appelé "encoche sèche" (CRETIN, 1979-a ; BRZOZOWSKA-HANOWER et al. 1979).

Nous développons cet aspect dans le chapitre suivant.

LA STIMULATION HORMONALE DE LA PRODUCTION DE LATEX

RESUME

Des injections d'oligoéléments (Cu⁺⁺, Borate,...) au niveau de l'écorce de saignée, ou des enductions par des auxinomimétiques du panneau de saignée (2,4-D,ANA,...) sont depuis longtemps utilisées pour améliorer la production de latex de l'Hévéa. Ces produits sont maintenant remplacés par l'acide 2-chloroéthyl-phosphonique (CEP, Ethrel, Ethephon). Il est apparu rapidement que l'action de tous ces stimulants (qui semblent avoir en commun la propriété de produire de l'éthylène *in situ*) correspond en premier lieu à une augmentation de la durée de l'écoulement du latex, mais aussi à une activation du métabolisme et, partant, de la régénération du latex au sein des laticifères.

1) Effets bénéfiques de la stimulation sur l'écoulement du latex:

Les effets bénéfiques des traitements stimulants ne semblent pas liés à une action majeure sur la vitesse d'écoulement du latex, ni le diamètre moyen et le "collapse" des laticifères. Le seul paramètre affecté à ce niveau est la teneur en matière sèche du latex (diminution) qui devrait correspondre théoriquement à une diminution de la viscosité, et donc à un écoulement facilité. Ce dernier paramètre se traduit, entre autre, par une augmentation de l'"aire drainée" (PAKIANATHAN *et al.* 1966) c'est-à-dire de la surface d'écorce expulsant son latex.

En fait, le prolongement remarquable de la durée de l'écoulement semble résulter d'une amélioration de la stabilité de la membrane lutoïdique, retardant les processus conduisant à la coagulation du latex et à l'obturation des laticifères, sans que les mécanismes en cause soient encore compris.

2) La stimulation hormonale engendre des modifications profondes de la composition organominérale, biochimique, et de la distribution de certains solutés entre compartiments cytosolique et vacuolaire du latex. Il en résulterait <u>une activation du métabolisme</u>, et en particulier de la glycolyse au sein des laticifères.

Les premiers effets enregistrés correspondent à :

- une activation générale (?) de la protéosynthèse (augmentation des teneurs en polysomes du latex,...)
- une modification des propriétés et de la perméabilité des membranes péri et intracellulaires : influx d'eau, d'ions et de saccharose au travers du plasmalemme, flux transtonoplastique de divers solutés (citrate, Mg⁺⁺, H⁺,...)
- une alcalinisation du cytosol concomittante à une acidification vacuolaire, aboutissant à une augmentation du gradient de protons transtonoplastiques.

Ces phénomènes semblent se dérouler, selon une chronologie fine encore mal connue, dans les premières 12 à 30 heures consécutives aux traitements stimulants.

3) La stimulation hormonale constitue donc un outil de choix pour lever certains facteurs limitant l'écoulement et (ou) la régénération du latex, déterminant donc la productivité de l'Hévéa.

Cependant, l'utilisation abusive, ou à mauvais escient, des techniques de stimulation peut entraîner à terme, une disfonction grave des laticifères. Il peut en résulter l'apparition d'"encoches sèches".

ABSTRACT

Some injections of trace elements (Cu⁺⁺, borate...) into the tapped bark or some auxinomimetic coatings (2,4- D, ANA...) have been used since a long time in order to imprive the latex production of the hevea. Nowadays, these products are replaced by 2 -chloroethyl- phosphonic acid (CEP, Ethrel, Ethephon). It soon became obvious that all these stimulants (which seem to have the common characteristic of producing ethylene in situ) lead first to an increase in the duration of the latex flow and also to an activation of the metabolism and therefore, of the latex regeneration within the laticifers.

I. THE FAVOURABLE EFFECTS OF STIMULATION ON THE LATEX FLOW

The favourable effects of the stimulating treatments do not seem to be related to a great effect on tapping flow rate of latex, nor on the mean diameter and the collapsing effect of laticiferous tubes. The only parameter likely to be affected is the percentage of dry matter in the latex (decrease) which should theoretically correspond to a decrease in viscosity and therefore, to an easier flow. The latter results, among other things, in an increase of the "drained area" (PAKIANATHAN et al., 1966), namely the bark area extruding its latex.

The considerable extension of the flow duration seems to result from an improvement in the stability of the lutoidic membrane, thus retarding the latex coagulation and the sealing of the laticifers without having reached a good understanding of the mechanisms involved.

II. The hormonal stimulation brings about some significant modifications in the organomineral and biochemical composition and in the distribution of certain solutes between the cytosolic and vacuolar compartments of the latex, thus giving rise to <u>an activation of the metabolism</u> and particularly of the glycolysis within the laticifers. The first effects observed correspond to :

- a general activation of proteosynthesis (increase in the polysome contents of the latex...)
- a modification in the properties and the permeability of the peri and intracellular membranes : inflow of water, ions and saccharose through the plasmalemma, transtonoplastic flux of various solutes (citrate, Mg⁺⁺, H⁺...)
- an alkalinization of the cytosol accompanied by a vacuolar acidification resulting in an increase of the transtonoplastic proton gradient.

These phenomena seem to occur according to a badly known chronology in the first 12 or 30 hours following the stimulating treatments.

III. Therefore, the hormonal stimulation is a choice method for removing certain factors limiting the latex flow and (or) the regeneration, thus determining the productivity of the hevea.

However, using improperly the stimulation techniques can lead to a severe dysfunction of the laticifers, thus giving rise to "brown bast".

L'ENCOCHE SÈCHE :

MALADIE PHYSIOLOGIQUE DE L'ECORCE D'HEVEA ?

Il arrive, au sein des exploitations hévéicoles, que certains arbres cessent de produire : certaines portions ou même la totalité de l'encoche, deviennent "sèches" (RANDS, 1921). Le taux d'arbres atteints de ce syndrome varie selon les exploitations et peut dépasser 30 %.

En outre, les anomalies de l'écorce qui en découlent, empêchent toute saignée normale : l'arbre atteint est donc mis au repos (non saigné) et devient, de ce fait, improductif.

Ainsi, bien que cette "maladie" ne conduise pas à la mort des hévéas, elle réduit notablement la productivité des plantations qui en sont atteintes, et peut avoir des répercussions économiques graves.

Nous nous limiterons, dans ce chapitre, à un survol rapide des caractéristiques et des principaux mécanismes proposés pour expliquer l'apparition des encoches sèches. Pour un approfondissement, on se réfèrera aux bibliographies de RANDS (1921), FREY-WISSLING (1932), SCHWEIZER (1949, 1953), BEALING et CHUA (1972) et plus récemment de DE FAY (1981), PAKIANATHAN et al. (1982) et YEANG et PARANJOTHY (1982).

A) SYMPTOMES ET CARACTERISTIQUES DE L'ENCOCHE SECHE

Ŧ

1) Symptômes macroscopiques et anatomiques :

Le tarissement des tissus laticifères est le premier symptôme évident de la maladie des encoches sèches. Ainsi, un arbre est présumé malade lorsqu'on a des difficultés à en extraire le latex, par saignée, à la profondeur habituelle (SANDERSON et SUTTCLIFFE, 1921). Ce syndrome est aussi connu sous l'appellation anglo-saxonne de "Brown-Bast". Un autre symptôme correspond en effet au brunissement des tissus de l'écorce (RANDS, 1921 ; PARANJOTHY *et al.* 1975).

On y associe également des craquelures et desquamations (PETCH, 1921, SANDERSON et SUTTCLIFFE, 1921 ; SHARPLES, 1936) ainsi que certaines déformations de l'écorce (BOBILIOFF, 1919, PETCH, 1921 ; RANDS, 1921). Lors de ces deux dernicrs stades qui correspondent à des phases avancées de la maladie, il n'est plus possible de saigner les arbres atteints.

2) Symptômes microscopiques et cytologiques :

Etudiant cet aspect, de FAY (1981) a démontré un certain nombre d'anomalies caractérisant l'écorce des arbres atteints d'encoche sèche. Celles-ci peuvent s'observer indépendamment ou être associées selon les échantillons. Cet auteur met ainsi en évidence, sans en préjuger, la chronologie de leur apparition :

- une accumulation de <u>gommes lignifiées</u> dans tous les tissus de l'écorce (dont les tubes criblés, certains laticifères,...);

- une sclérification notable des tissus ;

- une formation de <u>tissus hyperplasiques</u> constitués au sein du liber par des éléments parenchymateux à croissance anarchique ;

- une apparition d'<u>assises génératrices anormales</u>, de forme circulaire ou ellipsoïdale, au sein des tissus corticaux. Elles englobent des portions d'écorce nécrosée contenant des laticifères au contenu coagulé et une surabondance de cellules à tannin. A terme, ces formations peuvent se sclérifier et ainsi donner naissance à des <u>nodules scléreux</u>;

- la <u>formation de thyllosoïdes</u> correspondant à l'évagination des cellules parenchymateuses se développant et colonisant l'intérieur des laticifères ;

- la <u>coagulation du latex in situ</u>, dans les laticifères de tous les manteaux (à l'exception des formations les plus récentes, situées à proximité du cambium) ;

- on observe enfin un épaississement de l'écorce, au niveau des zones sèches, surtout aux stades avancés de la maladie.

Par ailleurs, les observations histochimiques et cytobiochimiques (de FAŸ, 1981) n'ont pas permis de mettre en évidence un réel épuisement des ressources amylacées (légère dépression). Enfin les activités enzymatiques (respiratoires, phosphohydrolasiques,...) des écorces sèches ne diffèrent pas significativement de celles des écorces saines.

Si toutes ces caractéristiques histo-cytologiques ne peuvent être observées simultanément au niveau des écorces malades de diverses origines, il existe cependant une certaine unité dans le syndrome d'encoche sèche : la présence des thyllosoïdes et de latex coagulé est constante dans toutes les écorces malades, quel que soit le stade de gravité de la maladie.



<u>Photo A</u> : ASPECT DES TROIS PHASES MAJEURES DU LATEX D'HEVEAS SAINS OU ATTEINTS D'ENCOCHE SECHE, APRES CENTRIFUGATION (55.000 g ; 45 min.) Le latex provient d'hévéas du clône PR 107, exploités en plantation régulière (S J/3 J/4; trois stimulations annuelles), sains (S) ou atteints d'encoche sèche (ES) sur 30 % (30) ou 60 % (60) de la longueur de leur encoche d'exploitation. Les latex des 3 tubes de gauche ont été colorés au rouge neutre.



<u>Photo B</u> : ASPECT DES TROIS PHASES DE CENTRIFUGATION DU LATEX D'HEVEAS SAINS, OU ATTEINTS D'ENCOCHE SECHE SUITE A LEUR SUREXPLOITATION.

Le latex centrifugé (55.QOO g; 45 min.) provient d'hévéas des clônes PR 107 ou GT1 surexploités (Spirale entière; J/2 J/2 J/2 J/1) stimulés 8 fois par an (Sti) ou non, sains (S) ou atteints d'encoche sèche partielle (induction d'ES par surexploitation).



. . .

Centrifugation en gradient discontinu de saccharose (0,8-2,0 M) (50.000 g), de latex d'hévéas sains ou atteints [«]d'encôche sèche".

B) SYMPTOMES BIOCHIMIQUES AU NIVEAU DU LATEX

a) Modification de la composition organominérale du latex : Les analyses effectuées sur des latex présentant des stades de gravité diverses de la maladie, montrent une très forte diminution des teneurs en Mg⁺⁺ total (CRETIN, 1979-a ;ESCHBACH et al. 1984) et en phosphore minéral(ESCHBACH et al. 1984) dans le latex des arbres atteints, significativement proportionnelle à la gravité de l'atteinte. Le pH du latex (son cytosol) (CRETIN, 1979-a ;ESCHBACH et al. 1984) et surtout le gradient transtonoplastique de protons (cytosol-lutoïdes) (CRETIN, 1979-a) diminuent également significativement, tandis que la baisse des teneurs en saccharose est à la limite de la significativité.

b) Fragilisation de la membrane lutoïdique :

La grande analogie entre les lutoïdes du latex et le lysosome du règne animal (PUJARNISCLE, 1968) amenait dès 1966, PUJARNISCLE et RIBAILLIER, à formuler l'hypothèse d'un rôle de ces particules dans le dégénérescence des laticifères et l'apparition d'encoches sèches.

Indépendamment de PARANJOTHY et al. (1975) et YEANG et PARANJOTHY (1982), notre attention a été attirée sur la détérioration de la fraction sédimentable des latex provenant d'arbres partiellement atteints d'encoche sèche (HANOWER et CRETIN, 1977 non publié ; CRETIN, 1979-a). De fait, le latex d'arbres atteints du syndrome d'encoche sèche "naturelle" ou provoquée (surstimulation, sursaignée) se caractérise par une forte diminution (voire une disparition virtuelle) de leur fraction sédimentable, proportionnelle à la gravité de l'atteinte, et un aspect anormalement granuleux et floculeux des particules sédimentées (CRETIN, 1979-a ; planche III). Par ailleurs, la densité de leurs lutoïdes diminue considérablement comme en témoignent les profils de leur répartition sur gradient de saccharose (CRETIN, 1979-a) (planche 4).

Corrélativement, la fragilité et les anomalies caractérisant ces organites se traduit par une augmentation alarmante de l'indice d'éclatement (IE) des lutoïdes dans les latex d'arbres malades. L'augmentation de l'IE est proportionnelle au stade de gravité (extension) apparente de la maladie au niveau de l'encoche (CRETIN, 1979-a ;ESCHBACH *et al.* 1984).

Il est dès lors émis l'hypothèse selon laquelle cette fragilité membranaire, déterminée in situ, se traduit par une autolyse des

organites au sein des laticifères (lutoïdes et particules de FREY-WISSLING). La libération consécutive dans le cytoplasme, des facteurs coagulants qu' elles compartimentent (SOUTHORN, 1969 ; HANOWER *et al.* 1976 ; BRZOZOWSKA-HANOWER *et al.* 1978 ; CRETIN, 1979-a) catalyse la coagulation du latex au sein même des laticifères (PARANJOTHY *et al.* 1975 ; CRETIN, 1979-a). Le fait est confirmé par les données d'histocytologie rapportées par de FAŸ (1981).

C) FACTEURS PRINCIPAUX CONNUS, INDUISANT L'APPARITION D'ENCOCHES SECHES

Le taux d'arbres secs est très variable d'une plantation à l'autre, et ceux-ci sont atteints à des degrés divers.

Le rôle des modalités d'exploitation est largement confirmé. Cependant, il existerait une certaine prédisposition à la maladie liée à des facteurs génétiques (CHUA, 1967 ; MILFORD *et al.* 1969 ; PARANJOTHY et YEANG, 1977 ; CRETIN, 1979-a), physiologiques (SHARPLES et LAMBOURNE, 1924 ; RODHES, 1930 ; CRETIN, 1979-a) phénologiques (VOLLEMA, 1949 ; COMPAGNON *et al.*, 1953 ; BEALING et CHUA, 1972 ; EVERS, 1974) et écologiques (RANDS, 1921 ; SHARPLES et LAMBOURNE, 1924 ; EVERS, 1974 ; TUPY, 1975).

Nous n'aborderons cependant ici que l'influence des modalités d'exploitation, dont le rôle semble le plus évident et le plus important. Les hévéaculteurs tendent à augmenter constamment les rendements de leurs plantations en modifiant, et souvent, <u>intensifiant</u> les systèmes d'exploitation. Ceux-ci sont classiquement définis par la fréquence de saignée, la longueur et la profondeur de l'encoche, ainsi que l'utilisation plus ou moins importante de substances stimulantes (doses et fréquence).

Intensité de saignée et "traumatisme mécanique (ou de blessure)" :

Dès le début de l'hévéaculture, où l'on saignait couramment les arbres jusqu'à une fois par jour, on s'aperçut que ce rythme induisait une apparition massive de la maladie ; lorsque le rythme des saignées fut diminué, on observa d'ailleurs une rémission significative du Brown Bast.

De fait, RANDS (1921) réussit à induire expérimentalement une sècheresse rapide des arbres, en effectuant des saignées sur-intensives (jusqu'à 6 par jour!). BEALING et CHUA (1972) montrent une corrélation positive entre l'intensité de la saignée, le taux des arbres atteints d'encoche sèche typique, et l'importance des zones non productrices sur l'encoche. Ces auteurs confirment que dans une certaine mesure, la longueur de l'encoche favorise l'apparition de la maladie (RANDS, 1921). VAN DE SYPE (1981) obtient des résultats analogues. Rappelons enfin que selon ASPHLANT (1926), la profondeur de l'encoche favorise également l'apparition du syndrome.

Notons par ailleurs que de FAY (1981) a réussi à induire l'apparition d'encoche sèche par compression mécanique de l'écorce (carcan).

En un mot, <u>l'intensité de la blessure</u> provoquée par des sursaignées induirait par suite d'un traumatisme mécanique trop intense, l'apparition d'encoches sèches.

Intensité de stimulation et traumatisme chimique ou hormonal :

Nous avons mis en évidence une corrélation positive entre l'intensité des traitements stimulants à l'Ethrel (fréquences et doses) et le nombre d'arbres (sains au départ) où le syndrome d'encoche sèche apparaît, ainsi que l'importance de zones non productrices sur l'encoche, après 16 mois de traitement (CRETIN, 1979-a ; BRZOZOWSKA-HANOWER et al. 1979).

VAN DE SYPE (1981) confirme ce résultat. Il note cependant que l'induction d'encoche sèche par les surstimulations semble moins efficace (moins rapide) que par la surintensité de saignée.

Enfin PAKIANATHAN *et al*. (1982) montrent qu'à long terme la stimulation des arbres à l'éthrel (2 fois par mois) se traduit par une baisse de rendement, associée, entre autre, à une instabilité des organites du latex et l'apparition de bouchons de latex coagulé au sein des laticifères.

Il apparaît donc évident que tous les traitements inducteurs d'encoche sèche (traumatisme mécanique ou traumatisme hormonal) induisent une fragilisation des organites membranaires au sein du latex. Dans tous les cas, cette déstabilisation membranaire se traduit par une augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes et l'apparition d'amas de caoutchouc coagulé au sein des laticifères de l'écorce exploitée.

D) THEORIES DIVERSES PROPOSEES POUR EXPLIQUER L'APPARITION D'ENCOCHES SECHES

Les théories essayant d'expliquer l'origine de la maladie sont nombreuses, <u>si tant est qu'il y ait une cause unique de sa manifestation</u>. Les théories proposées peuvent être scindées en deux groupes, suivant la nature des causes invoquées : causes d'ordre parasitaire, ou d'ordre physiologique. On se limitera ici à en citer les grandes lignes.

1 - Théorie parasitaire :

La localisation souvent en file (sur une ligne) ou en groupes des arbres atteints d'encoche sèche (de FAY, communication personnelle ; VAN DE SYPE, 1981) suggère la possibilité d'une transmission du syndrome par un vecteur parasitaire. Toutefois, les efforts ininterrompus déployés depuis les années vingt (RANDS, 1921 ; KEUCHENIUS, 1924 ...) jusqu'à nos jours (de FAY, 1981, et communication personnelle) n'ont pas permis de mettre en évidence l'existence d'un microorganisme (champignons, bactéries, mycoplasme, virus,...) responsable du syndrome. Enfin les symptômes n'ont jamais pu être volontairement transmis par greffage de fragments d'écorce sèche (à des degrés divers) sur les arbres sains.

2 - Théories "physiologiques" :

a - Insuffisance des ressources organominérales

- SCHWEIZER (1949, 1953) attribue l'apparition de la maladie à un <u>déficit en ressources organiques</u> et l'établissement d'une compétition trophique entre croissance et production ;

- TUPY (1973, 1975) attribue la maladie à une alimentation insuffisante en <u>saccharose des laticifères</u>, surtout lors des périodes de faible ensoleillement correspondant à une photosynthèse réduite. Cet effet n'est sans doute pas négligeable, et l'hypothèse semble confortée par le fait que les encoches sèches sont plus fréquentes en bas de panneau (effet frein du panneau de l'écorce en voie de régénération sur l'alimentation des laticifères).

L'induction de symptômes d'encoche sèche par compression de l'écorce au moyen d'un carcan métallique (de FAY, 1981) peut également s'expliquer par l'hypothèse de TUPY.

b - Déséquilibre de la balance minérale

Elle a été proposée par COMPAGNON *et al.* (1953). Ces auteurs ont en effet démontré que des fumures enrichies en potassium ainsi que des injections de sulfate de cuivre peuvent réduire le taux des accidents physiologiques de l'écoulement. Cependant, PUSHPADAS *et al.* (1975) constatent que si des fumures trop riches en potassium peuvent induire des surproductions chez les jeunes arbres, elles sont susceptibles d'aboutir, à terme, à la sècheresse des arbres.

Enfin, des actions diverses du calcium ou du rapport Ca⁺⁺/K dans l'écorce ou au sein des laticifères ont également été envisagées (EVERS,1974 ; PUSHPADAS *et al*, 1975).

c - Modification de la perméabilité des laticifères

C'est l'hypothèse de SCHWEIZER (1949), reprise par BEALING et CHUA (1972). Ces auteurs attribuent l'apparition des encoches sèches à la diminution de la perméabilité du plasmalemme des laticifères, entraînant une baisse des concentrations en divers composés minéraux et organiques dans le latex, alors que, généralement, elles augmentent dans les autres tissus de l'écorce.

d - Déséquilibre hormonal et dégradation des biomembranes au sein des laticifères

Nous formulons (CRETIN, 1979-a) l'hypothèse qu'un déséquilibre hormonal surviendrait au sein des laticifères (et autres tissus de l'écorce) consécutivement à des stress mécaniques (saignées, compression) ou chimiques (stimulations) trop intenses. Ce déséquilibre hormonal (éthylène) engendrerait à terme un déséquilibre rédox dans le latex, lequel serait préjudiciable à la stabilité des systèmes membranaires, et en particulier des lutoïdes, au sein des laticifères.

En effet, que les arbres aient subi ou non un traumatisme volontaire, mécanique (sursaignée,...) ou chimique (surstimulation), le latex provenant des hévéas atteints d'encoche sèche se caractérise par une instabilité anormale de leurs lutoïdes, laquelle est proportionnelle à la gravité de l'atteinte. Nous n'excluons pas que les autres systèmes membranaires (plasmalemme, membrane nucléaire, particules de FREY-WISSLING, mitochondries...) soient également lésés.

On peut admettre en ce qui concerne les lutoïdes, que l'instabilité de leur membrane aboutit à lyse de ces organites *in situ*, et en conséquence, à la coagulation du latex au sein des laticifères (CRETIN, 1979-a ; de FAŸ, 1981 ; PAKIANATHAN et al. 1982,...). Cette hypothèse expliquerait, entre autre, le déclenchement brutal et souvent irréversible des phénomènes de tarissement de l'écorce.

Il apparaît dès lors primordial de rechercher quels peuvent être les éventuels mécanismes chimiques et biochimiques responsables de la déstabilisation des systèmes membranaires, au sein de la cellule laticifère. Nous envisageons, dans le prochain chapitre, la possibilité d'une dégradation peroxydative des membranes et de leur protection, selon des mécanismes mis essentiellement en évidence, jusqu'alors, dans le règne animal.

L'ENCOCHE SÈCHE : MALADIE PHYSIOLOGIQUE DES LATICIFÈRES

RESUME

Toute forme de surexploitation des hévéas (surfréquence de saignée, surstimulation des arbres) peut conduire à un arrêt partiel ou total de l'écoulement du latex, consécutif à un tarissement des laticifères. Ce phénomène, qui peut atteindre plus ou moins sévèrement les exploitations hévéicoles (jusqu'à 30 % des arbres atteints), est dénommé "encoche sèche" (ou Brown Bast).

Diverses hypothèses essayant d'expliquer l'apparition naturelle ou induite (expérimentalement) du phénomène ont été proposées. Parmi les théories physiologiques, nous retenons en particulier l'incidence possible d'un déficit de l'alimentation organominérale (saccharose essentiellement) des laticifères (TUPY, 1973, 1975). Celui-ci pourrait être, semblet-il, induit par une modification de la perméabilité et des caractéristiques du plasmalemme des laticifères (BEALING et CHUA, 1972).

Une étude microscopique récente de l'écorce d'Hevea (de FAY, 1981) a montré que l'encoche sèche typique se traduisait dans ses premiers stades par une coagulation du latex *in situ* et l'envahissement des laticifères par des thyllosoïdes issus des cellules parenchymateuses voisins. Dans les stades plus avancés, apparaissent divers désordres anatomiques.

Il apparaît certain, aujourd'hui, que les lutoïdes (compartiment vacuolysosomal du latex) jouent un rôle majeur dans l'apparition du phénomène.

En effet, l'examen de latex issu d'arbres dont l'écorce est partiellement sèche, montre une disparition plus ou moins complète des lutoïdes dans les sédiments d'ultracentrifugation, un indice d'éclatement particulièrement élevé et un allègement considérable des lutoïdes résiduels (CRETIN, 1979-a).

La lyse des lutoïdes instables *in situ* est supposée conduire à la coagulation du latex au sein des laticifères, et provoquer ainsi l'arrêt définitif de l'écoulement.

THE BROWN BAST : THE PHYSIOLOGICAL DISEASE OF THE LATICIFERS

ABSTRACT

Any type of overexploitation of the heveas (too frequent tapping cuts, tree overstimulation) can lead to a partial or total stoppage in the flow of latex resulting from a drying up of laticifers. This phenomenon which can affect more or less seriously the hevea exploitations (up to 30% of the trees) is called "Brown Bast".

Various hypotheses have been put forward in order to try to account for the natural or induced (experimentally) occurrence of this phenomenon. We consider among the physiological theories the possible influence of a deficiency in the organominerals (mainly saccharose) of the laticifers (TUPY, 1973, 1975). The latter could be induced by a modification in the permeability and the characteristics of the plasmalemma of the laticifers (BEALING and CHUA, 1972).

A recent microscopical study of the hevea bark (de FAY, 1981) showed that the typical brown bast resulted first in a coagulation in situ of the latex and in the invasion of the laticifers by some thyllosoids derived from the neighbouring parenchymatous cells. Then, various anatomical disorders occur.

Nowadays, it becomes obvious that the lutoids (vacuo-lysosomal compartment of the latex) play a major role in the occurrence of the phenomenon.

The study of the latex derived from trees whose bark is partially dry shows a more or less complete disappearance of the lutoids from the ultracentrifuged sediments, a particularly high splitting index and a considerable reduction of the residual lutoids (CRETIN, 1979-a).

The lysis of the instable lutoids in situ is supposed to lead to the coagulation of the latex within the laticifers, thus causing the stoppage of the flow.

s

DEGRADATION PEROXYDATIVE ET PROTECTION

DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

A) IMPORTANCE DE LA STABILITE DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE

Nos propres résultats ainsi que les données bibliographiques rapportées précédemment suggèrent fortement que l'intégrité de la membrane lutoïdique est une nécessité primordiale dont dépendent :

- <u>la coagulation</u> précoce du latex sur l'encoche (bas producteurs) ou in situ (encoche sèche)
- l'homéostasie du compartiment <u>cytoplasmique</u> (i.e : la régulation de son pH et de sa composition ionique) siège des processus métaboliques aboutissant à la synthèse/régénération du latex
- en bref : <u>la compartimentation stricte, nécessaire</u> à la stabilité colloïdale et au métabolisme optimum du latex, gouvernant la productivité des arbres.

Il était donc nécessaire de rechercher s'il existe, au sein du latex des mécanismes biochimiques susceptibles de déstabiliser ou de protéger les membranes biologiques.

Les particules lutoïdiques sont entourées d'une membrane phospholipoprotéique de 80 à 100 Å d'épaisseur. Les études entreprises sur la composition lipidique de la membrane lutoïdique ont montré que les <u>acides</u> <u>gras insaturés</u> représentent environ 55 % des acides gras totaux constituant les lipides de leur membrane. (MOREAU et al. 1975 ; HANOWER et al.résultats non publiés).

Les acides gras insaturés sont plus instables que leurs homologues saturés : ils sont en effet exposés aux éventuelles dégradations oxydatives ou peroxydatives au niveau de leurs doubles liaisons, aboutissant à la rupture de leur chaîne carbonée.

Même si les teneurs en acides gras insaturés du tonoplaste lutoïdique se trouvent être anormalement basses, par rapport aux teneurs rencontrées dans d'autres systèmes membranaires (MOREAU et al. 1975), leur dégradation *in vivo* doit entraîner de profondes modifications des caractéristiques et en particulier de la stabilité de ces organites. Nous avons
donc recherché, d'une part l'existence de mécanismes biochimiques capables d'induire la peroxydation des lipides insaturés au sein du latex, et la présence éventuelle de "mécanismes protecteurs" d'autre part.

B) PRODUCTION DE FORMES TOXIQUES DE L'OXYGENE : BIBLIOGRAPHIE SOMMAIRE

Les phénomènes mis en jeu dans la dégradation peroxydative des lipides ont fait, et font encore, l'objet de nombreuses recherches, essentiellement au niveau des tissus d'origine animale.

Les mécanismes généralement admis correspondent à <u>l'émission</u> <u>de formes toxiques de l'oxygène</u> (anions superoxydes ; eau oxygénée ; radicaux hydroxyles,oxygène singulet...) lors du fonctionnement de certaines enzymes oxydoréductrices.

Les études les plus avancées dans ce domaine résultent de la mise en évidence d'une <u>absorption intense d'oxygène NAD(P)H dépendante</u> lors de la phagocytose et de la lyse des bactéries par les leucocytes de mammifères. Les enzymes mises en jeu dans ce phénomène ont été identifiées. On distingue :

1) Un complexe NAD(P)H- oxydase $\frac{1}{2}$ virique, relativement spécifique pour le NADPH, mis en évidence au niveau des granulocytes et macrophages alvéolaires de cochons d'Inde et de lapins, ainsi qu'au niveau des neutrophiles et macrophages induits, d'origine humaine (IYER et QUASTEL, 1967 ; ROSSI et al. 1975 ; GABIG et BABIOR, 1979). Une partie du flux électronique résultant du fonctionnement de ce complexe NADPH-oxydase aboutit à l'émission d'anions superoxydes $(0\frac{1}{2})$ selon un processus faisant intervenir le transfert de l électron respectant la stochiométrie suivante :

NADPH+ H^+ + $O_2 \rightarrow 2 O_2^-$ + $NADP^+$ + $2H^+$

2) Un complexe NADH-oxydase {lavinique, beaucoup plus actif, et très spécifique pour le NADH, libérant directement de l'eau oxygénée (H₂O₂) sans accumulation de l'intermédiaire superoxyde (réduction divalente de l'oxygène), selon une stoechiométrie globale :

$$NADH + O_2 + H^+ \rightarrow H_2O_2 + NAD^+$$

Ce type d'enzyme, utilisant le NADH, préférentiellement adsorbé au niveau des membranes (BAEHNER *et al*. 1970 ; STOSSEL *et al*. 1971) a été mis en évidence dans les neutrophiles de cochons d'Inde, ainsi que dans les neutrophiles et macrophages d'origine humaine (BAEHNER et KARNOVSKY, 1968 ; BRIGGS *et al*. 1975 ; BADWEY et KARNOVSKY, 1979). Ce complexe enzymatique réduit le ferricyanure beaucoup plus intensément (> 60 fois) que l'oxygène moléculaire et peut réduire aussi toute une variété de dérivés quinoniques (KARNOWSKY *et al*. 1980).

Des cytochromes de type b, présents au niveau des membranes leucocytaires, semblent être directement impliqués dans le flux électronique conduisant à la formation des superoxydes dépendant du NADH (SEGAL, JONES, WEBSTER, ALLISON, 1978).11 a été démontré par ailleurs que ces cytochromes b peuvent être réduits beaucoup plus intensément par le NADH que par le NADPH. Ce fait serait à mettre en parallèle avec l'efficacité plus grande du complexe NADH-oxydase à produire l'anion superoxyde (HATTORI, 1961 ; Mac CORD, 1974). Ces chaînes de transfert d'électrons sont insensibles au cyanure de même qu'à l'antimycine. Enfin ces mêmes cytochromes sont absents dans les granulocytes des malades atteints de déficience granulocytaire chronique (C.G.D.), trouble grave, se traduisant par l'incapacité de ces phagocytes à absorber intensément l'oxygène et d'émettre l'anion 0_{2}^{-} , en réponse à une attaque bactérienne (DAVIS et al. 1968 ; SEGAL et al. 1978). Par voie de conséquence les malades atteints de C.G.D. ne peuvent enrayer l'invasion parasitaire. Enfin, il a été démontré que ce type de cytochrome b était impliqué dans l'oxydation de quinones réduites (CRANE, 1977).

Dans le cas particulier des oxydations dépendantes du NADPH, un mécanisme a été proposé, faisant intervenir la NAD(P)H oxydase, le cytochrome b et des substances de type quinonique, fonctionnant comme une chaîne de transfert d'électrons capable de produire l'anion superoxyde et l'eau oxygénée (MILLARD *et al.* 1979).

3) Des systèmes dépendant du NAD(P)H, produisant des formes toxiques de l'oxygène ont été également mises en évidence aux niveaux des microsomes de foie de rat (WILLS , 1969). Il a été démontré en effet que l'incubation de microsomes en présence d'oxygène, de NADPH et de nucléotides adényliques aboutissait à une consommation rapide de l'oxygène, à la disparition concomitante du NADPH et à la peroxydation des lipides insaturés. Le système était fortement activé par la présence de traces d'ions

ferreux ou ferriques. WILLS (1969) fait une synthèse des résultats obtenus avec des suspensions de microsomes. Il décrit les conditions optimales de la peroxydation lipidique dépendante du NAD(P)H : spécificité assez marquée vis-à-vis du NADPH, pH voisin de la neutralité, intégrité de la membrane microsomale (participation au transfert d'e⁻?), nature enzymatique de la réaction, activation par le Fer et le Magnésium.

POYER et Mac CAY (1971) puis BILDBACK et TAPPEL (1972) précisent le rôle du Fer dans la peroxydation lipidique : le Fer complexé par l'ADP (ou l'EDTA) voit son niveau de potentiel abaissé et catalyse alors l'interaction entre l'anion superoxyde (0^-_2) et l'eau oxygénée (H_2O_2) pour libérer des radicaux hydroxyles(OH') et éventuellement l'oxygène singulet $(^1O_2)$: les formes les plus toxiques de l'oxygène actif (réaction décrite par HABER et WEISS, 1934). L'eau oxygénée présente dans le milieu résulte de la dismutation des mêmes anions superoxydes émis par le complexe NAD(P)H/O₂ oxydoréductase.

La succession des enchaînements réactionnels peut se résumer ainsi : à partir d'un flux d'anions superoxide $0\frac{\cdot}{2}$

(1) : $0_{2}^{-} + 0_{2}^{-} + 2 H^{+} \longrightarrow H_{2}^{0} + 0_{2}^{-}$ (dismutation)

parallèlement, en présence d'un catalyseur métallique Mⁿ⁺ (complexé ou non)

(2): $0_2^{-} + M^{n+} \longrightarrow 0_2^{-} + M^{(n-1)+}$ (Fe³⁺ Fe²⁺)

en présence d' H_2^{0} libéré par la réaction (1) :

(3) : $M^{(n-1)+} + H_2O_2 \longrightarrow M^{n+} + OH^{-}$ (réaction de FENTON)

Le bilan des réactions (2)+(3) correspond à la réaction d'HABER-WEISS :

FONG et al. (1973) mettent en évidence l'éclatement de lysosomes de foie de rat incubés en présence de microsomes, de NADPH et de Fer + ADP. Ils démontrent par piégeage ou inhibition sélective des différentes formes toxiques de l'oxygène que ce n'est pas l'anion superoxyde directement produit par l'oxydation du NADPH, mais bien des radicaux hydroxyles dérivant de l'interaction entre 0_2^- et H $_20_2$, qui induisent la peroxydation des lipides membranaires, et par conséquent, l'éclatement des structures lysosomales. 4) Outre ces complexes enzymatiques dépendants du NAD(P)H, principales sources spécialisées connues des formes toxiques de l'oxygène, de nombreuses enzymes oxydoréductrices émettent des ions superoxydes soit en tant qu'intermédiaires dans leurs réactions catalytiques, soit en tant que sous-produits accidentels de réactions rédox.

a) Dans cette catégorie d'enzymes, les plus connues sont la xanthine oxydase ainsi que la galactose oxydase (BOVERIS et al. 1972 ; RAJAGOPALAN et HANDER, 1968 ; HAMMILTON et LIBBY, 1973).

b) Les chaînes respiratoires mitochondriales peuvent également dans certaines conditions, essentiellement dans des conditions d'inhibition au niveau de sites particuliers, libérer $0_{\overline{j}}$ et $H_{2}0_{2}$:

- Les inhibitions séquentielles de la voie cytochromique par le cyanure, l'antimycine A, la roténone, etc... ou l'association de ces inhibiteurs spécifiques de cette voie, montrent alors que la respiration (consommation d'O₂) se trouve fortement réduite, que le flux d'électrons résiduel au niveau des systèmes situés en amont des sites d'inhibition, est détourné au profit de la génération d' $0\frac{1}{2}$ et H_2O_2 , par réduction directe de l'oxygène moléculaire. C'est le cas, en particulier chez les mitochondries d'origine animale ne présentant pas de voie alterne. L'émission de formes toxiques de l'oxygène semble alors se situer, tant au niveau de la NADH-déshydrogénase (TURRENS et BOVERIS, 1980) que de la NADHubiquinone-réductase (CADENAS et al. 1977 ; TAKESHIGE et al. 1980) ou de 1'ubiquinol-cytochrome c-réductase (CADENAS et al. 1977 ; CADENAS et BO-VERIS, 1980). Dans ce cas. l'apport simultané de ces trois inhibiteurs principaux de la voie cytochromique, inhibe totalement la consommation d'oxygène et la génération d' $0_{\overline{2}}$ et H_2O_2 (en cas d'absence totale de voie alterne résistante au cyanure).

- <u>Chez les végétaux, la voie alterne insensible au cyanure</u>, fonctionnelle lorsque la voie cytochromique est inhibée par ses inhibiteurs spécifiques, tels le cyanure et/ou l'antimycine A (HENRY et NYNS, 1975 ; LANCE 1981 ; DIZENGREMEL et LANCE, 1982...), libère également des anions superoxydes et de l'eau oxygénée (RICH *et al.* 1976 ; RICH et BON-NER, 1978...). Dans ce cas, tant le transfert d'e⁻, que la respiration cyanorésistante et que la libération d'O⁻₂ et H₂O₂, sont fortement inhibés par l'addition des inhibiteurs spécifiques de cette voie, tels les dérivés de l'acide hydroxamique (SHAM, CLAM,...) (SCHONBAUM *et al.* 1971 ; THEOLOGIS et LATIES, 1980 ; DIZENGREMEL, 1980,...) ou le propyl gallate (SIEDOW et GIRWIN, 1980 ; GOLDSTEIN et al. 1980,...).

En résumé, toute respiration mitochondriale et l'éventuelle émission de formes toxiques de l'oxygène qui l'accompagne, sont pratiquement inhibées complètement par l'apport simultané des principaux inhibiteurs de ces deux voies (cyanure + antimycine A + roténone + SHAM + ...).

C) LES PROTECTEURS DES MEMBRANES

Etant donné que l'anion superoxyde (source de toutes les formes toxiques de l'oxygène) est libéré par un grand nombre d'enzymes oxidoréductrices comme produit de réaction, spécifique ou accidentel, il est logique de penser qu'il est présent et susceptible de s'accumuler dans tous les organismes aérobies (FRIDOVICH, 1975). D'autre part la dismutation spontanée "relativement lente" des superoxydes aboutit à la formation d'H₂O₂, qui selon la réaction décrite par HABER et WEISS donne naissance aux radicaux hydroxyles: forme très réactive de l'oxygène (Mc CORD, 1974 ; FRIDOVICH, 1975 ; GOSCIN et FRIDOVICH, 1972 ; COHEN et HEIKKILA, 1974). Cette émission de radicaux libres amplifie donc considérablement le danger potentiel lié à la seule présence de l'anion superoxyde.

Le moyen le plus sûr d'éviter l'apparition des radicaux hydroxyles et de l'oxygène singulet est évidemment le piégeage immédiat des deux formes $(0_2^{-} \text{ et } H_2 0_2)$ qui, par leur interaction, donnent naissance aux formes les plus toxiques de l'oxygène. Tout un arsenal, enzymatique ou non, a été mis en évidence dans différents tissus biologiques, pour piéger et (ou) détoxifier l'oxygène actif.

1) Les protecteurs enzymatiques :

a) Les superoxydes-dismutases (SOD) :

Elles ont été mises en évidence par Mc CORD et FRIDOVICH (1969, 1970), décrites depuis dans de nombreux tissus tant animaux que végétaux. Leur centre actif contient soit une association Zinc-Cuivre (SAWADA *et al.* 1972 ; ASADA et al. 1972,...), soit un atome de Manganèse (KEEZE *et al.* 1970 ; WEISIGER et FRIDOVICH, 1973) ou l'ion Fe³⁺ (SALIN et BRIDGES, 1980 ; KIRBY *et al.* 1980). La présence de ces enzymes,généra-lement en forte quantité par rapport à la concentration en superoxydes, accélère la réaction de dismutation d'un facteur 10^5 à 10^9 .

$$\overline{O_2} + \overline{O_2} + 2H \xrightarrow{+ SOD} H_2O_2 + O_2$$

àbaissant ainsi considérablement la probabilité de l'interaction 0_{2}^{-} avec $H_{2}O_{2}$ et donc la formation de OH[•] (FRIDOVICH, 1975).

Des indications concernant le rôle protecteur vital de la superoxyde dismutase chez les organismes de type aérobie ont été fournies par :

- la présence de cette enzyme dans tous les organismes aérobies ou aérotolérants ;
- l'induction de la SOD chez les micro-organismes anaérobies facultatifs placés en aérobiose (GREGGORY et FRIDOVICH, 1973 a, b);
- l'augmentation de la teneur en SOD dans les organismes exposés à des teneurs anormales en oxygène (GRAPO, 1977);
- de forte activité SOD au niveau des tissus et organites à fortes activités oxydoréductrices ou respiratoires et donc susceptibles de dégager l'anion superoxyde (foie, leucocytes, mitochondries, chloroplastes) (ASADA et al., 1972; WEISIGER et FRIDOVICH, 1973);
- l'absence de SOD chez les micro-organismes anaérobies stricts (Mc CORD et al., 1971) pour lesquels la présence d'oxygène est létale.

b) La catalase (Cat.):

Deux fonctions de cette enzyme à fer hémique ont été décrites : une fonction purement catalasique, protectrice, aboutissant à la dégradation de l'eau oxygénée selon la stochiométrie :

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

(SCHONBAUM et CHANCE, 1976) et une fonction peroxidative aboutissant à l'oxydation d'un donneur d'hydrogène par H_2O_2 (KEILIN et HARTREE, 1945). Finalement la double fonction de la catalase est bien admise et semble dépendre des conditions du milieu (CHANCE, 1951). Quel que soit le type de réaction envisagé, la catalase se comporte comme une enzyme véritablement protectrice puisque son fonctionnement entraîne la consommation rapide d' H_2O_2 . L'existence de la catalase dans tous les organismes aérobies et la localisation de très fortes activités surtout dans les hématies (SCHONBAUM et CHANCE, 1976 ; NICHOLIS, 1965) et les organites tels les mitochondries (NOHL et HEGNER, 1978), les chloroplastes et certains groupes de lysosomes (DE DUVE et BAUDHUIN, 1966), sièges de fortes activités respiratoires ou oxydatives, indique que, comme la superoxyde dismutase, la catalase est une enzyme protectrice vis-à-vis des effets nocifs de l'oxygène inhérents à la vie en aérobiose.

c) Les peroxydases (Perox) :

Ces enzymes à noyau hémique, très répandues dans le domaine végétal, catalysent l'oxydation peroxydative de substrats donneurs d'hydrogène (R - H) (poly) insaturés, généralement du type noyaux phénoliques $R - H + H_2O_2 \xrightarrow{Perox} R - OH + H_2O$

Les formes (poly) phénoliques qui résultent de leur activité sont potentiellement toxiques après leur oxydation par les polyphénols oxydases donnant naissance aux noyaux quinoniques. L'action conjuguée de ces deux enzymes (peroxydases et polyphénol oxidases) aboutit à l'accumulation des mélanines et des tannins produits de condensation des polyphénols oxydés, dénaturants puissants des structures protéiques (BURGES, 1963 ; SWAIN, 1965 ; FEENY, 1969).

Paradoxalement les peroxydases, qui libèrent des produits (phénols, quinones) potentiellement toxiques, peuvent être considérées comme des enzymes détoxifiantes. En effet, elles éliminent l'eau oxygénée (l'un de leurs substrats) diminuant ainsi son accumulation et la probabilité de l'apparition des formes plus toxiques de l'oxygène (OH', 0.2) et 0.2).

Remarquons enfin que les tannins et mélanines résultant des activités peroxydases et polyphénol-oxydases sont soustraits généralement du milieu cytoplasmique, siège du métabolisme primaire. Ils sont en effet souvent compartimentés dans les vacuoles végétales (MATILE, 1976 ; CHAR-RIERE-LADREIX, 1976 ; ALIBERT *et al.* 1981) et en particulier dans les vacuoles de cellules dites à rannins bien connues chez l'Hévéa (TRANCARD, 1979 ; de FAY, 1981). Cette compartimentation au niveau cellulaire correspond au rôle détoxifiant des vacuoles végétales, et dans ce cas particulier évite la dénaturation et la coprécipitation des protéines cytoplasmiques par les tannins produits du métabolisme secondaire (HASHLAM, 1974). d) La glutathion peroxydase(GPX) :

Mise en évidence par MILLS (1957) dans les érythrocytes, cet enzyme largement répandue catalyse la réaction des hydroperoxydes avec le glutathion réduit (GSH) pour former le glutathion oxydé (GSSG) et le produit de réduction de l'hydroperoxyde.

Cette enzyme généralement cytosolique et mitochondriale est très spécifique vis-à-vis de son substrat donneur d'hydrogène (GSH), et ne présente pas de spécificité particulière pour son substrat hydroperoxyde. C'est ainsi que GPX peut catalyser la réduction de l'eau oxygénée et de toute une gamme d'hydroperoxydes organiques (ROOH) dont les hydroperoxydes des nucléotides, des stéroides et surtout ceux des acides gras.

Cette enzyme présente donc un intérêt majeur dans le système de détoxification puisqu'elle <u>élimine l'eau oxygénée</u> ambiante, et les éventuels hydroperoxydes organiques formés accidentellement (MILLS, 1960 ; CHOW et TAPPEL, 1972 ; LAWRENCE et BURK, 1976).

A l'équilibre, la régénération du GSH par la réduction du GSSG est une nécessité absolue (LANKIN et CUREVICH, 1976). Cette régénération est catalysée par la glutathion réductase-NADPH dépendante (Gred), dont la distribution intracellulaire accompagne celle de GPX.

Le <u>turnover enzymatique</u> du glutathion peut se résumer ainsi :



2) Les protecteurs non enzymatiques :

Ce sont d'une manière générale des réducteurs organiques naturels. Ils sont souvent substrats spécifiques d'enzymes oxydoréductrices lorsque celles-ciexistent dans les tissus considérés.

a) L'acide ascorbique (vitamine C) :

Il s'agit d'une substance hydrosoluble fortement réductrice, largement répandue dans le domaine végétal. Elle peut être le substrat spécifique de l'acide ascorbique oxydase lorsque celle-ci est présente. L'acide ascorbique oxydé peut être réduit par un certain nombre de composés thiols (R - SH) tel le glutathion. Le glutathion oxydé étant lui-même réduit enzymatiquement par la NADPH-glutathion-réductase. Il peut donc exister une séquence d'oxydoréduction régénérant l'acide ascorbique :

L'acide ascorbique est capable de réduire directement et non enzymatiquement les quinones libérées par les polyphénols-oxydases (JAVILLIER *et al.* 1962) et les peroxydases (SAUNDERS *et al.* 1964) et il retarde ainsi la formation des mélanines ettannins potentiellement toxiques. Le système détoxifiant les quinones peut donc se schématiser ainsi :



Le système X/XH₂ peut éventuellement correspondre au système chimique régénérateur de l'ascorbate décrit précédemment, ou également par une ascorbate réductase spécifique.

b) Les composés thiols :

Ces protecteurs naturels sont présents dans le monde animal et dans une moindre mesure dans le domaine végétal. Les plus connus sont les acides aminés soufrés comme la cystéine, ou des dérivés tel l'ergothionéine ou encore des structures plus complexes comme le glutathion.

En présence de traces de fer ou de cuivre, les composés thiols peuvent être oxydés directement par l'eau oxygénée ou des radicaux libres (CALVIN, 1954 ; TARBELL, 1961,...) et se comportent donc comme des protecteurs vis-à-vis des formes toxiques de l'oxygène. Par ailleurs, la détoxification des peroxydes en présence de composés thiols, tel GSH, peut être assurée par des activités enzymatiques spécifiques (GSH peroxydases). Ces composés réducteurs abondamment représentés chez les végétaux sont les substrats des deux enzymes : polyphénols oxydases et peroxydases ; ils participent indirectement donc à l'élimination de l'eau oxygénée et de l'oxygène dissout. Leur oxydation aboutit, nous l'avons vu, à la libération de quinones outannins espèces moins réactives que les formes radicalaires de l'oxygène.

d) Les tocophérols et tocotriénols :

Les tocophérols, substances liposolubles, constituent aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* d'excellents antioxydants. Fixant facilement les formes toxiques de l'oxygène (NISHIKIMI *et al*. 1980), ils protègent de l'oxydation les acides gras insaturés moins sensibles qu'eux à l'oxydation, en inhibant les étapes initiales des réactions en chaîne d'autoxydation. Pratiquement les tocophérols présents en petites quantités dans les graisses sont capables de prévenir ou de retarder l'oxydation des acides gras et, éventuellement, de détruire les peroxydes formés (Mc CAY *et al.* 1971).

Signalons de plus qu'un certain nombre de substances et en particulier l'acide ascorbique possèdent une action antioxydante synergique. Ces synergiques constituent une réserve d'hydrogène capable de régénérer l'antioxydant (tocophérols...) après son oxydation partielle par les peroxydes des acides gras (COLUMBIC et MATTIL, 1941).

Les tocophérols sont des protecteurs membranaires des hématies. Leur adjonction empêche l'hémolyse induite par l'alloxane ou l'acide dialuronique chez les animaux carencés en tocophérols (GEORGY et ROSE, 1948).

3) Dans le latex :

La présence d'un certain nombre de ces systèmes protecteurs a déjà été décrite dans le latex.

Signalons en particulier la mise en évidence et la compartimentation des catalases et peroxydases (TATA et EDWIN, 1970; COUPE *et al.* 1972) et l'étude des polyphénols oxydases (BRZOZOWSKA-HANOWER *et al.* 1978) présents dans le latex. En ce qui concerne les protecteurs non enzymatiques, la présence dans le latex d'acide ascorbique (ARCHER et al. 1969) des tocotriénols et tocophérols (DUNPHY et al.,1965 ; WHITTLE et al.,1966) et de composés soufrés tel l'ergothionéine (TAN CHEE HONG et AUDLEY, 1968) et le glutathion (Mc MULLEN, 1960) a été rapportée. Enfin, de nombreux composés phénoliques ont été répertoriés et vingt trois aglycones identifiés au sein du latex (CRETIN, 1979-a ; HANOWER et al. 1979). Les variations quantitatives du pool phénolique total du latex, au cours d'un cycle végétatif et lors de la stimulation des hévéas par l'Ethrel, ont également été étudiées (CRETIN, 1979-a).

DEGRADATION PEROXYDATIVE ET PROTECTION

DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

RESUME

La stabilité de la membrane lutoïdique est une nécessité primordiale dont dépendent la <u>stabilité colloïdale</u> du latex (précocité de la coagulation) et le maintien de <u>l'homéostasie</u> intralaticifère (pH, équilibre ionique): deux caractéristiques gouvernant la productivité des arbres. La dégradation des propriétés de cette membrane pourrait être à l'origine du syndrome des encoches sèches.

I - L'une des voies possibles aboutissant à la dégradation des structures membranaires, correspond à l'attaque peroxydative des lipides insaturés qui les constituent, par des formes dites "toxiques" ou "agressives" de l'oxygène.

- Des systèmes enzymatiques, spécialisés dans la production de formes toxiques de l'oxygène $(0, 2, H_2, 0, 0, H, 0, 2, ...)$, ont été étudiés et caractérisés dans le règne animal, et particulièrement au niveau des granulocytes, des neutrophiles et des macrophages des mammifères. L'émission des formes toxiques de l'oxygène ferait intervenir, dans ces cas, des systèmes complexes transporteurs d'électrons essentiellement membranaires, comportant une activité NAD(P)H oxydase, des cytochromes du type b et probablement des structures quinoniques.

- Des activités NADPH oxydases produisant des formes agressives de l'oxygène ont également été localisées au niveau des microsomes animaux et végétaux. Ils font dans ce cas intervenir également une structure cytochromique spécialisée : le cytochrome P₄₅₀.

- De nombreuses autres enzymes oxydo-réductrices peuvent également libérer accidentellement des formes toxiques de l'oxygène $(0\frac{1}{2})$ et $H_2O_2)$. C'est le cas des xanthine oxydase et des galactose oxydase par exemple. - De même, les chaînes respiratoires mitochondriales cytochromique ou alterne, peuvent également, dans certaines conditions, libérer des 0⁷/₂ et H₂0₂. Dans ce cas, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (antimycine A, rotenone, HOQNO, CN⁻, SHAM,...) réduit l'intensité respiratoire et permet de localiser les sites générateurs des formes toxiques de l'oxygène.

Dans tous les cas, les anions superoxyde $(0\frac{1}{2})$ et $1'H_2O_2$ libérés peuvent par leur interaction, en présence de catalyseurs métalliques (traces de Fe⁺⁺ ou de Cu⁺⁺, chélatés ou non), donner naissance aux formes les plus agressives de l'oxygène (radicaux hydroxyles OH et oxygène singulet ${}^{1}O_2$) catalysant la dégradation peroxydative des lipides insaturés, et la lyse membranaire.

2 - Le moyen le plus sûr d'éviter ce type de dégradation peroxydative des lipides membranaires (entre autres) est d'éliminer immédiatement les formes toxiques de l'oxygène directement émises $(0_2^{-} \text{ et H}_2 0_2)$. Les enzymes directement concernées dans ce système de détoxification correspondent essentiellement aux activités superoxyde dismutases, catalases, peroxydases et glutathion peroxydases. Certains protecteurs chimiques antioxydants (thiols réduits, tocophérols, ascorbate,...) font également partie des systèmes de détoxification en piégeant directement certaines formes agressives de l'0₂.

3 - Nous serons amenés à rechercher l'existence de tels systèmes oxydatifs et protecteurs des structures membranaires dans le latex, et leur implication dans la dégradation des propriétés du tonoplaste lutoïdique, en relation avec l'apparition du syndrome des encoches sèches.

THE PEROXIDATIVE DEGRADATION AND THE PROTECTION

OF THE BIOLOGICAL MEMBRANES

ABSTRACT

The stability of the lutoidic membrane is of prime necessity in the colloidal stability of the latex (early coagulation) and in the maintenance of the intralaticiferous homeostasis (pH, ionic balance) which regulate the tree productivity. The degradation of the properties of this membrane could be at the origin of the brown bast syndrome.

I. One of the possible ways leading to the degradation of membranous structures corresponds to the peroxydative modification of unsaturated lipids by toxic form of oxygen (aggressive oxygen).

- Enzyme systems specialized in the production of toxic forms of oxygen $(\overline{o_2}, H_2 O_2, OH^{\bullet}, {}^1O_2 \ldots)$ have been studied and characterized in the animal kingdom and particularly in the granulocytes, the neutrophils and the macrophages of the mammals. The release of the toxic forms of oxygen would involve here some complex electron transport systems, mainly membrane ones with an NAD(P)H oxidase activity <u>b</u> cytochromes and probably some quinonoid structures.

- NADPH oxidase activities which yield some aggressive forms of oxygen have also been identified in the animal and plant microsomes. In this case, they also involve a specialized cytochromic structure : the cytochrome P_{450} .

- Numerous other oxido-reducing enzymes can also release casually some toxic forms of oxygen $(0_2^{\bullet} \text{ and } H_2 0_2)$. Such is the case of the xanthine oxidase and galactose oxidase.

- Likewise, the cytochromic or alternate mitochondrial respiratory chains can also, under certain conditions, release $0_2^{\overline{1}}$ and $H_2 O_2$. In this case, specific inhibitors (antimycin A, rotenone, HOQNO, CN⁻, SHAM...) reduce the respiratory intensity and allow to identify the sites generating the toxic forms of oxygen.

In any case, the released superoxide anions $(\overline{0_2})$ and $H_2 \overline{0_2}$ can, through their interaction and in presence of metal catalysts (traces of Fe⁺⁺ or Cu⁺⁺, whether chelated or not) give rise to the most aggressive forms of oxygen (hydroxyl radicals OH° and singlet oxygen ${}^{1}O_2$), thus catalyzing the peroxydative degradation of the unsaturated lipids and the membrane lysis.

II. The most reliable method for preventing this type of peroxidative degradation of the membrane lipids (among others) consists in removing at once the directly released toxic forms of oxygen $(\overline{0_2}$ and $H_2 O_2)$. The enzymes directly involved in this detoxification system correspond mainly to the superoxide dismutase, catalase, peroxidase and glutathione peroxidase activities. Certain protective antioxidants (reduced thiols, tocopherols, ascorbate...) are also part of the detoxification systems by trapping directly some aggressive forms of 0_2 .

III. We will be led to try and find such oxidative and protective systems of the membrane structures in the latex and their implication in the degradation of the properties of the lutoidic tonoplast related to the occurrence of the brown bast syndrome.

MATERIEL

. •

.

ET

METHODES

ΜΑΤΕRΙΕL ΕT METHODES

I - SÉLECTION DES HEVEAS, RECOLTE DU LATEX ET TECHNIQUE DE STIMULATION :

1 - Sélection du matériel végétal :

La variabilité de l'Hévéa impose une sélection stricte du matériel végétal. On travaille sur des arbres du même clone (GT1, sauf mention contraire), à une époque déterminée de l'année et donc en évitant les expériences portant sur des temps trop longs. On choisit les arbres d'une surface pédologiquement homogène ce qui, compte tenu de sa taille (environ 80 ares) est toujours supposé vrai. On veille à ce que les caractéristiques de la saignée soient les mêmes pour tous les individus : rythme de saignée, hauteur et longueur d'encoche, profondeur de saignée (en pratique on saigne toujours à la profondeur maximum : l mm du cambium), heure de la saignée (généralement 6h30 le matin) et fraction du latex écoulé. Il est très important que les arbres aient des caractéristiques les plus proches possible : même croissance, bon état sanitaire (absence de fomès, de chancres,...), et sauf expérimentation spéciale, absence d'encoche sèche.

Tous les critères énoncés ci-dessus sont faciles à contrôler. La première phase de sélection porte en fait sur la circonférence des arbres. Celle-ci est mesurée à 1,50 m de hauteur. Cette étape permet d'éliminer les arbres ayant des croissances excessivement faibles ou fortes et de garder ceux dont la morphologie est semblable. Sur les individus ainsi sélectionnés on effectue un nouveau contrôle en mesurant leur production sur 10 saignées consécutives, et l'absence (ou la présence) d'encoche sèche. A ce stade de la sélection, la variabilité de la production demeure très importante. Les valeurs extrêmes sont 10 et 280 g de caoutchouc/arbre/ saignée. Ce protocole nous permet de choisir selon les besoins de l'expérience des arbres hauts, moyens ou bas-producteurs.

Malgré ces précautions il demeure une variabilité irréductible. Le même arbre peut présenter d'une saignée à l'autre des écarts de production assez importants.

Nous soulignons que l'expérimentation sur l'Hévéa présente des difficultés dues au manque d'homogénéité du matériel végétal. Celles-ci sont en partie levées en travaillant sur des lots d'arbres de taille importante ou sur des mélanges de latex de plusieurs arbres (20). Ceci ne nous a pas toujours été possible et dans les expériences où les dosages portaient sur des mesures individuelles, nous avons rarement utilisé plus de 4 arbres par lot.

Dans le cas où les expérimentations portent sur des arbres atteints d'encoche sèche partielle, les arbres sont sélectionnés en mesurant la portion d'encoche d'où ne s'écoule pas de latex immédiatement après la saignée. Les arbres sont alors classés selon la gravité de l'atteinte en % de longueur d'encoche non productive par rapport à la longueur totale de l'encoche d'exploitation. En général les quelques cm (2 à 3) d'encoche souvent "improductifs", situés aux extrémités de l'encoche d'exploitation, ne sont pas pris en compte.

2 - Récolte du latex :

a) La saignée :

Nous avons travaillé généralement sur des arbres saignés en S/2 J/3 J/4,llmois/12. Cette faible intensité de saignée a été choisie délibérément afin de n'être jamais limité par des facteurs trophiques. Dans certains cas nous avons utilisé des arbres saignés en spirale entière (expériences sur les encoches sèches en particulier). La profondeur de saignée (jusqu'à 1 mm du cambium) est fréquemment vérifiée.

b) Le prélèvement :

Le latex est recueilli dans un tube refroidi par de la glace, de cette façon il est porté rapidement à une température voisine de 0°C. Les quatre ou cinq premiers ml de latex sont éliminés pour plusieurs raisons :

- Ils sont riches en lutoïdes éclatés (RIBAILLIER, 1972-a)

- Ils contiennent des débris et diverses contaminations de l'écorce. On prélève ensuite 30 à 40 ml de latex.

3 - Techniques de stimulation :

Dans toutes nos expériences, nous utilisons pour stimuler les arbres l'acide 2-chloroéthylphosphonique ou Ethrel. Le produit est le plus souvent employé à la concentration de 5 % (m/v) de matière active dans de l'huile de palme. L'application est réalisée au pinceau sur une bande située sous l'encoche de saignée (sauf mention contraire signalée dans le texte). La longueur moyenne de la bande est de 35 cm, sa largeur de 2 cm. L'écorce est grattée au préalable afin d'éliminer la couche de cellules subérifiées, le tissu chlorophyllien sous-jacent, et faire apparaître le phelloderme. Les témoins de nos expériences sont grattés de la même façon et enduits d'huile de palme. Les quantités de produit appliquées sont d'environ 200 mg par arbre, soit environ 3 mg/cm² d'écorce grattée.

II - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES LUTOIDES ET DU CYTOSOL DU LATEX :

1 - Préparation des lutoïdes :

Les lutoïdes ont été isolés soit à l'état brut par simple centrifugation du latex (70.000 à 150.000 g ; 40 min. à 4°C), soit à l'état "purifié" par lavages successifs. Le culot lutoïdique obtenu par centrifugation du latex à 35.000 g (20 min. à 4°C) est alors remis en suspension (par pipettages doux) dans un tampon isotonique (Mannitol 0,3 M ; Hepes-Tris à 50 mM à pH 7,0 sauf mention contraire) et recentrifugé à 30.000 g (10 min.). Ce lavage est effectué à 3 reprises à la température de 4°C.

Les dosages ont porté soit sur des lutoïdes intacts en suspension dans le tampon isotonique (Mannitol 0,3 M) soit sur des lutoïdes détruits par un traitement aux ultrasons (l minute puissance maximale) ou au Triton X-100 (0,1 % final). Les dosages et expérimentations diverses sur les les lutoïdes ainsi purifiés peuvent débuter 70 minutes après la récolte du latex.

2 - Séparation sur gradient de densité de saccharose :

Cinqml de latex ou 3 ml de lutoïdes (50 % p/v) remis en suspension dans leur cytosol ou dans un tampon isotonique sont déposés au-dessus d'un gradient linéaire de saccharose 0,6 à 1,8 M (tampon Hepes-Tris 20 mM pH 7, EDTA 0,5 mM, Mannitol, 0,3 M) sur un "coussin" de saccharose 2,3 M. Les tubes sont centrifugés 70 à 120 minutes à 85.000 g (SW-25.2) à la température

de 8°C. Les fractions sont récupérées par le fond du tube (2 à 4 ml selon les cas).

3 - Lyse spécifique des particules de FREY-WYSSLING :

Certaines expériences ont nécessité une lyse particulaire spécifique (COUPE et al. 1972). Pour libérer spécifiquement les enzymes des particules de FREY-WYSSLING nous avons traité les culots de centrifugation de la façon suivante :

- le culot est pesé, puis additionné de digitonine 0,5 mM dans un tampon Hepes-Tris 50 mM pH 7,4, Mannitol 0,3 M (50 %, p/v),
- la suspension particulaire est maintenue 30 minutes sous agitation magnétique douce à 4°C, puis centrifugée à 15.000 g,
- le traitement est répété, puis le culot de centrifugation résiduel est lavé en absence de digitonine (tampon isotonique),
- les essais sont ensuite effectués séparément sur le culot lutoïdique purifié (digitonine) traité aux ultrasons, et sur le surnageant de premier traitement à la digitonine (particules de FREY-WYSSLING lysées).

5 - Isolement du cytosol du latex :

Le latex centrifugé à 70.000 (ou 120.000) x g est séparé en ses trois fractions principales : le caoutchouc surnageant, la phase aqueuse correspondant au cytosol, et le culot particulaire (Planche II, Introduction). La phase cytosolique limpide est recueillie par aspiration douce (seringue) en évitant toute contamination par les particules de caoutchouc et par des organites remises en suspension. Le cas échéant, le cytosol est recentrifugé (45 minutes à 150.000 x g) pour éliminer toute contamination particulaire.

6 - Ultrafiltration du cytosol ou du sérum intra-lutoïdique :

Certaines expériences ont été réalisées en présence de cytosol ou de sérum intra-lutoïdique débarrassés de leurs protéines enzymatiques susceptibles d'interférer dans certains dosages. La déprotéinisation est effectuée par ultra-filtration sous pression d'azote (3 à 4 bar) sur membrane AMICON PM 10, retenant les macro-molécules de poids moléculaires supérieurs à 10.000. L'appareil d'ultra-filtration est immergé dans un bain de glace, et le filtrat recueilli dans un récipient également plongé dans un bain de glace fondante. Les filtrats obtenus, sont soit utilisés directement, soit congelés à -18°C. Ce procédé de "déprotéinisation" partielle a l'avantage de conserver la composition et la concentration en solutés de bas poids moléculaire, identiques à celles du fluide biologique initial.

Pour obtenir un sérum lutoïdique ultra-filtré, les lutoïdes purifiés sont traités aux ultrasons, puis débarrassés des structures membranaires résiduelles par centrifugation (150.000 x g, 30 min, 4°C) avant d'introduire le sérum intra-lutoïdique dans la cellule d'ultra-filtration.

Avant utilisation, les sérums ultra-filtrés sont éventuellement ajustés au pH désiré par l'addition d'Hepes, Mes ou Tris, et le cas échéant additionné de Mannitol 0,25 M final (sérums légèrement hypertoniques).

III - MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES :

1 - Mesure des activités ATPase :

La mesure des activités ATPase a été effectuée en dosant enzymatiquement l'ADP libéré, selon la méthode de d'AUZAC (1975) adaptée à nos conditions opératoires. Les dosages de série sont effectuées à 26° C dans un tampon isotonique contenant : Mannitol 0,3 M, MgSO₄3 ou 5 mM, molybdate d'ammonium 0,1 mM, tamponné à pH 7,0 (sauf mention contraire) par Hepes-Mes-Tris 50 mM. L'incubation est réalisée pendant 10 minutes (sauf mention contraire indiquée dans le texte) sur 3 ml de suspension lutoïdique à 10 % (p/v). La réaction est amorcée par l'addition d'ATP 2,5 mM (concentration finale). Elle est arrêtée par précipitation d'une partie aliquote (1 ml) dans un tube EPPENDORF contenant 0,1 ml de PCA 5 mM, immédiatement plongé dans un bain de glace pendant 30 minutes.

La suspension est ensuite centrifugée pendant 2 minutes à 9000 x g à l'aide d'une centrifugeuse de table BECKMAN (type B). Après neutralisation contrôlée du surnageant par KOH 5 M, l'ADP formé est dosé en suivant la décroissance de la D.O. à 366 nm, consécutive à l'oxydation du NADH selon la réaction suivante en présence des substrats et enzymes exogènes.



Lorsque la concentration en protéine a été mesurée, l'activité ATPase est exprimée en umoles d'ATP hydrolysées. min⁻¹. mg⁻¹ de protéines. Le dosage d'ADP libéré dans d'autres conditions d'incubation est effectué selon le même principe.

2 - Mesure des activités phosphatase acides et de l'indice d'éclatement des lutoïdes :

Les incubations sont réalisées à 26° C dans un tampon acétate de sodium 100 mM à pH 5,0 en utilisant le p-nitrophénylphosphate (10 mM) comme substrat (PUJARNISCLE, 1968). La prise d'essai du latex est de 50 µl le volume réactionnel est de 2 ml. Dans le cas de suspensions lutoïdiques (10 % p/v) la prise d'essai est de 75 µl. La réaction est arrêtée au bout de 10 minutes par 1 ml de TCA 2N. Une fraction de la phase aqueuse limpide (0,5 ml généralement) est ajoutée à 2,5 ml de NaOH 1N et le p-nitrophénol libéré est dosé par spectrophotométrie à 400 nm (LINHARDT et WALKER, 1965).

On distingue deux types d'activités (PUJARNISCLE, 1969-a) :

- l'activité phosphatase acide totale (PaT) :

Elle représente le potentiel global de l'enzyme dans le latex ou dans la suspension (WATTIAU et DE DUVE, 1956). Cette activité est mesurée en présence de Triton X-100 0,1 % , qui provoque la lyse complète des lutoïdes et la libération des enzymes qu'ils contiennent, sous forme soluble (PUJARNISCLE, 1965-a);

- l'activité phosphatase acide libre (PaL) :

Elle rend compte des enzymes accessibles au substrat lorsque les lutoïdes sont en parfait état d'intégrité (DE DUVE *et al.* 1955). Cette mesure est effectuée en milieu isotonique (Mannitol 0,3 M), pendant des temps généralement courts (10 à 20 minutes), afin qu'il n'y ait pas déstabilisation des organites pendant la mesure. Cette mesure représente essentiellement l'activité des phosphatases libérées par les lutoïdes instables.

On estime que le rapport des deux activités phosphatasiques libre et totale est une mesure de l'intégrité des lutoïdes. L'indice d'éclatement des lutoïdes (IE) a été défini par RIBAILLIER (1968-b) comme suit :

3 - Mesure des activités NAD(P)H cytochrome c oxydoréductase :

Elles sont mesurées à 26° environ selon la méthode décrite par MOREAU et al.(1975), en suivant la réduction du cytochrome <u>c</u> à 550 nm, dans un tampon isotonique (mannitol 0,3 M, Hepes-Mes-Tris 25 ou 50 mM) généralement à pH 7,0 en présence de cytochrome <u>c</u> (oxydé) 50 uM, NADH l mM ou NADPH 200 μ M (en présence ou non de KCN l mM). Le volume total du milieu réactionnel est de 3 ml et la concentration en lutoïdes de 0,5 ou l % (p/v). La réaction est initiée par l'addition du NAD(P)H.

4 - Mesure des activités NAD(P)H ferrycyanure ou dichlorophénolindophénol oxydoréductase :

Les mesures sont réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites pour les mesures des activités NAD(P)H cytochrome <u>c</u> ocydoréductases.

Le cytochrome <u>c</u> est remplacé par le ferrycyanure (500 μ M) dont on suit la réduction à 420 nm (MOREAU et al. ; 1975), ou par le dichlorophénol-indophénol (500 μ l d'une solution saturée à pH 7,0 pour un volume total de milieu réactionnel égal à 3 ml) dont on suit la réduction à 540 nm.

5 - Mesure des activités cytochrome c oxydase :

a) Réduction chimique du cytochrome c :

Le substrat de la réaction (ferrocytochrome <u>c</u>) est préparé selon la technique suivante : une solution de ferricytochrome (environ 3 mM) tamponnée par Hepes 50 mM, ajustée à pH 7,0 par Tris, est réduite chimiquement par quelques cristaux de dithionite. La solution est ensuite éluée sur une petite colonne de Sephadex G-25 par un tampon Hepes-Tris 20 mM, K_2SO_4 50 mM à pH 7,0. Les différentes fractions de ferrocytochrome <u>c</u> sont collectées. Les fractions sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur PM-10, sous 3 bar d'azote. La concentration finale de la solution de cytochrome <u>c</u> réduit est estimée spectrophotométriquement à 550 nm; où le coefficient d'extinction (réduit-oxydé) est de 21 mM⁻¹.cm⁻¹.

b) Recherche d'une activité cytochrome c oxydase :

- On suit l'oxydation du ferro cytochrome <u>c</u> à 550 nm, dans un tampon isotonique saturé en air (mannitol 0,3 M, Hepes-Mes 25 mM, ajusté à pH 7,0 par Tris, K_2SO_450 mM) en présence de ferrocytochrome 100 μ M, et en présence ou non de KCN 1 mM. Le volume total du milieu réactionnel est

de 3 ml, et la concentration en lutoïdes est de 0,5 ou l % (p/v). La réaction est initiée par l'addition des lutoïdes intacts ou préalablement soniqués.

- On a également recherché une consommation d'oxygène par des suspensions de lutoïdes intacts ou soniqués (10 % p/v), au moyen d'une électrode de CLARK, dans les mêmes conditions de milieu d'incubation que celles indiquées ci-dessus (pH 7,0 et 26°C), en présence ou non d'ATP (100 µm) et d'ADP (500 µM).

6 - Recherche d'activités succinate déshydrogénases :

Les activités succinates deshydrogénases de type mitochondrial ont été recherchées en mesurant la consommation d'oxygène par une suspension de lutoïdes lavés, intacts ou soniqués (10 % p/v), dans un tampon isotonique (Hepes-Mes 50 mM, ajusté à pH 7,0 par Tris- K_2SO_450 mM, saturé en air) contenant ou non de l'ATP-Mg 100 μ M, de l'ADP 500 μ M, en présence de NAD 500 μ M. La réaction est initiée par l'addition de succinate 10 mM (concentration finale). L'effet de KCN (1 mM) a été testé.

7 - Mesure des activités NAD(P)H oxydases :

Ces activités sont mesurées de deux façons (température 25-26°C): a) <u>On suit l'oxydation du NAD(P)H au spectrophotomètre</u> à 340 nm. Le milieu réactionnel contient du mannitol 0,3 M, du tampon Tris-Hepes ou Tris-HCl (50 mM) à pH 7,4 (BERGMEYER, 1965). Le volume du milieu réactionnel est de 3 ml, la concentration en NADH généralement 500 µM, ou en NADPH 250 µM. La concentration finale en lutoïdes est de 0,5 ou 1 % (p/v). Lorsque les teneurs en protéines ont été déterminées, les activités sont exprimées en µM de NAD(P)H oxydé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine. Dans le cas contraire les activités sont ramenées à 100 µl de l'extrait.

b) <u>On suit la consommation d'oxygène</u> (électrode de CLARK) par une suspension de lutoïdes intacts ou soniqués (5 % p/v) en présence de NADH l mM ou de NADPH 250 μ M dans le tampon isotonique décrit précédemment, saturé en air. Le volume total du milieu réactionnel est de 5 ml. Les résultats sont le plus souvent exprimés en μ l d'oxygène consommé en 10 minutes pour 250 μ l de lutoïdes, la réaction n'étant pas toujours linéaire.

Dans les deux cas de mesure les réactions sont initiées par l'addition du NAD(P)H.

8 - Mesure des activités malate deshydrogénases (MDH) :

La MDH est dosée selon la méthode d'OCHOA (1955), à pH 7,5, dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 en présence de NADH (0,1 mM) et d'oxaloacétate (0,5 mM). Le volume total du milieu réactionnel est de 3 ml. L'oxydation du NADH est suivie au spectrophotomètre à 340 nM. La mesure est faite par rapport à un témoin sans oxaloacétate. La réaction est initiée par l'addition de l'oxaloacétate.

9 - Les catalases :

Les activités catalases ont été estimées en mesurant l'oxygène dégagé à partir de l'eau oxygénée à l'aide d'un oxygraphe équipé d'une électrode de CLARK. Le milieu réactionnel (phosphate 20 mM à pH 7,0 ; H_2O_2 à 0,7 %) est maintenu sous barbotage d'azote désoxygéné (pyrogallol-NaOH 2N) afin de chasser l'oxygène dissout. La teneur en O_2 ne représente alors plus que 20 à 30 % de la teneur en oxygène présent dans le même tampon maintenu sous barbotage d'air à 25°C (considéré comme 100 %). L'échantillon est injecté directement dans la cuve de dosage.

10 - Les polyphénols oxidases :

L'activité O-diphénol oxydase (O-DPO) est mesurée en utilisant la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) à 0,1 % en présence de CaCl₂ (5 mM) dans un tampon cacodylate 0,1 M à pH 6,0 maintenu sous barbotage d'air.

Les activités ont été suivies selon deux méthodes :

- apparition de la coloration orange à 450 nm due à l'oxydation de la DOPA (LANCE, 1963 ; BZROZOWSKA et al. 1978).
- consommation de l'oxygène mesurée à l'aide d'un oxygraphe. Le tampon maintenu sous barbotage d'air (saturation 100 %) contient environ 5 μ l d'O₂ par ml à 25°C.

Dans tous les cas, la suspension est maintenue sous agitation magnétique pendant les mesures.

11 - Les peroxydases : (CHANCE et MAEHLY, 1955)

Les activités peroxydases sont déterminées en utilisant le gaïacol comme substrat. Le milieu d'incubation contient le tampon cacodylate (100 mM ; pH : 6,0), $CaCl_2$ 5 mM, gaïacol 16 mM et 0,75 % d'H₂O₂. La cinétique (vitesse initiale) est enregistrée directement au spectrophotomètre à 470 nm. La suspension est maintenue sous agitation magnétique pendant les mesures.

12 - Production de radicaux superoxydes $(\overline{0_2})$:

Trois méthodes ont été testées :

a) en suivant la cooxidation de l'épinéphrine en adrénochrome induite par la présence des radicaux $0\frac{1}{2}$ (MISRA et FRIDOVICH, 1972).

La réaction est suivie au spectrophotomètre à 480 nm et quantifiée en utilisant un coefficient d'extinction molaire $\varepsilon = 2,96 \text{ mM}^{-1}$ cm⁻¹. Le milieu réactionnel est composé d'une solution tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,4, contenant de l'épinéphrine (Noradrénaline) 1 mM. La réaction est initiée par l'addition de NAD(P)H 1 mM.

b) <u>La réduction non enzymatique du cytochrome C</u> par l'anion superoxyde (FRIDOVICH, 1970).

Le milieu d'incubation contient du cytochrome C (250 µM) en solution dans un tampon Tris-HCl 50 mM(pH 7,4)saturé en air. La réaction est initiée par l'addition successive de 50 µl d'extrait lutoïdique, et après stabilisation, de NADH (0,5 mM final). La réduction du cytochrome C est suivie au spectrophotomètre à 550 nm.

c) En utilisant l'essai mis au point par BEAUCHAMP et FRIDOVICH (1971) consistant à suivre la <u>réduction du bleu nitré de tetrazolium</u> (NBT à l mg/ml) par les radicaux superoxydes. L'apparition du formazan est dosée à 560 nm, dans un tampon Tris HCl 50 mM à pH 7,4.

13 - <u>Superoxyde dismutase</u> (SOD) : Cette enzyme catalyse la réaction $0_{\overline{2}}^{-} + 0_{\overline{2}}^{-} + 2H^{+} + H_{2}O_{2} + O_{2}$

Nous avons utilisé la méthode de BEAUCHAMP et FRIDOVICH (1971) dans laquelle les radicaux superoxydes sont générés par la xanthine $(10^{-4}M)$ en présence de xanthine oxydase, et détectés en suivant à 560 nm la réduction du NBT (1 mg/ml) en formozan à pH 7,4. La superoxyde dismutase est estimée par l'aptitude de l'échantillon à inhiber l'apparition du formazan grâce au piégeage spécifique des superoxydes par la SOD.

La quantification des activités SOD a été effectuée selon la méthode de ASADA *et al*. (1974) et GIANNOPOLIS et BIES (1977) utilisant la relation linéaire entre la concentration en SOD et le rapport V/v, selon l'équation :

V/v = 1 + K' (SOD)

où V et v représentent les vitesses de réaction d'apparition du formazan en absence et présence de SOD, respectivement.

Dans ces conditions K' (SOD) = $(\frac{V}{v})$ - 1 ; à 50 % d'inhibition de la réduction du formazan, K' (SOD) est égal à l'unité.

Si "l'unité SOD" est définie comme la quantité d'enzyme pour laquelle K' (SOD) = l (c'est-à-dire provoquant une inhibition de 50 % de l'apparition du formazan), la quantité de SOD de l'extrait peut être déterminée directement à partir du rapport V/v selon l'équation :

SOD unités/ml = $(V/v - 1) \times (dilution)$.

14 - Mise en évidence des activités glutathion réductases :

Deux méthodes ont été testées :

a) <u>Suivi cinétique de la consommation du NAD(P)H à 340 nm</u>, selon la méthode de SHAEDLE et BASSHAM (1977) modifiée. Le milieu d'incubation est constitué de tampon phosphate 50 mM à pH 7,0, EDTA 1 mM, glutathion oxydé 1 mM et NAD(P)H 250 µM. La mesure est effectuée contre un témoin sans glutathion. Le volume réactionnel est de 3 ml au total. La quantité de matériel végétal ajoutée est de 50 ou 100 µl. La réaction est initiée par l'addition du GSSG.

b) Mesure de la réduction du GSSG en GSH,

La réduction du GSSG en GSH a été déterminée par dosage des thiols acido solubles, selon la méthode de ELLMAN (1959). L'incubation est dans ce cas conduite en tampon phosphate à pH 6,8 en présence de GSSG 4 mM et de NAD(P)H 2,5 mM. Le volume total du milieu réactionnel est de 3,5 ml. La réaction est initiée par l'addition du NAD(P)H. On prélève manuellement, en fonction du temps, une partie du milieu d'incubation (250 μ l) dont on arrête la réaction par acidification à l'acide trichloracétique (0,1 N final) à 4°C. Après élimination des protéines par centrifugation (9000 x g; 3 min.), les thiols réduits acido-solubles sont dosés par l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (voir dosage des composés thiols du latex dans ce chapitre).

15 - Mise en évidence des activités glutathion peroxydases :

L'activité glutathion peroxydase a été estimée en mesurant indirectement la peroxydation du GSH, par dosage du GSH résiduel (ZAKOVSKI et TAPPEL, 1978) après incubation en présence de tertio-butyl hydroperoxyde (t-bu) ou d'H₂O₂. L'incubation est effectuée dans un tampon phosphate (50 mM) à pH 6,8 en présence de GSH 2 mM et de t-bu 0,5 mM ou d'H₂O₂. La réaction est initiée par l'addition du GSH. On prélève manuellement, en fonction du temps, une partie du milieu d'incubation (250 μ l), sur laquelle on dose le GSH résiduel, après acidification par TCA (0,1 N final), comme décrit précédemment.

16 - Mise en évidence des activités glyoxalases I :

L'activité glyoxalase I est suivie directement en mesurant au spectrophotomêtre (240 nm) l'apparition de S-lactoyl-glutathion, produit de la réaction de la glyoxalase I en présence de méthylglyoxal et de GSH (RACKER, 1952). Le milieu réactionnel est composé de tampon phosphate (50 mM) à pH 6,8 en présence de GSH 2 mM et de méthylglyoxal 45 µM. La réaction est initiée par l'addition du methylglyoxal.

IV - MISE EN ÉVIDENCE ELECTROPHORETIQUE DES ENZYMES :

1 - Electrophorèses sur gel de polyacrylamide :

Nous avons utilisé la méthode d'ORNSTEIN et DAVIS (1964). Les migrations sont réalisées avec un appareil SHANDON, dans les conditions expérimentales suivantes : gel contenant 7,5 % d'acrylamide, tampon Tris 50 mM glycine 380 mM, pH 8,3, un courant de 2,5 mA par tube à température ambiante, durée environ 80 minutes (migration complète du bleu de bromophénol). 10 μ 1 de sérum lutoïdique ou 25 μ 1 de sérum cytosolique chargés en saccharose (10 %) sont déposés au sommet des tubes.

Les isoenzymes sont révélés de la manière suivante :

a) Catalases :

Les gels sont incubés quelques minutes dans un tampon phosphate 20 mM à pH 7 en présence d'eau oxygénée à 0,1 volume, puis rincés abondamment à l'eau distillée. Les enzymes sont révélées par incubation des gels dans une solution préparée extemporanéement , de ferricyanure de potassium à 1 % et de chlorure ferrique 1 %. Les enzymes apparaissent sous forme de zone jaune sur fond bleu (HARRIS et HOPKINSON, 1976).

b) Superoxyde dismutases (SOD) :

Les gels sont préincubés 30 minutes dans un tampon Tris HCl 50 mM pH 7,4 en présence de NBT 3.10⁻³M. Après rinçage rapide, ils sont immergés dans une solution tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,4, contenant de la tetraméthylènediamine 30 mM et de la riboflavine 30 mM pendant 15 minutes environ, puis exposés à la lumière (lampe UV) jusqu'à coloration du gel d'un bleu uniforme, à l'exception de zones incolores correspondant aux isosymes de la SOD (BEAUCHAMP et FRIDOVICH, 1971). c) NADH-NBT réductases :

Les gels sont incubés dans un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 contenant du NBT 3 mM et du NAD(P)H 250 µM. Les activités sont localisées sous forme de taches bleu-violette sur fond clair.

d) Glutathion réductases :

Les gels sont incubés (15 à 30 minutes) dans un tampon phosphate 50 mM à pH 7,0, contenant du NBT (1 mg.m1⁻¹) en présence de NAD(P)H 250 μ M et en présence ou en absence de GSSG afin de discriminer les activités GSSG réductases des activités diaphorases ou NAD(P)H oxydases (HAR-RIS et HOPKINSON, 1976).

2 - Electrophorèse sur plaque de gel d'amidon :

Les électrophorèses ont été effectuées selon la technique horizontale décrite par SMITHIES (1955) sur gel d'amidon à 14 %. Des rondelles de papier WHATMAN N° 3 de 6 mm de diamètre imbibées de sérum lutoïdique ou cytoplasmique (de différentes dilutions) ont été disposées entre anode et cathode du gel (côté (-)).

Deux systèmes ont été testés :

- le système de BREWER (1970) : tampon "gel": histidine 5 mM, NaCl 2,5 mM(pH 6), et tampon d'électrophorèse citrate 0,41 M à pH 6 ; voltage 250 V et 15 mA par plaque,
- le système de SMITHIES (1955) : tampon "gel": acide borique 30 mM ajusté à pH 8,5 par NaOH. Tampon de migration: acide borique 300 mM ajusté à pH 8,0 par NaOH. Voltage 250 V et 15 MA par plaque.

Les révélations suivantes ont été effectuées :

a) Catalase :

Selon la même technique décrite pour les gels de polyacrylamide (2-a)

b) SOD :

Selon la même technique décrite en (2-b)

c) Peroxydases :

Les gels ont été incubés dans un tampon acétate 50 mM à pH 5 comprenant pour 100 ml : 50 mg de 3-amino-N-ethyl carbazole ; 5 ml de diméthyl formamide ; 1 g: de CaCl₂ et 0,3 % d'eau oxygénée (SHAW et PRASAD, 1970).

v - DÉTERMINATION DES TENEURS EN DIVERS SOLUTÉS DANS LE LATEX :

1 - Dosage des composés thiols réduits acido précipitables :

Les thiols réduits du latex sont dosés après dilution du latex au 1/3, sur champ par du mannitol 0,3 M et précipitation immédiate au moyen de TCA (0,1 N final). Des mesures ont été également effectuées sur du cytosol et les lutoïdes isolés par centrifugation. Les protéines sont également précipitées par le TCA (0,1 N final).

Après centrifugation (9000 x g, 3 min.), une fraction des extraits TCA (25 à 100 μ l selon les essais) est incubée 30 minutes en présence d'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB) (0,15 mg.ml⁻¹) dans 2,5 ml de tampon Tris 0,2 M, EDTA 10 mM, à pH 8,0.

La couleur jaune caractéristique de la présence de thiols réduits est mesurée à 412 nm (ELIMAN, 1959), et la quantification effectuée en utilisant le coefficient d'extinction du paranitrophénol déterminé dans ces conditions : $\varepsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}$. cm⁻¹.

2 - Dosage de l'acide ascorbique :

L'acide ascorbique est titré par la réduction du dichlorophénolindophénol (0,25 %) en milieu acide (acide métaphosphorique 0,5 %) afin d'éliminer les interférences dues aux groupements thiols et phénols (ROE, 1964). La quantification est effectuée à partir d'une courbe étalon établie avec de l'acide ascorbique (réduit) pur. Les mesures sont réalisées à partir des "extraits TCA" définis précédemment. La prise d'essai est de 250 ou 500 µl selon les essais.

3 - Dosage du citrate :

Les teneurs en citrate sont déterminées, après dilution adéquate des échantillons, selon la technique deMOELLERING et GRUBER (1966). L'oxydation du NADH quantifiée spectrophotométriquement (366 nm) après l'addition de malate deshydrogénase et de lactate déshydrogénase permet d'estimer les teneurs en acide pyruvique + oxalocetique des échantillons. La consommation du NADH après addition ultérieure de citrate lyase permet de déterminer les teneurs en citrate.

Les teneurs en citrate des différents compartiments du latex (cytosol et lutoïdes) sont déterminées sur des extraits préalablement précipités au PCA (0,1 N final), déprotéinisés par centrifugation (9000 x g, 3 minutes) puis neutralisés par KOH (les dilutions successives sont rigoureusement notées).

Les teneurs en citrate dans les effluents de dialyse sont déterminées directement sur 2 ml de chaque fraction collectée, selon la même technique (MOELLERING et GRUBER, 1966).

4 - Dosage des nucléotides adényliques du latex :

a) Préparation des échantillons :

- Lorsque le prélèvement est effectué au niveau de l'encoche de saignée, les dix premiers ml de latex s'écoulant après le ravivage de l'encoche sont écartés, et les 25 gouttes de latex suivantes sont recueillies dans 5 ml d'un tampon isotonique (mannitol 0,3 M) alcalin (Tris 25 mM, pH 9,5) contenant du molybdate d'ammonium (0,1 mM) afin d'inhiber les activités phosphatases (JACOB et SONTAG, 1974). Lors de la récolte du latex, le tube est constamment agité manuellement et refroidi par de la glace. Ainsi le métabolisme est bloqué immédiatement par le froid et le pH alcalin. Dès la quantité nécessaire de latex recueillie, le mélange est vigoureusement agité et immédiatement "fixé" par 2 ml de TCA 2N, les tubes sont alors conservés dans de la glace jusqu'au retour au laboratoire.

- Lorsque le prélèvement est effectué par micropiqure, au niveau d'un quelconque endroit de l'écorce (jusqu'au cambium), les 3 premières gouttes, s'écoulant par une micro-gouttière, sont écartées, et les 15 suivantes récoltées dans 2,5 ml du même tampon alcalin isotonique. Le mélange est fixé par 1 ml de TCA 2N et traité dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus.

Dès le retour au laboratoire, le caoutchouc coagulé par le TCA est trituré avec une baguette de verre afin d'en extraire tout soluté adsorbé. Il est ensuite rincé à 2 reprises par le TCA 0,5 N. Les coagulums sont enfin desséchés (24 heures à 105°C) puis pesés. Ils serviront de référence. Les teneurs en matière sèche du latex total, déterminées par ailleurs permettent de calculer le volume exact de latex récolté.

Les "extraits TCA" sont centrifugés (17.000 x g, 10 min. à 4°C) puis le TCA éliminé par 3 extractions successives à l'éther (4°C). Les fractions d'éther contenant le TCA sont éliminées par aspiration. L'éther résiduel est évaporé par bullage d'air. Les échantillons sont alors neutralisés par KOH, sous contrôle pH-métrique, puis ajustés à 10 ml (ou 5 pour les micropiqures) par un tampon Hepes-Tris 30 mM, pH 7,4, et conservés au froid jusqu'au dosage (dans la journée).

b) Dosage des nucléotides adényliques :

L'ATP est dosé par la méthode de Bioluminescence, en utilisant le réactif luciferine-luciferase (STREHLER et TOTTER, 1952 ; PRADET, 1967), au moyen d'un luminomètre WALLACK-LKB (modèle 1250) équipé d'un module d'injection et d'un intégrateur digital.

L' ADP et l'AMP sont dosés selon la même technique, après leur phosphorylation en ATP par la pyruvate kinase (PK) en présence de PEP, et l'adenylate kinase (AK) selon la méthode décrite par SAGLIO *et* $a\ell$. (1979). Tous les témoins permettant d'évaluer les rendements des réactions et le pouvoir inhibiteur des extraits sont systématiquement effectués. Les concentrations des nucléotides adényliques sont déterminées à partir de courbes étalon effectuées pour chaque série de dosage, avec des nucléotides adényliques du commerce de la plus grande pureté.

Notons que toute trace de l'ion Cl doit être soigneusement évitéetant dans les extraits que dans les milieux réactionnels, Cl étant un puissant inhibiteur de la luciférase.

Chaque dosage est effectué en 3 ou 4 exemplaires. Chaque tube contient 200 μ l de tampon (Tris H₂SO₄ 30 mM pH 7,4 contenant K₂SO₄ 15 mM et Mg SO₄ 2 mM, EDTA 2 mM), 100 μ l d'une solution contenant le PEP en présence ou non des enzymes AK ou PK, et 50 μ l de l'extrait du latex.

Après 40 minutes d'incubation à 26°C, les dosages sont effectués au luminomètre, sous agitation rotative des tubes, par l'injection de 50 μ l de l'extrait luciférin-lucifèrase (FLE 50 de SIGMA, 5 mg.ml⁻¹)

La constance de la réponse de l'appareil est vérifiée périodiquement au cours des dosages en utilisant un standard contenant 200 picomoles d'ATP.

5 - Dosage des peroxydes lipidiques :

a) Dosage des carbonyls par la 2,4- dinitrophenylhydrazine :

La peroxydation des lipides aboutit à la formation de groupements carbonyls (aldehydes, cétones...) que l'on peut doser par la réaction à la 2,4- dinitrophénylhydrazine (DNPH). A 1 ml d'échantillon à analyser sont ajoutés successivement 0,5 ml de TCA 4N et 1 ml de DNPH 0,1 % dans HCl 2N. Ce milieu réactionnel est incubé 5 minutes à 50°C, puis on ajoute 2 ml d'éthanol absolu et 5 ml de NaOH (N). Le tout est centrifugé 3 minutes à 15.000 g afin d'éliminer le précipité protéique. La couleur brun-orange du surnageant est mesurée au spectrophotomètre à 450 nM; b) Dosage du malondialdéhyde par l'acide 2-thiobarbiturique :

La peroxidation de l'acide linoléique et linolénique aboutit à la formation de malondialdéhyde (MDA). Le MDA libéré est dosé selon la méthode de STANCLIFF *et al*. (1969). La suspension lutoïdique (1 ml) est précipitée par 0,5 ml de TCA à 40 % et 0,25 ml de HC1 5N puis traitée par 0,5 ml d'acide 2-thiobarbiturique (TBA) à 2 %. Les échantillons sont alors placés 10 minutes dans l'eau bouillante sous reflux, puis refroidis dans la glace. Le précipité protéique est éliminé par centrifugation, et la couleur rose des surnageants mesurée à 532 nm ($\varepsilon = 155.000 \text{ M}^{-1}$. cm⁻¹).

6 - Dosage des protéines :

Après précipitation au TCA (ou au PCA)et centrifugation, les protéines sont rapidement lavées à l'éther, puis reprisespar 2 ml (ou plus) de NaOH N contenant 0,1 % de Triton X-100. Elles sont incubées à température ambiante pendant 12 heures environ, puis dosées selon la méthode LOWRY *et al*. (1951) en utilisant le sérum-albumine bovine pour effectuer la gamme étalon.

7 - Mesure des pH :

Les pH sont mesurés au moyen d'une électrode combinée semimicro INGOLD ou BECKMAN, qualité "recherche", reliée à un pH mètre ORION (Modèle 701 A) à affichage digital, équipé d'un module de compensation de température.

Les mesures directes du pH des compartiments cytosolique et vacuolaire du latex, sont effectuées immédiatement après la centrifugation du latex à 4°C (70.000 x g, ou 150.000 x g, 40 minutes) selon les expérimentations. Le cytosol est prélevé par aspiration (seringue) et son pH immédiatement mesuré. Après élimination du surnageant (pâteux) constitué des particules de caoutchouc, le reste de cytosol est éliminé, le tube de centrifugeuse égoutté par renversement et la paroi du tube soigneusement essuyée (Kleenex). Dans le cas de mesures précises, la surface du culot est rapidement rincée par quelques ml de mannitol 0,3 M. Les culots sont alors soniqués pendant 30 secondes, dans un bain de glace, et le pH des lysats immédiatement mesurés. Dans certains cas la mesure du pH intralutoïdique a été effectuée après 3 lavages successifs du sédiment par un tampon Hepes-Tris à pH 7,0, contenant du mannitol 0,3 M.

8 - Mesures des teneurs en matière sèche du latex (TSC) :

Les teneurs en matière sèche du latex sont déterminées par pesée de 0,5 ou l ml de latex, finement étalé dans des boites à tare, avant et après étuvage à 105°C pendant 24 heures (en présence de silicagel).

VI - TECHNIQUES D'INCORPORATION DES MOLÉCULES RADIOACTIVES PAR LES LUTOÏDES INTACTS :

1 - Conditions standards d'incubation :

La plupart des expériences sont effectuées à pH 7,0 et à température ambiante (25 à 27°C).

Sauf indication contraire mentionnée dans le texte, le milieu d'incubation est généralement constitué d'un tampon isotonique (mannitol 0,3 M) Hepes-Mes 50 mM ajusté à pH 7,0 par Tris, contenant $MgSO_4$ 3mM, du molybdate d'ammonium 0,1 mM et dans le cas de la détermination des Δ pH ou $\Delta\Psi$, respectivement de la méthylamine (0,1 mM) ou du méthyltriphénylphosphonium (Br) 0,2 mM.

La présence d'autres effecteurs et leurs concentrations sont indiquées dans le texte ou dans la légende des figures.

2 - Mesure de la distribution transmembranaire des molécules lipophiles :

a) Cas de la technique de cinétique de dialyse en flot continu :

La conception des appareils de cinétique de dialyse en flot continu et le principe de la méthode sont décrits dans un chapitre spécial (voir VII). Mentionnons simplement ici que cette technique permet de suivre en continu, la cinétique des variations des concentrations de marqueurs radioactifs dans le "milieu extérieur" d'une suspension d'organites. Elle permet en particulier d'estimer les ΔpH et $\Delta \Psi$ transtonoplastiques, dans la mesure où l'on détermine par ailleurs le volume interne des organites étudiées. Elle donne ainsi directement une estimation des Δ pH et $\Delta \Psi$, et permet de calculer les pH intravacuolaires par simple différence, si l'on connait le pH du milieu d'incubation extérieur. C'est généralement le cas, le milieu d'incubation étant fortement tamponné (50 mM minimum) d'une part, et l'on en contrôle périodiquement la valeur (pH mètre) au cours des expérimentations, d'autre part. Les lutoïdes sont mis en suspension dans le tampon standard, par quelques pipettages doux. Leur concentration dans la suspension est en général de l'ordre de 12 à 15 % (p/v). Sauf cas particulier, le milieu de préincubation est dépourvu de tout effecteur énergétique.

La suspension est préincubée 20 minutes (sur agitateur orbital, à faible vitesse), à température ambiante, en présence d'environ 3,3 µci.ml⁻¹ des sondes radioactives ¹⁴C-méthylamine, ¹⁴C-méthyltriphényl phosphonium, ¹⁴C-thiocyanate ou ⁸⁶ Rubidium, ou encore de 10 µci.ml⁻¹ de ³H-tetraphényl phosphonium. C'est le temps que nous avons jugé nécessaire pour que soit atteint, avec sureté, l'équilibre de distribution de la plupart des sondes utilisées. Lorsque plusieurs expériences sont réalisées simultanément, la quantité de suspension nécessaire à l'ensemble des expériences est préparée et marquée d'une façon homogène. Après la période de préincubation, des fractions de 3 ml sont réparties dans chaque appareil de dialyse.

b) Cas de la technique dite "de centrifugation" :

Les lutoïdes mis en suspension dans le tampon standard (10 à 15 % p/v) <u>sont préincubés 20 minutes</u>, à température ambiante en présence de 0,1 μ ci.ml⁻¹ de sondes radioactives marquées au ¹⁴C où de ⁸⁶Rb⁺, ou encore de 0,3 μ ci.ml⁻¹ de sondes tritiées.

La suspension est répartie à raison de 2,5 ml dans des tubes de centrifugation à usage unique préalablement tarés. Les différentes molécules effectrices sont ensuite ajoutées. Les volumes sont ajustés d'une façon homogène par du tampon. <u>Après 20 minutes, les incubations sont arrêtées</u> en plongeant les tubes dans de la glace fondante, et centrifugation immédiate (30.000 x g, 10 minutes). Dans le cas de la mesure des activités pompe à protons, dépendante de l'ATP-Mg, les incubations sont arrêtées grâce à l'addition de NEM (500 μ M final) qui bloque instantanément l'activité ATPase et la pompe à H⁺ qui lui est associée, sans pour autant modifier les gradients de protons ou de potentiel transtonoplastiques initiaux ou nouvellement engendrés (GIDROL, 1984). Les essais sont réalisés en 2 exemplaires, au minimum.

Après centrifugation, une partie de surnageant de chaque tube est prélevée (1 ml), le reste est éliminé. Les tubes sont alors soigneusement égouttés, leur paroi essuyée, et le poids du culot déterminé. Les culots lutoïdiques sont alors repris par 500 µl de Triton X-100 (0,1 %) acétate 25 mM pH 4,5, puis vigoureusement agités, et incubés environ une heure

à température ambiante afin d'obtenir un lysat parfaitement fluide. Enfin la totalité du lysat est transférée dans les fioles à scintillation, et les tubes "lavés"à 2 reprises par 2,5 ml de solution scintillante, euxmêmes transvasés dans les fioles de scintillation correspondante.

La radioactivité des surnageants est comptée sur des prélèvements de 250 ou 500 µl, complétés dans les fioles respectivement par 750 ou 500 µl de Triton X-100, acétate.

3 - Estimation des volumes intravacuolaires :

Les estimations des volumes intravacuolaires sont effectuées parallèlement mais indépendamment des mesures de distribution transmembranaire des autres solutés. Pour chaque expérience (en cinétique de dialyse ou par centrifugation) une partie de la suspension lutoïdique est incubée en présence d'³H₂O (0,3 μ Ci.ml⁻¹) et de ¹⁴C-inuline (0,1 μ Ci.ml⁻¹) en présence d'inuline non marquée (0,3 mM), pendant 20 minutes au minimum. Des fractions de 2,5 ml sont ensuite réparties dans des tubes de centrifugation et centrifugées à 30.000 x g pendant 10 minutes. Les fractions surnageante et sédimentée sont ensuite traitées comme explicité dans le paragraphe précédent traitant de la technique de centrifugation.

Le principe du calcul des volumes intra-organites repose sur deux postulats (REIJNGOUD et TAGER, 1973) :

- l'eau tritiée se distribue uniformément entre les divers compartiments, et sa pénétration au travers de la membrane lutoïdique ne dépend d'aucun processus actif. Elle est supposée procéder d'une simple diffusion transmembranaire jusqu'à l'équilibre. Nous avons vérifié la validité de ce postulat : l'équilibre est atteint après environ 10 à 12 minutes d'incubation. Ainsi, à l'équilibre, la quantité d'eau tritiée permet d'évaluer le "volume liquide total" du culot de centrifugation. Il correspond à la somme des volumes intersticiel et intraparticulaire, à l'exclusion du volume membranaire.

- les macromolécules inertes (Dextran ou inuline) sont supposées ne pas pénétrer à l'intérieur des organites, et ne pas s'adsorber sur les structures membranaires étudiées. Nous avons vérifié que c'est le cas de l'inuline pour les lutoïdes. L'inuline constitue donc un marqueur imperméant permettant de quantifier le volume intersticiel, c'est-à-dire la contamination du culot par le milieu d'incubation extérieur aux organites.

Le volume intralutoïdique pourra donc être estimé à partir de la détermination :
- du volume liquide total du culot, appelé "espace eau" (E(H $_2^{\rm O}))$ marqué par l'eau tritiée ;

- du volume intersticiel marqué par la C¹⁴-inuline, appelé "espace inuline" (E(In))

Le volume intralutoïdique (Vi) correspond donc à :

$$Vi = E(H_2O) - E(In)$$

en notant : Vs : le volume connu (en μ1) de la prise de comptage du surnageant; Hs : les dpm³H enregistrés dans la prise de comptage du surnageant; Cs : les dpm¹⁴C " " " " " ; et :

Hc : les dpm 3 H enregistrés dans la totalité du culot; Cc : les dpm 14 C " " " ;

Si la solution que constitue le surnageant est parfaitement homogène : Vs = Hs = Cs

On détermine alors les "espaces eau" et "espace inuline" du culot :

$$E(H_2O) = \frac{Hc}{Hs} \cdot Vs$$
 et $E(In) = \frac{Cs}{Cs} \cdot Vs$

Le volume intralutoïdique (Vi) est calculé en appliquant la formule :

Vi = E (H₂O) - E (In) =
$$\frac{\text{Hc}}{\text{Hs}} - \frac{\text{Cc}}{\text{Cs}}$$
 • Vs exprimé en µ1

Le calcul des volumes intralutoïdiques corrigés pour chaque tube par le poids du culot, et la détermination par ailleurs des quantités de solutés accumulées et de leur répartition entre les compartiments internes et externes, permettent la détermination des concentrations des sondes ou des solutés dans les deux compartiments. 5 - Préparation des échantillons pour les mesures de radioactivité :

Les volumes des échantillons radioactifs à compter sont systématiquement complétés à 1 ml par une solution de Triton X-100 (0,1 %) contenant de l'acétate 25 mM à pH 4,5 (acidification afin d'éviter tout phénomène de chimie-luminescence à pH légèrement alcalin).

> Le milieu scintillant est composé, pour un litre au total, de : - 666 ml de toluène

- 334 m1 de Triton X-100

- 5 gr de PPO (2,5-diphényl-oxazole)

- 0,5 gr. de POPOP (1,4-di(5-phényl-oxazol-) benzène).

On ajoute l volume de l'échantillon aqueux à 9 volumes de liquide scintillant. Les comptages sont effectués dans un compteur à scintillation en phase liquide INTERTECHNIQUE SL-40, avec correction de quenching par étalon externe.



«DYALYSE A ECOULEMENT CONTINU»

<u>Schéma 1</u> : MISE EN EOUVRE D'UNE EXPERIMENTATION SELON LA TECHNIQUE DE "DTALYSE A ECOULEMENT CONTINU".

Le Schéma illustre une cellule de dialyse à écoulement continu vue en coupe. Le compartiment d'incubabion supérieur, contenant une suspension d'organites radioactive, est séparé du compartiment inférieur, dans lequel circule à débit constant le tampon de dialyse, par une membrane de dialyse.

La radioactivité détectée dans l'effluent de dialyse, à la sortie du compartiment d'écoulement, est proportionnelle à la concentration du soluté radioactif libre du milieu extérieur de la suspension contenue dans le compartiment d'incubation supérieur. A l'équilibre on enregistre une cinétique décroissante de la radioactivité dans l'effluent, par suite de l'évacuation régulière d'une proportion constante des solutés traversant librement la membrane de dialyse. Toute perturbation entrainant, dans le milieu d'incubation, une diminution ou une augmentation de la concentration du soluté radioactif libre dans le milieu extérieur de la suspension, se traduit par des variations proportionnelles, et dans le même sens, de la radioactivité détectée dans l'effluent de dialyse.

VII - CONCEPTION ET REALISATION DES APPAREILS DE DIALYSE

A FLOT CONTINU

1) PRINCIPE

La technique de cinétique de dialyse à écoulement continu a été mise au point par COLLOWICK et WOMACK (1969). Elle a été reprise par un certain nombre d'auteurs, dans le but d'étudier les flux transmembranaires de divers solutés, à partir de vésicules membranaires d'*E.Coli* (RAMOS *et al.*, 1976) de *Paracoccus denitrificans* (KELL *et al.* 1978), ou de particules submitochondriales (SORGATO *et al.* 1978). Cette méthode consiste à suivre, sur une même suspension, la cinétique d'évolution des concentrations d'un soluté particulier, dans le milieu extérieur au sein duquel baignent les particules membranaires.

La cellule de dialyse est constituée de deux compartiments séparés par une membrane de dialyse de porosité définie, ne laissant pas passer les macro-structures biologiques (macro-molécules, vésicules membranaires, organites,...), mais par contre librement perméable aux solutés étudiés. On définit ainsi deux compartiments :

- l compartiment supérieur, appelé "compartiment d'incubation" contenant la suspension de matériel biologique, et dans lequel se réalisent les expérimentations. La suspension y est maintenue sous agitation constante (mécanique ou magnétique).

- l compartiment inférieur, séparé du premier par la membrane de dialyse, dans lequel circule, à débit constant, et sous agitation magnétique rapide, le tampon de dialyse. Le tampon circulant dans ce "compartiment d'écoulement", est de même composition que le tampon utilisé dans le compartiment d'incubation supérieur, afin de limiter les éventuelles perturbations de la dialyse, par des phénomènes autres que celui se rapportant aux solutés étudiés (seuls le matériel biologique et le marqueur radioactif sont absents).

L'évolution des concentrations du soluté, analysé dans le tampon de dialyse effluant traduit indirectement les variations de contration de ce même soluté dans le milieu extérieur de la suspension présent dans le compartiment d'incubation supérieur.



Photo 1 : DEUX TYPES DE CELLULE DE DIALYSE A ECOULEMENT CONTINU

- a) Cellule parallélipédique (dialyses multiples)
- b) Cellule cylindrique à réponse rapide (dialyse automatique)



Photo 2 : MONTAGE DE QUATRE CELLULES DE DIALYSE EN PARALLELE POUR LES ANALYSES SIMULTANEES DE ROUTINE (Les prélèvements et les comptages sont effectués manuellement) Ainsi, toute absorption (ou adsorption) du soluté par les structures biologiques aboutit à une diminution de la concentration en ce soluté libre dans le milieu extérieur de la suspension (tampon d'incubation) et se traduit par une diminution, normalement proportionnelle, de la concentration de ce soluté, de l'autre côté de la membrane de dialyse, c'està-dire dans l'effluent de dialyse. Inversement, toute exorption (ou désorption) du soluté, préalablement accumulé (ou fixé) par les structures biologiques, se traduit par une augmentation de sa concentration dans le milieu d'incubation, et donc dans le flot de dialyse.

Généralement, des marqueurs radioactifs sont utilisés. Ils permettent une détection rapide et précise des phénomènes à observer.

2) MONTAGE DE CELLULES DE DIALYSE, EN PARALLELE, POUR LES EXPERIENCES DE SERIES

Les cellules de dialyse sont fabriquées au laboratoire. Elles sont constituées de deux blocs de résine polyester, rectangulaires,(schéma 1 et photos 1-a et 2), percés en leur centre d'un orifice cylindrique, formant le compartiment d'incubation supérieur (volume = 6 ml), ouvert aux deux extrémités, et un compartiment inférieur (volume = 2 ml) fermé à une extrémité. Ce dernier compartiment est percé, à mi-hauteur, de deux petits orífices opposés, munis de buses en téflon, constituant l'entrée et la sortie de l'écoulement continu. Lors de la mise en service de la cellule, les deux compartiments sont alors accolés, comprimés et verrouillés par un système de boulons et de pinces, en ayant pris soin, auparavant, de déposer un barreau aimanté dans le compartiment inférieur, et d'intercaler la membrane de dialyse prétraitée (30 min. à 100°C, pH 8,0), entre les deux faces dépolies, parfaitement planes. La surface d'échange entre les deux compartiments (membrane de dialyse) est d'envir u 4,5 cm².

Une entrée de flot continu de chaque cuve inférieur , est connectée à la réserve de tampon, et la sortie est reliée à une pompe péristaltique multicanaux, qui envoie les dialysats vers les collecteurs de fractions.

Les cellules de dialyse prêtes à l'emploi sont alors fixées sur des agitateurs magnétiques de mêmes caractéristiques. Après avoir pris soin d'éliminer toute bulle d'air dans le compartiment d'écoulement, le débit de chaque cellule est contrôlé, et éventuellement homogénéisé. L'échantillon à étudier est alors déposé dans le compartiment supérieur, et maintenu sous agitation mécanique douce (1 tour/seconde) durant toute



<u>Photo 3</u> : DETAIL DU MONTAGE DE L'APPAREIL DE CINETIQUE DE DIALYSE AUTOMATIQUE.

La cellule de dialyse cylindrique à réponse rapide est fixée sur un micro-agitateur magnétique. Les aiguilles des 4 injecteurs programmés (programmeur au-dessus, hors de la photo) convergent dans le compartiment supérieur, au niveau de l'axe de l'agitateur mécanique situé audessus. L'effluent de dialyse est dirigé vers la pompe péristaltique qui envoie le liquidé radioactif vers le mélangeur de scintillant, situé à l'arrière plan. La réserve de tampon de dialyse est également visible à l'arrière-plan. la manipulation (dans les montages en parallèle, les agitateurs sont couplés par un système de courroies).

En routine, jusqu'à quatre (parfois six) cellules de dialyse sont mises en service simultanément (photo 2).Ces montages en parallèle permettent ainsi, de réaliser, à partir d'une même suspension homogène au départ, en même temps, des expériences de contrôle, d'inhibition et d'observation des phénomènes recherchés, dans des conditions expérimentales aussi homogènes que possible.

L'addition des effecteurs et l'analyse des effluents sont dans ce cas effectuées manuellement, pour chaque motif expérimental.

3) REALISATION D'UNE CELLULE DE DIALYSE, ENTIEREMENT AUTOMATISEE

Les expériences de dialyses multiples, en parallèle, offrent un avantage méthodologique énorme lorsque l'on désire réaliser simultanément des cinétiques détaillées sur plusieurs motifs expérimentaux, dans des conditions aussi homogènes que possible. Elles permettent en l'occurence des manipulations comparatives, avec motifs de contrôle, permettant les quantifications ultérieures. Cependant cette méthode manuelle nécessite la présence quasi-constante de l'expérimentateur à proximité du montage. Par ailleurs, les analyses chimiques et comptages radioactifs, sont effectués à partir de fractions des dialysats prélevées manuellement, traitées, puis comptées ultérieurement. Les résultats ne sont donc pas accessibles immédiatement. Enfin, en l'absence d'expériences préliminaires permettant d'évaluer la cinétique même approximative caractérisant l'installation d'un nouvel état d'équilibre consécutif à l'addition d'un substrat ou effecteur, les additions séquentielles de nouveaux effecteurs, peut donner lieu à des perturbations cumulatives des équilibres et donc à des interprétations erronées.

Nous avons donc mis au point un montage de dialyse à écoulement continu, entièrement automatisé, permettant d'une part de visualiser rapidement (3 à 4 minutes) les phénomènes engendrés par l'addition des substrats ou effecteurs testés, et d'autre part d'injecter automatiquement ces substrats ou effecteurs dans le compartiment supérieur d'incubation, en absence de tout manipulateur (injection automatique programmée). Le montage se compose donc (photos 3,4 et 5):

- d'une série d'injecteurs (jusqu'à 8) dont la mise en service est déclenchée par l'action d'un mécanisme électromagnétique, libérant

Ĥ



<u>Photo 4</u> : DETAIL DU MONTAGE DE LA CELLULE DE DIALYSE AUTOMATIQUE La cellule de dialyse à réponse rapide est fixée sur un microagitateur-magnétique. On aperçoit la membrane de dialyse séparant les 2 compartiments, ainsi que l'entrée et la sortie par lesquel-

les circule le tampon de dialyse, dans le compartiment inférieur.



<u>Photo 5</u> : VUE D'ENSEMBLE DU MONTAGE DE L'APPAREIL DE CINETIQUE DE DIALYSE AUTOMATIQUE On notera à l'arrière-plan : la cellule de comptage en continu

On notera à l'arrière-plan : la cellule de comptage en continu (sortie du spectrophotomètre à scintillation), le détecteur d'écoulement continu, et le coupe circuit de sécurité qui lui est ' couplé, placé au premier plan. le piston de chaque seringue, selon une séquence temporelle programmée électroniquement (déclenchement simultané ou non de plusieurs seringues ; intervalles de temps réglables, fixes ou variables selon le protocole expérimental). Les injecteurs préalablement chargés de leurs effecteurs, sont fixés au-dessus de la cellule, de façon à ce que leurs aiguilles convergent à la surface de la suspension, à proximité de l'axe de l'agitateur relatif (photos 3 et 4).

- d'une cellule en plexiglass "à réponse rapide" (volume du compartiment d'écoulement du dialysat réduit à 0,8 ml), fixée sur un micro-agitateur magnétique. Le compartiment d'incubation supérieur est maintenu sous agitation douce par un agitateur rotatif à palette inclinée (1 tour/seconde) (photos 1b et 4).

- l'écoulement du tampon de dialyse est assuré par le fonctionnement d'une pompe péristaltique à débit finement régulé (2,5 ou 3 ml/ minute), et fonctionnant en aspiration au-travers de la cellule (photo 3).

- en sortie de pompe, le dialysat contenant le soluté radioactif est alors éventuellement séparé en deux parties ; l'une est soit évacuée directement dans un collecteur de déchets radioactifs, soit récupérée par un collecteur de fractions (pour analyses ultérieures, ou vérifications). L'autre partie (0,5 ou l ml/min) est dirigée vers un mélangeur automatique en continu, de liquide scintillant (rapport volumes : scintillant/ dialysat radioactif aqueux = 7,5)(photo 5);

- le mélange șcintillant radioactif est alors amené, par un tube souple résistant aux solvants organiques, vers une cellule de comptage en continu (serpentin en quartz), installée dans un compteur de scintillation en phase liquide (Intertechnique) ;

- le mélange analysé, est enfin évacué vers le collecteur de déchets radioactifs (photo 5).

- le système est protégé d'éventuelles fuites, surpressions, ou collematage, par un détecteur d'écoulement continu, relié à un rupteur, coupe circuit des pompes, et à une électrovanne, coupant l'alimentation de la cellule de comptage (noté "sécurité" sur la photo 5);

- les résultats des comptages de radioactivité sont simultanément enregistrés sur en enregistreur (muni d'un convertisseur exponentiel) à partir de la sortie "ictomêtre" du compteur, et leur intégration



Figure 5 : VARIATIONS PROPORTIONNELLES DE LA RADIOACTIVITE RETROUVEE

DANS LE DIALYSAT (COMPARTIMENT INFERIEUR) EN REPONSE AUX DILUTIONS RELLES DE LA RADIOACTIVITE SPECIFIQUE EFFECTUEES DANS LE COMPARTIMENT SUPERIEUR DE LA CELLULE DE DIALYSE.

Les dilutions de la radioactivité spécifique, dans le compartiment supérieur d'incubation, ont été effectuées par des additions successives de quantités connues de tampon (contenant de la méthylamine non radioactive 100 μ M). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité retrouvée à l'équilibre dans le dialysat (ordonnées), et en % de la dilution réelle de la ¹⁴C-méthylamine dans le compartiment d'incubation (abscisses), par rapport aux valeurs initiales respectives (avant toute dilution) de la radioactivité dans chaque compartiment. (cpm) imprimée toutes les minutes, en même temps que la correction de quenching éventuel.

4) CARACTERISTIQUES DES CINETIQUES DE DIALYSE

a) Temps de réponse :

L'analyse des courbes de cinétique de dialyse, pour les expérimentations décrites dans notre mémoire, montre que le temps de réponse moyen de notre appareillage est inférieur à 2 minutes. Il correspond, pour majeure partie, au temps nécessaire au dialysat pour aller de la cellule de dialyse (entrée) jusqu'au collecteur de fraction ou à la cellule de comptage en continu, via les systèmes de pompage.

b) Cinétique quasi-linéaire :

Dans nos conditions expérimentales, les cinétiques de dialyse, sur des temps longs, sont légèrement curvilinéaires descendantes. Elles peuvent être cependant considérées comme linéaires sur des tranches de 70 à 80 minutes.

c) Proportionnalité:

Des expériences de dilution de radioactivité, effectuées par des additions de volumes connus de tampon, dans le compartiment supérieur de la cellule de dialyse, montrent que toute variation de concentration dans le "milieu d'incubation" se traduit par une variation quasi-proportionnelle de la radioactivité apparaissant dans le dialysat. Ainsi (fig. 5) pour des dilutions inférieures à 75 % de la concentration initiale, nous pouvons considérer que la "réponse radioactivité dans le dialysat" est proportionnelle à la dilution réelle (l'écart à la proportionnalité est inférieure à 8 %, pour une dilution de 75 %).

En pratique, tout phénomène d'absorption (ou d'adsorption), correspondant à une immobilisation des molécules radioactives, dialysables à l'état libre dans la cuve supérieure, se traduira par une chute quasi-proportionnelle de la radioactivité dans le dialysat. Inversement, tout phénomène aboutissant au relargage des radioéléments dans le milieu d'incubation, se traduira par une augmentation proportionnelle de la radioactivité dans l'effluent de dialyse.

Dans le cas de très fortes absorptions (> 75 %), l'estimation quantitative sera faite par excès. Par contre, dans le cas de très faibles mouvements de radioéléments (< 5 à 10 %), et surtout en présence de macro-structures biologiques (lutoïdes,...) qui peuvent parfois passablement perturber la régularité des cinétiques de dialyse, l'estimation sera très aléatoire, souvent par défaut. Aussi, nous ne tiendrons pas pour significatives, les variations de comptage inférieures à 5 ou 7,5 % autour de la pente moyenne initiale des cinétiques.

Enfin, cette proportionnalité satisfaisante des réponses de dilutions, permet le calcul simple des corrections, à apporter lors de la quantification des phénomènes observés, tenant compte des dilutions engendrées par les additions successives des substrats et effecteurs.

5) MISE EN OEUVRE, DESCRIPTION ET INTERPRETATION DES CINETIQUES DE DIALYSE

De manière générale, la suspension isotonique de lutoïdes frais (10 à 15 % en poids) est préincubée en présence des sondes radioactives (3 à 10μ ci ml⁻¹). Pour qu'une sonde soit utilisable en tant que telle, il est nécessaire que celle-ci traverse et atteigne rapidement un équilibre stable de part et d'autre de la membrane biologique. C'est le cas pour les lutoïdes puisque toutes les sondes testées (¹⁴C-méthylamine, ³H TPP⁺ ou MTPP⁺, ¹⁴C-SCN et ⁸⁶Rb⁺+ valinomycine), dans des expériences préliminaires décrites plus loin atteignent un équilibre de répartition de part et d'autre du tonoplastelutoïdique frais, après environ 5 à 7 minutes d'incubation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par MARIN (1981), à partir de vésicules lutoïdiques. Cependant, par souci de sécurité, nous avons systématiquement effectué des préincubations de 20 minutes, au minimum, avant de répartir les suspensions marquées (3 ml) dans chaque compartiment d'incubation des cellules de dialyse.

Après introduction de la suspension radioactive, et après moins de 2 minutes de latence, correspondant au temps de réponse de l'appareil, la radioactivité apparaît dans l'effluent. Celle-ci atteint un équilibre de distribution, de part et d'autre de la membrane de dialyse, en moins de 3 à 4 minutes. Dans les fractions suivantes, la quantité de radioactivité diminue lentement et régulièrement, selon une cinétique considérée comme linéaire sur des temps suffisamment courts.L'évacuation continue de la radioactivité par le flot de dialyse correspond, en moyenne, à une disparition d'environ 10 % de la radioactivité initiale par heure (voir par exemple la figure 6). Les différentes additions de substrats ou effecteurs sont effectuées le plus souvent à des intervalles de 20 à 30 minutes, de façon à ce que soit atteint avec certitude un nouvel équilibre stable de dialyse.

En fin d'expérimentation, les lutoïdes sont systématiquement lysés par l'addition de Triton X-100 (0,1 % final) (RIBAILLIER, 1972), afin de libérer dans le milieu extérieur, toute la radioactivité que ces organites ont accumulée, sous forme libre, tout au long de l'expérimentation.

La quantité de radioactivité absorbée (ou exsorbée) lors de l'addition des divers effecteurs et substrats, est déterminée en effectuant la diftérence de la radioactivité présente dans une fraction donnée de l'effluent de dialyse, au cours d'une phase ou la cinétique a atteint un état d'équilibre stabilisé (avant l'addition de Triton), et la quantité de radioactivité qu'il y aurait eu dans cette même fraction si le Triton avait été présent tout au long de l'expérimentation. Vu la quasi-linéarité des cinétiques, cette dernière est estimée par extrapolation, vers les temps zéro, de la radioactivité libérée (à l'équilibre) après l'addition de la dose lytique de Triton. Les volumes intralutoïdiques déterminés par ailleurs, et le volume connu du milieu extérieur permettent de calculer les concentrations du soluté considéré, de part et d'autre du tonoplaste.

PRESENTATION

.

DES

•

.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

.

PARTICIPATION DU COMPARTIMENT VACUOLAIRE : LES LUTOIDES AU MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE CYTOSOLIQUE

AU SEIN DU LATEX D'HEVEA

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I

REGULATION DU PH CYTOSOLIQUE

PAR

LE TONOPLASTE LUTOIDIQUE

REGULATION DU PH CYTOSOLIQUE PAR LE TONOPLASTE LUTOIDIQUE

- A- NATURE ET COMPOSANTES DU GRADIENT DE PROTONS TRANSTONO-PLASTIQUE LUTOÏDIQUE
 - 1- LA MÉTHYLAMINE : SONDE LIPOPHILE ADÉQUATE POUR LA MESURE DU GRADIENT DE PROTONS TRANSTONOPLASTIQUE LUTOÏDIQUE :
 - 1/ GENERALITES :

La taille réduite des lutoïdes (5 à 10 µm en moyenne) interdit l'utilisation de micro-électrodes pour en mesurer les cinétiques d'évolution de leur pH interne. Dans ce cas, la technique de distribution d'une sonde ionique lipophile radioactive ou fluorescente, s'avère une des seules méthodes techniquement aisée à mettre en oeuvre (ROTTENBERG, 1979 ; GILLIES et DEAMER, 1979...).

Le choix de la molécule indicatrice est fonction de la valeur du pH interne du compartiment étudié. En tant que sonde radioactive on utilise couramment la ¹⁴C-méthyl-amine (MeA), base faible s'accumulant dans les compartiments cellulaires les plus acides (ROTTENBERG et al., 1972 ; REINJGOUD et TAGER, 1973 ; KURKDJIAN et GUERN, 1981 ...), ou un acide faible comme la diméthvl-oxazolidine-2,4-dione (DMO) qui s'accumule dans les compartiments les plus basiques (WADDEL et BUTTLER, 1959).

Etant donné le caractère acide du compartiment lutoïdique, nous avons choisi la MeA pour mesurer les gradients transmembranaires de H⁺ développés au niveau du tonoplaste lutoïdique intact.

Il convient toutefois, de vérifier la validité de la méthode utilisée, pour chaque type de cellule ou organite à étudier. D'une part la sonde utilisée doit atteindre rapidement un équilibre de part et d'autre de la membrane biologique, et elle ne doit pas faire, d'autre part, l'objet d'un transport actif, susceptible d'être catalysé par des récepteurs membranaires plus ou moins spécifiques. Notons, par exemple, que selon l'équipe de SMITH, il existerait un transporteur uniport des formes ionisées de la DMO et de la MeA, au niveau du plasmalemme et du tonoplaste des Characées (WALKER et SMITH, 1975 ; SMITH et WALKER, 1976 ; RAVEN et SMITH, 1978 ; DE MICHELIS et al., 1979)

2) PRINCIPE DE LA METHODE :

L'estimation des A pH transmembranaires par la méthode de distribution de la MeA, est basée sur la particularité qu'ont les amines lipophiles, de pK adéquat, de s'accumuler dans les compartiments cellulaires les plus acides.

Elle consiste donc à mesurer la distribution de l'amine marquée entre deux compartiments et à calculer le & pH, en admettant que la concentration de l'amine non chargée (R-NH2) est identique dans les deux compartiments, ceci grâce à la libre diffusion transmembranaire de cette forme. Seule l'amine protonée $(R-NH_3^+)$ est retenue dans le compartiment le plus acide (ROTTENBERG et al., 1972 ; REIJNGOUD et TAGER, 1973).

Dans la mesure où la constante de dissociation de l'amine (^KRNH₂) est identique dans les deux compartiments, on peut écrire :

$$K_{RNH_{2}} = \frac{(H^{+})_{in} \cdot (RNH_{2})_{in}}{(RNH_{3}^{+})_{in}} = \frac{(H^{+})_{ex} \cdot (RNH_{2})_{ex}}{(RNH_{3}^{+})_{ex}}$$

équation dans laquelle les indices "ex" et "in" correspondent respectivement au milieu extérieur et au milieu interne (intralutoïdique).

A l'équilibre, la forme perméante (RNH₂) est supposée être à equi-concentration de part et d'autre de la membrane. Il s'en suit que $(RNH_2)_{ex} = (RNH_2)_{in}$.

 $\frac{(H^{+})_{ex}}{(RNH_{3}^{+})_{ex}} = \frac{(H^{+})_{in}}{(RNH_{3}^{+})_{in}}$ il en découle que $\frac{(H^{+})_{in}}{(H^{+})_{ex}} = \frac{(RNH_{3}^{+})_{in}}{(RNH_{3}^{+})_{ex}}$ et donc : $\log \frac{(H^+)_{\text{in}}}{(H^+)_{\text{ex}}} = \frac{\log \frac{(RNH_3^+)_{\text{in}}}{(RNH_3^+)_{\text{ex}}} = pH_{\text{ex}} - pH_{\text{in}} = \Delta pH$ on obtient alors

3) VALIDITE DE LA METHODE DANS LE CAS DES LUTOIDES :

a) Nature du phénomène d'accumulation de la méthylamine :

Lorsque à concentration constante en méthylamine dans le milieu on fait varier la concentration en lutoïdes, c'est-à-dire le volume intravacuolaire (tableau 2-a), on ne constate pas de variation significative dans le rapport d'accumulation de la sonde (exprimée en concentration). Il en est de même (tableau 2-b) lorsqu'à concentration constante en lutoïdes (volume intra-vacuolaire constant), on fait varier la concentration en méthylamine dans le milieu d'incubation.

Tableau 2-a: EFFETS DES VARIATIONS DE LA CONCENTRATION EN LUTOIDES SUR LE RAPPORT D'ACCUMULATION DE LA METHYLAMINE (MeA).

(MeA) in (MeA) ex	ΔpH
10,81	1,03
9,51	0,93
9,55	0,98
11,75	1,07
	(MeA) _{in} (MeA) _{ex} 10,81 9,51 9,55 11,75

Tabl	leau	<u>2-b</u>	:	EFFETS	DES	VARIA	ATIONS	DE	LA	CONCENT	[RA]	TION	EN	METHYLA	MINE,
SUR	LE	RAPPC	R	D'ACCI	JMULA	ATION	TRANS	FONC	PLA	STIQUE	DE	LA	SONI	DE.	

Concentration MeA (µM)	(MeA) in (MeA) ex	ΔpH
10	10,96	1,04
25	8,91	0,95
50	13,18	1,12
100	10,80	1,03

Ces observations indiquent que l'accumulation de la sonde à H^{\dagger} par les lutoïdes est essentiellement attribuable à la mise en place d'un véritable équilibre de concentration de part et d'autre de la membrane lutoïdique, plutôt qu'à des phénomènes d'adsorption sur des sites membranaires externes. Cette dernière éventualité aurait en effet donné lieu à des processus de saturation.

b) La méthylamine : véritable sonde à protons :

La figure 6 rend compte de l'allure typique des cinétiques de dialyse, telles que nous les avons couramment obtenues au moyen de notre appareillage.



<u>Figure 6</u>: ACCUMULATION DE LA ¹⁴C-METHYLAMINE PAR DES LUTOIDES INTACTS EN SUSPENSION DANS UN TAMPON ISOTONIQUE. MOUVEMENTS DE LA SONDE A H^+ INDUITS PAR DES VARIATIONS CONTROLEES DU _PH DU MILIEU D'INCUBATION.

L'expérience a été initiée par l'addition, au temps zéro, de 15 µCi de l⁴C-méthylamine dans le compartiment supérieur de la cellule de dialyse contenant 2,5 ml du tampon d'incubation isotonique à pH 7,45. Les flèches indiquent successivement l'addition de 0,5 ml d'une suspension de lutoïdes concentrée (volume interne : 347 µl) (Lut.), ajustée à pH 7,45 (------), puis des alcalinisations(OH⁻) du milieu d'incubation provoquées successivement par l'addition de NaOH (0,5 N), puis de Tris (0,5 M), suivies d'acidifications induites par HCl (0,5 N), puis Hepes (0,5 M).Le pH du milieu est contrôlé directement au moyen d'une électrode de pH (------). L'expérience est terminée par l'addition d'une dose lytique de Triton X-100 (0,1 % final). Le tracé en pointillés et symboles vides (---0---) représente une cinétique de dialyse réalisée dans les mêmes conditions mais en absence de lutoïdes. Toutes les valeurs de radioactivité ont été corrigées en fonction des dilutions successives d'après la figure 5).

La différence des niveaux de radioactivité entre les deux cinétiques après l'addition du Triton, s'explique par le "piégeage" de la sonde, au sein des lutoïdes, au cours de la cinétique de dialyse. Ainsi, la méthylamine moins concentrée dans le milieu extérieur de la suspension se trouve moins intensément évacuée dans l'effluent de dialyse (l'évacuation de la radioactivité est de l'ordre de 10 % .h⁻¹). Les deux expériences illustrées dans cette figure, sont initiées (temps zéro) par l'addition de ¹⁴C-méthylamine dans la cuve d'incubation contenant le tampon seul (en absence de lutoïdes). Lorsqu'après 20 minutes, un équilibre suffisamment stable est atteint de part et d'autre de la membrane de dialyse, une suspension de lutoïdes concentrée ajustée à pH 7,0, est ajoutée dans l'une des cellules de dialyse. La présence de lutoïdes intacts induit une chute rapide, et de forte amplitude, de la radioactivité mesurée dans l'effluent. Se référant aux résultats rapportés ci-dessus, cette disparition de la méthylamine libre du milieu d'incubation, correspond à une accumulation vraie (absorption et non a.lsorption) de la sonde à H⁺, à l'intérieur du compartiment lutoïdique, en raison de l'acidité caractérisant l'intérieur de ces organites. L'équilibre de la répartition transtonoplastique de la sonde est atteint en 6 minutes environ.

La méthylamine s'accumule donc bien dans le compartiment le plus acide de la suspension, et l'équilibre de sa distribution est atteint suffisamment rapidement de part et d'autre de la membrane lutoïdique. L'alcanisation contrôlée du milieu d'incubation, par l'addition de petites quantités de bases minérale (NaOH) ou organique (Tris concentré), conduit à une accumulation plus forte de la MeA dans le compartiment vacuolaire (fig. 6).

Par contre, des acidifications provoquées par l'addition d'HCl ou d'Hepes (concentré), aboutit à une augmentation de la radioactivité dans l'effluent de dialyse. Ce fait traduit donc une libération de la sonde de pH préalablement accumulée au sein des lutoïdes, attribuable à la diminution du gradient de pH transtonoplastique.

En résumé, toute variation du gradient transtonoplastique de protons se traduit par une variation, dans la même direction, de l'accumulation de la méthylamine au sein du compartiment lutoïdique.

La lyse des lutoïdes, provoquée par l'addition de Triton X-100 aboutit au relargage complet, dans le milieu d'incubation, de la méthylamine restant encore accumulée au sein des lutoïdes.

L'estimation des concentrations de méthylamine dans chaque compartiment permet d'évaluer les variations de pH intralutoïdique et de gradient de protons transtonoplastique, induites par les modifications contrôlées du pH du milieu d'incubation. Les résultats sont rapportés dans le tableau 3.

pll extérieur	pH interne	∆ pH	effecteurs
6,0	5,55	0,45	+ H ⁺ (Hepes)
6,5	5,68	0,82	+ H ⁺ (HCl)
7,0 ⁽ *)	5,805	1,19	-
7,5	5,835	1,66	+ OH (NaOH)
8,0	5,95	2,05	+ OH (Tris)

tableau 3 : Variations du pH intralutoïdique et du gradient de pH transtonoplastique, lors de modifications contrôlées du pH du milieu d'incubation .Les données sont tirées de la fig.6. (*):pH initial de la suspension)

Notons que, lorsque le pH du milieu d'incubation extérieur est neutre (pH 7,0), les valeurs de pH intralutoïdique et de Δ pH transtonoplastique déterminées, *in vitro*, par la distribution de la ¹⁴C-Méthylamine, sont du même ordre de grandeur que celles mesurées à l'aide d'une électrode de pH, sur du cytosol et des lutoïdes (traités aux ultrasons) isolés à partir du latex frais, par ultracentrifugation. En effet, à des pH du cytosol laticifère de 7,0 correspondent généralement des pH intralutoïdiques, établis *in vivo*, compris entre 5,55 et 5,85 (CRETIN, 1979-a ; BROZOZOWSKA-HANOWER et al. 1979).

4) CONCLUSION :

Les différents résultats décrits ci-dessus nous incitent à conclure que la méthylamine se comporte comme un excellent indicateur de

Δ pH transtonoplastique pour les lutoïdes intacts,fraîchement isolés du latex. En ce sens, nos résultats sont pleinement en accord avec ceux rapportés par MARIN (1981) concernant les vésicules tonoplastiques reconstituées à partir de lutoïdes lyophilisés.

En outre, la technique de dialyse mise en oeuvre nous semble parfaitement adaptée à l'étude cinétique des flux transtonoplastiques de la sonde. L'estimation parallèle des volumes intravacuolaires nous permet d'obtenir des estimations quantitatives des phénomènes observés, concordant avec les résultats obtenus par ailleurs, au moyen de techniques expérimentales différentes. En effet, contrairement aux mesures de pH vacuolaires effectuées sur des cellules entières d'Acet (KURKDJIAN et GUERN, 1981), la détermination du pH intralutoïdique par la distribution de la méthylamine entre le compartiment vacuolaire et son milieu environnant, donne des résultats similaires à ceux directement mesurés au moyen d'une électrode sur des lutoïdes fraîchement isolés du latex et traités aux ultrasons.

II- ESTIMATION DES GRADIENTS DE POTENTIEL ELECTRIQUE TRANSTONOPLASTIQUE LUTOÏDIQUE :

1) GENERALITES :

La distribution asymétrique d'ions imperméants de part et d'autre d'une membrane engendre un gradient de potentiel transmembranaire $(\Delta \Psi)$. L'existence d'ions perméants au sein de la suspension d'organites membranaires donne lieu à l'établissement d'un équilibre de DONNAN. En effet, les charges imperméantes négatives fréquemment portées par des macro-structures biologiques internes aux organites, telles les protéines et surtout les phospholipides à caractère acide, tendent à être neutralisées par l'accumulation d'un nombre équivalent de contre-ions positifs. Si ces ions sont suffisamment perméants, ils engendrent un potentiel électrique transmembranaire, ceci grâce à leur tendance à diffuser dans le sens de leur gradient de concentration, c'est-à-dire vers l'extérieur du compartiment délimité par cette membrane. Il s'établit donc un équilibre, appelé "équilibre de DONNAN", pour lequel le gradient de potentiel transmembranaire se trouve exactement compensé par le gradient de concentration des contre-ions mobiles. De ce fait, la condition nécessaire pour qu'un ion perméant donné se distribue de part et d'autre d'une membrane grâce à la seule intervention d'un équilibre de DONNAN, est que le potentiel électrochimique de cet ion (ũi) soit identique de part et d'autre de la membrane. L'expression thermodynamique de cette condition se traduit par l'équation dans laquelle A pi correspond à un gradient électrochimique transmembranaire de l'ion considéré (Equation de NERNST) :

$$\Delta \tilde{\mu} i = Z F \Delta \Psi + RT \ln \frac{(i)_{in}}{(i)_{ex}} = 0$$

....

soit :
$$\Delta \Psi = -\frac{RT}{ZF} \cdot \ln \frac{(i)_{in}}{(i)_{ex}}$$

où : Z correspond à la valence de l'ion :

R,T et F ont leur signification thermodynamique habituelle (respectivement : constante des gaz parfaits, température absolue et équivalent de Faraday).

 Δ Ψ correspond à la différence de potentiel transmembranaire;

(i)_{in} et (i)_{ex} sont les activités internes et externes de l'ion i•

Dans le cas particulier où la membrane offre une certaine perméabilité aux protons, l'équation peut s'appliquer à cet ion :

 $\Delta \tilde{\mu} H^{\dagger} = F \Delta \Psi + RT \ln \frac{(H^{\dagger})_{in}}{(H^{\dagger})_{ex}} = 0$

Si A Y est exprimé en millivolts et que les valeurs appropriées sont substituées aux paramètres R,T et F, la condition d'équilibre définie ci-dessus peut être exprimée sous la forme simplifiée de l'équation de NERNST :

$$\Delta \Psi = 2,3 \frac{RT}{F} \cdot \Delta pH = -60 \Delta pH = E_{H}$$

ou $E_{\rm H}^{}$, défini comme ~60 Å pH, correspond à l'équilibre de potentiel pour les protons, a une température ambiante de 30°C.

Cette simple équation permet donc de préciser si un ion, et en particulier des H⁺, sont répartis à l'équilibre, de part et d'autre d'une membrane. Tout écart par rapport à cette loid'équilibre implique des processus d'accumulation nécessitant un apport d'énergie.

Par ailleurs, depuis le modèle chimi-osmotique développé par MITCHELL (1961-1968) le concept de force motrice protonique (pmf) est à la base de toutes les réactions se déroulant au niveau des membranes biologiques. Elle implique la formation et l'utilisation d'une différence de potentiel électrochimique de protons. Elle correspond en fait à la création d'un déséquilibre thermodynamique de la répartition transmembranaire des protons. Son équation peut s'exprimer ainsi :

$$pmf = \Delta p = \underline{\Delta \tilde{\mu} H}^{+} = \Delta \psi - 2, 3 \frac{RT}{F} \cdot \Delta pH \quad (\neq 0)$$

Pour ce qui concerne le transport membranaire de soluté, la théorie de MITCHELL implique l'existence d'un ensemble de transporteurs qui facilitent les échanges électriquement compensés des anions avec OH⁻,

et des cations avec H^+ . Ce système prévoit des transporteurs spécifiques fonctionnant soit selon un processus uniport, soit selon un processus symport ou antiport. Le mécanisme uniport utilise la seule composante électrique $\Delta \Psi$, de la pmf. Les mécanismes symports ou antiports consomment le gradient transmembranaire de pH. Ces processus constituent donc, en fait, des mécanismes de transport secondaires, impliquant la mise en place préalable d'un gradient électrochimique de protons, nécessitant un apport d'énergie.

Que ce soit dans le but de déterminer le type de couplage énergétique entrainant le transport et l'accumulation d'un soluté, ou que ce soit dans le but de déterminer la nature d'un gradient de protons (équilibre de DONNAN, transport actif,...) il apparaît donc essentiel de pouvoir mesurer les deux composantes du gradient électrochimique de protons, c'est-à-dire le gradient de pH et le gradient de potentiel électrique au travers d'une membrane.

2) PRINCIPE:

La taille réduite des lutoïdes rend impossible l'utilisation de micro-électrodes spécifiques pour en mesurer la différence de potentiel électrique transtonoplastique. Il est donc nécessaire de recourir à des méthodes indirectes, telles celles introduites par GRINIUS et al. (1970), qui utilisent la distribution, à l'équilibre, d'un anion ou cation lipophile. Ces méthodes semblent avoir été utilisées avec succès pour l'étude des bactéries (HAROLD et PAPINEAU, 1972 ; RAMOS et al. 1976 ...) et récemment sur les vésicules tonoplastiques reconstituées à partir de lutoïdes lyophilisés (MARIN, 1981).

Ces sondes ioniques sont supposées traverser librement les membranes biologiques. Les plus utilisées sont le SCN⁻, le dibenzyl-diméthyl ammonium (DDA⁺) (ALTENDORF et al. 1975), le tetraphényl phosphonium(TPP⁺) (GRINIUS et al., 1970 ; BAKEEV et al., 1970 ; LIBERMAN et SKULACHEV, 1970 SKULACHEV, 1971 ...) ou encore le methyl-triphényl phosphonium (MTPP⁺)

D'autres auteurs ont utilisé la méthode consistant à suivre la distribution du Rubidium (86 Rb) ou du potassium (42 K) radioactifs, en présence de valinomycine. Cetionophore perméabilise spécifiquement les membranes biologiques aux cations monovalents (K⁺ et Rb⁺) et permet leur libre répartition de part et d'autre des membranes en réponse à une différence de potentiel membranaire (MITCHELL et MOYLE, 1969 ; PADDAN et ROTTENBERG, 1973 ; ...)

Comme dans le cas de la détermination des gradients de pH, le calcul des volumes de chaque compartiment et l'estimation de la répartition des sondes de potentiel, permet une évaluation du gradient de potentiel transmembranaire. Le calcul s'effectue en appliquant l'équation précédemment explicitée :

$$\Delta \Psi = -\frac{RT}{ZF} \cdot \ln \frac{(i)_{in}}{(i)_{ex}}$$

La validité de la relation, ainsi définie à l'équilibre, suppose que plusieurs conditions soient réunies :

- seule la forme ionique de la sonde doit être passivement perméante ;
- l'équilibre transmembranaire doit être rapidement atteint ;
- la sonde ne doit pas être adsorbée sur les constituants de la membrane ;
- le mouvement propre de la sonde ne doit pas altérer le potentiel transmembranaire préexistant. Cette condition implique que la sonde soit utilisée à des concentrations faibles.

3) EVALUATION DU POTENTIEL TRANSTONOPLASTIQUE LUTOIDIQUE IN VITRO :

Des expériences préliminaires (incubation 30 min dans un tampon artificiel, puis centrifugation et lavage), réalisées en présence de concentrations physiologiques de K⁺ (30 mM), ont montré que seules les sondes cationiques testées (MTPP⁺, TPP⁺, Rb⁺) sont accumulées par les lutoïdes. L'anion SCN⁻ ne pénêtre pas dans ces organites. Ces résultats indiquent donc que la membrane lutoïdique est polarisée négativement du côté interne, par rapport au milieu d'incubation extérieur. Dans ce sens, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par MARIN (1981).

Al'instar des expériences réalisées avec la méthylamine, lorsque, à concentration constante en sonde cationique (MTPP⁺ ou ${}^{86}Rb^+=200 \mu$ M), ont fait varier la concentration en lutoïdes dans le milieu (volume intravacuolaire), nous constatons deux comportements distincts selon la nature de la sonde du potentiel utilisée (Tableau 4-a).

Tableau 4-a : EFFETS DES VARIATIONS DE LA CONCENTRATION EN LUTOIDES SUR LES VALEURS DE $\Delta \Psi$ DETERMINEES PAR LE RAPPORT D'ACCUMULATION DU ⁸⁶ RUBIDIUM (+VALINOMYCTNE) OU DU MTPP⁺:

Volume intralutoïdique (µl)	ΔΨ (⁸⁶ Rb ⁺)	ΔΨ (MTPP⁺)
95	- 68	- 132
150	- 72	- 111
265	- 78	- 92
320	- 70	- 80
320	- 70	- 80

Les incubations ont été réalisées dans un tampon isotonique (mannitol 0,3 M, Hepes-Tris 50 mM) à pH 7,0 en présence de KCL 30 mM et de valinomycine (10 μ g.ml⁻¹). La concentration en MTPP⁺ est de 0,2 mM. La répartition des sondes a été estimée, après détermination des volumes intralutoïdiques, par la méthode de centrifugation. Le temps d'incubation est de 30 minutes. Les potentiels transtonoplastiques sont exprimés en mV.

Tableau 4-b : EFFETS DES VARIATIONS DES CONCENTRATIONS EN SONDES DE POTENTIEL, ⁸⁶ RUBIDIUM (+VALINOMYCINE) OU MTPP⁺, A CONCENTRATION CONS-TANTE EN LUTOIDES, SUR L'ESTIMATION DU AY TRANSTONOPLASTIQUE LUTOIDIQUE :

Concentration en sonde (µM)	ΔΨ (⁸⁶ Rb ⁺)	ΔΨ (MTPP ⁺)
· 10	- 75	- 46
25	- 72	- 58
50	- 70	- 72
100	- 78	-102
200	- 80	-106

Les incubations ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le tableau 4-a. Le volume intralutoïdique moyen est de 190 µl. - le potentiel transtonoplastique estimé par la distribution du 86 Rb⁺, en présence de valinomycine, reste quasiment constant, quelle que soit la quantité de lutoïdes présents dans le milieu. Les valeurs de $\Delta\Psi$ estimées sont de l'ordre de -73 $\frac{+}{2}$ 5 mV ;

- on note par contre une diminution significative du $\Delta \Psi$ déterminé par le rapport d'accumulation du MTPP⁺, lorsque la concentration en lutoides augmente (les valeurs de $\Delta \Psi$ varient de -132 à -80 mV).

Parallèlement, lorsqu'à volume intralutoïdique constant (Vi ≃ 190 µl), on fait varier la concentration des sondes de potentiel dans le milieu (Tableau 4-b) :

- le gradient de potentiel transtonoplastique estimé par la distribution du 86 Rb⁺ + valinomycine, reste encore quasi constant, les valeurs estimées restant voisines de -74 mV ;

- on constate par contre une augmentation progressive du $\Delta\Psi$ calculé par le rapport d'accumulation du MTPP⁺ lorsqu'on augmente la concentration de la sonde dans le milieu. A partir d'un rapport de concentration MTPP⁺/(lutoïdes) adéquate (100 μ M MTPP⁺/Vi \approx 190 μ 1) les valeurs du "potentiel transtonoplastique" restent constantes, et se stabilisent entre -102 et -108 mV.

Ces observations indiquent que l'accumulation du ⁸⁶Rb⁺ par les lutoïdes <u>est essentiellement attribuable à la mise en place d'un vérita-</u> <u>ble équilibre de concentration</u> de part et d'autre de la membrane lutoïdique. L'utilisation de cette sonde ne semble pas donner lieu à des phénomènes d'adsorption particulièrement intenses sur les structures membranaires de lutoïdes intacts et frais.

Par contre, les valeurs de $\Delta \Psi$ estimées par la répartition de la sonde lipophile MTPP⁺, dépendant à la fois des concentrations en sonde et en lutoïdes dans le milieu, indiquent qu'il y a superposition de deux phénomènes :

- x des phénomènes d'adsorption non négligeable, probablement au niveau de la membrane (interactions hydrophobes des cycles benzéniques de la sonde phényl-phosphonium, avec les lipides membranaires ; interactions électrostatiques avec les acides phospatidiques électronégatifs,...)
- x une accumulation intralutoidique vraie, correspondant à la mise en place <u>d'un véritable équilibre de concentration</u> de part et d'autre de la membrane, s'établissant probablement lorsque les sites d'adsorption membranaires sont saturés.



Figure 7 : CINETIQUES D'ACCUMULATION PAR DES LUTOIDES INTACTS, DES SONDES DE POTENTIEL 14 C-MTPP⁺ (200 μ M) ET DU 86 Rb⁺ (100 μ M) EN PRESENCE OU NON DE VALINOMYCINE.

Les incubations ont été effectuées dans le tampon isotonique à pH 7,0 contenant du KOH 30 mM neutralisé par Mes, à température ambiante, pendant des temps variables (5 à 90 minutes).

L'estimation des potentiels transtonoplastiques a été effectuée après mesure du volume intra-lutoïdique, par la technique de centrifugation (voire Matériel et Techniques). A concentrations saturantes en MTPP⁺ (100 μ M/Vi \simeq 200 μ l), les gradients de potentiel transtonoplastiques lutoïdiques calculés par les sondes phényl-phosphonium seront donc largement surestimés, puisque les valeurs trouvées correspondent à la superposition de deux phénomènes au moins partiellement additifs.

Il semble donc, à priori, que la méthode utilisant la distribution du Rb⁺, soit mieux adaptée pour effectuer des mesures de gradients de potentiel transtonoplastique sur des lutoïdes intacts et frais. Ce cation ne semble en effet pas interagir fortement avec les structures membranaires, au moins dans nos conditions. On reprochera cependant à cette méthode la nécessité absolue d'effectuer les incubations en présence de valinomycine, qui seule permet l'installation rapide de l'équilibre de répartition du *Rubidium* de part et d'autre de la membrane des lutoïdes intacts.

La figure 7 montre en effet que l'équilibre de distribution transtonoplastique des sondes phényl-phosphonium est atteint rapidement, après 5 à 10 minutes d'incubation. Le *Rubidium* n'atteint rapidement cet équilibre (en moins de 5 minutes) qu'en présence de valinomycine (5 à 10 μ g/ml). En absence de cetionophore, le *Rubidium* (au même titre que le potassium ?) ne pénètre que très lentement dans les lutoïdes, et l'équilibre transtonoplastique ne s'établit qu'après 45 à 60 minutes d'incubation.

L'utilisation de la valinomycine, ionophore catalysant l'équirépartition des ions K^+ et Rb^+ selon un processus électrogène, nécessite une connaissance suffisamment précise des concentrations physiologiques en potassium préexistant *in vivo*, afin que celle-ci soient recontituées lors des expérimentations *in vitro*.

En présence de valinomycine, les mesures du gradient de potentiel transtonoplastique, réalisées en présence de concentrations en K^+ externes inférieures aux concentrations physiologiques cytosoliques, aboutiront à des valeurs surestimées du potentiel ; inversement les mesures réalisées en présence de concentrations élevées de K^+ aboutiront à des valeurs sous-estimées du gradient de potentiel transtonoplastique lutoïdique.

4) CONCLUSION :

<u>Le tonoplaste des lutoïdes intacts</u>, fraîchement isolés du latex, incubés dans un milieu artificiel en absence de toute énergie métabolique, et en présence de concentrations physiologiques en potassium (30 mM) <u>est</u> <u>polarisé</u>. Le gradient de potentiel électrique transtonoplastique développé est <u>négatif du côté intérieur de la membrane</u>, mais les valeurs estimées de ce potentiel dépendent de la nature de la sonde utilisée.

L'utilisation des cations lipophiles, tels que les cations à noyaux aromatiques du type phényl-phosphonium, aboutit à une surestimation du gradient de potentiel transtonoplastique. Cette estimation par excès est due à la superposition de deux phénomènes inhérents à la nature même de la sonde : des adsorptions intenses sur les structures membranaires, venant s'ajouter à l'accumulation intravacuolaire rendant compte du gradient de potentiel.

La méthode utilisant la distribution du ⁸⁶Rb en présence de valinomycine donne des résultats plus fiables. En effet, dans nos conditions expérimentales le *Rubidium* ne s'adsorbe pas d'une manière significative sur les structures membranaires des lutoïdes intacts frais. Cependant la présence de valinomycine s'avère être nécessaire pour que s'établisse rapidement l'équilibre de distribution transmembranaire de la sonde.

Il sera donc important, pour obtenir des valeurs de gradient de potentiel transtonoplastique lutoïdique, *in vitro*, d'effectuer les mesures en présence de concentrations de potassium aussi proches que possible des concentrations existant *in vivo*. Selon les différents auteurs ayant étudié la question, cette concentration en K⁺ dans le cytosol du latex semble constante, et de l'ordre de 30 mM (RIBAILLIER, 1972 ; COUPÉ, 1977,...). C'est la concentration que nous utiliserons donc classiquement dans les expériences de quantification des gradients de potentiel transtonoplastique lutoïdique, en présence de valinomycine.

Bien que d'amplitude plus faible ($\Delta \Psi$ moyen -65 mV), les valeurs de gradient de potentiel transtonoplastique négatives à l'intérieur des lutoïdes intacts et fraîchement isolés du latex, sont en accord avec les résultats décrits par MARIN (1981) pour des vésicules tonoplastiques reconstituées (environ -100 mV). Nos valeurs négatives de $\Delta \Psi$ transtonoplastique sont également en accord avec les mesures effectuées chez *Beta vulgaris* (DOLL et HAUER, 1981) au moyen de sondes de potentiel lipophiles. Nos résultats sont par contre en totale contradiction avec les valeurs

de $\Delta \Psi$ mesurées au moyen de micro électrodes chez de nombreux végétaux, et en particulier chez *Beta vulgaris* (BARBIER et GUERN, 1982). Il semble en fait que selon les méthodes utilisées et l'origine du matériel végétal, les valeurs de $\Delta \Psi$ transtonoplastique mesurées soient souvent contradictoires (LÜTTGE et HIGINBOTHAM, 1979 ; BARBIER et GUERN, 1982).

Ces expérimentations sur le gradient de potentiel transtonoplastique lutoïdique nous ont permis également de mettre en évidence une perméabilité relativement faible du tonoplaste lutoidique vis-à-vis du Rubidium, et on peut le supposer, vis-à-vis de son homologue le potassium. Nos expériences montrent qu'il existe un gradient de potentiel électrique transtonoplastique négatif à l'intérieur des lutoïdes. Il est estimé à -40 mV par le 86 Rb seul, à -60 à -70 mV par le 86 Rb + valinomycine, et entre -80 et -130 mV par le MTPP⁺. Par ailleurs les données bibliographiques (RIBAILLIER, 1972 ; COUPÉ, 1977) précisent que le potassium est réparti à équi-concentration de part et d'autre de la membrane lutoïdique in vivo. Si le gradient de potentiel transmembranaire s'avérait effectivement négatif à l'intérieur des lutoïdes in vivo, il faudrait en conclure que le potassium n'est pas à son équilibre thermodynamique de part et d'autre de la membrane lutoïdique in vivo, et qu'il doit donc être exclu de ce compartiment par un processus consommateur d'énergie !

- III PROPRIÉTÉS DU TONOPLASTE ET NATURE DU GRADIENT DE PROTONS TRANSTONOPLASTIQUES DES LUTOÏDES FRAIS INTACT, NON ÉNERGISÉS :
- 1) PERMEABILITE PASSIVE DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE VIS-A-VIS DES PROTONS ?

La représentation graphique (figure 8) des résultats obtenus précédemment (figure 6 et tableau 3), permet de visualiser les variations du pH intra-lutoidique et du gradient de pH transtonoplastique, en fonction des modifications contrôlées du pH du milieu d'incubation extérieur. Il apparaît alors que le gradient de pH transtonoplastique est beaucoup plus affecté par les variations de pH du milieu extérieur, que ne l'est le pH intra-vacuolaire. On observe en effet que lorsque le pH extérieur varie de 2 unités, le gradient de pH transtonoplastique, à l'équilibre, varie de 1,6 unité, alors que le pH interne n'évolue que de 0,4 unité.



<u>Figure 8</u>: VARIATIONS DU pH INTERNE (pH_i) (• ••• •••) ET DU \triangle pH TRANSTONOPLASTIQUE (------) DES LUTOIDES INTACTS, EN FONCTION DU pH DU MILIEU D'INCUBATION (pHext.).

Les pH internes ont été calculés à partir des rapports d'accumulation de la ¹⁴C-méthylamine tirés de la figure 6, et des volumes intralutoïdiques estimés parallèlement. Il semble donc que <u>les protons ne diffusent pas librement</u>, au travers de la membrane des lutoïdes intacts. Ces observations nous conduisent par ailleurs à postuler l'existence de quelques processus garantissant une acidité intravacuolaire relativement constante, même en milieu artificiel.

Ces résultats obtenus avec des lutoïdes intacts, semblent donc partiellement en contradiction avec les observations de MARIN (1981), cet auteur rapporte des modifications relativement plus importantes du pH interne des vésicules reconstituées à partir de lutoïdes lyophilisés lors des modifications du pH du milieu d'incubation extérieur. Rappelons que dans ce dernier cas, les processus de vésiculisation entraîne la perte du contenu intralutoïdique existant *in vivo*.

2) CONTRIBUTION D'UN EQUILIBRE DE DONNAN :

Nous avons incubé dans un tampon artificiel, des lutoïdes fraîchement isolés, en présence simultanément de ¹⁴C-méthylamine et de ⁸⁶Rb⁺ (+ valinomycine), avec des concentrations croissantes de potassium, jusqu'à ce que soient atteints les équilibres de distribution transtonoplastique des sondes (30 minutes).

KCl (mM) dans le milieu ex.	ΔрН	-Z∆pH (mV)	ΔΨ (mV)	∆µ̃H ⁺ (mV)
10	-1,19 ±0,11	71 ±7	-84 -8	-13 -15
30	-0,98 [±] 0,12	58 [±] 7	-70 +6	-12 +13
120	-0,53 +0,10	31 [±] 6	-40 +5	-9 -11
220	-0,20 +0,08	12 ±5	-10 +5	+2 +10

tableau 5 : Effets des concentrations croissantes en potassium externe, sur le ΔpH, le ΔΨ et leur résultante ΔũH⁺ transtonoplastiques des lutoïdes

Les incubations ont été réalisées en milieu artificiel à pH 7,0 et la distribution des sondes estimée par la méthode de cinétique de dialyse (moyenne de 3 mesures)

Les résultats rassemblés dans le tableau 5, ci-dessus, confirment qu'à une concentration en potassium considérée comme physiologique (30 mM), le gradient transtonoplastique de pH est de l'ordre de l'unité et le $\Delta \Psi$ d'environ -70 mV (négatif à l'intérieur). Il en résulte un gradient électrochimique de protons proche de zéro, ou très légèrement

négatif. Dans un milieu artificiel, dépourvu de tout apport d'énergie, les lutoïdes frais conservent donc une grande partie de leur gradient de protons initialement établi in vivo.

La majeure partie de ce Δ pH conservé in vitro semble correspondre essentiellement à une distribution transmembranaire de protons maintenue grâce à l'existence d'un "équilibre de DONNAN" et donc susceptible d'être dissipé par un large excès de cations perméants (K⁺ + valinomycine,...).

Nous avons pu également reproduire ces résultats en absence de valinomycine. Dans ce cas, conformément aux résultats décrits dans la figure 7, la dissipation simultanée des Δ pH et $\Delta \Psi$, provoquée par tout excédent de potassium, n'atteint l'équilibre qu'après un temps d'incubation supérieur à 45 minutes. Ces résultats confirment d'une part, la perméabilité restreinte du tonoplaste lutoïdique vis-à-vis du potassium (diffusion lente), et d'autre part la <u>participation</u> d'un équilibre de DONNAN, dans la constitution et le maintien du gradient de pH transtono-plastique lutoïdique.

3) QUANTIFICATION DES PHENOMENES DANS DES CONDITIONS QUASI IN VIVO :

La nature même du latex permet de séparer à partir d'un cytoplasme végétal, tant le compartiment cytosolique, que le compartiment vacuolaire, à l'état purifié. Cet avantage a été exploité pour quantifier les paramètres du gradient électrochimique de protons transtonoplastique, pour des lutoïdes frais et intacts, remis en suspension dans du cytosol laticifère ultrafiltré.
Milieu d'incubation	Effecteurs	∆рН	-Z∆pH (mV)	ΔΨ (mV)	∆ µ̃н ⁺ (mV)	
TAMPON	$(K^{+}) = 30 \text{ mM}$	-1,18 ± 0,1	70 ± 7	- 78 ± 8	- 8 ± 15	
ARTIFICIEL	$(K^+) = 30 \text{ mM} + \text{FCCP}$	$-0,80 \pm 0,1$	47 ± 6	-106 ± 6	-59 ± 12	
рН 7,0	(K ⁺) =200 mM + FCCP	-0,16 ± 0,05	9,± 3	- 7±6	+ 2 ± 9	
CYTOSOL	(K ⁺) physiol.	-1,42 ± 0,12	84 ± 7	- 35 ± 7	+49 ± 14	
U. FILTRE	" " + FCCP	$-0,73 \pm 0,1$	43 ± 6	- 75 ± 6	-32 ± 12	
рН 7,0	$(K^{+}) = 200 \text{ mM}$	$-0,46 \pm 0,1$	27 ± 6	- 5 ± 5	$+22 \pm 11$	
	$(\kappa^+) = 200 \text{ mM} + \text{FCCP}$	$-0,12 \pm 0,05$	7 ± 3	- 3 ± 5	+3±8	

<u>Tableau 6</u> : Etude comparative des gradients de pH, de potentiel électrique et des Δ μ H transtonoplastiques lutoïdiques, mesurés sur des lutoïdes intacts en suspension dans un tampon artificiel ou dans du cytosol ultrafiltré du latex d'Hevea.

Les lutoïdes, lavés par du cytosol ultrafiltré (PM 10), ont été préincubés 15 minutes, soit dans du tampon isotonique, soit dans du cytosol ultrafiltré, ajustés à pH 7,0, en présence ou non de KCl et (ou) de FCCP (10 μ M). Les Δ pH et $\Delta\Psi$ sont déterminés simultanément par la distribution des sondes ¹⁴C-méthylamine (100 μ M) et ⁸⁶Rb⁺ (100 μ M) en présence de valinomycine (10 μ g/ml) après centrifugation et lavage des lutoïdes. Les volumes sont estimés parallèlement sur des suspensions incubées dans des conditions identiques. a) Le gradient transtonoplastique de protons :

Les résultats rassemblés dans le tableau 6 ci-contre, associés là ceux rapportés précédemment (tableau 5), suggèrent l'existence de deux pools de protons, au sein du compartiment lutoïdique. En d'autres termes: que les lutoïdes soient incubés en tampon artificiel ou dans leur milieu d'origine, leur gradient de pH se subdivise en deux composantes distinctes :

- une composante majoritaire, rendant compte d'un Δ pH minimum. Elle est dissipée par un excès de cations perméants ou rendus perméants artificiellement (K⁺ + valinomycine). Cette composante semble donc représenter la part du gradient de protons transmembranaire entretenue (et/ ou engendrée) grâce à l'existence d'un potentiel de DONNAN.

- une composante, d'amplitude éminemment variable, susceptible d'être dissipée par l'action des seuls protonophores, comme le FCCP. Cette composante constitue un pool de protons en déséquilibre thermodynamique de part et d'autre de la membrane lutoïdíque.

- l'ensemble du gradient de protons ne peut être totalement dissipé qu'en présence simultanée de cations perméants et d'un protonophore.

Mesurée sur des lutoïdes incubés dans un tampon artificiel (concentration en K⁺ physiologique) aussi bien que dans le cytosol ultrafiltré, la part du Δ pH attribuable à la présence d'un équilibre de DONNAN (dissipée par un excès de K⁺, et conservé en présence de FCCP), apparaît comme une caractéristique relativement constante. Elle rend compte de 40 à 50 mV "d'équivalent Δ pH" (0,65 à 0,85 unité de pH).

La part du gradient transtonoplastique de protons, essentiellement dissipée par le FCCP, peut rendre compte de moins de 20 mV "équivalent Δ pH" (< 0,3 unité de pH), surtout dans le cas de lutoïdes lavés et incubés dans un tampon artificiel, jusqu'à plus de 50 mV (0,6 à 0,8 unité de pH) chez les lutoïdes constamment "équilibrés" dans le cytosol du latex (lavages et incubation/rinçage dans le cytosol ultrafiltré). Cette composante semble donc constituer la part variable du gradient de pH transtonoplastique. Elle est en déséquilibre thermodynamique de part et d'autre de la membrane.

b) Le gradient de potentiel transtonoplastique lutoïdique :

Dans le cytosol ultrafiltré, comme en suspension dans un tampon artificiel à concentration physiologique en K⁺, le tonoplaste lutoidique est électriquement polarisé. Toujours négatifs à l'intérieur des lutoides

les $\Delta \Psi$ transtonoplastiques mesurés pour des lutoïdes intacts incubés dans du cytosol ultrafiltré sont d'amplitudes plus faibles (-30 à -40 mV) que ceux estimés pour des lutoïdes en suspension dans un tampon artificiel (-60 à -80 mV) en présence de 30 mM de K⁺.

c) Le gradient électrochimique de protons :

Pour des lutoïdes incubés dans un tampon artificiel, les valeurs de Δ $\tilde{\mu}H$ estimées sont voisines de zéro. On peut considérer dans ce cas que la distribution transtonoplastique des protons, est proche de l'équilibre thermodynamique.

Préparés et incubés dans leur cytosol d'origine ultrafiltré, les lutoïdes intacts se caractérisent par un Δ pH plus élevé, et surtout un gradient électrochimique de protons (Δ µH) transtonoplastique positif à l'intérieur des lutoïdes (dépassant parfois 50 mV). Nous en concluons que, en suspension dans leur cytosol, les lutoïdes compartimentent un large pool de protons, en déséquilibre thermodynamique. La quasi-disparition de ce pool chez les lutoïdes lavés et incubés dans un tampon artificiel, pourrait s'interpréter de deux façons (au moins) non mutuellement exclusives :

- ce pool de protons en déséquilibre thermodynamique se dissipe progressivement en milieu artificiel, mais beaucoup plus rapidement qu'en milieu cytosolique;

- ce pool peut être partiellement entretenu, grâce à la présence de "facteurs énergétiques", dans cytosol laticifère isolé.

4) CONCLUSION ET DISCUSSION :

Les pH intra-lutoïdiques sont moins acides , et donc les Δ pH transtonoplastiques sont toujours sensiblement inférieurs (de 20 à 40%) lorsqu'ils sont mesurés sur des lutoïdes intacts incubés dans un tampon artificiel, comparativement aux valeurs trouvées, lorsque immédiatement après centrifugation du latex, les lutoïdes sont incubés dans leur cytosol d'origine. Nos estimations de pH interne et de Δ pH effectuées au moyen de la ¹⁴C-méthylamine (tableaux 5 et 6) confirment ce type de résultat d'ores et déjà mis en évidence par la mesure directe des pH intra-lutoïdiques et des Δ pH au moyen d'une électrode (HANOWER et al., 1977; CRETIN, 1979-a; BRZOZOWSKA-HANOWER et al., 1979).

Tout se passe donc comme si une partie du pool intralutoïdique de protons, établi *in vivo*, avait tendance à se dissiper relativement rapidement, lorsque les lutoïdes sont transposés de leur milieu naturel dans un tampon artificiel. La part du gradient de protons transtonoplastique ainsi dissipée semble correspondre au pool de protons se trouvant en déséquilibre thermodynamique dans les conditions *in vivo* ou *quasi in vivo*. En effet, le gradient électrochimique de protons au travers du tonoplaste de lutoïdes incubés dans des conditions artificielles, sans apport d'énergie, reste quasiment nul. Le pool de protons intralutoïdique se trouve donc, dans ces conditions, à l'équilibre thermodynamique. Par contre, les lutoïdes incubés dans leur cytosol d'origine, conservent une partie de leur pool de protons interne, en déséquilibre thermodynamique par rapport à leur milieu environnant, ainsi qu'en témoignent les valeurs positives des Δ $\tilde{\mu}$ H estimés dans ces conditions quasi *in vivo*.

Les différents résultats rapportés dans ce chapitre nous conduisent à postuler l'existence de deux pools distincts de protons, mis en place in vivo, au sein des lutoïdes. La contribution de chaque pool à la constitution et au maintien de l'ensemble du Δ pH transtonoplastique peut varier selon l'origine, et la nature du milieu d'incubation, des lutoïdes. L'un de ces pools de protons, de taille relativement constante, correspondrait aux protons piégés au sein des lutoïdes grâce à l'existence d'un potentiel de DONNAN transtonoplastique. Cette part du gradient de pH peut être dissipée par un excès d'ions perméants, ou rendus perméants par l'addition d'un ionophore spécifique (K⁺ + valinomycine). D'amplitude relativement constante lorsqu'elle est mesurée dans des conditions de concentration physiologique en potassium (40 à 50 mV), cette composante du gradient de protons transtonoplastique lutoïdique pourrait rendre compte du gradient de protons minimum, toujours mesurable entre 1e compartiment lutoidique et le milieu environnant à pH 7,0 (0,6 à 0,8 unité de pH).

Le deuxième pool de protons intralutoïdique postulé, est de taille variable. Il est dissipé par les protonophores, tel le FCCP. Ce dernier est toujours de faible amplitude lorsque les lutoïdes sont maintenus en suspension dans un milieu artificiel, même en présence de concentrations physiologiques en K⁺. Ce deuxième pool de protons intralutoïdique pourrait correspondre à la composante du Δ pH transtonoplastique se trouvant en déséquilibre thermodynamique, essentiellement dans des conditions (quasi) <u>in vivo</u>. Il serait facilement dissipé lors de l'incubation

des lutoïdes en milieu artificiel. Il constituerait de ce fait un pool de protons "facilement échangeables" et éventuellement utilisable pour le transport de divers solutés au travers de la membrane lutoïdique.

Ainsi, bien que le tonoplaste lutoïdique ne soit pas à proprement parler librement perméable aux protons et au potassium (diffusion très lente), une large part du Δ pH transtonoplastique est susceptible d'être dissipée à plus ou moins long terme, par les mécanismes d'échanges ioniques (passifs ou actifs) entre le compartiment lutoïdique et son milieu environnant. Dans la mesure ou le cytosol de la cellule laticifère possède un très faible pouvoir tampon (COUPÉ, 1977 ; JACOB et al., 1979), ces échanges transtonoplastiques non contrôlées de protons sont susceptibles de modifier fortement le pH et donc le métabolisme cytosolique, au sein des laticifères. Par ailleurs, le gradient de protons transtonoplastique assuré par la seule intervention du potentiel de DONNAN aurait tendance à se dissiper progressivement, du fait de l'apport constant d'ions cytosoliques perméants ou transportés, inhérent aux échanges ioniques intercellulaires et au métabolisme cellulaire propre.

Il doit donc exister, au niveau du tonoplaste lutoïdique, des mécanismes consommateurs d'énergie, capables, d'une part de reconstituer constamment le gradient de protons transtonoplastique lutoïdique, et d'autre part d'assurer l'établissement du potentiel électrochimique de protons transtonoplastique positif ($\Delta \ \mu H > 50 \ mV$), mis en évidence chez les lutoïdes en suspension dans leur cytosol d'origine.

Soulignons que la nature des structures biochimiques intralutoïdiques, à l'origine de ce potentiel de DONNAN transtonoplastique élevé reste obscure. Elles doivent implicitement correspondre à des macro-structures globalement chargées négativement. On sait pourtant que les lutoïdes contiennent une grande partie de protéines à point isoélectrique très élevé (Introduction, p. 19). Ces protéines cationiques pourraient adsorber l'excédent de charges négatives accumulées au sein des lutoïdes (citrate et Pi) (cf. Introduction p. 20), neutralisant ainsi leurs charges positives constitutives. On sait d'autre part qu'il n'existe pas d'anion polyphosphate au sein des lutoïdes (d'AUZAC, non publié). Mis à part l'existence peu probable d'un pool important de protéines anioniques intra-lutoïdique, on peut supposer, *a phiohi*, que ce potentiel de DONNAN transtonoplastique peut être engendré, pour partie, par une forte densité de charges négatives portée sur la face intérieure du tonoplaste, par les phospholipides. La participation des tannins accumulés au sein des lutoïdes est également à prendre en considération.

REMARQUES :

Ainsi que certains de nos résultats l'indiquent (figures 7 et 8, tableaux 4 et 5), le tonoplaste lutoïdique ne laisse pas librement (rapidement) diffuser certains ions comme H⁺ et K⁺. Il semble cependant que la perméabilité de cette membrane soit malgré tout suffisante pour permettre un certain rééquilibrage ionique passif entre le milieu intra-vacuolaire et son environnement. C'est en particulier le cas, lorsque les lutoïdes sont transférés de leur environnement naturel (le cytosol laticifère), dans un tampon isotonique artificiel à pH et concentration de K⁺ physiologiques. Ce rééquilibrage ionique pourrait faire intervenir un mouvement trantonoplastique de cations, qui diffusent alors dans le sens de leur gradient de concentration. Cette décharge de cations se traduit par une hyperpolarisation de la membrane lutoidique, l'intérieur des lutoïdes devenant plus négatif lorsque ceux-ci sont transférés dans un milieu artificiel. Une part de ces mouvements d'ions semble correspondre à un certain efflux de protons, se traduisant par une diminution sensible systématique du gradient de protons transtonoplastique. Cette décharge de protons se traduit en particulier par l'annulation du gradient électrochimique de protons transtonoplastique, maintenu uniquement lorsque les lutoïdes sont incubés dans leur cytosol d'origine ; milieu dans lequel les conditions d'équilibre ionique transmembranaire sont réalisées in vivo.

NATURE ET QUANTIFICATION DU GRADIENT DE

PROTONS TRANSTONOPLASTIQUE LUTOÏDIQUE

RESUME

Les lutoïdes intacts, fraîchement isolés, lavés puis incubés dans un tampon artificiel isotonique, à pH 7,0 et en présence de concentrations physiologiques de K⁺ (30 mM), mais en absence de toute source d'énergie métabolique, conservent un gradient de protons transtonoplastique voisin de l'unité (∆ pH≃1), et un gradient transtonoplastique de potentiel, toujours négatif à l'intérieur, quelle que soit la sonde de potentiel utilisée. Ce AY est estimé aux environs de -65 mV en utilisant le ⁸⁶Rb⁺+valinomycine comme sonde de potentiel. Le gradient électrochimique de protons résultant est donc quasi-nul (Δ μ̈Η = ΔΨ -60 Δ pH ≃ O). Nous en concluons, que dans le cas où les lutoïdes frais sont incubés dans un tampon artificiel, en absence de toute source d'énergie métabolique, la majeure partie du pool de protons que ces vacuoles compartimentent, est à l'équilibre thermodynamique. Seule une très faible partie (< 30 %) de ce gradient "résiduel" peut être dissipéepar le protonophore FCCP. Par contre, la majeure partie de ce gradient peut être dissipée (rapidement en présence de valinomycine) par un large excès de potassium, indiquant ainsi, qu'il est essentiellement attribuable à l'existence d'un potentiel de DONNAN.

Les lutoïdes intacts, rapidement isolés (1 h), et incubés à pH 7,0 (20 min) dans du cytosol du latex déprotéinisé par ultrafiltration, se caractérisent par un gradient transtonoplastique de pH systématiquement plus élevé, et un gradient de potentiel transmembranaire toujours négatif à l'intérieur des organites, (mais de plus faible amplitude). Dans ces conditions, aussi proches que possible que celles prévalant *in vivo*, on détermine un Δ pH transtonoplastique moyen supérieur à 1,4, et un $\Delta\Psi$ moyen d'environ -35 mV (86 Rb⁺+ valinomycine). Les lutoïdes intacts, fraîchement isolés, et incubés dans leur cytosol, développent donc un gradient électrochimique de protons transtonoplastique positif. Il est en moyenne de l'ordre de +50 mV. L'addition de FCCP dissipe entre 30 et 50 % (0,5

à 0,7 unité pH) du pH conservé dans ces conditions ; le pool de protons résiduel (0,6 à 0,8 unité pH) peut être dissipé par un excès de potassium dans le milieu d'incubation (plus rapidement en présence de valinomycine).

Dans ces conditions physiologiques (pH 7,0 et 30 mM K⁺), nous postulons l'existence de deux pools de protons au sein des lutoïdes :

- <u>un pool de taille relativement constante</u> (0,6 à 0,8 unité pH), correspondant à la part du gradient de protons transtonoplastique attribuable à la présence d'un potentiel de DONNAN transmembranaire. Ce pool, dissipé par la présence d'un excès de cations perméants dans le milieu d'incubation, est à l'équilibre thermodynamique (Δ µH = 0), et rend compte de la majeure partie du Δ pH résiduel mesuré au travers du tonoplaste des lutoïdes conservés en milieu artificiel.

- <u>un pool de taille éminemment variable</u> (0,2 à 0,8 unité pH), conservé essentiellement par les lutoïdes fraîchement isolés, et incubés dans le cytosol du latex ultrafiltré. Ce pool de protons, maintenu en déséquilibre thermodynamique au sein du compartiment lutoïdique, peut être dissipé par l'addition de protonophores comme le FCCP. Il semble également se dissiper de lui-même, au cours des lavages et incubations des lutoïdes, dans un tampon isotonique artificiel (pH 7,0 et 30 mM K⁺). Cette part du gradient de protons pourrait correspondre à un pool de protons "facilement échangeable", éventuellement utilisé pour énergiser les translocations de solutés au travers de la membrane vacuolaire.

Bien que le tonoplaste lutoïdique ne semble pas librement perméable aux protons et aux ions K^+ , une large partie du gradient de protons transtonoplastique est susceptible, <u>à long terme</u> de se dissiper par suite de divers mouvements transmembranaires de toute une variété d'ions. Ce Δ pH, et surtout le gradient électrochimique positif de protons mesurable dans des conditions quasi *in vivo*, doit être constamment renouvelé et entretenu par des mécanismes translocateurs de protons, consommant de l'énergie, localisés au niveau du tonoplaste lutoïdique.

Ces échanges d'ions, et en particulier de protons, au travers du tonoplaste lutoïdique, sont susceptibles de modifier considérablement le pH, et partant, le métabolisme du cytosol laticifère.

THE TYPE AND QUANTIFICATION

OF THE LUTOIDIC TRANSTONOPLASTIC PROTON GRADIENT

ABSTRACT

The intact lutoids which were freshly isolated, washed and incubated in an isotonic artificial buffer at pH 7,0 in the presence of physiological concentrations of K^{+} (30 mM) but in the absence of any source of metabolic energy preserve a transtonoplastic proton gradient which is close to the unit (\triangle pH \simeq 1)and a transtonoplastic potential gradient which is always negative within the lutoid, whatever the potential probe may be. This $\Delta \Psi$ is evaluated at about -65 mV by using the ⁸⁶ Rb⁺ valinomycin as the potential probe. Therefore, the resulting electrochemical proton gradient is almost equal to zero (Δ_{μ}^{∞} H = Δ Ψ -60 Δ pH \simeq 0). We come to the conclusion that, when the fresh lutoids are incubated in an artificial buffer in the absence of any source of metabolic energy, most of the proton pool compartmented by theses vacuoles is at the thermodynamic balance. Only a very small fraction (< 30%) of this "residual" gradient can be dissipated by the FCCP protonophore. On the contrary, most of this gradient can be dissipated (rapidly in the presence of valinomycin) by an excessive amount of potassium, thus showing that it is mainly due to the existence of a DONNAN potential.

The intact lutoids which are rapidly isolated (lh) and incubated at pH 7,0 (20 mn) in the cytosol of the latex which is deproteinized by ultrafiltration are characterized by a pH transtonoplastic gradient which is systematically higher and a transmembrane potential gradient which is always negative within the organites (although it is lower in amplitude). Under these conditions as close as possible to those prevailing in vivo, a mean transtonoplastic ΔpH higher than 1,4 is defined as well as a mean $\Delta \Psi$ of about -35 mV ($^{86}\text{Rb}^+$ + valinomycin). Therefore, the intact lutoids which are freshly isolated and incubated in their cytosol show a positive transtonoplastic proton electrochemical gradient which amounts to about +50 mV on an average. 30 to 50% of the pH (0,5 to 0,7 pH unit) preserved under these conditions are dissipated by adding FCCP ; the residual proton pool (0,6 to 0,8 pH unit) can be dissipated by an excessive amount of potassium in the incubating medium (more rapidly in the presence of valinomycin).

Under these physiological conditions (Ph 7,0 and mM K^+), we assume the existence of two proton pools within the lutoids :

- a pool whose size is rather constant (0,6 to 0,8 pH unit) corresponds to the fraction of the transtonoplastic proton gradient which is due to the presence of a transmembrane DONNAN potential. This pool which is dissipated by the presence of an excessive amount of permeating cations in the incubating medium is at the thermodynamic balance $(\Delta \overset{\sim}{\mu} H = 0)$ and accounts for most of the residual Δ pH measured through the tonoplast of the lutoids preserved under artificial conditions.

- a pool whose size is highly variable (0,2 to 0,8 pH unit) is preserved mainly by the freshly isolated lutoids which are incubated in the cytosol of the ultrafiltered latex. This proton pool which is preserved at a thermodynamic imbalance within the lutoidic compartment can be dissipated by adding protonophores such as FCCP. It also seems to be dissipating in an artificial isotonic buffer (pH 7,0 and 30 mM K⁺) when the lutoids are washed and incubated. This fraction of the proton gradient could correspond to an "early exchangeable" proton pool which can be used to energize the solute translocations through the vacuolar membrane.

Although the lutoidic tonoplast does not seem to be freely permeable to the protons and the ions K^+ , a large fraction of the transtonoplastic proton gradient is likely to dissipate in the long term due to various transmembrane movements of a whole variety of ions. This Δ pH and mainly the positive electrochemical proton gradient which can be evaluated under quasi in vivo conditions must be constantly turned over and preserved by proton-translocating processes which consume energy and are located in the lutoidic tonoplast.

These exchanges of ions and particularly of protons through the lutoidic tonoplast are likely to modify pH to a large extent and therefore the metabolism of the laticiferous cytosol.

- B- RÉGULATION DU PH CYTOSOLIQUE PAR LE COMPARTIMENT VACUOLAIRE, AU SEIN DU LATEX
 - J UNE ATP-ASE POMPE A PROTONS SUR LE TONOPLASTE LUTOÏDIQUE :

INTRODUCTION :

Les flux transtonoplastiques de protons sont susceptibles de modifier efficacement le pH du cytosol, au sein des cellules laticifères. Nous avons, en particulier, démontré qu'une large part du pool de protons intra-lutoïdique pouvait être relarguée dans le cytosol, comme dans un milieu d'incubation artificiel, lors de la "neutralisation" du potentiel de DONNAN. Par ailleurs, il est maintenant acquis, que certaines accumulations vacuolaires font intervenir des mécanismes antiport actifs de protons. C'est le cas du citrate, dont l'accumulation au sein des lutoïdes engendre une acidification du milieu d'incubation et l'alcalinisation simultanée du compartiment lutoïdique. Celle-ci se traduit donc globalement par une chute du gradient transtonoplastique de protons (MARIN, 1981). Ces phénomènes de transferts de solutés au niveau du tonoplaste lutoïdique doivent également tendre, in vivo, à acidifier le compartiment cytosolique et à dégrader le gradient de pH transtonoplastique, au sein des cellules laticifères. Il est maintenant bien admis que ces deux phénomènes sont préjudiciables au fonctionnement du métabolisme cytosolique, et partant à la synthèse de caoutchouc donc à la production du latex.

Il doit donc exister des mécanismes s'opposant à cette tendance naturelle du système à dissiper ce gradient transtonoplastique de protons. Ils sont supposés maintenir un pH cytosolique compatible avec le fonctionnement normal du métabolisme laticifère et reconstituer en permanence le ΔpH , voire le $\Delta \tilde{\mu}H$, transtonoplastique. De tels mécanismes, s'opposant par nature à l'installation d'un équilibre thermodynamique de la répartition transmembranaire des ions, nécessitent sans aucun doute une consommation d'énergie.

D'AUZAC (1975-1977) a mis en évidence et caractérisé une activité ATPase spécifique, au niveau du tonoplaste lutoïdique.

Par ailleurs l'addition d'ATP-Mg²⁺ dans le milieu d'incubation où baignent des lutoïdes fraîchement isolés du latex d'Hevea brasiliensis entraine une acidification de leur milieu interne (LAMBERT, 1975 ; d'AUZAC



Figure 9 : ACCUMULATION INTRA-LUTOIDIQUE DE LA SONDE A PROTONS EN PRE-SENCE D'ATP-Mg.

Les lutoïdes intacts ont été préincubés (volume interne = $360 \ \mu$ l) dans le tampon isotonique à pH 7,45 en présence de KCl 30 mM et de 20 μ Ci de l⁴C-MeA, à 26°C, (volume total de la suspension = 3 ml). Après 20 min. d'incubation, la suspension de lutoïdes est transférée dans le compartiment d'incubation (supérieur) de la cellule de dialyse (temps zéro). Lorsque la cinétique atteint un équilibre stable (25 minutes), on ajoute de l'ATP-Mg 5 mM () ou de l'ADP-Mg 5 mM (····0····0···), ajustés précisément au pH du milieu d'incubation. Aux temps indiqués par les flèches : NH₄Cl 30 mM (final), puis du Triton X-100 0,1 % sont ajoutés. (Le pH du milieu d'incubation est contrôlé périodiquement au pH mètre). et al., 1977).

L'existence d'un gradient transmembranaire de pH et son augmentation par l'addition d'ATP-Mg²⁺, alors même qu'il existe une activité ATPase au niveau du tonoplaste lutoïdique, suggèrent fortement l'intervention d'une ATPase membranaire pompe à protons, contrôlant au sein du latex l'accumulation des protons à l'intérieur du compartiment vacuolaire.

Nous en confirmons le fonctionnement dans ce chapitre.

1) ACIDIFICATION INTRALUTOIDIQUE, LORS DU FONCTIONNEMENT DE L'ATPASE TONOPLASTIQUE :

La figure 9 montre que l'addition d'ATP-Mg²⁺ à une suspension de <u>lutoïdes intacts</u>, préincubés à l'équilibre dans un <u>milieu artificiel</u> en présence de ¹⁴C-méthylamine, induit une forte diminution de la radioactivité détectable dans l'effluent de dialyse. L'addition d'ADP-Mg²⁺, reste sans effet significatif. Nous avons d'autre part vérifié que l'addition d'ATP-Mg²⁺ dans le tampon, en absence de lutoïde, n'induit aucune perturbation significative du mouvement de la sonde au travers de la membrane de dialyse. Cette diminution de la radioactivité dans le milieu d'incubation (extérieur) traduit donc une accumulation de la sonde au sein du compartiment lutoïdique. Cette assertion est d'ailleurs confortée par le relargage total de la radioactivité dans le milieu d'incubation, lors de la lyse des lutoïdes engendrée par l'addition finale de Triton.

Dans nos conditions expérimentales, où les activités phosphatase acides lutoïdiques sont inhibées par le pH alcalin (7,45) et la présence de molybdate (tableau 7) nous pouvons considérer que la quasitotalité de l'hydrolyse de l'ATP mesurée après 20 minutes d'incubation, est attribuable à l'activité ATPase du tonoplaste lutoïdique décrite par d'AUZAC (1975-1977).

 $\frac{Tableau\ 7}{TONOPLASTIQUE\ LUTOIDIQUES\ AVEC\ LE\ SUBSTRAT\ ATP-Mg^{2+}$

```
ATP hydrolysé après 20 minutes d'incubation..... 13,68 µmol.(91%)
Activité ATPase : substrat ATP-Mg (µmol. min<sup>-1</sup>.m1<sup>-1</sup>).... 0,103
Activité phosphatase acide résiduelle : substrat PNPP (id). 0,009
Activité phosphatase acide résiduelle (substrat ATP-Mg)
estimant le rapport de l'activité ATP/PNPP = 0,4.....(id). 0,004
Rapport des activités ATPase/phosphatases résiduelles
avec ATP-Mg<sup>2</sup> comme substrat ..... 25,8
```

Les activités enzymatiques sont exprimées en unités arbitraires : µmol de substrat hydrolysé. min⁻¹. par ml de la suspension renfermant 360 µl de volume interne lutoïdique. L'incubation est réalisée à pH 7,45 en présence de Cl₂Mg 3 mM; de molybdate d'ammonium 0,25 mM; d'ATP-Mg²⁺ ou PNPP 10 mM. Dans nos conditions, le rapport des affinités de la phosphatase acide lutoïdique pour les substrats ATP-Mg et le PNPP est estimé à 0,4 (JACOB, communication personnelle).

Nous avons par ailleurs vérifié que le pH du milieu extérieur, fortement tamponné (Hepes/Mes/Tris : 100 mM au total) reste stable, tout au long de l'expérimentation. La diminution de la concentration de l'amine dans le milieu d'incubation extérieur traduit donc une accumulation de la sonde à protons à l'intérieur des lutoïdes, en réponse à une forte acidification du milieu intralutoïdique engendrée par l'activité ATPase tonoplastique.

2) EFFETS DES DECOUPLANTS ET PROTONOPHORES :

L'addition, au milieu d'incubation, d'une concentration découplante de NH₄Cl (30 mM) provoque l'efflux de la sonde à protons accumulée au sein des lutoïdes (figure 9). L'addition ultérieure d'une dose lytique de détergent (Triton X-100 : 0,1 % final), n'entraîne qu'une faible augmentation de la radioactivité dans le milieu d'incubation, et donc dans l'effluent de dialyse. La présence de chlorure d'ammonium, à forte concentration, avait donc dissipé la quasi totalité du gradient de protons transtonoplastique.



Figure 10 : EFFETS DU FCCP SUR L'ACCUMULATION DE LA ¹⁴C-METHYLAMINE PAR DES LUTOIDES INTACTS, EN ABSENCE ET EN PRESENCE D'ATP-Mg EXOGENE. Des lutoïdes intacts, ont été préincubés dans un tampon isotonique à pH 7;0, contenant de la ¹⁴C-méthylamine (100 μ M), en présence (··O···O ...) ou en absence de FCCP 10 μ M (). Les suspensions sont ensuite transférées dans les cellules de dialyse, et aux temps indiqués par les flèches ont ajoute de l'ATP-Mg 5 mM (concentration finale, pH 7,0), puis une dose lytique de Triton X-100 (0,1 % final).



Figure 11 : EFFET DES PROTONOPHORES FCCP ET NH₄CL, SUR LE GRADIENT TRANS-TONOPLASTIQUE DE PROTONS, APRES LE FONCTIONNEMENT DE L'ATPase.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la figure 10. La préincubation est effectuée en absence de protonophore. Aux temps indiqués sont ajoutés successivement : ATP-Mg (5 mM), FCCP (25 μ M), NH₄Cl (30 mM) puis 0,1 % de Triton. L'expérience est effectuée à pH 7,0.

Comme décrit précédemment, la préincubation des lutoïdes frais dans un tampon artificiel, en présence du protonophore FCCP (5 à 15 μ M) n'affecte que très légèrement le gradient de pH transtonoplastique initial des lutoïdes non énergisés (figure 10). Par contre ce protonophore électrogène inhibe totalement l'accumulation intralutoïdique de la sonde à protons normalement induite en présence d'ATP (figure 10).

De même (figure 11) l'addition du FCCP <u>après</u> l'acidification intralutoïdique induite par l'ATP-Mg²⁺, ne relargue qu'une part du gradient transtonoplastique de protons équivalente à celle établie grâce à l'action de l'ATPase. L'autre part du gradient de protons n'est dissipée que par l'addition massive de NH₄Cl ou d'une dose lytique de détergent (Triton). Il apparaît donc que seul le pool de protons accumulés *in vitro*, en présence d'ATP-Mg²⁺, puisse être dissipé par le protonophore électrogène FCCP.

Figure de référence	pH extérieur mesuré	préincubation	premiers effecteurs ajoutés	autres effecteurs v ajoutés	pH vacuolaire estimé	∆рН
Fig. 9	7,45 7,45 7,45 7,45 7,45 7,45	- - - - -	$dDP-Mg^{2+}(5 mM)$ $ATP-Mg^{2+}(5 mM)$ ATP-Mg ou ADP-M $NH_4C1 (30 mM)$	- - g +NH ₄ C1(30mM) +Triton(0,1%)	6,12 6,06 5,43 7,32 7,4	1,33 1,39 2,02 0,13 0
Fig. 10	7,0 7,0 7,0 7,0	- - + FCCP (10μM) + FCCP (10μM)	ATP-Mg ²⁺ (5 mM) ATP-Mg ²⁺ (5 mM)	- - - -	5,84 5,0 5,89 5,97	1,16 2,0 1,11 1,03
Fig. 11	7,0 7,0 7,0 7,0	· – – – –	 ATP-Mg ²⁺ (5 mM) ATP-Mg ²⁺ (5 mM) FCCP (5 µM)	- +FCCP (5 μM) +NH ₄ Cl(30mM)	5,93 5,15 6,05 6,68	1,07 1,85 0,95 0,32
Fig. 12	7,0 7,0 7,0	valinomycine+K ⁺ valinomycine+K ⁺ valinomycine+K ⁺	ATP-Mg ²⁺ (5 mM) ATP-Mg ²⁺ (5 mM)	- - +KCl (120 mM)	5,89 4,89 5,35	1,11 2,11 1,65

Tableau 8 : Estimation des pH internes et des ∆ pH transtonoplastiques de lutoïdes intacts, énergisés ou non par un apport d'ATP-Mg²⁺. Effets des protonophores. Les rapports d'accumulation intralutoïdique de méthylamine sont déterminés à partir des expérimen-

Les rapports d'accumulation intralutoïdique de méthylamine sont déterminés à partir des expérimentations, réalisées selon la technique de cinétique de dialyse, illustrées dans les figures citées en référence.

3) QUANTIFICATION DES FLUX TRANSTONOPLASTIQUES DE PROTONS, EN MILIEU ARTIFICIEL :

Les phénomènes observés à l'issue des diverses expériences, réalisées par la méthode de cinétique de dialyse, rapportées dans les figures 9 à 12, ont été quantifiés. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 8 ci-contre.

L'ensemble des résultats montre que l'acidification intralutoïdique provoquée par l'addition d'ATP-Mg²⁺ est attribuable à l'activité ATPase membranaire lutoïdique, fonctionnant comme une véritable pompe à protons tonoplastique, découplée par les protonophores.

4) L'ATP-ASE POMPE A PROTONS LUTOIDIQUE EST ELECTROGENE :

On distingue classiquement deux types de pompes ioniques membranaires. Les unes sont qualifiées d'électroneutres ; dans ce cas le transport d'un ion est <u>directement</u> couplé à un mouvement d'autres ions de telle façon qu'il ne résulte globalement aucun transfert net de charge lors de son fonctionnement. Par contre, au moins dans le domaine végétal, la plupart des ATPase membranaires développent un potentiel transmembranaire à partir de l'hydrolyse de l'ATP. C'est le cas par exemple de l'ATPase plasmalemmique de *Neurospora crassa* (SLAYMAN et al., 1973 ; BOWMAN et al., 1978 ; SCARBOROUGH, 1976 et 1980).

Nous avons recherché l'effet de l'ATP-Mg²⁺, sur le potentiel transtonoplastique des lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex.

Lorsque les lutoïdes sont préincubés simultanément avec de la ¹⁴C-méthylamine et du ⁸⁶Rubidium en présence de valinomycine (+ K⁺), 1'addition d'ATP-Mg²⁺ provoque simultanément (figure 12) :

- un influx de la sonde à protons à l'intérieur des lutoïdes, montrant que l'acidification intravacuolaire attribuée à l'activité ATPase lutoïdique est assurée, même en présence de cet ionophore ;

- un efflux symétrique de la sonde de potentiel (⁸⁶Rb⁺), préalablement accumulée au sein des lutoïdes en raison de leur potentiel initial négatif.

Cependant, ainsi que l'indique la figure 13, la présence de valinomycine est nécessaire pour que soit assuré un efflux rapide du ⁸⁶Rb⁺. En effet, l'addition d'ATP-Mg²⁺, en absence de cet ionophore, provoque un efflux de la sonde de potentiel, beaucoup plus lent et de plus





<u>Figure 13</u> : EFFET DE L'ADDITION DE LA VALINOMYCINE SUR L'EFFLUX TRANS-TONOPLASTIQUE DU ⁸⁶Rb⁺, INDUIT PAR LE FONCTIONNEMENT DE L'ATPase.

Les lutoïdes (vi=334 µl) ont été préincubés à pH 7,0 dans un tampon isotonique contenant 20 µCi de 86 Rb⁺ et K⁺ 30 mM (KOH neutralisé par Mes), en absence de valinomycine, pendant 70 minutes. Les suspensions sont transférées dans le compartiment d'incubation des cellules de dialyse. Dans l'une d'elles () on ajoute aux temps indiqués par les flèches : de l'ATP-Mg (5 mM, pH 7,0), puis de la valinomycine (10 µg. ml⁻¹). Dans l'autre (··Δ··Δ··) sont ajoutés successivement MgSO4 (5 mM, pH 7,0) puis 15 µl d'acétone (70 %). Les deux expériences sont terminées par l'addition de Triton (0,1 % final).



 $\frac{\text{Figure 14}}{^{14}\text{C-METHYLAMINE ET DU CATION LIPOPHILE}}$ SIMULTANES DE LA ¹⁴C-METHYLAMINE ET DU CATION LIPOPHILE ³H-TETRAPHENYL PHOSPHONIUM.

Les lutoides ont été préincubés pendant 20 minutes dans un tampon isotonique à pH 7,15 contenant K⁺ 30 mM (KOH neutralisé par Mes), 30 μ Ci de la sonde de pH ¹⁴C-méthylamine (100 μ M). Concentrations finales d'ATP-Mg : 3 mM, et de FCCP : 25 μ M. () : flux de méthylamine () : flux de TPP⁺. faible amplitude. Par ailleurs, l'addition de la valinomycine, pendant le fonctionnement de l'ATPase, assure un efflux brutal et rapide de rubidium, préalablement accumulé au sein des lutoïdes (figure 13). Il semble donc, qu'en l'absence de valinomycine, l'influx de protons ne soit pas directement couplé à un efflux correspondant de Rb⁺ (et K⁺?).

L'influx de protons, engendré par le fonctionnement de l'ATPase lutoïdique, s'accompagne donc, au moins transitoirement, d'une variation du potentiel électrique transtonoplastique.

L'addition de KCl (120 mM) en présence de valinomycine, après l'acidification intralutoïdique induite par l'ATP (figure 12), ne provoque qu'un efflux supplémentaire négligeable de ⁸⁶Rb⁺. La lyse ultérieure des lutoïdes, par l'addition de Triton, indique que la quasi totalité de la sonde de potentiel initialement accumulée au sein de ces organites a été relarguée dans le milieu extérieur par les additions antérieures d'effecteurs. Ces résultats indiquent que la présence d'ATP dans une suspension lutoïdique, induit une dépolarisation quasi complète de leur membrane.

L'électrogénicité de la pompe à protons est confirmée en utilisant le tetraphényl-phosphonium comme sonde de potentiel (figure 14). Par ailleurs l'influx de la méthylamine et l'efflux simultanée du TPP⁺, induits en présence d'ATP-Mg²⁺, sont réversés par une addition ultérieure de FCCP. Ce protonophore électrogène provoque en effet l'efflux immédiat d'une large part du pool intralutoïdique de protons, couplé à une repolarisation simultanée du tonoplaste (l'intérieur des lutoïdes redevenant alors plus négatif).

Les phénomènes mis en évidence dans la figure 12 ont été quantifiés. L'addition d'ATP-Mg²⁺ engendre, au cours de cette expérimentation, une augmentation du Δ pH transtonoplastique d'une unité de pH (figure 12 et tableau 8) et une variation de potentiel électrique transmembranaire, qui passe de -83 mV, pour des lutoïdes "au repos", à -19 mV chez les lutoïdes énergisés. Le fonctionnement de l'ATPase pompe à protons induit donc une dépolarisation du tonoplaste lutoïdique de l'ordre de 64 mV, l'intérieur du compartiment vacuolaire devenant alors moins négatif.

Dans ces conditions (K⁺ 10 mM + valinomycine, pH 7,0), le gradient électrochimique de protons (Δ $\tilde{\mu}$ H) varie de - 18 mV, lorsque les lutoïdes sont incubés dans le tampon artificiel dépourvu de toute source

d'énergie, à environ + 96 mV lorsqu'ils sont "énergisés" en présence d'ATP-Mg²⁺ (Tableau 9).

Ces résultats suggèrent fortement que l'ATPase localisée au niveau du tonoplaste lutoïdique fonctionne comme une pompe à protons électrogène. Elle construit donc un gradient de protons transtonoplastique en déséquilibre thermodynamique avec le milieu environnant.

5) INTERFERENCE : POTENTIEL DE DONNAN ET POMPE A PROTONS :

Nous avons précédemment montré (p.166) que le gradient transtonoplastique de pH conservé par des lutoïdes intacts incubés dans un tampon artificiel et dépourvu de toute source d'énergie, était constitué pour majeure partie grâce à l'existence d'un potentiel de DONNAN. Celuici peut être déchargé par un excès de cations perméants (ou rendus perméants).

Ainsi, lorsque des lutoïdes sont incubés dans un milieu artificiel, en présence de ¹⁴C-méthylamine et de ⁸⁶Rb⁺+ valinomycine, on constate que toute augmentation des concentrations en KCl (10 à 220 mM) dans le milieu d'incubation dépourvu de toute source d'énergie, se traduit par une diminution simultanée et proportionnelle des gradients transtonoplastiques de protons et de potentiel (tableau 9). Le potentiel électrochimique de protons demeure alors quasiment nul, ou légèrement négatif.

incubation KCl (mM)	-Z ∆ pH initial (mV)	-Z ΔpH +ATP-Mg ²⁺ (mV)	ΔΨ initial (mV)	$+ ATP - Mg^{2+}$ (mV)	∆ µ̃H initial (mV)	Δ μ̃Η +ATP-Mg ²⁺ (mV)
10	74	124	-92	-28	-18	+96
30	62	106	-73	-17	-11	+89
120	32	88	-44	- 8	-12	+80
220	11	78	-12	> 0	- 2	>78

Tableau 9 :Effets de concentrations croissantes en KCl dans le milieu d'incubation sur le potentiel de DONNAN, l'activité ATPase pompe à protons et le gradient électrochimique de protons (Δ µ̃H) transtonoplastique lutoïdique. Les lutoïdes intacts ont été préincubés 30 min. à pH 7,0 en présence de différentes concentrations de KCl (+ valinomycinel0 µg.ml⁻¹) avec les sondes ¹⁴C-méthylamine et ⁸⁶Rb⁺, avant d'être transférés dans l'appareil de dialyse. Lorsque l'équilibre de dialyse initial est atteint, l'ATP-Mg²⁺ 5 mM a été ajouté. Les Δ pH, Δ Ψ et leur résultante Δ µ̃H ont été estimés après 30 min. d'incubation en présence ou non d'ATP.

Quelle que soit la concentration en potassium dans le milieu, l'addition d'ATP-Mg²⁺ provoque une forte augmentation du Δ pH et une dépolarisation significative de la membrane lutoïdique (estimée par ⁸⁶Rb).

Les résultats rapportés dans le tableau 9 montrent que, dans tous les cas, le fonctionnement de l'ATPase engendre donc une augmentation spectaculaire du gradient électrochimique de protons transtonoplastique. En milieu artificiel ce dernier ne semble toutefois guère pouvoir excéder le seuil de + 100 mV.

L'ATPase tonoplastique lutoïdique est donc capable de reconstituer rapidement un gradient de protons lorsque le potentiel de DONNAN est neutralisé en présence d'un excès de cations perméants. Le Δ pH engendré est alors en déséquilibre thermodynamique de part et d'autre du tonoplaste (Δ µH largement positif).

6) L'ATP-ASE POMPE A PROTONS ELECTROGENE EST FONCTIONNELLE DANS LE CYTOSOL DE LA CELLULE LATICIFERE :

Nous venons de démontrer que l'ATPase lutoïdique fonctionne in vitto, comme une véritable pompe à protons électrogène tonoplastique. En présence de son substrat ATP-Mg, elle catalyse une acidification non électriquement compensée du compartiment vacuolaire, <u>lorsque les lutoï</u>des intacts sont incubés dans un tampon totalement artificiel.

Nous avons voulu vérifiersi tel est le cas, lorsque les lutoïdes sont maintenus en suspension dans un milieu de composition aussi proche que possible que celle prévalant *in vivo*.

Nous avons quantifié les transferts de protons et de charges induits au niveau du tonoplaste lutoïdique, par l'addition d'ATP-Mg²⁺, chez des lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex, lavés et incubés dans du cytosol de latex déprotéinisé par ultrafiltration (sur PM 10), ajusté à pH 7,0.

	Δ pH (et -Z Δ pH)		ΔΨ (mV)		Δ μ̈́Η (mV)	
Milieu d'incubation	initial	+ ATP-Mg ²⁺	initial	+ ATP-Mg ²⁺	initial	+ ATP-Mg ²⁺
Hepes-Mes-Tris 50 mM ; KCl 30 mM ; pH 7,0	1,13 (70)	1,68 (101)	- 68	- 20	+ 2	+ 81
Cytosol ultrafiltré ajusté à pH 7,0	1,37 (82)	1,90 (145)	- 28	- 2	+ 54	+143
Cytosol ultrafiltré pH 7,0 ; + FCCP 50 μM	0,61 (40)	0,55 (33)	- 87	- 92	- 47	- 59
Cytosol ultrafiltré pH 7,0; + KCl 200 mM	0,50 (30)	1,61 (97)	- 5	> 0	+ 25	+ 96

Tableau 10 : Etude comparative des Δ pH, $\Delta \Psi$ et Δ $\tilde{\mu}$ H transtonoplastiques énergisés ou non par un apport d'ATP-Mg²⁺, de lutoïdes incubés en tampon artificiel ou dans du cytosol du latex ultrafiltré. Les lutoïdes, lavés dans du cytosol de latex ultrafiltré, ajusté à pH 7,0 (par : Mes-Hepes-Tris "poudre")sont préincubés en présence des sondes (¹⁴C-méthylamine ou ⁸⁶Rb⁺⁺ valinomycine) pendant 30 minutes, soit dans un tampon isotonique (Mannitol 0,3 M + KCl 30 mM) à pH 7,0, soit dans le même cytosol ultrafiltré (pH 7,0), en présence ou non de FCCP ou de KCl 200 mM. Ensuite, une fraction de chaque suspension est soit énergisée par l'addition d'ATP-Mg²⁺ (5 mM), soit complémentée par 5 mM de MgSO₄, à pH 7,0. Les distributions des sondes de Δ pH et de potentiel, ainsi que les volumes intralutoïdiques sont déterminés sur des suspensionsséparées, après 20 minutes d'incubation. Les expériences sont ici réalisées selon la méthode de centifugation. (une moyenne de 3 séries d'expérience). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux valeurs de (-Z Δ pH) exprimées en mV. Les résultats rassemblés dans le tableau 10 montrent que l'ATPase tonoplastique lutoïdique assure également l'acidification du milieu intra-vacuolaire lorsque les lutoïdes sont incubés dans du cytosol de cellules laticifères. Dans ces conditions, l'influx de H⁺ conduit également à une dépolarisation de la membrane. Les deux phénomènes sont inhibés par le protonophore électrogène FCCP.

Au sein du cytosol laticifère, comme dans un tampon artificiel isotonique, l'ATPase lutoïdique fonctionne donc comme une véritable pompe à protons électrogène. Elle peut recharger le gradient de protons transtonoplastique dans les conditions de composition ioniques prévalant in vivo.

Dans le cytosol, le Δ $\tilde{\mu}H$ engendré par le fonctionnement de l'ATPase tonoplastique peut atteindre des valeurs approchant + 150 mV.

7) CONDITIONS DE MAINTIEN DU △ µ̃H TRANSTONOPLASTIQUE LUTOIDIQUE :

L'ATPase du tonoplaste lutoïdique accumule donc, au sein des lutoïdes, un large pool de protons en déséquilibre thermodynamique (Δ µ̃H >0) par rapport au milieu environnant (cytosol ou tampon artificiel).

La rétention, à long terme de ce gradient électrochimique de protons dépendra d'une part, de la perméabilité passive (diffusion) du tonoplaste lutoïdique vis-à-vis de ces protons électrogènes, et d'autre part, des échanges ioniques transtonoplastiques possibles faisant intervenir des transferts couplés de protons.

Nous avons tenté de vérifier la validité de ces hypothèses et en particulier, de tester la capacité de rétention, par le tonoplaste lutoïdique, du Δ µH élevé engendré par le fonctionnement de l'ATPase pompe à protons.

Ainsi qu'il l'a été précédemment décrit pour diverses conditions expérimentales (figures : 9 à 14) la figure 15 confirme que des lutoïdes intacts, incubés dans un milieu "semi artificiel" (50 % v/v de cytosol et tampon isotonique artificiel, mais <u>en présence de glucose</u> <u>10 mM</u>, à pH 7,0, accumulent des protons lorsqu'ils sont énergisés par un apport d'ATP-Mg²⁺ (3 mM). Si, après 30 minutes de réaction, on ajoute une dose supplémentaire d'ATP-Mg²⁺ (1,5 mM) dans la suspension, on ne constate pas d'influx supplémentaire significatif de la sonde à protons à l'intérieur des lutoïdes, montrant ainsi que ces organites développent d'ores et déjà un Δ pH maximum. Le milieu intralutoïdique ne peut donc

۰.,



Figure 15 : NECESSITE D'UN APPORT CONSTANT D'ATP POUR MAINTENIR LE \triangle pH TRANSTONOPLASTIQUE, ENGENDRE PAR L'ACTIVITE ATPase.

Des lutoïdes intacts ont été préincubés 20 minutes dans un tampon isotonique à pH 7,0 contenant du glucose 10 mM, en présence de K⁺ (KOH neutralisé par Mes) 30 mM, et de ¹⁴C-méthylamine. Dans une des suspensions transférée dans une cellule de dialyse, on ajoute successivement de l'ATP-Mg 3 mM, puis de l'ATP-Mg 1,5 mM avec environ 100 unités d'hexokinase (). Une expérience identique est effectuée en absence d'hexokinase exogène (). En fin d'expérience les lutoïdes sont lysés par l'addition de Triton 0,1 %. s'acidifier au-delà d'un certain seuil, probablement en raison de son pouvoir tampon interne relativement élevé en dessous de pH 5,5. De fait, le pH interne des lutoïdes, quantifié au cours de l'ensemble de nos expérimentations effectuées *in vitro*, n'a jamais atteint des valcurs inférieures à pH 5,0 (tableau 8). Notons, par ailleurs, que les pH intralutoïdiques mesurés immédiatement après centrifugation du latex, ne semble jamais être inférieurs à pH 5,35 (CRETIN, 1979-a ; BROZOZOWSKA et al., 1979). Il est à remarquer enfin que, dans cette expérience, le gradient transtonoplastique de pH reste à son maximum tout au long de l'incubation, en présence d'ATP (au moins 90 minutes).

Si par contre, on ajoute en même temps que la dose supplémentaire d'ATP-Mg²⁺ (figure 15, symboles pleins) une quantité saturante d'hexokinase (en présence de glucose 10 mM), on constate, après un temps de latence de 15 à 20 minutes, une dissipation progressive du Δ pH préalablement engendré par l'apport précédent d'ATP. Le gradient de pH transtonoplastique rejoint en effet sa valeur initiale développée au cours de la préincubation, une heure environ après l'addition de l'hexokinase.

Nous avons vérifié par ailleurs qu'une addition de glucose-6phosphate (3mM) en même temps que la seconde addition d'ATP, mais en absence d'hexokinase (non figuré ici) n'entraîne aucun efflux significatif de méthylamine. L'efflux de protons, hors des lutoïdes, n'est donc pas attribuable à la présence, ou à l'apparition de glucose-6-phosphate résultant de l'activité hexokinase en présence de ses substrats : glucose et ATP-Mg²⁺.

Par contre, des dosages d'ATP résiduels dans le milieu nous ont permis de vérifier que ce substrat commun aux deux enzymes (ATPase endogène et hexokinase hexogène) a presque totalement disparu après environ 20 minutes d'incubation en présence de l'hexokinase.

Nous en concluons que l'efflux progressif des protons, préalablement accumulés au sein des lutoïdes grâce à l'action de l'ATPase tonoplastique, peut être attribué à la pénurie d'ATP dans le milieu d'incubation. Le maintien d'un Δ pH, et en particulier d'un Δ μ H, transtonoplastique maximum, semble donc nécessiter un fonctionnement permanent de l'ATPase membranaire. Le fonctionnement continuel de l'ATPase pompe à protons est lui-même conditionné par un apport constant et suffisant de son substrat : l'ATP.

Lorsque l'ATP devient limitant dans le milieu, l'efflux progressif des protons accumulés, se traduit par une repolarisation symétrique.



Figure 16 : REPOLARISATION PARTIELLE DU TONOPLASTE LUTOIDIQUE CONSECU-TIVE A LA PENURIE D'ATP DANS LE MILIEU.

Les lutoïdes intacts ont été préincubés 20 minutes dans un tampon isotonique à pH 7,0, contenant du glucose 10 mM et du potassium 30 mM, en présence de la sonde de potentiel radioactive tetraphénylephosphonium. Le protocole expérimental ultérieur est identique à celui décrit dans la figure 15. (): addition d'hexokinase, (): absence d'HK. de la membrane lutoïdique (figure 16). Cependant, la comparaison des cinétiques d'évolution des sondes de pH (figure 15) et de potentiel (figure 16), indique que le Δ pH transtonoplastique se dissipe plus rapidement et rejoint "quantitativement" sa valeur initiale caractéristique des lutoïdes non énergisés, alors que, dans le même temps (1 heure) la repolarisation de la membrane n'est pas totale.

Ces résultats indiquent que la dissipation progressive du pool de protons, accumulés contre un équilibre thermodynamique, n'est pas totalement électrogène. Cette dissipation du gradient électrochimique de protons, préalablement engendré par l'activité ATPase pompe à H⁺, peut donc effectivement résulter de deux phénomènes additifs :

- un efflux passif des H⁺ accumulés énergétiquement, dans le sens de leur gradient de concentration, conduit à terme à un équilibre thermodynamique transmembranaire. Il en découle que, bien qu'opposant une certaine barrière à la diffusion passive des H⁺ (figures 6 et 9 tableau 3), la membrane lutoïdique n'est pas totalement imperméable aux protons ;

- des phénomènes accessoires de transfert de protons sont partiellement compensés électriquement. Ces derniers peuvent correspondre à des mouvements transtonoplastiques d'autres ions, faisant intervenir des mécanismes "symport ou antiport" avec les protons intralutoïdiques.

Considérant nos conditions expérimentales particulières (milieu d'incubation contenant 50 % de cytosol ultrafiltré), les ions ou solutés éventuellement transportés, et donc susceptibles de rendre compte des efflux de protons électriquement compensés, peuvent aussi bien être d'origine cytosolique (citrate, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, ...) qu'artificiel (divers constituants du milieu tampon artificiel ...).

Notons, entre autre, que ces phénomènes peuvent expliquer les différences de Δ µH transtonoplastiques constatées entre lutoïdes lavés et incubés dans un tampon totalement artificiel (Δ µH toujours \leq 0) et ceux constamment maintenus en présence de leur cytosol (Δ µH toujours > 0). L'incubation des lutoïdes fraîchement isolés dans leur cytosol cellulaire peut en effet entretenir un équilibre ionique trantonoplastique, aussi proche que possible de celui existant *in vivo* évitant ainsi tout rééquilibrage artificiel.

Par ailleurs, le cytosol laticifère peut contenir des quantités non négligeables d'ATP (jusqu'à 300 µM), susceptible d'entretenir pendant

un certain temps in vitro le $\Delta \tilde{\mu} H$ transtonoplastique positif existant très probablement au sein de la cellule laticifère.

8) CONCLUSIONS :

2.

Į

L'hydrolyse de l'ATP, catalysée par l'activité ATPase tonoplastique (d'AUZAC 1975-1977), s'accompagne d'une acidification du compartiment intralutoïdique, et d'une dépolarisation de sa membrane. Dans ce sens, nos résultats acquis sur des lutoïdes intacts, fraîchement isolés (CRETIN, 1979, 1981 ; CRETIN et al. 1980) sont en accord avec ceux obtenus <u>indépendamment, dans le même temps</u>, et en utilisant des techniques relativement différentes par MARIN, (1979, 1980, 1981), essentiellement sur des vésicules reconstituées à partir de tonoplaste de lutoïdes lyophilisés.

L'ATPase tonoplastique des lutoïdes intacts fonctionne donc comme une pompe à H^+ électrogène. Elle catalyse un influx, non électriquement compensé, de protons au sein des lutoïdes. A notre connaissance, nos résultats acquis dès 1979 sur les lutoïdes, associés à ceux obtenus parallèlement par MARIN, constituent la première mise en évidence non ambigüe d'une ATPase membranaire, fonctionnant comme une pompe à H^+ , au niveau des vacuoles des végétaux supérieurs. Notons que récemment une activité ATPase pompe à protons tonoplastique semble avoir été caractérisée au sein de suspensions microsomales de racines (MANDALA et al. 1982) et de coleoptiles (DUPONT et al. 1982 ; O'NEIL, 1983) de blé, de racine d'avoine (CHURCHILL et SZE, 1982) et de cals de tabac (SZE, 1982).

Une activité ATPase pompe à protons a également été localisée au niveau du tonoplaste de vacuoles intactes purifiées de Saccharomyces cerevisiae (KAKINUMA et al. 1981).

Nous avons démontré, par ailleurs, que l'ATPase lutoïdique pompe à H⁺, est effectivement fonctionnelle dans les conditions de composition ionique prévalant *in vivo*. C'est le cas pour des lutoïdes intacts fraîchement isolés et incubés dans le cytosol du latex déprotéinisé par ultrafiltration. Toutefois, quel que soit le milieu d'incubation dans lequel baignent les lutoïdes, l'activité de la pompe à protons est capable d'assurer deux fonctions primaires :

- elle peut reconstituer, au moins partiellement, le pool de H⁺, normalement maintenu au sein des lutoïdes grâce à l'existence d'un potentiel de DONNAN lorsque ce dernier est dissipé par un excès de cations perméants :

- elle engendre dans tous les cas un potentiel électrochimique de H⁺ largement positif au travers du tonoplaste. Celui-ci correspond à l'accumulation, en présence d'ATP, d'un pool excédentaire de protons au sein des lutoïdes venant s'ajouter au pool de protons entretenu à l'équilibre par le seul potentiel de DONNAN.

Ce pool excédentaire de H^+ , accumulé au sein des lutoïdes lors du fonctionnement de l'ATPase, se trouve donc en déséquilibre thermodynamique de part et d'autre du tonoplaste, et a tendance à se dissiper progressivement lorsque, faute d'ATP, la membrane lutoïdique n'est plus énergisée. Il semble donc qu'un fonctionnement minimum permanent de l'activité ATPase pompe à protons soit nécessaire pour assurer le maintien d'un Δ pH et surtout d'un Δ μ H transtonoplastique maximum.

Nos résultats concilient les deux théories avancées par différents auteurs, pour expliquer le maintien constant de l'acidité caractérisant le compartiment vacuolaire chez les végétaux, ou lysosomal dans le règne animal. Ainsi, l'acidification du milieu intralysosomal chez les animaux a fait l'objet de nombreuses études. Elles ont donné lieu à deux interprétations divergentes :

> Certains auteurs attribuent la totalité du pH intralysosomal à la distribution "à l'équilibre" des protons, faisant intervenir uniquement un potentiel de DONNAN imposé par l'existence de groupements anioniques non diffusibles localisés à l'intérieur des lysosomes.

Ces auteurs nient d'une façon générale l'intervention de pompes à protons spécifiques (GOLDMAN et ROTTENBERG, 1973 ; HENNING, 1975 ; REIJNGOUD, 1976 a et b ; REIJNGOUD et TAGER, 1977 ; HOLLEMANS et al., 1979 et 1980).

D'autres auteurs, par contre, attribuent une importance capitale à l'existence de mécanismes consommant de l'énergie.
 Dans ce cas, une activité ATPase membranaire interviendrait directement en catalysant un influx de protons au sein des lysosomes (MEGO et al., 1972; SCHNEIDER, 1977 et 1979 a et b; DELL'ANTONE 1979; REEVES, 1983 ...).

Ainsi que le souligne MARIN (1981), "ces deux mécanismes ne s'excluent pas mutuellement,...". Nos résultats nous conduisent à conclure que ces deux phénomènes coexistent, et se complémentent, chez les lutoïdes intacts fraîchement isolés du latex.

Quoiqu'il en soit, la présence d'une activité ATPase pompe à protons au niveau du tonoplaste, confère à la vacuole un rôle important dans la régulation des équilibres ioniques, au sein des cellules végétales (Mc ROBBIE, 1975 ; RAVEN et SMITH, 1979,...). En ce sens, la mise en évidence, au niveau du tonoplaste lutoïdique, d'une activité ATPase pompe à protons électrogène, fonctionnelle, en particulier lorsque les lutoïdes sont incubés dans le cytosol du latex, présente un intérêt considérable.

En catalysant un véritable influx transtonoplastique de H⁺ vers l'intérieur des lutoïdes (acidification vacuolaire), le fonctionnement de l'ATPase doit se traduire, en contrepartie, par une alcalinisation symétrique du milieu environnant (le cytosol). Nous avons dans une certaine mesure vérifié la réalité de ce dernier phénomène, en suivant la cinétique d'alcalinisation, lors de l'addition d'ATP-Mg²⁺, d'un milieu d'incubation très faiblement tamponné (Hepes-Tris, 5 mM, pH 7,4) contenant des lutoïdes (ANNEXE I).

Par ailleurs, ainsi que nous le confirmerons ultérieurement, le pouvoir tampon du cytosol laticifère est relativement faible, dans la zone physiologique des variations de pH (COUPÉ, 1977 ; JACOB et al., 1979).

Ces diverses considérations nous conduisent à conclure que le fonctionnement de l'ATPase tonoplastique pompe à protons doit participer activement à la régulation du pH cytosolique, au sein de la cellule laticifère. Parce que son fonctionnement engendre une alcalinisation du compartiment cytosolique, l'activité de l'ATPase lutoïdique peut activer le métabolisme du cytoplasme laticifère, et l'orienter dans un sens favorable à la régénération et plus globalement à la production du latex.

Enfin, le Δ $\tilde{\mu}H$ transtonoplastique engendré par son fonctionnement, constitue une source d'énergie protonique, susceptible d'énergiser l'accumulation vacuolaire de certains solutés considérés comme inhibiteurs du métabolisme cytosolique (JACOB, 1970 ...). C'est le cas,

par exemple, du citrate, dont l'accumulation au sein des lutoïdes fait intervenir un antiport citrate $^{2-}/H^+$, énergisé par l'ATP-Mg $^{2+}$ (MARIN, 1981 ; MARIN et al., 1981).

II - EFFLUX TRANSTONOPLASTIQUE DE PROTONS LORS DU FONC-TIONNEMENT D'UN SYSTÈME TRANSPORTEUR D'ELECTRONS LUTOÏDIQUE :

La présence d'une ATPase pompe n'exclut pas, a priori, l'existence, sur la même membrane, d'autres systèmes capables de contrôler des flux transtonoplastiques de H⁺, mais utilisant une autre forme d'énergie que celle engendrée par l'hydrolyse de l'ATP.

MOREAU et al. (1975) ont mis en évidence le fonctionnement d'un système transporteur d'e⁻, localisé sur le tonoplaste lutoïdique. Ce système est capable de transférer les électrons du NADH sur des accepteurs artificiels tels le ferricyanure de potassium ou le cytochrome <u>c</u> exogène. Ces auteurs ont également montré que le tonoplaste lutoïdique est totalement dépourvu de cytochrome <u>c</u>, de cytochrome P₄₅₀ et d'activité cytochrome <u>c</u> oxydase. Par contre la membrane lutoïdique renferme deux cytochromes du type <u>b</u> (<u>b</u>₅₆₁ et <u>b</u>₅₆₃) dont un seul (<u>b</u>₅₆₃) semble réductible par le NADH. Le NADPH est sans effet. La fonction d'un tel système transporteur d'e⁻ tonoplastique au sein de la cellule laticifère demeure obscure.

Par analogie avec la capacité des chaînes de transport d'électrons membranaires mitochondriales (PADAM et ROTTENBERG, 1973; SIGEL et CARAFOLI, 1978...), chloroplastiques (NEUMAN et JAGENDORF, 1964; TELFER et EVANS, 1972; HELDT et al., 1973; GRABER et WITH, 1976 ...) ou bactériennes (REEVES, 1971; RAMOS et al., 1976; KELL et al., 1978; ELEMA et al., 1978 ...), à convertir un flux d'e en énergie protonique (Δ µ̃H), nous avons recherché si le système transporteur d'e situé sur le tonoplaste lutoïdique était impliqué dans quelque processus de transfert de protons entre les compartiments vacuolaire et cytosolique du latex d'Hevea.

1) ALCALINISATION DU COMPARTIMENT VACUOLAIRE LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH-CYTOCHROME c OYDOREDUCTASE TONOPLASTIQUE :

La figure 17 montre une expérience typique de cinétique de dialyse, réalisée sur une suspension de lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex, et préincubés à l'équilibre en présence de méthylamine comme sonde à protons.

L'addition d'une solution concentrée de cytochrome <u>c</u> (500 μ M final), ajustée au pH de la suspension provoque une légère augmentation instantanée de la radioactivité dans l'effluent de dialyse. Celui-ci traduit un "efflux" de faible amplitude, mais significatif de la sonde à protons du milieu intralutoïdique vers le milieu d'incubation extérieur. Après l'établissement d'un nouvel équilibre, l'addition ultérieure de NADH, ajusté au pH de la suspension, provoque une augmentation massive et progressive de la radioactivité dans le milieu extralutoïdique. L'addition de NAD⁺ reste sans effet significatif.

La figure 18 montre que, en absence de protonophore (FCCP), l'addition préalable de NADH seul, induit un léger efflux lent et progressif de la sonde à protons hors des lutoïdes, et que l'adjonction ultérieure du cytochrome <u>c</u> accélère et amplifie fortement le phénomène. La lyse des lutoïdes par le Triton libère instantanément la méthylamine résiduelle, accumulée par le compartiment vacuolaire lors de la préincubation.

Au cours des expérimentations, des contrôles périodiques au moyen d'une microélectrode de pH combinée, nous ont permis de vérifier que le pH du milieu d'incubation, fortement tamponné, ne montre qu'une faible acidification en fin de réaction, ne pouvant expliquer à elle seule les efflux massifs de la sonde à protons. Par ailleurs des mesures spectrophotométriques effectuées en parallèle, dans des conditions identiques, confirment que dans le même temps, le NADH s'oxyde et le cytochrome c est réduit, en présence de lutoïdes (tableaux 14 et 15).

Ces différentes considérations nous conduisent à conclure que les efflux de méthylamine hors des lutoïdes sont essentiellement attribuables à une diminution de Δ pH transtonoplastique par suite d'une alcalinisation du milieu intralutoïdique, lors du fonctionnement de la NADH cytochrome c oxydoréductase tonoplastique.


Figure 17 : EFFLUX TRANSTONOPLASTIQUE DE LA ¹⁴C-METHYLAMINE LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH-CYTOCHROME <u>C</u> OXYDOREDUCTASE LUTOIDIQUE.

Les lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex ont été préincubés 30 minutes à pH 7,0, dans un tampon isotonique contenant du potassium 30 mM, en présence de ¹⁴C-méthylamine. Après transfert des suspensions dans les cellules de cinétique de dialyse, du Cytochrome <u>c</u> 500 μ M puis du NADH 2 mM () ou du NAD 2 mM (), ajustés à pH 7,0, sont ajoutés. En fin d'expérience les lutoïdes sont lysés par l'addition de Triton X-100.



Figure 18 : INHIBITION, EN PRESENCE DE FCCP, DES EFFLUX TRANSTONOPLASTI-QUES DE LA SONDE A PROTONS, NORMALEMENT LIES A L'ACTIVITE NADH-CYTOCHRO-ME C OXYDOREDUCTASE LUTOIDIQUE.

Les lutoïdes ont été préincubés soit en présence () soit en absence () de FCCP 50 μ M, à pH 7,0. Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la figure précédente (Fig. 17); cependant l'ordre d'addition des substrats est inversé.

2) ACIDIFICATION DU MILIEU EXTERIEUR, LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH-CYTOCHROME C REDUCTASE DES LUTOIDES FRAIS, INTACTS :

Au moyen d'une électrode, nous avons effectué des mesures directes de pH du milieu extérieur, et du milieu intravacuolaire (traitement aux ultrasons des lutoïdes sédimentés) de suspensions lutoïdiques en milieu faiblement tamponné (Hepes-Tris, 20 mM au total, à pH 7,0) après incubation en présence de NADH + Cytochrome <u>c</u>.

Milieu d'incubation	effecteurs -	pH mesuré ap	ΔpH		
(pH 7,0)		extérieur	vacuolaire		
(Hepes-Tris)	Cytochrome <u>c</u>	6,94 ± 0,08	5,94 ± 0,10	1,0 ± 0,18	
+ Mannitol	Cyt. <u>c</u> + NADH	6,72 ± 0,06	6,39 ± 0,08	0,33± 0,14	
(ultrasons)	Cytochrome <u>c</u>	6,97 ± 0,06	-	-	
– Mannitol (Hepes-Tris)	Cyt. <u>c</u> + NADH	6,90 ± 0,08	-	-	

<u>Tableau 11</u> : Variations des pH extra et intralutoïdiques lors du fonctionnement de la NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase, mesurés au pH-mètre. Chaque essai est réalisé à partir d'une suspension de lutoïdes (10 % p/v) intacts (mannitol 320 mM) ou lysés (ultrasons, sans mannitol) tamponnée par 20 mM d'Hepes-Tris et ajustée à pH 7,0. Après 15 minutes d'incubation en présence de Cytochrome <u>c</u> (500 μ M) ± NADH 2mM, les lutoïdes sont sédimentés (5 min., 35.000x g) traités aux ultrasons, et les pH de chaque compartiment mesurés au pH-mètre (une moyenne de 3 essais).

Les résultats consignés dans le tableau ll, montrent qu'en présence simultanée de NADH et de Cytochrome <u>c</u>, seuls les lutoïdes intacts, incubés dans le milieu isotonique, assurent une acidification de leur milieu extérieur d'incubation, corrélative à l'alcalinisation de leur intérieur. En présence de lutoïdes lysés, l'addition de NADH + Cytochrome <u>c</u> n'induit aucune acidification significative du milieu d'incubation, alors que nous avons pu vérifier par ailleurs que l'activité NADH-Cytochrome c oxydoréductase restait fonctionnelle.

L'acidification du milieu extérieur n'est donc pleinement assurée qu'en présence de lutoïdes intacts fraîchement isolés. Ces résultats suggèrent que les variations symétriques de pH des deux compartiments sont liées, et qu'elles peuvent être attribuées à un véritable flux transtonoplastique de protons.

3) EFFETS DES PROTONOPHORES ET DES POISONS RESPIRATOIRES CLASSIQUES :

Lorsque les lutoïdes sont préincubés en présence du protonophore FCCP (figure 18), alors que le gradient initial de pH est déjà partiellement dissipé, l'addition de NADH puis de cytochrome <u>c</u> ne provoque aucun mouvement transtonoplastique de protons significatif. La présence du FCCP n'affecte par l'activité oxydoréductase en tant que telle (tableau 12), mais inhibe le transport de protons qui lui est lié. Ce protonophore agit donc comme un agent découplant l'efflux de protons lutoïdique, normalement couplé au fonctionnement de la NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase tonoplastique.

Le même type d'expérience réalisé en présence d'antimycine A de cyanure ou d'acide salicylhydroxamique (SHAM) aux concentrations inhibant classiquement les chaînes respiratoires bactériennes et/ou mitochondriales (voies cytochromique ou alterne), montre que l'activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase, ainsi que l'efflux de protons qui lui est couplé restent pratiquement inchangés. Ces caractéristiques écartent donc l'hypothèse d'éventuelles contaminations mitochondriales, bactériennes ou fongiques au sein de la suspension.

Il apparaît donc, qu'un système transporteur d'électrons, localisé sur la membrane lutoïdique, catalysant l'oxydation du NADH et la réduction corrélative du cytochrome \underline{c} exogène, est capable de fonctionner comme une pompe à protons, assurant un efflux transtonoplastique des H⁺ accumulés au sein des lutoïdes.

Etant donné que l'oxydation du NADH(+H⁺), en tant que telle, libère des protons à l'état libre dans le milieu, une analyse plus fine des phénomènes devrait aboutir à l'établissement d'une stoéchiométrie : n H⁺ libérés dans le milieu extérieur/NADH (+H⁺) oxydé > 1. La détermination d'une telle stoéchiométrie, qui reste encore à élucider, constituerait une preuve supplémentaire irréfutable du caractère vectoriel du système rédox catalysant la libération de protons libres dans le milieu.

Précisons enfin, que l'effet du FCCP, peut s'interpréter par le fait que cet ionophore, dissipant le pool de protons maintenu en déséquilibre thermodynamique au sein des lutoïdes (non attribuable à l'effet DONNAN) a dissipé les seuls H⁺ susceptibles d'être transportés par la pompe rédox. Ainsi, cette pompe à H⁺ rédox ne pourrait effectivement décharger que le seul pool de protons maintenu en déséquilibre thermodynamique au sein des lutoïdes.

Figure de référence	préincubation	effecteurs ajoutés	pH vacuolaire estimé	∆pH trans- tonoplasti- que calculé	d ∆pH
Fig. 17	_	-	5,95	1,05	·
	-	+ $Uyt \cdot c$ + " +NADH	6,02 6,48	0,52	-0,07 -0,46
Fig. 18	-	- + NADH + "+ Cyt. <u>c</u>	5,72 5,96 6,41	1,28 1,04 0,62	-0,24 -0,42
	+FCCP +FCCP +FCCP	- + NADH + " + Cyt. <u>c</u>	6,51 6,55 6,61	0,49 0,45 0,39	-0,04 -0,06
non figurés	+KCN +Cyt. <u>c</u> + "	- + NADH	5,89 6,47	1,11 0,58	_ -0,53
	+Anti A +Cyt. <u>c</u> + "	- + NADH	6,00 6,42	1,00 0,58	- -0,42
	+SHAM +Cyt. <u>c</u> + "	-+ NADH	6,18 6,53	0,88 0,47	- -0,41
Fig. 19	+valino. +Cyt. <u>c</u> + "	- + NADH	6,1 6,57	0,90 0,43	- -0,47

<u>Tableau 12</u> : Estimation des pH intralutoïdiques et des \triangle pH transtonoplastiques avant et après addition des substrats de la NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase tonoplastique.

Les valeurs sont calculées par les distributions de ¹⁴C-méthylamine déterminées à partir des expériences en cinétique de dialyse réalisées en milieu artificiel et illustrées dans les figures en référence. Toutes les incubations ont été réalisées à pH constant = 7,0 et en présence de KCl 30 mM ($d\Delta pH$ = variations de ΔpH consécutives à chaque addition)

Les concentrations des effecteurs : (NADH) 2 mM ; (Cytochrome c) 0,5 mM. (FCCP) 50 µM ; (KCN) 1 mM; (SHAM) 3 mM; (Antimycine A) 100 µM; (valinomycine) 10 µg/m1.



Figure 19 : FLUX TRANSTONOPLASTIQUE OPPOSES DE LA SONDE A PROTONS (METHYLAMINE) ET DE LA SONDE DE POTENTIEL (85 Rb⁺ + VALINOMYCINE), LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH-CYTOCHROME <u>C</u> OXYDO-REDUCTASE LUTOIDIQUE.

Des lutoïdes fraîchement isolés ont été préincub&s 20 minutes dans un tampon isotonique (pH 7,0 et KCl 30 mM) simultanément en présence de ^{14}C méthylamine, de $^{86}Rb^+$ + Valinomycine (10 µg.ml⁻¹) et de Cytochrome <u>c</u> (oxydé) 500 µM. Dans la cellule de dialyse la suspension est complémentée en NADH (2 mM, pH 7,0). En fin 1.es lutoïdes sont lysés par du Triton.



<u>Figure 20</u> : EFFLUX DE LA METHYLAMINE ET INFLUX DE LA SONDE DE POTENTIEL TETRAPHENYLE PHOSPHONIUM, LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH-CYTOCHROME <u>C</u> OXYDOREDUCTASE TONOPLASTIQUE.

Des lutoïdes fraîchement isolés du latex ont été préincubés dans un tampon isotonique (KCl 30 mM, pH 7,0) simultanément en présence de ¹⁴C-Méthylamine et de ³H-Tétraphénylephosphonium (TPP⁺). Dans la cellule de dialyse, sont successivement ajoutés : le Cytochrome <u>c</u> (500 μ M), puis le NADH (2 mM) et enfin le FCCP (25 μ M). A la fin de l'expérience les lutoïdes sont lysés par une addition de Triton X-100. 4) QUANTIFICATION DES EFFLUX DE H⁺ ENGENDRES PAR LE FONCTIONNEMENT DE LA NADH-CYTOCHROME <u>c</u> OXYDOREDUCTASE TONOPLASTIQUE, EN MILIEU ARTIFICIEL :

Les variations de pH intralutoïdique et des gradients transtonoplastiques de protons ont été quantifiées, à partir des cinétiques de dialyses effectuées dans les différentes conditions d'incubation en milieu tampon artificiel. Les valeurs sont rassemblées dans le tableau 12.

A pH extérieur constant (milieu d'incubation fortement tamponné par Hepes-Mes-Tris, 100 mM), et en absence de protonophore, le fonctionnement de la NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase tonoplastique est donc capable d'assurer une alcalinisation du compartiment vacuolaire, et une diminution correspondante du Δ pH transtonoplastique *in vitro*. Dans certaines conditions, surtout lorsque le milieu intralutoïdique est particulièrement acide et donc le Δ pH initial élevé (figure 18), l'addition du NADH seul peut engendrer une certaine dissipation du gradient de pH transtonoplastique. Cette observation peut suggérer la présence d'accepteurs d'e endogènes, au sein de certains lots de lutoïdes.

Cependant, dans tous les cas, la présence des deux substrats (NADH + Cytochrome <u>c</u>) est nécessaire pour assurer un efflux maximum de protons. On notera toutefois qu'une certaine partie du gradient de pH ne peut être dissipée lors du fonctionnement de la pompe rédox, même en présence de concentrations supérieures en substrats. Le pool de protons ainsi conservé au sein des lutoïdes semble de taille relativement constante, et maintient, pour des valeurs de pH extérieur égales à 7,0, un gradient transtonoplastique de protons d'environ 0,5 unité.

5) ELECTROGENICITE DE LA POMPE A EFFLUX :

Les expériences réalisées après incubation des lutoïdes en présence 86 Rb⁺ + valinomycine (figure 19), montrent que l'addition de NADH en présence de Cytochrome <u>c</u> induit une accumulation de la sonde de potentiel, concomitante de l'efflux de la méthylamine. Ces résultats sont confirmés lorsque l'on suit simultanément les évolutions symétriques de la sonde à protons et du tétraphényl-phosphonium (figure 20). Dans ce cas également, la présence des deux substrats (NADH+Cytochrome <u>c</u>) est nécessaire pour assurer l'influx de la sonde de potentiel (TPP⁺), vers l'intérieur des lutoïdes. Les deux phénomènes : efflux de protons et polarisation membranaire sont au moins partiellement réversés par l'addition de FCCP (figure 20).

Ces résultats indiquent que le fonctionnement de la pompe rédox à efflux d'H⁺ est électrogène, et qu'il induit donc une polarisation du tonoplaste lutoïdique (intérieur plus négatif).

6) FONCTIONNEMENT DE LA POMPE TONOPLASTIQUE À EFFLUX DANS LE CYTOSOL :

Nous avons voulu vérifier, si les phénomènes décrits dans le cas de lutoïdes intacts incubés dans un tampon totalement artificiel, pouvaient se manifester pour des lutoïdes incubés dans des conditions de composition du milieu, aussi proches que possible de celles existant *in vivo*.

A l'instar des expériences effectuées pour démontrer le fonctionnement de l'ATPase pompe à protons dans de telles conditions, nous avons incubé des lutoïdes intacts, fraîchement isolés, dans du cytosol ultrafiltré, en présence des substrats de la NADH-Cytochrome <u>c</u> réductase. Les résultats acquis sont rapportés dans le tableau 13.

······	∆ pH et(-Z∆pH)*		ΔΨ		Δ µ̃H	
Milieu d'incubation	initial	+NADH +Cyt. <u>c</u>	initial	+NADH +Cyt. <u>c</u>	initial	+NADH +Cyt. <u>c</u>
Tampon isotonique KCL 30mM; pH 7,0	1,13 (68)	0,78 (47)	- 80	-102	-12	-55
Cytosol ultrafiltré ajusté à pH 7,0	1,41 (84)	1,29 (77)	- 32	- 41	+52	+45
Cytosol ultrafiltré "oxydé"; pH 7,0	1,22 (73)	0,70 (42)	- 37	- 63	+31	-11
Cytosol ultrafiltré "oxydé"; pH 7,0+FCCP	0,68 (41)	0,60 (36)	-100	- 93	-59	-57

<u>Tableau 13</u> : Fonctionnement de la NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase "pompe à efflux de protons", chez des lutoïdes intacts incubés dans un tampon artificiel ou dans le cytosol ultrafiltré du latex. Les incubations ont été effectuées selon la méthode et les conditions décrites dans le tableau 10. Concentration en NADH : 2mM, cytochrome <u>c</u> oxydé 500 μ M. Cytosol "oxydé": cytosol débarrassé de son acide ascorbique réduit endogène par préincubation en présence d'ascorbate oxydase

 $((-Z \ \Delta pH)^{x}, \ \Delta \Psi \text{ et } \Delta \ \tilde{\mu}H \text{ sont exprimes en mV}).$

234

ć :

Nos premières expériences ont été infructeuses : les lutoïdes fraîchement isolés et incubés dans du cytosol ultrafiltré, sans autre traitement, ne montrent qu'une alcalinisation peu significative de leur intérieur en présence de NADH + Cytochrome <u>c</u>. On sait que le cytosol contient de fortes concentrations en acide ascorbique (> 2 mM). Celui-ci réduit chimiquement, très rapidement, tout le Cytochrome <u>c</u> présent, induisant ainsi une pénurie rapide du substrat artificiel accepteur des e de la NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase lutoïdique. Afin de se débarrasser de l'artefact attribué à la présence de l'acide ascorbique endogène, nous avons incubé le cytosol ultrafiltré avec de l'ascorbate oxydase exogène, sous barbottage d'air. Après ce traitement, le cytosol ainsi "oxydé" a été débarrassé de l'enzyme par une nouvelle ultrafiltration.

Dans le cytosol, débarrassé de son acide ascorbique réduit excédentaire, et ajusté à pH 7,0, l'addition simultanée de NADH et de Cytochrome <u>c</u> oxydé, provoque un efflux des protons lutoïdiques. Le phénomène est électrogène et inhibé par le FCCP (tableau 13).

La NADH cytochrome <u>c</u> oxydoréductase tonoplastique des lutoïdes intacts et fraîchement isolés, peut donc, dans certaines conditions, fonctionner comme une pompe à protons au sein du cytosol laticifère. Son fonctionnement électrogène engendre une alcalinisation du compartiment vacuolaire, corrélative à l'acidification du milieu d'incubation, et dissipe ainsi le Δ $\tilde{\mu}H$ transtonoplastique positif.

Cependant, le fonctionnement in vivo de cette pompe à protons "rédox", dont nous avons démontré l'activité potentielle in vitro (accepteur d'e artificiel), repose sur l'existence d'accepteurs d'électrons endogènes, qui restent à découvrir. La part du caractère strictement vectoriel de ce système devra être également précisée.

7) FONCTIONNEMENT DE LA "POMPE REDOX" AVEC DIVERS ACCEPTEURS D'e :

Nous avons tenté de faire fonctionner, en milieu artificiel, la pompe à efflux de protons couplée au fonctionnement du système transporteur d'électrons tonoplastique, avec divers effecteurs artificiels ou susceptibles d'être présents *in vivo*. Les résultats de ces <u>expériences</u> ponctuelles sont rassemblées dans le tableau 14.

		Δ p			
Substrats	MM NADH	sans NADH	+(NADH) 2 mM	$d \land pH$	
	en 20 min.	(20 min.)(a)	(20 min.)(b)	(a-b)	
-	0,14	1,23	1,12	-0,13	
Cytochrome <u>c</u> (500 µM)	0,61	1,08	0,61	-0,47	
Cytochrome <u>c</u> (5 µM)	0,18	1,19	1,00	-0,19	
Cytochrome <u>c</u> oxydase	0,26	0,91	0,73	-0,18	
Cyt. <u>c</u> (5 µM)+Cyt.oxydase	0,81	0,90	0,51	-0,39	
Ferricyanure de K ⁺ (1)	1,09	0,87	0,57	-0,30	
DCPIP (1)	1,63	0,92	0,70	-0,22	
dehydroascorbate (1)	0,20	1,14	1,06	-0,08	
glutathion(oxydé):GSSG(1)	0,56	1,20	0,95	-0,25	
glutathion(réd.) :GSH (1)	0,28	1,18	1,03	-0,15	
GSSG (1) + GSH (0,5)	0,71	1,15	0,81	-0,34	

Tableau 14 : EFFICACITE DE DIVERS ACCEPTEURS D'E⁻, A ENGENDRER UNE ALCALINISATION INTRALUTOIDIQUE EN PRESENCE DE NADH (EN MILIEU ARTI-FICIEL).

1.5

Les incubations ont été réalisées à pH 7,0 pendant 20 minutes et arrêtées par centrifugation. Les Δ pH sont quantifiés par la distribution de la ¹⁴C-méthylamine. La consommation du NADH a été estimée en déterminant le NADH résiduel. Ces résultats correspondent à une moyenne de deux expériences. Sauf cas particulier (cytochrome c en μ M) les concentrations indiquées entre parenthèses sont exprimées en mM. Le cytochrome <u>c</u> à forte concentration (500 μ M) semble, dans la série des substrats testés, l'accepteur d'électrons le plus efficace pour engendrer la dissipation du gradient transtonoplastique de protons en présence de NADH, et ce d'autant qu'il affecte peu le Δ pH initial des lutoïdes intacts.

Afin d'éviter les éventuels artéfacts attribuables aux concentrations excessives de cytochrome (assemblage de cytochrome en multimères au sein de la membrane susceptibles de jouer un rôle de "conducteurs privilégiés" d'e ou de protons,... (VON JAGOW et SEBALD, 1980), nous avons réalisé des expériences en présence de concentrations 100 fois plus faibles de cytochrome c (5 µM).

A ces faibles concentrations, la totalité du cytochrome se trouve très rapidement réduit, et la dissipation du ∆ pH est à la limite de la significativité, probablement à cause de la rapide pénurie de l'accepteur des e du NADH dans le milieu. L'addition de cytochrome oxydase mitonchondriale exogène (5 unités/m1) afin de recycler sous forme oxydée, la faible concentration en cytochrome c rapidement réduite en cours de la réaction, assure en présence des deux substrats (NADH 2 mM; cytochrome c 5µM) la dissipation maximale du gradient transtonoplastique de protons. On remarque cependant qu'en l'absence de NADH et de cytochrome <u>c</u> exogène, la seule addition de cytochrome oxydase engendre déjà une diminution significative du A pH. Il est possible qu'en s'incorporant dans la membrane lutoïdique, la cytochrome oxydase exogène puisse à elle seule assumer le rôle de pompe à H⁺, qui lui est attribué (PROTEAU et al. 1983 ; CASEY et AZZI, 1983 ; MITCHELL et MOYLE, 1983,...) Elle pourrait, dans notre cas fonctionner en utilisant le pouvoir réducteur accumulé au niveau du tonoplaste lutoïdique (cytochromes <u>b</u> ...).

Les autres accepteurs d'électrons artificiels, tels le ferricyanure de potassium ou le dichlorophénol-indophénol, également réduits par le tonoplaste lutoïdique en présence de NADH, assurent un efflux de protons lutoïdiques. Cependant, leur seule présence (en absence de NADH) engendre une diminution déjà significative du Δ pH transtonoplastique initial. Nous avons par ailleurs observé que ces deux substrats au moins sous leur forme oxydée, pénètrent au sein du compartiment lutoïdique, qui se colore intensément en leur présence.

Enfin, il semble que le couple GSSG/GSH puisse également assurer une large dissipation du gradient de protons transtonoplastique en présence de NADH. Des groupements thiols oxydés pourraient donc jouer un rôle d'accepteur d'électrons physiologique *in situ* (GRIFFITHS et LIOYD, 1979).

Cependant, les résultats sont souvent assez peu reproductibles, et ne sont rapportés ici qu'à titre indicatif. Nous n'en tirerons donc aucune conclusion définitive quant à l'identité d'un éventuel accepteur d'électrons endogène.

Les recherches méritent et doivent être approfondies dans ce domaine.

8) INTEGRITE MEMBRANAIRE ET LABILITE DE LA POMPE REDOX A EFFLUX DE H⁺:

Nous avons vu précédemment que l'intégrité structurale du tonoplaste était nécessaire pour assurer une acidification du milieu d'incubation extérieur, puisque celle-ci résulte précisément d'un efflux transtonoplastique de protons. Nous sommes arrivé par la suite à la conclusion qu'une intégrité parfaite, non seulement de la structure macroscopique mais également de la composition physico-chimique de la membrane lutoïdique, est strictement nécessaire pour que soit assuré le couplage entre l'activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase et le fonctionnement de la pompe à efflux de protons.

Nous avons remarqué, dans un premier temps, que la pompe à efflux n'était opérationnelle que chez les lutoïdes intacts, très fraîchement isolés, et immédiatement utilisés pour ce type d'expérience. Nous avons par la suite quantitativement estimé la perte d'activité "pompe à efflux de H⁺" au cours du vieillissement naturel deslutoïdes incubés dans un tampon isotonique pendant des temps plus ou moins longs.

Les divers résultats sont rassemblés dans le tableau 15.

Ainsi, après 4 heures d'incubation en milieu isotonique artificiel, à pH 7,0, moins de 10 % des lutoïdes en suspension se sont complètement autolysé comme le montrent les évolutions concordantes de leurs indices d'éclatement et des volumes intralutoïdiques estimés dans cet intervalle de temps.

Dans le même temps les lutoïdes ont relargué (passivement...) une certaine quantité de protons; leur milieu interne s'alcalinisant ainsi de moins de 0,2 unité. Par contre, l'efficacité des lutoïdes à engendrer un efflux énergisé de protons en présence de NADH + cytochrome <u>c</u> diminue considérablement. En effet, les lutoïdes perdent en 4 heures, près de 80 % de leur capacité à dissiper énergétiquement leur \triangle pH transtonoplastique en présence des deux substrats de la pompe à efflux, alors que la NADHcytochrome <u>c</u> oxydoréductase (DO 550 nm), semble significativement activée (tableau 15).

Traitements de "vieillissement"	Indice d' éclatement IE %	Volume interne µl	^{∆pH} i (1) initial	$^{\Delta pH}f$ (2) +NADH +Cyt.c	d∆pH (1)-(2)	Efficacité de la pompe à efflux H ⁺ %	Réduction Cyt.c DO/min/ml	Consommation d'oxygène (+ NADH) µ1 0 ₂ /min/V╤300
néant (expérience immédiate)	11,5	331	1,07	0,59	- 0,48	100	0,410	0,37
préincubation 2 heures à 30°C	17,3	307	0,91	0,68	- 0,23	48	0,535	1,17
préincubation 4 heures à 30°C	20	311	0,89	0,79	- 0,10	21	0,580	1,65

<u>Tableau 15</u> : Effet du vieillissement naturel du tonoplaste lutoïdique sur son intégrité et sur l'efficacité de la NADH-Cytochrome c oxydoréductase membranaire à engendrer un efflux de protons. L'expérience a été effectuée sur une suspension de lutoïdes frais homogènes, préparés dans un tampon isotonique contenant : Hepes-Tris, 50 mM;mannitol, 320 mM;MgCl₂, 3 mM;KCl, 30 mM;ajusté à pH 7,0. Des aliquotes de 3 ml ont été préincubées ou non, à température de 30°C dans ce même tampon pour provoquer leur "vieillissement". Les volumes intralutoïdiques ont été déterminés en fin d'incubation. Les Δ pH en absence (Δ pHi) ou après (Δ pHf) addition de NADH (2 mM) + Cytochrome c (0,5 mM) ont été déterminés par la distribution de la méthylamine, après 30 minutes de réaction (méthode de centrifugation). Les indices d'éclatement des lutoïdes (Phosphatase accessible libre/phosphatase-lutoïdique totale =%) ainsi que les activités NADH-Cytochrome c oxydoréductase (DO 550 nM) ont été déterminées parallèlement sur des fractions de l ml. Les consommations de O₂ dépendante du NADH ont été analysées sur des fractions de 3 ml de la même suspension, en présence de KCN²(1 mM) à pH 7,0 (cf. 2ème Partie; chapitre I : mise en évidence d'une activité NADH oxydase lutoïdique) Nous en concluons que le vieillissement "naturel", induit une dégradation physico-chimique suffisamment "discrète" de certaines structures du tonoplaste sans toutefois provoquer une altération importante des propriétés macroscopiques de la membrane. L'éclatement, le volume interne des lutoïdes, ainsi que leur capacité de rétention de leur pool interne de H⁺ initial, sont en effet peu affectés. Cependant ce vieillissement naturel découple la pompe à efflux de H⁺, normalement associée au fonctionnement du système rédox membranaire.

Nous avons par ailleurs montré que le vieillissement in vitro des lutoïdes entiers, se traduit par une augmentation significative de leur absorption d'oxygène en présence de NADH (Tableau 15).

Nous émettons alors l'hypothèse, selon laquelle le vieillissement in vitro du tonoplaste lutoïdique, se traduit par une déviation d'une partie du flux d'électrons énergisant normalement la pompe à efflux, vers d'autres "systèmes accepteurs". Un de ces accepteurs accidentel peut êire l'oxygène moléculaire (cf : deuxième partie de ce mémoire).

Cette labilité du système de couplage entre le flux d'électrons, provenant de l'activité NADH-cytochrome \underline{c} oxydoréductase, et la pompe à protons tonoplastique peut expliquer l'extrème variabilité des phénomènes engendrés (amplitudes de ΔpH et de $\Delta \Psi$).

9) CONCLUSION :

Le tonoplaste lutoïdique est donc doté d'un second système transporteur de protons, fonctionnant en sens inverse de l'ATPase. Il s'agit d'un système couplé à un transport d'électrons, fonctionnant avec la NADH et un accepteur encore non identifié *in vivo*. Son fonctionnement *in vitro*, en présence d'accepteurs d'électrons artificiel comme le Cytochrome <u>c</u>, et dans une moindre mesure le ferricyanure de potassium ou le dichlorophénol indophénol, engendre un efflux transtonoplastique de protons, aboutissant à une alcalinisation du milieu intravacuolaire et à l'acidification consécutive du milieu environnant.

Son fonctionnement est électrogène et peut engendrer un gradient électrochimique de protons transtonoplastique négatif, au moins en milieu artificiel.

En présence d'accepteurs exogènes (cytochrome $\underline{c},...$) la NADHcytochrome \underline{c} oxydoréductase tonoplastique peut également fonctionner comme une pompe à efflux de protons, quand les lutoïdes sont incubés dans

le cytosol du latex (dans la mesure où ce dernier n'est pas excessivement réducteur). Elle pourrait donc être fonctionnelle au sein du latex, mais l'accepteur d'électrons endogène reste à identifier.

Le couplage entre cette activité NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase et le système provoquant l'efflux transtonoplastique de protons est extrèmement labile. Ce découplage pourrait s'expliquer par la dégradation ou le relargage irréversible d'un élément membranaire au cours de son vieillissement, au moins *in vitro*.

La présence sur le tonoplaste lutoïdique de deux pompes à protons, fonctionnant en sens inverse et utilisant des substrats différents confère aux lutoïdes un rôle primordial dans la régulation fine des équilibres ioniques au sein de la cellule laticifère. La modulation des activités différentielles des deux pompes à protons antagonistes localisées sur le tonoplaste est susceptible de réguler finement le pH du cytosol et l'amplitude du gradient transtonoplastique de H⁺.

Pour des raisons analogues à celles évoquées précédemment concernant l'ATPase lutoïdique, le fonctionnement *in vivo* d'une telle pompe à efflux de H^+ , peut jouer un rôle considérable dans la régulation du métabolisme conduisant à la production du latex par *Hevea*.

III- AUTORÉGULATION DU DOUBLE PH-STAT TONOPLASTIQUE, ET RÉGULATION DU PH CYTOSOLIQUE :

1) LOCALISATION DE DEUX POMPES A H⁺ ANTAGONISTES SUR UNE MEME MEMBRANE : un pH-Stat biophysique unitaire ?

La présence d'activités ATPase localisées sur la membrane des vacuoles végétales commence à être bien admise. Elles ont dans un premier temps été décelées et caractérisées au niveau du tonoplaste de levures, telles Saccharomyces cerevisiae (WIEMKEN, 1969 et 1975 ; WIEMKEN et al., 1979) et récemment chez Saccharomyces carlbergensis (OKOROKOV et al. 1982). Chez les végétaux supérieurs, parallèlement, d'AUZAC 1975, 1977 met en évidence une activité ATPase au niveau du tonoplaste des lutoïdes d'Hévéa. La présence de telles activités a été par la suite démontrée sur le tonoplaste de protoplastes isolés de Tulipa et d'Hippeastrum §.p. (LIN et al. 1977), et de Nicotiana rustica (SAUNDERS, 1979), puis sur des vacuoles ou des fragments tonoplastiques isolées de Beta vulgaris

(DOLL et al., 1979 ; LEIGH et WALKER, 1980 ; ADMON et al., 1981) et récemment de Saccharum (THOM et al., 1983). BRISKIN et LEONARD (1980) ont mis en évidence que l'activité ATPase associée à la fraction tonoplastique des membranes isolées de cellules de Nicotiana tabacum montrait des caractéristiques permettant de la différencier de l'ATPase plasmalemmique. Des activités ATPase ont en effet également été caractérisées dans des fractions de membranes plasmalemmiques de cals et de tissus racinaires (HENDRIX et KENNEDY, 1977; TRAVIS et BOOZ, 1979), de Scutel-Soja de lum de maïs (WHEELER et HUMPHREYS, 1979) et de pois (HENDRIX et PIERCE, 1980), de même qu'au niveau du plasmalemme isolé des racines d'avoine (CAMBRAIA et HODGES, 1980), d'orge (CALDWELL et HAUG, 1980) et de blé (DUPONT et LEONARD, 1980 ; DUPONT et al. 1981 et 1982 ; LUNDBORG et al., 1981). Récemment, des activités ATPase d'origine tonoplastique semblent avoir été caractérisées et différenciées des activités ATPase plasmalemmiques présentes simultanément dans des suspensions de microsomes isolés de cals de tabac (SZE, 1980, 1982), de betterave sucrière (WINGSTRAND et LINDBERG, 1982), de racines (MANDALA et al., 1982) et de coléoptiles (DUPONT et al., 1982; O'NEIL, 1983) de blé, ou d'avoine (CHURCHILL et SZE, 1982).

Quelques auteurs contestent cependant le bien-fondé de la localisation tonoplastique de certaines activités ATPase. Elles seraient parfois attribuées à des activités phosphatase non spécifiques (METTLER et LEONARD, 1979), ou alors à des contaminations d'origine mitochondriale ou plasmalemmique (MARIN, 1984).

Rappelons enfin que dans le règne animal, des activités ATPase pompe à protons ont été mises en évidence au niveau de la membrane d'organites assimilables au vacuo-lysomes du latex tels les lysosomes de foie de rat (SCHNEIDER, 1979, 1981 ; DELL'ANTONE, 1979) ou les granules chromaphiniques d'origine bovine (APPS et al., 1979 et 1980 ; PHILLIPS et ALLISON, 1978,...).

En ce qui concerne le latex d'Hevea brasiliensis, la localisation tonoplastique d'une activité ATPase pompe à protons ne fait aucun doute. A titre de confirmation, les expériences récentes réalisées dans notre équipe par GIDROL (1984 ; et GIDROL et al., 1984 ; voir ANNEXE IV), sur des lutoïdes intacts, montrent que tant l'activité ATPase que l'influx de protons qui lui est couplé sont totalement insensibles à l'oligomycine, au NaN₃, au Vanadate et à la Nystatine, éliminant de ce fait toute hypothèse d'une éventuelle contamination mitochondriale ou plasmalemmique.

Nous avons démontré par ailleurs, après centrifugation isopycnique, d'un sédiment de lutoïdes bruts sur un gradient de densité de saccharose, que les activités ATPase ainsi que l'activité pompe à protons dépendante de l'ATP-Mg⁺⁺, sont localisées dans les mêmes fractions denses, superposables à celles contenant les activités phosphatase acide typiquement vacuolaires (figure 21). Nous avons de plus vérifié, sur un échantillon moven regroupant une aliquote de chaque fraction lutoïdique, que l'activité ATPase (mesurée en présence de molybdate 100 µM) qui leur est associée est totalement insensible à la présence simultanée d'olygomycine (50 µg/ml) et d'ortho vanadate (120 µM). Nous n'avons enfin pu détecter aucune activité Cytochrome c oxydase, ni succinate deshydrogenase significative, dans les différentes fractions du gradient. Ces résultats confirment donc sans ambiguité la localisation strictement vacuolaire de cette activité ATPase pompe à protons tonoplastique, et excluent, par le fait, toute possibilité de contamination mitochondriale ou plasmalemmi~ que importante dans la fraction sédimentable du latex frais.

Nous avons, sur les mêmes échantillons lutoïdiques, vérifié le profil de distribution des activités NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase, dans les différentes fractions du gradient. Ainsi qu'il l'a été précédemment rapporté par MOREAU et al. (1975) (pour des lutoïdes conservés 24 heures dans de la glace), la distribution de l'activité NADH+cytochrome <u>c</u> oxydoréductase des lutoïdes fraîchement isolés est tout à fait superposable à celle de la phosphatase acide lutoïdique. Comme dans le cas de l'ATPase, la distribution de l'activité pompe à efflux de protons dépendante du NADH et du cytochrome <u>c</u> est parallèle à celle de l'activité oxydoréductase elle-même localisée dans les fractions denses.

A l'instar des expériences réalisées sur l'ATPase, nous avons vérifié, sur un échantillon moyen regroupant une aliquote des 5 fractions denses les plus actives, que l'activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase est effectivement insensible à la présence simultanée d'antimycine A (100 μ M) et de SHAM (2 mM).

La présence d'activités phosphatase acide associées à des activités ATPase et NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase dans les fractions les plus légères du gradient peuvent correspondre à la présence de lutoïdes dégradés. Ces dernières ne montrent d'ailleurs pas d'activité pompe à H^+ qui leur est normalement associée, lorsque le tonoplaste est intact.



Figure 21 : LOCALISATION DES ACTIVITES POMPES A PROTONS PAR CENTRIFUGA-TION DES ORGANITES DU LATEX SUR UN GRADIENT DE DENSITE DE SACCHAROSE.

Une suspension isotonique (50 % p/v) du sédiment brut du latex (50.000 x g; 30 min.) a été centrifugée sur un gradient de densité de saccharose (0,6 à 1,8 M) contenant du mannitol 0,3 M à pH 7,0 (70 min, 95.000 x g, 8°C). Les activités phosphatase acide, malate deshydrogénase et o-diphénoloxydase ont été testées directement sur les diverses fractions de densité recueillies. Les activités ATPase, NADH-cytochrome <u>c</u> réductase et des pompes à H⁺ qui leur sont liées, ont été mesurées après dilution du saccharose (jusqu'à 0,3 M) par le tampon isotonique, suivie d'une nouvelle sédimentation des organites (30.000 x g; 15 min.). Les sédiments ont été remis en suspension dans le tampon isotonique habituel, et les activités ATPase et NADH-Cytochrome <u>c</u> réductase déterminées. Les activités pompes à protons ont été estimées (méthode de centrifugation) après une préincubation de 15 minutes en présence de ¹⁴C-méthylamine, puis incubation (20 min., pH 7,0) en présence ou non d'ATP-Mg (3 mM) ou de NADH (2 mM) + Cytochrome <u>c</u> (0,5 mM).

Ces résultats confirment que l'activité NADH-Cytochrome \underline{c} oxydoréductase pompe à protons est bien localisée, au même titre que l'activité ATPase, sur le tonoplaste lutoïdique. Par ailleurs, les lutoïdes sont indemnes de contaminations mitochondriale ou plasmalemmique décelable.

Dans le cas des lutoïdes, la localisation de cette activité rédox membranaire n'est donc pas ambigüe. Certains auteurs ont d'ailleurs montré que des activités NADH-Cytochrome <u>c</u> réductase étaient associées au tonoplaste (MATILE et WIEMKEN, 1967 ; MATILE, 1968 ; LEIGH et BRANTON, 1976 ; SAUNDERS 1979). D'autres auteurs contestent le bien-fondé d'une localisation tonoplastique de telles activités (METTLER et LEONARD, 1979; WAGNER, 1979).

Notons enfin que des activités NADH-accepteur (?) oxydoréductase ont été localisées en même temps que des cytochromes <u>b</u>, et au même titre qu'une activité ATPase, au niveau de la membrane des granules chromaffiniques d'origine bovine (FLATMARK et al., 1971 ; TERLAND et FLATMARK, 1980 ; ZAREMBA et HOGUE-ANGELLETI, 1982).

A notre connaissance, c'est la première fois dans le règne végétal que l'on trouve associées sur une même membrane, et en particulier sur une membrane tonoplastique, deux pompes à protons antagonistes fonctionnant avec des substrats énergétiques différents. Le fonctionnement différentiel de ces deux pompes est susceptible de réguler très finement les flux de protons transtonoplastiques et donc le pH et l'homéostasie globale du cytosol cellulaire.

Hormis les exigences évidentes des deux systèmes antagonistes vis-à-vis de la disponibilité de leurs substrats respectifs dans le milieu, il est donc important de connaître les conditions optimales de leur fonctionnement. Nous avons en particulier analysé leur sensibilité respective vis-à-vis des variations de pH du milieu, dans des conditions de compositions ioniques aussi proches que possible de celles existant réellement *in vivo* (cytosol laticifère).

2) REGULATION RECIPROQUE DU pH-STAT TONOPLASTIQUE ET DU pH CYTOSOLIQUE :

Nous avons incubé des lutoïdes intacts, très fraîchement isolés du latex, dans du cytosol ultrafiltré (80 % v/v) tamponné à différents pH (entre 5,5 et 9,0) par l'addition de Mes-Hepes-Tris concentré. Nous avons analysé sur ces suspensions les activités ATPase et NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase, et estimé parallèlement les activités des pompes à H⁺ qui leur sont associées.





Les lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex, ont été lavés dans un tampon contenant 80 % de cytosol du latex ultrafiltré, 20 % de tampon Hepes-Mes-Tris (30 mM final) et du mannitol (180 mM final) à pH 7,0. Ils ont été ensuite préincubés 30 minutes, en présence ou non de ^{14}C -Méthylamine (150 μ M) et de molybdate (100 μ M), dans un milieu de même composition (cytosol 80 %) mais ajusté à divers pH (entre 5,4 et 9,0) par l'addition de Mes-Hepes et(/ou) Tris pulvérulants.

Les activités enzymatiques et les activités pompes à protons ont été estimées respectivement après 10 et 20 minutes d'incubation, en présence, ou non, soit d'ATP-Mg (3 mM), soit de NADH (2 mM) + cytochrome <u>c</u> (500 μ M), préalablement ajustés aux pH correspondants. Les valeurs de pH du milieu portées en abscisses sont les valeurs mesurées au pH mêtre après les incubations. Les activités sont exprimées arbitrairement en valeurs relatives par rapport à leur maxima respectives. Pour les activités NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase le cytosol a été préalablement débarrassé de son acide ascorbique réduit endogène. Les activités pompes à protons ont été estimées par la méthode de centrifugation. Les résultats résumés dans la figure 22 mettent en évidence que, dans ces conditions de composition ionique quasi physiologiques du milieu, l'activité ATPase tonoplastique ainsi que la pompe à H⁺ qui lui est associée, montrent un même pH optimum, situé entre pH 6,5 et 7,0. Il s'en suit que dans la zone physiologique de variations de pH les plus fréquemment observées pour le cytosol du latex (entre pH 6,6 et 7,0), l'activité ATPase pompe à protons reste quasiment constante et potentiellement à son maximum (Notons qu'en milieu totalement artificiel nous avons observé des courbes d'activité à peu près analogues mais avec des optimums moins marqués (GIDROL, 1984).

Le pH optimum de l'activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase, et surtout de la pompe à efflux de protons qui lui est couplée chez les lutoïdes fraîchement isolés, est situé dans des zones plus alcalines, légèrement en deçà de la zone physiologique des variations maximales pH du cytosol (> 7,5).

Il en résulte que, au moins en raison du pH du cytosol, l'activité potentielle de l'ATPase pompe à protons reste pratiquement toujours à son maximum. Par contre, dans cette même zone de variations de pH, l'activité "NADH-accepteur" pompe à efflux est fonction directe du pH du milieu. Cette dernière augmente en effet lorsque le milieu s'alcalinise.

Nous émettons l'hypothèse, selon laquelle toute alcalinisation excessive du cytosol, éventuellement engendrée d'ailleurs par une hyperactivité de l'ATPase (très forte disponibilité en ATP-Mg²⁺, par exemple), pourra être compensée par un efflux de protons contrôlé par la pompe à protons rédox, activée à pH alcalin. Le pH du système aura donc théoriquement, c'est-à-dire si les disponibilités en substrats respectifs des deux activités antagonistes ne sont pas limitantes, tendance à se stabiliser dans la zone comprise entre les pH optimums de chaque pompe à protons.

Nous sommes donc en présence d'un véritable pH-STAT bioosmotique (biophysique) basé sur les flux contrôlés transtonoplastiques de protons. Son fonctionnement doit participer activement à la régulation fine du pH et au maintien de l'homéostasie du cytosol des laticifères. Il est donc impliqué dans la régulation du métabolisme cytoplasmique conditionnant la régénération et la production du latex.

Insistons cependant encore sur le fait que, si la participation active de l'ATPase tonoplastique lutoïdique, à la régulation du pH cytosolique et du Λ $\tilde{\mu}$ H transtonoplastique, ne fait aucun doute dans des conditions *in vivo*, le fonctionnement *in situ* de l'activité NADH-accepteur d'oxydoréductase pompe à H⁺, et son intervention potentielle démontrée *in vitro*, dans la régulation du pH cytosolique, reste subordonnée à l'existence d'un accepteur terminal endogène des flux membranaires d'e⁻ provenant du NADH. Enfin, la quantification des flux strictement vectoriels des protons, engendrés par ce système rédox, de même que la stoéchiométrie : NADH oxydé/n H⁺ transportés, devront également être étudiés avec précision.

Dans l'état actuel des connaissances acquises sur ce système, il nous semble hasardeux de proposer un schéma précis des structures moléculaires et des enchainements réactionnels susceptibles d'expliquer le couplage entre l'activité rédox et l'efflux transtonoplastique de protons. Les cytochromes <u>b</u> (MOREAU *et al.*,1975) les plastoquinones et les tocophérols (ARCHER *et al.*,1969) constitutifs du tonoplaste lutoïdique sont susceptibles de jouer une part active dans ces phénomènes de transfert d'électrons et de protons. L'implication éventuelle de composés soufrés ("sulfure-protéines") et de métallo-protéines nous semble également envisageable.

RÉGULATION DU PH CYTOSOLIQUE PAR UN PH-STAT

BIO-OSMOTIQUE TONOPLASTIQUE,

AU SEIN DU LATEX D'HEVEA

RESUME

Nos résultats acquis grâce à l'utilisation des sondes à protons (¹⁴C-méthylamine) et de potentiel (⁸⁶Rb⁺, ou TPP⁺), tant par la technique de cinétique de dialyse que par simples"incubations-centrifugations", montrent que le tonoplaste deslutoïdes intacts et fraîchement isolés du latex d'Hévéa porte deux systèmes transporteurs de protons antagonistes.

1) Le premier est couplé à l'activité ATPase mise en évidence sur le tonoplaste lutoïdique par d'AUZAC (1975 et 1977). Ainsi, l'ATPase tonoplastique des lutoïdes intacts fonctionne comme une pompe à protons catalysant un influx de H⁺ à l'intérieur du compartiment vacuolaire du latex. Son fonctionnement entraîne donc une acidification marquée du milieu intra-vacuolaire, et une alcalinisation concomitante du milieu environnant, se traduisant par une forte augmentation du gradient de pH transtonoplastique.

Le fonctionnement de cette pompe à H⁺ dépendante de l'ATP-Mg²⁺, est inhibé par les protonophores. Le gradient de pH qu'elle engendre est sélectivement dissipé par le protonophore FCCP.

Les cinétiques de distributions des sondes de potentiel montrent que le fonctionnement de la pompe à H⁺, couplée à l'activité ATPase, est électrogène. Cette pompe engendre une forte dépolarisation de la membrane lutoïdique (l'intérieur des lutoïdes devenant alors moins négatif ou très légèrement positif).

Nos résultats, acquis sur des lutoïdes intacts et fraîchement isolés du latex, sont donc en accord avec ceux obtenus par MARIN (1981) L'ATPase pompe à influx de protons est fonctionnelle dans le cytosol (ultrafiltré) du latex. Dans toutes les conditions d'incubations, en absence de protonophore, son fonctionnement engendre une forte augmentation du gradient électrochimique de protons transtonoplastique (d'environ 100 mV). Lorsque les lutoïdes intacts sont incubés dans un milieu totalement artificiel, à pH 7,0 et en présence de K⁺ (30 mM), le Δ μ H passe d'environ -10 mV pour les lutoïdes non énergisés, à environ +85 mV en présence d'ATP-Mg²⁺. Dans le cytosol ultrafiltré du latex, le Δ μ H, déjà légèrement positif pour des lutoïdes au repos, passe d'environ +50 mV à plus de +140 mV lorsqu'ils sont énergisés par un apport d'ATP exogène.

2) Le second transporteur de protons est couplé au fonctionnement d'un système membranaire oxydoréducteur utilisant le NADH et un accepteur d'électrons. Il fonctionne *in vitto* avec des accepteurs artificiels tels le cytochrome c.

L'activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase mise en évidence sur le tonoplaste lutoïdique par MOREAU et al. (1975), pourrait ainsi fonctionner dans le cas de lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex, comme une pompe provoquant un efflux transtonoplastique de protons. Son fonctionnement entraîne donc une alcalinisation du compartiment vacuolaire et une acidification concomitante du milieu extérieur. Ce transfert de protons, inhibé en présence de FCCP, est électrogène et se traduit par une diminution du Δ µH transtonoplastique lorsque les lutoïdes sont incubés dans le cytosol. Ce Δ µH devient fortement négatif (inférieur à -50 mV) lorsque le système fonctionne dans un milieu artificiel.

L'activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase, de même que la pompe à efflux de H^{+} qui lui est normalement associée, sont résistantes aux inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires mitochondriales, bactériennes ou fongiques utilisés aux concentrations habituelles (KCN, Antimycine, SHAM).

Nous avons montré que la pompe à protons dépendante du NADH et du cytochrome \underline{c} peut rester fonctionnelle lorsque les lutoïdes sont incubés dans le cytosol du latex ultrafiltré. Cependant, l'élimination préalable de l'acide ascorbique présent dans le cytosol (> 2 mM) s'avère nécessaire pour éviter une réduction chimique rapide du Cytochrome \underline{c} et

la pénurie concomitante de l'accepteur artificiel d'e obligatoire pour assurer le fonctionnement de la chaîne rédox tonoplastique, in vitro.

Lorsque des lutoïdes, fraîchement isolés du latex, sont maintenus 4 heures en suspension dans un milieu isotonique, à température ambiante, la stabilité de leur membrane limitante ne semble pas affectée outre mesure. En effet, leur indice d'éclatement, leur volume interne et leur gradient transtonoplastique de pH ne sont que peu modifiés dans cet intervalle de temps. Cependant ces lutoïdes "vieillis" perdent jusqu'à 80 % de leur capacité à assurer l'efflux transtonoplastique de protons normalement couplé à l'activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase, alors que cette dernière reste pleinement fonctionnelle.

Le "vieillissement" du tonoplaste semble donc induire un découplage de l'activité oxydoréductase et du système translocateur de protons qui ne lui est associé que tant que l'intégrité parfaite de la membrane est assurée. Ce phénomène pourrait être attribué à la dégradation ou au relargage irréversible d'un hypothétique facteur de couplage lors du vieillissement de la membrane.

L'activité NADH-cytochrome <u>c</u> pompe à H^+ tonoplastique reste la plupart du temps fonctionneile *in vitro* lorsqu'elle est recherchée sur des lutoïdes très fraîchement isolés. Nous insisterons cependant sur le fait que son fonctionnement effectif *in situ* (au sein du latex), reste subordonné à l'existence d'accepteurs d'électrons endogènes, qui restent à identifier au sein du latex.

3) L'optimum de pH correspondant à l'activité potentielle maximum de chacure des deux pompes à protons a été déterminé dans des conditions de composition ionique de milieu s'approchant de celles existant *in vivo* (Cytosol 80 %). Ils correspondent chacun aux limites de la zone physiologique des variations de pH cytosoliques, qu'ils encadrent.

Ainsi, l'ATPase pompe à influx de H^+ fonctionne au maximum de ses potentialités des pH 6,5 et reste très active jusqu'à pH 7,0.

La NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase pompe à efflux de H⁺, se caractérise par un pH optimum sensiblement déplacé dans les zones plus alcalines, rarementenregistrées au sein du latex (pH 7,5). Son activité est très sensible aux variations physiologiques de pH. De 35 % environ à pH 6,5 elle atteint 85 % de son activité potentielle maximum vers pH 7,3.

Il s'en suit que toute alcalinisation excessive du cytosol, éventuellement occasionnée par une hyperactivité de l'ATPase, pourra être compensée par une acidification en retour, engendrée par l'activation de la pompe rédox à efflux de H^+ , en milieu alcalin.

Ce double système de pompes à protons antagonistes, localisé sur la membrane tonoplastique des lutoïdes frais, fonctionne donc comme un véritable pH-Stat bioosmotique (biophysique), capable, à l'équilibre, de réguler efficacement le pH du cytosol laticifère. La modulation des activités différentielles de chacune des pompes à H^+ (par la disponibilité en leurs substrats dans le milieu, par exemple), peut engendrer des modifications importantes du pH cytosolique au sein des laticifères, et donc influer efficacement sur le métabolisme cytoplasmique dont dépend la production du latex.

Les mécanismes évoqués ci-dessus peuvent rendre compte des corrélations mises en évidence par ailleurs, liant la productivité des hévéas aux caractéristiques de pH des deux compartiments subcellulaires majeurs du latex.

REGULATION OF THE CYTOSOLIC PH THROUGH A TONOPLASTIC,

BIOOSMOTIC PH-STAT WITHIN THE HEVEA LATEX

ABSTRACT

Our results obtained through the dialysis kinetics technique and simple "incubations-centrifugations" using the proton (14 C-methylamine) and potential (86 Rb⁺ or TPP⁺) probes show that the tonoplast of the intact and freshly isolated lutoids of the hevea latex contains two different proton transport systems.

1) The first one is associated with the ATPase activity revealed in the lutoidic tonoplast by d'AUZAC (1975 and 1977). Thus, the tonoplastic ATPase of the intact lutoids functions as a proton pump which catalyzes an H^+ inflow within the vacuolar compartment of the latex, thus leading to a pronounced acidification of the intravacuolar medium accompanied by an alkalinization of the environment which result in a considerable increase of the pH transtonoplastic gradient.

This $ATP-Mg^{2+}$ - dependent H^+ pump is inhibited by the protonophores. The resulting pH gradient is selectively dissipated by the FCCP protonophore.

The distribution kinetics of the potential probes show that the H^+ pump associated with the ATPase activity is electrogenic. This pump leads to a high depolarization of the lutoidic membrane (the internal part of the lutoids becomes less negative or very slightly positive).

Therefore, our results obtained in intact and freshly isolated lutoids of the latex are consistent with those obtained by MARIN.(1981).

The ATPase proton inflow pump is functional in the (ultrafiltered) cytosol of the latex. Under all the incubating conditions and in the absence of protonophore, it leads to a considerable increase in the electrochemical transtonoplastic proton gradient (of about 100 mV). When the intact lutoids are incubated in a totally artificial medium at pH 7,0 and in the presence of K^+ (30 mV), Δ H increases from - 10 mV for the non-energized lutoids to about + 85 mV in the presence of

ATP-Mg²⁺. In the ultrafiltered cytosol of the latex, \triangle H which is already slightly positive in lutoids at rest increases from about + 50 mV to more than + 140 mV when they are energized by an exogenous supply of ATP.

2) The second proton transport system is associated with an oxidoreducing memebrane system using NADH and an electron acceptor. It functions in vitro with artificial acceptors such as the cyto-chrome \underline{c} .

The NADH-cytochrome <u>c</u> oxidoreductase activity revealed in the lutoidic tonoplast by MOREAU et al. (1975) could function as a proton transtonoplastic efflux pump in the intact lutoids, freshly isolated from the latex, thus leading to an alkalinization of the vacuolar compartment accompanied by an acidification of the external environment. This proton transfer which is inhibited in the presence of FCCP is electrogenic and results in a decrease of the transtonoplastic Δ H when the lutoids are incubated in the cytosol. This Λ H becomes highly negative (lower than - 50 mV) under artificial conditions.

The NADH-cytochrome \underline{c} oxidoreductase activity as well as the related \underline{H}^+ efflux pump are resistant to the classical inhibitors of the mitochondrial, bacterial or fungic respiratory chains used with the usual concentrations (KCN, Antimycin, SHAM).

We showed that the NADH and the <u>c</u> cytochrome-dependent proton pump can remain functional when the lutoids are incubated in the cytosol of the ultrafiltered latex. However, it is necessary to remove previously the ascorbic acid from the cytosol (> 2 mM) in order to avoid a rapid chemical reduction of the cytochrome <u>c</u> accompanied by a shortage of the artificial acceptor <u>e</u> which is necessary for the tonoplastic redox chain to function in vitro.

When some lutoids which are freshly isolated from the latex remain suspended in an isotonic medium at room temperature for 4 hours, the stability of their limiting membrane does not seem to be affected

beyond measure. Their splitting index, their internal volume and their pH transtonoplastic gradient are only slightly modified within this period. However, these "aging" lutoids lose up to 80% of their capacity in order to secure the proton transtonoplastic efflux which is generally associated with the NADH-cytochrome <u>c</u> oxidoreductase activity while the latter remains fully functional.

Therefore, the "senescence" of the tonoplast seems to induce a decoupling of the oxidoreductase activity and of the proton translocationg system which is related to it only as long as the integrity of the membrane is preserved. This phenomenon coud be due to the degradation or the irreversible of an assumed coupling factor when the membrane is subject to senescence.

The NADH-cytochrome \underline{c} tonoplastic \underline{H}^+ pump activity remains most often functional in vitro when it is observed in freshly isolated lutoids. However, we will emphasize that it functions in situ (within the latex) depending on the existence of endogenous electron acceptors which are still to be identified within the latex.

3) The optimum pH corresponding to the maximum potential activity of each of the two proton pumps has been defined with an environmental ionic composition close to that existing in vivo (80% of cytosol).

Thus, the ATPase H^{\dagger} influx pump functions at a maximum pH 6,5 and remains very active up to pH 7,0.

The NADH-cytochrome <u>c</u> oxidoreductase H^+ efflux pump is characterized by an optimum pH which is considerably modified in the more alkaline zones being scarcely observed within the latex (pH 7,5). Its activity is very sensitive to the physiological variations in pH ranging from about 35% at pH 6,5 to 85% towards pH 7,3.

Therefore, any excessive alkalinization of the cytosol which can be caused by an ATPase hyperactivity could be compensated by an acidification induced by the activation of the redox H^+ efflux pump under alkaline conditions. Therefore, this double system of opposite proton pumps located in the tonoplastic membrane of the fresh lutoids functions as a real bioosmotic pH-Stat (biophysical) which can, on balance, regulate effectively the pH of the laticiferous cytosol. The modulation of the differential activities of each H^+ pump (due, for instance, to their available substrates in the medium) can lead to some considerable modifications in the cytosolic pH within the laticifers, thus exerting a considerable influence on the cytoplasmic metabolism which is instrumental to the latex production.

The above-mentioned processes can account for the correlations which relate the hevea productivity to the pH characteristics of the two major sub-cellular compartments in the latex.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE II

FLUX TRANSTONOPLASTIQUES ET COMPARTIMENTATION VACUOLAIRE DES IONS (cas du calcium et du citrate)

UN EXEMPLE DU RÔLE REGULATEUR ET DETOXIFIANT DU COMPARTIMENT VACUOLAIRE VIS-A-VIS DU METABOLISME CYTOSOLIQUE, AU SEIN DU LATEX D'HEVEA BRASILIENSIS

FLUX TRANSTONOPLASTIQUE ET COMPARTIMENTATION VACUOLAIRE DES IONS CALCIUM ET CITRATE

INTRODUCTION :

L'existence de pompes à protons fonctionnelles au niveau du tonoplaste lutoïdique, permet d'envisager le rôle actif que doit jouer le compartiment vacuolaire dans la régulation du pH cytosolique, au sein des cellules laticifères. Ce pH-Stat tonoplastique participe directement à la régulation (orientation et intensité) du métabolisme laticifère. Il fait ainsi partie intégrante des processus contrôlant la régénération, et partant, la production du latex chez l'Hévéa.

Il est maintenant largement reconnu, par ailleurs, que les gradients électrochimiques transmembranaires de H⁺ (ou d'autres ions), constituent fréquemment la source d'énergie nécessaire au transport de divers solutés (SLAYMAN, 1974 ; SLAYMAN et SLAYMAN, 1975 ; HAROLD, 1977 a et b ; BAKER, 1978 ; EDDY, 1978 ; POOL, 1978 ; SPANSWICK, 1981,...). Le fonctionnement des pompes à H^+ lutoïdiques module l'amplitude du $\Delta \mu H^+$ transtonoplastique. On peut donc supposer qu'elles participent à la régulation des divers flux de solutés entre les compartiments cytosolique et vacuolaire du latex. L'intervention de la force motrice protonique dans les processus de transport du citrate par les lutoïdes a d'ailleurs été clairement démontrée (MARIN, 1981 ; MARIN et al., 1981-a). Ainsi, outre leur rôle direct dans la régulation du pH cytosolique, les pompes à H⁺ du tonoplaste lutoïdique pourraient donc être également susceptibles de réguler indirectement le métabolisme laticifère, en modulant les flux et l'accumulation vacuolaire, des divers solutés métabolisables (citrate, Pi, ...) ou inhibiteurs (citrate, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺,...), contrôlant ainsi leur compartimentation au sein des lutoïdes (cf. Introduction).

A ce titre, si divers ions et molécules s'accumulent, in vivo, dans les lutoïdes, contre un gradient de concentration, on n'est pas en mesure d'affirmer s'il s'agit d'un processus de stockage (réserve) ou d'une détoxification. Le stockage de réserves vacuolaires implique un phénomène réversible, tandis qu'un processus de détoxification pure devrait correspondre à une accumulation irréversible.

Nous avons tenté de mieux cerner la dualité de cette fonction vacuolaire, en étudiant, en tant que modèle, les flux (influx et efflux) transtonoplastiques du calcium et du citrate, au niveau de lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex. Ces deux ions sont en effet nécessaires au métabolisme cellulaire, mais à trop fortes concentrations dans le cytosol, ils inhibent efficacement un certain nombre d'enzymes clefs du métabolisme laticigène. Leur concentration dans le cytosol doit donc être modulée d'une façon telle, qu'elle permette le fonctionnement optimum du métabolisme laticifère, dont dépend la régénération et la production du latex par les Hévéas (cf. Introduction).

A - COMPARTIMENTATION VACUOLAIRE ET RÉGULATION DES FLUX TRANSTONOPLASTIQUES DU CALCIUM

Le calcium est strictement nécessaire au métabolisme cellulaire. Cependant, ce cation étant à la fois un activateur ou un inhibiteur de nombreux processus enzymatiques, sa teneur doit être en permanence finement régulée au sein de la cellule. Les effets induits par les variations de sa concentration intracellulaire ou au niveau sub-cellulaire sont tels, que dans le règne animal le Ca²⁺ est classiquement considéré comme un second messager, dont les teneurs varient en réponse à un stimulus primaire souvent de nature hormonale (RASMUSSEN, 1970 ; RASMUSSEN *et al.* 1975 ; KRETSINGER, 1976,...). Un concept du même type semble progressivement se développer dans le règne végétal (WILLIAMSON, 1981 ; MARME, 1981 ; MARME et DIETER, 1982 ; DIETER ET MARME, 1984).

En tant qu'activateur de certaines enzymes, le Ca^{2+} doit donc être présent à concentration suffisante, ou rapidement mobilisable, au sein du cytoplasme cellulaire. Cependant, à trop fortes concentrations, ce cation est un inhibiteur efficace de certaines enzymes clés du métabolisme. C'est le cas par exemple de la pyruvate kinase au sein du cytosol laticifère (JACOB et al., 1977 ; 1979). Par ailleurs, le calcium constitue un puissant agent déstabilisant la suspension colloïdale que constitue le latex. Il est donc nécessaire que tout excès de Ca²⁺ libre.soit évité au sein du cytosol laticifère. Ce cation est de fait accumulé à l'intérieur du compartiment vacuolaire du latex : les lutoïdes (RIBAILLIER, 1972).

Nous avons recherché quelles pouvaient être les modalités contrôlant les flux de calcium au travers du tonoplaste lutoïdique.

1) ACCUMULATION DU CALCIUM PAR LES LUTOIDES :

Ainsi qu'en témoigne le relargage immédiat de la radioactivité, lors de la lyse membranaire provoquée par l'addition de Triton, la figure 23 montre qu'après une préincubation de 30 minutes en présence de $^{45}Ca^{++}$ les lutoïdes intacts ont piégé la quasi-totalité (> 90 %) du calcium initialement présent dans le milieu (0,5 mM au départ).

Deux additions successives (1,0 puis 1,5 mM) de CaCl₂ (non radioactif) suivies d'une addition de MgCl₂(5 mM) n'induisent aucune variation significative de la radioactivité libre dans le milieu d'incubation, et



<u>Figure 23</u> : ACCUMULATION DU ${}^{45}Ca^{++}$ PAR DES LUTOIDES INTACTS. ABSENCE D'ECHANGE ISOTOPIQUE.

Des lutoïdes intacts (10 % p/v) ont été préincubés 30 minutes dans un tampon isotonique à pH 7,4 contenant du KCl 30 mM, en présence de $CaCl_2$ 0,5 mM et de $45Ca^{++}$ (8 µCi). Après le transfert de la suspension dans la cellule de dialyse, on a ajouté successivement $CaCl_2$ 0,5 puis 1,5 mM, MgSO₄ 5 mM, suivis d'ADP-Mg 3 mM. En fin d'expérience les lutoïdes sont lysés par une addition de Triton X-100 (0,1 % final).



Figure 24 : EFFETS DES VARIATIONS DU _PH DU MILIEU D'INCUBATION ET DE L'ADDITION D'ATP SUR LES ECHANGES DE CALCIUM ENTRE LE COMPARTIMENT VA-CUOLAIRE ET LE MILIEU EXTERIEUR D'UNE SUSPENSION DE LUTOIDES INTACTS.

Les lutoïdes intacts ont été préincubés 30 minutes dans un tampon isotonique à pH 7,5 (Hepes-Tris 30 mM) contenant KCl 30 mM et $MgSO_4$ 5 mM, en présence de CaCl₂ 0,5 mM et de $45Ca^{++}$ (5 µCi). Après le transfert de la suspension dans la cellule de dialyse, le milieu a été acidifié à pH 5,9 par l'addition lente d'HCl (0,5 N) puis réalcalinisé à pH 7,0 par du NaOH (0,5 N). Les additions suivantes correspondent à ATP-Ca⁺⁺ (2,5 mM), puis valinomycine (8 µg.ml⁻¹) et enfin Triton (0,1 % final). Les modifications de pH ont été effectuées sous contrôle d'un pH mètre.


Figure 25 a et b : EFFETS DES VARIATIONS DU pH, DE L'ADDITION D'ATP ET DE CALCIUM, SUR LES ECHANGES DE $^{45}Ca^{++}$ ENTRE LE MILIEU D'INCUBATION ET LES LUTOIDES INTACTS, OU LES STRUCTURES DE LUTOIDES LYSES.

 \times Fig. 25/a : Les lutoïdes intacts ont été préincubés dans un tampon isotonique (Mannitol 0,3 M) Hepes-Tris (30 mM) à pH 7,4, en présence de KCl (30 mM) MgSO₄ (5 mM) et de CaCl₂ (0,5 mM) + 45Ca (15 μ Ci).

 \times Fig. 25/b : Les lutoïdes ont été incubés dans les mêmes conditions mais en absence de mannitol, et traités, en début d'incubation, aux ultra-sons pendant l minute. Le lysat a été ensuite réajusté à pH 7,4 par KOH (0,5 N).

Dans les deux cas de figure, les suspensions lutoïdiques transférées dans des cellules de dialyse ont été acidifiées par l'addition de Mes (0,5 M) et alcalinisées par Tris (0,5 M). Les additions suivantes correspondent à ATP-Mg (3 mM), puis CaCl₂ (2 mM) et enfin Triton X-100 (0,1 %).

en particulier aucun relargage du ${}^{45}_{-}$ Ca⁺⁺ piégé par les lutoïdes intacts. Ces résultats rendent peu probable, d'une part l'intervention de mécanismes d'échanges isotopiques susceptibles d'expliquer l'accumulation du 45 Ca⁺⁺ à l'intérieur des lutoïdes, et d'autre part l'existence de phénomènes d'adsorption majeurs sur les structures extérieures du tonoplaste lutoïdique.

Les lutoïdes intacts absorbent donc, contre un gradient de concentration (concentration intralutoïdique d'environ 1,5 mM), une grande quantité de calcium, et ce, dans un milieu isotonique totalement dépourvu d'énergie métabolique. Nos résultats confirment ainsi ceux obtenus par RIBAILLIER (1972).

L'addition d'ADP-Mg⁺⁺, dans le milieu reste sans effet.

2) FLUX DE Ca^{++} LIES AUX VARIATIONS DU pH EXTERIEUR ET DU \triangle pH TRANSTONOPLASTIQUE :

L'acidification d'une suspension de lutoïdes intacts, par l'addition d'HCl (figure 24) ou d'une solution concentrée de Mes (figure 25-a) se traduit par une augmentation rapide, et de forte amplitude, de la radioactivité dans l'effluent de dialyse. Inversement une réalcalinisation du milieu d'incubation par l'addition de NaOH (figure 24) ou d'une solution de Tris-base (figure 25-a), provoque une forte diminution de la radioactivité libre dans le milieu en présence de lutoïdes intacts.

Lorsque l'on effectue le même type d'expérience avec une suspension de lutoïdes lysés (lutoïdes traités l minute aux ultrasons et suspendus dans un tampon hypotonique (figure 25-b)),les modifications du pH du milieu engendrent également des variations significatives de la radioactivité dans l'effluent. Ces variations vont dans le même sens, mais sont de <u>beaucoup plus faibles amplitudes</u> que celles observées en présence de lutoïdes intacts. Ainsi une acidification de 1,8 unité de pH du milieu d'incubation provoque l'apparition d'environ 700 cpm dans l'effluent lorsque les lutoïdes sont lysés, et de plus de 2700 cpm dans le cas de lutoïdes intacts (figure 25 a et b).

L'addition de Ca⁺⁺ 2 mM (non radioactif) ne provoque aucune variation de la radioactivité dans le milieu d'incubation lorsque les lutoïdes sont intacts, mais relargue par contre la quasi-totalité du ⁴⁵Ca⁺⁺, piégé sur les structures des lutoïdes lysés. Seul l'addition finale d'une concentration lytique de Triton libère la totalité de la radioactivité accumulée au sein des lutoïdes intacts (figure 25-a). Ces résultats nous incitent à conclure que la <u>quasi-totalité</u> <u>du calcium</u> lutoïdique échangeable, dans nos conditions expérimentales, est réellement <u>accumulée à l'intérieur des lutoïdes</u>. Une partie du calcium se trouve adsorbée sur des <u>macro-structures intralutoïdiques</u> non dialysables (face intérieure du tonoplaste, macromolécules internes,...) Ce pool de calcium adsorbé à l'intérieur des lutoïdes n'est sujet au relargage en présence d'un excès de protons (acidification), ou de Ca⁺⁺ (échange isotopique) que dans la mesure où ces organites sont lysées (ultra-sons, hypoosmolarité, présence de Triton).

Par ailleurs, dans le cas de lutoïdes intacts, les flux transtonoplastiques de Ca⁺⁺ induits par les modifications du pH du milieu d'incubation, semblent attribuées aux variations consécutives du gradient transtonoplastique de pH engendrées. En effet, la membrane lutoïdique est peu perméable aux protons (figures 6 et 8). Il est donc peu probable que les flux rapides de calcium observés, procèdent, pour majeure partie, d'une modification des charges intra-lutoïdiques causée par d'éventuels mouvements passifs de protons (ou OH⁻).

Il en résulte que l'accumulation intravacuolaire du Ca⁺⁺ est directement liée à l'amplitude du gradient de protons transtonoplastique. On peut s'attendre ainsi à ce que tout flux transmembranaire de protons s'accompagne d'un flux de Ca⁺⁺ de même direction.

3) INFLUENCES DE L'ATP SUR L'ACCUMULATION DU CALCIUM PAR LES LUTOIDES :

L'addition d'ATP-Ca⁺⁺ (fig. 24 ; Mg⁺⁺ (5 mM) présent) ou d'ATP-Mg⁺⁺ (fig. 25-a) induit une accumulation supplémentaire de calcium, à l'intérieur du compartiment vacuolaire. L'addition d'ADP-Mg⁺⁺, à même concentration, reste sans effet (Fig. 23). Enfin, lorsque l'ATP-Mg⁺⁺ est ajouté à une suspension hypotonique de lutoïdes traités aux ultra-sons (Fig. 25-b), les "mouvements" de calcium sont à peine perceptibles, et la très faible diminution de la radioactivité détectée dans le milieu peut correspondre à une légère accumulation du $^{45}Ca^{++}$ au sein de microstructures tonoplastiques éventuellement revésiculées. Cet effet mineur est par ailleurs totalement aboli, lorsque les expériences sont réalisées en présence d'une dose lytique de Triton (non montré ici).

L'activité ATPase tonoplastique semble donc capable d'"énergiser" une accumulation de calcium au sein des lutoïdes intacts.





Les lutoïdes intacts ont été préincubés 30 minutes dans un tampon isotonique à pH 7,0 (K⁺ 30 mM, Mg⁺⁺ 5 mM, Ca⁺⁺ 0,5 mM, Hepes-Mes-Tris 50 mM) en présence de 45 Ca⁺⁺ (10 µCi environ).

25 minutes après le transfert dans les cellules de dialyse on ajoute du FCCP (20 µM) dans l'une des suspensions (** * *) et une quantité équivalente du solvant seul (12 µl d'éthanol) dans l'autre. Les additions ultérieures sont identiques dans les deux suspensions : ATP-Mg⁺⁺ (3 mM) à pH 7,0 puis Triton (0,1 %).

4) EFFETS DU FCCP ET DU IONOPHORE A-23187

L'addition de FCCP à une suspension de lutoïdes incubés dans un milieu <u>dépourvu de toute source d'énergie</u>, en présence de ⁴⁵Ca⁺⁺, ne provoque qu'un relargage relativement faible (moins de 25 %) de la radioactivité accumulée au sein des lutoïdes (Figure 26). L'addition d'ATP-Mg⁺⁺ <u>en présence du protonophore FCCP</u> n'engendre aucune accumulation supplémentaire du calcium à l'intérieur du compartiment vacuolaire. Au contraire, et à l'instar des phénomènes observés précédemment concernant les flux transtonoplastiques de la sonde à protons (Figure 10) le fonctionnement de l'ATPase, en présence de FCCP, provoque un efflux de faible amplitude, mais significatif, du calcium accumulé dans les lutoïdes (Figure 26).

Nous avons vérifié précédemment (Figures 10 et 11) que le FCCP ne dissipe que le pool de protons se trouvant accumulé en déséquilibre thermodynamique à l'intérieur des lutoïdes. Par ailleurs, ce protonophore découple totalement la pompe à protons associée à l'activité ATPase tonoplastique. Enfin, son action électrogène engendre une hyperpolarisation du tonoplaste (Figure 14 et tableaux 10 et 13).

L'analyse de ces divers résultats met en évidence trois faits majeurs :

- x Le gradient de potentiel (négatif à l'intérieur), ne semble pas constituer le moteur assurant le transport du Ca⁺⁺ au travers du tonoplaste. Il pourrait par contre être directement impliqué dans la rétention d'un large pool de Ca⁺⁺ intralutoïdique ;
- x Les flux transtonoplastiques du calcium sont intimement liés aux flux des protons ;
- * Enfin, le gradient électrochimique de protons transtonoplastique engendré par l'activité ATPase lutoïdique peut "énergiser" un large influx de calcium au sein du compartiment vacuolaire. Les deux phénomènes sont inhibés de la même manière par le protonophore FCCP.

L'addition du ionophore A-23187, considéré comme spécifique des cations divalents (REED et LARDY, 1972 ; CASWELL et PRESSMAN, 1972 ; PRESSMAN, 1976), à une suspension de lutoïdes préincubés avec du $^{45}Ca^{++}$ en absence d'ATP, n'induit qu'un efflux négligeable (< 10 %) du calcium accumulé dans le compartiment vacuolaire (non montré ici). En absence



Figure 27 : EFFETS DE L'ATP ET DU IONOPHORE A-23187 SUR LES FLUX TRANS-TONOPLASTIQUES DE LA METHYLAMINE ET DU CALCIUM.

Les lutoïdes intacts ont été incubés dans un milieu isotonique à pH 7,4 (K⁺ 30 mM, Mg⁺⁺ 5 mM, Ca⁺⁺ 0,5 mM) pendant 30 minutes en présence de 45 Ca⁺⁺ (15 μ Ci) ou de ¹⁴C-Méthylamine (10 μ Ci, 100 μ M). Les additions correspondent à : ATP 3 mM (Ca⁺⁺ 0,5 mM, Mg⁺⁺ 2,5 mM) puis

ionophore A-23187 (20 μ M) et enfin Triton 0,1 %.



Figure 28 : EFFLUX TRANSTONOPLASTIQUES DE LA METHYLAMINE ET DU TETRAPHE-NYIE PHOSPHONIUM, EN PRESENCE DE QUANTITES CROISSANTES DE CALCIUM. EFFET DU FCCP.

Les lutoïdes intacts ont été préincubés à pH 7,0 (Mannitol 0,3 M, Hepes-Tris 15 mM, Ca⁺⁺ 0,5 mM) soit en présence de ¹⁴C-méthylamine (100 μ M) soit de ¹⁴C-TPP⁺ (200 μ M). Les additions successives correspondent à CaCl₂ : 0,5 puis, 1 puis 1,5 mM à pH 7,0 suivies de FCCP (25 μ M) et enfin de Triton 0,1 %. (La concentration cumulée finale de calcium dans le milieu est donc de 3,5 mM environ). d'énergie, il semble donc que le calcium se distribue à l'équilibre thermodynamique de part et d'autre du tonoplaste. Par contre, l'addition de A-23187 à une suspension de lutoïdes "énergisés" par un apport d'ATP-Mg⁺⁺ (Figure 27), provoque un efflux de Ca⁺⁺ au moins équivalent à la quantité de calcium accumulée en présence de l'ATP. Ces résultats indiquent que ce pool de Ca⁺⁺ transporté au sein des lutoïdes grâce au fonctionnement de l'ATPase, est accumulé contre un gradient électrochimique de concentration. Il se trouve de ce fait distribué en déséquilibre thermodynamique de part et d'autre du tonoplaste lutoïdique.

L'efflux de la méthylamine induit par l'addition du A-23187 après le fonctionnement de l'ATPase (Figure 27) est inattendu et difficile à expliquer. On considère en effet généralement que cetionophore catalyse un échange de Ca⁺⁺ ou de Mg⁺⁺ contre des protons. L'effet contradictoire observé peut être attribué à une faible spécificité de l'ionophore, à la concentration utilisée (20 μ M), qui se comporterait alors également comme un protonophore.

5) ECHANGES Ca⁺⁺/H⁺, AU NIVEAU DU TONOPLASTE LUTOIDIQUE :

La Figure 28 montre que des additions successives de calcium, à une suspension de lutoïdes intacts, faiblement tamponnée (Hepes-Tris-15 mM, pH 7,0),provoquent l'efflux de la méthylamine préalablement accumulée dans les lutoïdes. Il y a donc diminution du gradient transtonoplastique de protons. L'addition de FCCP, alors que la concentration totale cumulée du Ca⁺⁺ est de l'ordre de 3,5 mM dans la suspension, provoque une réabsorption de la sonde à protons par le compartiment vacuolaire. Ce phénomène indique que la présence du calcium, et probablement son intense accumulation par les lutoïdes, a provoqué une inversion du gradient de protons transtonoplastique.

Des additions successives de calcium induisent également un efflux de la sonde de potentiel TPP⁺. Cependant, aux concentrations de Ca^{++} , pour lesquelles le Δ pH est dissipé, voire inversé, le gradient de potentiel transtonoplastique reste encore négatif à l'intérieur des lutoïdes. En effet le TPP⁺ n'est totalement libéré dans le milieu, qu'après l'addition d'une dose lytique de Triton (Figure 28).

L'accumulation du calcium au sein des lutoïdes se fait donc au dépend du gradient trantonoplastique de protons. Le transport de ce cation divalent fait très probablement intervenir un mécanisme d'échange.



<u>Figure 29</u> : EFFETS DES AGENTS DEPOLARISANT LE TONOPLASTE LUTOIDIQUE SUR LES FLUX TRANSTONOPLASTIQUES DE CALCIUM.

Les lutoïdes intacts ont été préincubés dans un tampon isotonique (Hepes-Tris 50 mM, Mg⁺⁺ 5 mM, Ca⁺⁺ 0,5 mM, K⁺ 30 mM) en présence de valinomycine (10 μ g.m1⁻¹) et de ⁴⁵Ca⁺⁺.

Les additions correspondent à : KCl 130 mM, ATP-Mg⁺⁺5 mM, Nigéricine (16 μ g.ml⁻¹) puis méthyle-triphénylephosphonium 1,5 mM et enfin Triton 0,1 %.

(antipont) Ca^{++}/H^{+} tonoplastique. Le processus induit une dépolarisation partielle de la membrane lutoïdique, correspondant à un transfert net de charges positives à l'intérieur du compartiment vacuolaire. La dépolarisation observée pourrait traduire une stoechiométrie correspondant à l'échange transmembranaire d'1 Ca^{++} contre 1 seul H^{+} , ou encore à une stoéchiométrie $Ca^{++}/2$ H^{+} accompagnée du cotransport d'un anion dans la même direction que les protons. L'absence de mesure quantitative nous oblige cependant à rester au stade des hypothèses, quant à la stoechiométrie des échanges $Ca^{++}/(n?)$ H^{+} .

6) EFFLUX PARTIEL DU CALCIUM LORS DE LA NEUTRALISATION DU POTENTIEL DE DONNAN TRANSTONOPLASTIQUE (Figure 29):

L'addition d'une forte concentration de KCl (130 mM) dans une suspension de lutoïdes, en présence de valinomycine, induit un efflux marqué du calcium vacuolaire (Figure 29). Ce phénomène est à mettre en parallèle avec la diminution du Δ pH provoquée par la dissipation du potentiel de DONNAN transmembranaire, dans ces mêmes conditions (Tableaux 5 et 9).

Une addition ultérieure d'ATP-Mg, qui restaure au moins partiellement le gradient transtonoplastique de protons (Tableau 9), provoque une réabsorption rapide du calcium précédemment relargué par les lutoïdes.

L'addition de nigéricine dans le milieu contenant de fortes teneurs en potassium (160 mM), provoque l'efflux du calcium accumulé au sein des lutoïdes en présence d'ATP. Cet efflux peut être attribué à l'action du ionophore, qui, catalysant un échange électroneutre K^+/H^+ (PRESSMAN, 1976) dissipe le Δ pH engendré par l'activité ATPase pompe à H^+ .

Enfin, le cation lipophile méthyl-triphényl-phosphonium (MTPP⁺), qui à forte concentration dépolarise totalement le tonoplaste lutoïdique et neutralise le potentiel de DONNAN,provoque également un efflux massif du calcium intralutoïdique.

Ainsi tous les agents dépolarisants testés, qui dissipent le pool intralutoïdique de protons maintenu grâce à l'existence d'un potentiel de DONNAN, provoquent également un relargage massif du calcium accumulé au sein du compartiment lutoïdique. Un large pool de Ca⁺⁺ pourrait donc être également retenu au sein du compartiment vacuolaire grâce à son adsorption sur des structures intralutoïdiques chargées négativement.





Les lutoïdes intacts fraichement isolés, ont été préincubés 20 minutes dans un tampon isotonique à pH 7,4 en présence de K⁺ 30 mM, Ca⁺⁺ 0,5 mM $(+^{45}Ca^{++})$ et d'ATP-Mg⁺⁺ 2,5 mM.

Les additions successives correspondent respectivement à : NADH (1 mM) cytochrome \underline{c} (0,3 mM) puis simultanément NADH (1 mM) + cytochrome \underline{c} (0,3 mM), et enfin Triton (0,1 %).

7) EFFLUX DU CALCIUM LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH-CYTOCHROME C OXYDOREDUCTASE LUTOIDIQUE :

La Figure 30 représente une expérience réalisée avec une suspension de lutoïdes très fraîchement isolés du latex, et <u>préincubés avec</u> $du \frac{45}{Ca^{++}}$, en présence d'ATP-Mg⁺⁺.

Une première addition de NADH (1 mM) provoque un efflux progressif, et de faible amplitude, du calcium accumulé au sein des lutoïdes. L'adjonction ultérieure de cytochrome <u>c</u> (oxydé) augmente considérablement la vitesse de l'efflux. Cette dernière est encore amplifiée lorsque l'on ajoute simultanément une dose supplémentaire des deux substrats.

Des expériences du même type, non figurées ici, ont montré que les efflux de Ca⁺⁺ engendrés par l'activité rédox lutoïdique sont insensibles au cyanure de même qu'à l'Antimycine A et que par ailleurs le système perd de son efficacité si les lutoïdes ne sont pas utilisés immédiatement après leur extraction du latex. Le système oxydoréducteur catalysant l'efflux du calcium intralutoïdique partage donc des caractéristiques communes à celles mises en évidence concernant le fonctionnement de la NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase pompe à efflux de protons tonoplastique.

Il apparaît alors que le fonctionnement de la NADH-cytochrome <u>c</u>oxydoréductase localisée sur le tonoplaste lutoïdique peut assurer un efflux important du calcium intra-vacuolaire.

Toutefois, d'autres expériences analogues à celle décrite dans la Figure 30, mais effectuées avec des suspensions de lutoïdes préincubés $({}^{45}Ca^{++})$ <u>en absence d'ATP-Mg</u>, montrent des cinétiques d'efflux de calcium similaires, mais d'amplitudes beaucoup plus faibles (non figurées ici). Ces observations suggèrent que seul le pool de Ca⁺⁺ libre, accumulé en déséquilibre thermodynamique au sein des lutoïdes "énergisés" par l'ATP, est susceptible d'être relargué, lors du fonctionnement de la NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase tonoplastique. Il constituerait donc un pool de Ca⁺⁺ mobile, énergétiquement mobilisable, donc susceptible d'être remis à la disposition du métabolisme cytoplasmique.

8) DISCUSSION ET CONCLUSION :

De nombreuses études ont été réalisées sur les processus catalysant les transports actifs du calcium au niveau des structures membranaires d'origine animale. Elles ont montré que dans la plupart des cas les mécanismes mis en jeu utilisent soit directement l'énergie libérée par une activité ATPase membranaire, soit le gradient électrochimique de Na⁺ ou de H⁺ qu'elle engendre. On se réfèrera, à titre indicatif, aux revues ou aux récents travaux démonstratifs concernant les mécanismes de transport actif du calcium au niveau des erythrocytes (SARKADI, 1980 ; NIGGLI et al., 1982 ;...) du plasmalemme de foie de rat (KRAUS-FREIDMANN et al., 1982 ;...), du réticulum sarcoplasmique (FROELICH et TAYLOR, 1976 ZIMNIACK et RACKER, 1978 ; MADEIRA, 1980 ; SHOSHAW, 1983 ;...) et enfin au niveau des mitochondries d'origine animale (AKERMAN, 1978 ; BERNARDI et AZZONE, 1979 ; ROSIER et al., 1981 ; AFFOLTER et CARRAFOLI, 1980; ...).

Chez les plantes, on considère généralement que les faibles concentrations en calcium libre dans le cytosol cellulaire, sont essentiellement maintenues d'une part grâce à une accumulation active de ce cation dans les organites cellulaires (surtout dans les mitochondries), et d'autre part grâce à l'extrusion transplasmalemmique du Ca⁺⁺ énergisée par une activité ATPase (DIETER et MARME, 1980 et 1982). Notons qu'une participation <u>active</u> du compartiment vacuolaire dans les processus de régulation des teneurs en calcium cytosolique ne semble jamais avoir été réellement prise en considération !

Si, à l'instar des études effectuées dans le règne animal, de nombreux travaux ont été entrepris pour définir les processus de transport actif du Ca⁺⁺ au niveau de mitochondries d'origine végétale (revue de WILSON et GRAESSER, 1976 par exemple) on ne dispose actuellement que de quelques résultats fragmentaires concernant le transport du calcium par des structures membranaires non-mitochondriales. Chez les végétaux inférieurs, STROOBANT et SCARBOROUGH (1979) et SCARBOROUGH (1980) ont montré que l'accumulation du Ca⁺⁺ dans des vésicules inversées obtenues à partir du plasmalemme de *Neurospora crassa* fait intervenir un échange Ca⁺⁺/H⁺. Dans ce cas l'accumulation du Ca⁺⁺ fait intervenir un processus antiport utilisant le gradient de protons engendré par l'ATPase plasmalemmique (pompe à protons électrogène). Elle est inhibée en présence de FCCP.

Des accumulations de calcium, activéesen présence d'ATP, ont également été récemmentmises en évidence au niveau de microsomes (probablement la fraction plasmalemmique), isolés à partir de végétaux supérieurs (GROSS et MARME, 1978 ; DIETER et MARME, 1980 ; GROSS, 1982 ; MONESTIEZ et al., 1982 ; MONESTIEZ et RONA, 1983 ; STOSIC et al., 1983).

Dans ces derniers cas cependant, l'accumulation du calcium en présence d'ATP n'est pas inhibée par les protonophores. Ce processus de transport (supposé plasmalemmique) utiliserait donc directement l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP, sans intervention d'un mécanisme antiport Ca⁺⁺/H⁺ analogue à celui décrit chez Neurospora Crassa.

Récemment, RASI-CALDOGNO et al. (1982) ont montré la coexistence des deux processus assurant le transport du Ca⁺⁺ en présence d'ATP, au sein d'une même suspension microsomale (entre noeuds de pois) fractionnée sur gradient de métrizamide. Une fraction de microsomes (enrichies en plasmalemme?) montre une accumulation de Ca⁺⁺ activée en présence d'ATP et inhibée par le FCCP ou la nigéricine. Cette fraction accumulerait donc le calcium au dépend d'un gradient électrochimique de protons engendré par le fonctionnement d'une ATPase électrogène. Une deuxième fraction microsomale, de nature indéterminée, assurerait une accumulation de calcium en présence d'ATP, mais resterait insensible aux protonophores.

Les résultats concernant l'énergisation des flux transmembranaires (non mitochondriaux) du calcium chez les végétaux supérieurs, sont donc relativement fragmentaires et contradictoires. Par ailleurs, il est rarement fait mention de l'éventuelle participation, du compartiment vacuolaire, ou même de structures tonoplastiques, dans les phénomènes d'accumulation du calcium observés.

Nos résultats acquis sur les lutoïdes apportent donc des éléments nouveaux. Ils démontrent la participation active du compartiment vacuolaire, dans la régulation des teneurs en calcium d'un cytosol d'origine végétale :

Les lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex, accumulent contre un gradient de concentration, une grande quantité de calcium, et ce en absence de tout apport d'énergie métabolique.

L'accumulation lutoïdique ne peut être attribuée à des phénomènes d'adsorption sur les structures externes du tonoplaste. Par ailleurs, l'absence d'échange isotopique implique l'existence d'un influx net de calcium à l'intérieur du compartiment vacuolaire.

Le fonctionnement de l'ATPase qui induit une acidification du milieu intralutoïdique, et en conséquence, une augmentation du \triangle pH transtonoplastique, provoque une accumulation supplémentaire de Ca⁺⁺ à l'intérieur des lutoïdes. <u>Cet influx de calcium, énergisé en présence d'ATP</u>, <u>est inhibé (ou réversé) en présence de FCCP, du ionophore A-23187, et</u> <u>de la nigéricine.</u> Par contre, ces ionophores n'engendrent qu'un faible efflux du Ca⁺⁺ accumulé par des lutoïdes non énergisés par un apport d'ATP. Il apparaît donc que seul ce pool de calcium libre accumulé au sein des lutoïdes en présence d'ATP, soit en déséquilibre thermodynamique de part et d'autre du tonoplaste lutoïdique.

Le fonctionnement de la NADH-c**y**tochrome <u>c</u> oxydoréductase membranaire provoque un efflux du Ca⁺⁺ préalablement absorbé par les lutoïdes. L'effet est beaucoup plus marqué lorsque les lutoïdes ont été préincubés en présence d'ATP, c'est-à-dire lorsqu'il existe un pool important de Ca⁺⁺ libre maintenu en déséquilibre thermodynamique au sein du compartiment vacuolaire.

Toute augmentation du Δ pH transtonoplastique, par l'alcalinisation contrôlée du milieu d'incubation, provoque une accumulation proportionnelle du calcium à l'intérieur des lutoïdes. Inversement, toute diminution du Δ pH, par une acidification du milieu, engendre un relargage du calcium accumulé.

Par ailleurs, la présence d'agents dépolarisants (K^+ + valinomycine, MTPP⁺, ...), qui à fortes concentrations, neutralisent le potentiel de DONNAN transtonoplastique, et dissipent la part du Δ pH qui lui est associée,provoque également un efflux massif du calcium lutoïdique.

Enfin, l'addition de concentrations croissantes de calcium dans une suspension de lutoïdes intacts, provoque un efflux des protons intralutoïdiques,pouvant aboutir à une inversion du A pH transtonoplastique.

Les différents résultats résumés ici nous conduisent aux conclusions suivantes :

* Il existe deux pools de calcium compartimentés au sein des lutoïdes intacts :

<u>Un pool de Ca⁺⁺ libre</u>, maintenu en déséquilibre thermodynamique dans le compartiment vacuolaire. Celui-ci est sélectivement dissipé par des ionophores tels le FCCP, A-23187 ou la nigéricine en présence de K⁺. Ce pool lutoïdique semble dériver de l'activité ATPase pompe à protons.

<u>Un pool de calcium "lié</u>" retenu fortement au sein du compartiment vacuolaire par un effet "type potentiel de DONNAN". Il peut être partiellement dissipé, au même titre que le \triangle pH qui lui est associé, par une forte concentration de cations perméants.

- * L'accumulation du Ca⁺⁺ au sein du compartiment vacuolaire se fait au dépend du gradient de protons transtonoplastique. Le transport du calcium libre ferait donc intervenir un processus d'échange Ca⁺⁺/(n?)H⁺ au niveau du tonoplaste. Cet échange n'est pas électroneutre. Il engendre une dépolarisation du tonoplaste, traduisant ainsi un influx net de charges positives, au sein des lutoïdes. L'électrogénicité partielle du processus nous conduit à postuler une stoéchiométrie correspondant à l'échange d'un Ca⁺⁺ contre 1 H⁺.
- * Les activités ATPase et NADH-Cytochrome <u>c</u> oxydoréductase tonoplastiques fournissent "l'énergie protonique" nécessaire pour respectivement contrôler l'accumulation ou le relargage du Ca⁺⁺ libre lutoïdique. Le couplage est indirect, et fait intervenir le gradient (électrochimique) de protons qu'elles engendrent. La composante du Δ µH⁺ utilisée pour catalyser les flux transtonoplastique du Ca⁺⁺ mobile semble correspondre essentiellement à la composante osmotique (*i*.e. le Δ pH).
- x En conséquence, les activités tonoplastiques, en contrôlant finement les flux de H⁺ entre le compartiment vacuolaire et cytosolique, moduleront indirectement la compartimentation du Ca⁺⁺ libre.

En ce qui concerne le calcium, le compartiment vacuolaire du latex assure donc pleinement son double rôle vis-à-vis du métabolisme cytosolique :

- un rôle détoxifiant, en soustrayant et séquestrant un large pool de Ca⁺⁺ excédentaire ("fixé" par effet DONNAN) ;

- <u>un rôle de réserve</u> : une partie du Ca⁺⁺ lutoïdique (libre) est susceptible, en permanence, d'être remis à la disposition du métabolisme cytoplasmique. Ce processus doit être sous le contrôle strict du métabolisme cellulaire global qui lui assure la fourniture d'énergie adéquate (ATP et/ou NADH + accepteur), nécessaire à son fonctionnement. En retour, les flux transtonoplastiques de Ca⁺⁺ engendrés sont susceptibles de moduler, au même titre que les flux de H⁺, l'intensité et l'orientation du métabolismeintra-laticifère, et de jouer ainsi un rôle important dans les processus contrôlant la régénération et la production du latex. Cependant, l'effet de la calmoduline exogène, sur les flux transtonoplastiques du Ca⁺⁺, et surtout sur les flux énergisés en présence d'ATP devra absolument être étudié (DIETER et MARME, 1980 a et b, et 1982 ; STOSIC et al., 1983). De même la présence de cette protéine mobilisatrice du calcium, régulant spécifiquement les teneurs cytosoliques de ce cation, et souvent considérée comme un messager hormonal largement distribué aussi bien dans le règne animal que végétal (KLEE et al., 1980 ; MARME et DIETER, 1982) devra également être recherchée au sein du latex.

B - QUASI-SÉQUESTRATION DU CITRATE AU SEIN DES LUTOIDES INTACTS DU LATEX

Nous venons de montrer que, au sein du cytoplasme des laticifères, les lutoïdes intacts peuvent assumer le double rôle, à la fois de compartiment détoxifiant et de réserve vis-à-vis de l'ion Ca⁺⁺. En particulier, grâce à sa capacité de contrôler énergétiquement des flux bidirectionnels de calcium libre, le tonoplaste lutoïdique doit participer activement à la modulation des teneurs de cet ion au sein du cytosol.

Les travaux de JACOB et d'AUZAC (1967, 1969 et 1972) et JACOB (1980, 1979) portant sur le métabolisme cytoplasmique du latex, ont montré l'importance du citrate dans la régulation de certaires enzymes clés du catabolisme glucidique. A des concentrations légèrement supérieures aux concentrations cytosoliques physiologiques (5 à 7 mM),<u>le citrate inhibe</u> entre autre l'invertase, la phospho-fructokinase et la pyruvate kinase, limitant ainsi la disponibilité en acetyl-CoA (précurseur du polyisoprène) et donc la productivité en caoutchouc de l'Hévéa. Les éventuels excès de citrate, produits par le métabolisme laticigène, doivent donc être continuellement soustraits du cytosol. De fait, les lutoïdes du latex accumulent massivement le citrate *in vivo* (RIBAILLIER et al., 1971 ; RIBAILLIER, 1972), assumant de ce point de vue, un véritable rôle détoxifiant vis-à-vis du métabolisme cytosolique.

A l'opposé, rappelons que le ¹⁴C-citrate constitue un précurseur du caoutchouc. Il est en effet transformé par le latex et incorporé dans les molécules de Cis-polyisoprène (caoutchouc) (d'AUZAC, 1965-a). Son accumulation au sein des lutoïdes pourrait donc correspondre également à un stockage vacuolaire de précurseurs carbonés. Le compartiment lutoïdique exercerait ainsi un rôle tampon, vis-à-vis du métabolisme isoprénique au sein des cellules laticifères. Cette fonction implique la possibilité d'efflux du citrate intralutoïdique, vers le compartiment cytosolique, siège des processus enzymatiques conduisant à la synthèse du caoutchouc.

Toutes les études entreprises pour caractériser les mécanismes et les processus d'"énergisation" de l'accumulation du citrate, que ce soit avec des lutoïdes intacts, ou des vésicules tonoplastiques reconstituées, ont abouti à des résultats concordants. In vitro, les lutoïdes accumulent le citrate selon une cinétique michaelienne, thermo et pH dépendante

(d'AUZAC et LIORET 1974, MONTARDY et LAMBERT, 1977). L'énergie nécessaire à cette absorption, qui s'effectue contre un gradient de concentration, semble dériver du gradient électrochimique de protonstranstonoplastique (COUPÉ et LAMBERT, 1977) (MARIN, 1981). Ce dernier est entretenu grâce à l'activité ATPase tonoplastique (d'AUZAC, 1975 et 1977) fonctionnant comme une pompe à protons électrogène (MARIN et al. 1981, CRETIN, 1982).

Par contre, les résultats obtenus par différents auteurs, étudiant les possibilités d'efflux des acides organiques accumulés par les lutoïdes, sont totalement divergents. Selon MONTARDY et LAMBERT (1977), l'accumulation du citrate par des lutoïdes intacts. praîchement isolés du latex, est irréversible. Après une incubation de 45 minutes dans un milieu d'exorption, les lutoïdes intacts retiennent en effet plus de 87 % du citrate absorbé. Ces auteurs attribuent d'ailleurs le faible relargage observé à une déstabilisation voire une lyse inévitable d'une certaine proportion des organites au cours des incubations. A l'opposé, MARIN (1981) démontre une réversibilité du transport du citrate chez des vésicules tonoplastiques reconstituées à partir de lutoïdes lyophilisés. Avec ce matériel, cet auteur met en effet en évidence un efflux thermodépendant du citrate intravésiculaire (très faible à 0° C). Par ailleurs, l'amplitude de l'exorption est fonction de la concentration en citrate dans le milieu. Ces différentes observations conduisent MARIN (1981) à postuler la mise en place de deux pools cinétiques de citrate au sein du compartiment vésiculaire : l'un, de taille réduite correspondrait au citrate échangeable, l'autre, de taille plus importante correspondant à une forme non perméante (citrate $\frac{3-Mg^{++}}{Mg^{+}}$).

Notons cependant que dans leurs expériences réalisées sur les lutoïdes intacts, MONTARDY et LAMBERT (1977) n'ont pas pris en considération un certain nombre de paramètres (modifications de Δ pH, $\Delta \Psi$, de la pression osmotique,...) susceptibles d'influer sur d'éventuels processus d'exorption du citrate intralutoïdique.

Dans le but de préciser le rôle du compartiment vacuolaire "natif", dans la régulation des teneurs en citrate du cytosol laticifère (rôle de réserve), nous avons tenté de provoquer des efflux du citrate intralutoïdique, en modifiant divers paramètres énergétiques, ioniques et osmotiques de suspensions de lutoïdes intacts.

I - ACCUMULATION IRREVERSIBLE DU CITRATE RADIOACTIF PAR LES LUTOIDES INTACTS :

Les figures 31 à 34 présentent les résultats d'expériences réalisées avec des suspensions de lutoïdes intacts, préincubés en présence de fortes radioactivités spécifiques de ¹⁴C-citrate (5 à 25 μ Ci/mmol. Après une heure de préincubation (selon les conditions expérimentales décrites dans la légende de chaque figure) les lutoïdes sont sédimentés, puis lavés (1 fois) de leur excédent de radioactivité externe, par le même tampon d'incubation, non radioactif. Les lutoïdes ainsi "chargés" de ¹⁴C-citrate sont alors remis en suspension dans un tampon d'incubation similaire; seule la concentration en citrate (non marqué) étant alors éventuellement modifiée Trois ml de cette suspension sont finalement transférés dans le compartiment supérieur de la cellule de dialyse. Le volume interne du compartiment lutoïdique représente, selon les expérimentations, entre 20 et 45 % du volume total de la suspension.

1) ACCUMULATION SUPPLEMENTAIRE DU CITRATE EN PRESENCE D'ATP-Mg. EFFETS DU FCCP :

La figure 31 montre que l'addition d'ATP-Mg⁺⁺ à une suspension concentrée de lutoïdes préincubés en présence de ¹⁴C-citrate, induit une accumulation supplémentaire du citrate au sein du compartiment vacuolaire. L'effet de l'ATP-Mg⁺⁺ est totalement inhibé en présence de FCCP (50 μ M). Notons surtout que le protonophore (ajouté à la suspension lors de son transfert dans la cellule de dialyse) n'a provoqué aucun efflux significatif du citrate radioactif préalablement accumulé par les lutoïdes au cours de leur préincubation.

Précisons toutefois que cette accumulation supplémentaire de citrate induite par l'addition d'ATP-Mg⁺⁺, n'est détectable qu'en utilisant de fortes concentrations de lutoïdes, et en présence d'une radioactivité spécifique suffisamment élevée dans le milieu d'incubation. En effet la technique de cinétique de dialyse visualise les variations de concentration du soluté dans le <u>milieu "extérieur</u>" alors que les quantités de citrate maxima accumulées dans les lutoïdes en présence d'ATP, et donc soustraites du milieu d'incubation, n'excèdent jamais 70 µmol. mg⁻¹ (lutoïdes). h⁻¹. Cette technique impose donc, pour que les phénomènes d'accumulation soient détectables d'une manière fiable,



Figure 31 : EFFETS DE L'ATP-Mg ET DU FCCP SUR LES FLUX TRANSTONOPLAS-TIQUES DU ¹⁴C-CITRATE.

Les lutoïdes (0,5 gr.ml⁻¹) ont été préincubés dans un tampon isotonique (mannitol 0,3 M, Hepes-Mes-Tris 50 mM, MgCl₂ 3 mM, KCl 30 mM, molybdate 0,1 mM, citrate 3 mM) à pH 6,7 pendant 1 heure, en présence de 14C-citrate (25 μ Ci).

Après la préincubation, les lutoïdes sont centrifugés et remis en suspension (0,5 gr.ml⁻¹) dans un tampon identique mais en présence de citrate "froid" 0,3 mM. Les additions successives correspondent à : ATP-Mg 1,5 puis 3 mM. Dans l'une des expériences on a ajouté, au temps séro, du FCCP 50 μ M. En fin d'expérience, on ajoute dans les deux cas une dose lytique de Triton X-100 (0,1 %). l'utilisation de très hautes radioactivités spécifiques, et surtout de faibles concentrations en citrate. On peut estimer que la concentration en citrate dans le milieu extérieur ne doit pas excéder d'un facteur supérieur à 10, la capacité d'accumulation du soluté par les organites. En l'occurence la concentration de citrate utilisable dans le milieu d'incubation ne peut guère dépasser 600 à 700 μ M, en présence de l gramme de lutoïdes frais. Dans cette expérimentation particulière, les concentrations en citrate utilisées sont donc nécessairement trop éloignées des concentrations saturantes du substrat pour son transporteur (d'AUZAC et LIORET, 1974 ; MARIN, 1981). Cependant, bien que de ce point de vue cette expérimentation soit critiquable, on peut considérer que l'effet induit par l'ATP, et surtout, son inhibition en présence de FCCP, confirme dans une certaine mesure le fait maintenant bien établi, attribuant l'énergisation du transport du citrate en présence d'ATP, à l'établissement d'un gradient électrochimique de protons transtonoplastique.

Toutefois, l'inéfficacité du protonophore FCCP à engendrer un quelconque efflux du citrate radioactif accumulé au sein du compartiment vacuolaire pendant la préincubation, constitue, de notre point de vue, l'élément irréfutable le plus intéressant, mis en évidence dans cette expérience.

2) RETENTION DU CITRATE RADIOACTIF PAR LES LUTOIDES :

Les modifications du pH du milieu d'incubation par l'addition de tampons "imperméants" (Tris-Hepes-Mes) et les variations de Δ pH transtonoplastique qu'elles engendrent, ne provoquent aucun efflux significatif de la radioactivité absorbée (Figure 32). Seule l'alcalinisation à pH 8 entraîne un très faible relargage apparent du citrate accumulé. Nous avons constaté cependant que ce phénomène n'était pas toujours reproductible. Nous avons testé par ailleurs que, lors de l'alcalinisation du milieu extérieur, un passage local et transitoire à des pH supérieurs à 9 à proximité des injecteurs, pouvait entrainer un éclatement de quelques lutoïdes entrainant ainsi une libération artéfactuelle de radioactivité.

En fin d'expérience, la lyse deslutoïdes par l'addition de Triton X-100 (0,1 %) entraine la libération du citrate accumulé. On constate ainsi que les lutoïdes ont effectivement absorbé *in vitro* une quantité importante de citrate radioactif lors de la période d'incubation.

286



 $\underline{Figure~32}$: EFFETS DES MODIFICATIONS DU $_{\rm PH}$ DU MILIEU D'INCUBATION SUR LES FLUX DU $^{14}\text{C-CITRATE}$.

Les lutoïdes (0,3 gr.ml⁻¹) ont été préincubés dans un tampon identique à celui décrit dans la fig. 31 (citrate 3 mM et 25 μ Ci de citrate radio-actif).

Après centrifugation, les lutoïdes sont remis en suspension (0,3 gr.ml⁻¹) dans le même tampon mais en présence de citrate 5 mM. Les modifications de pH sont induites sous contrôle d'un pH-mètre, par l'addition de Tris, Hepes puis Mes saturés.



 $\underline{Figure~33}$: EFFETS DU $_{\rm P}H,$ DU POTASSIUM, DU MAGNESIUM ET DU IONOPHORE A-23187 SUR LES FLUX TRANSTONOPLASTIQUES DU $^{14}\text{C-CITRATE}$.

Les lutoïdes (0,25 gr.m1⁻¹) ont été préincubés pendant l heure dans un tampon isotonique à pH 7,5 en présence de KCl 30 mM + valinomycine (10 μ g.m1⁻¹), de citrate 5 mM, de ¹⁴C-citrate (22 μ Ci) et d'ATP-Mg 5 mM. Après centrifugation, les lutoïdes sont remis en suspension dans le même tampon isotonique, mais sans ATP et en présence de citrate 'froid' 2 mM. L'acidification est provoquée par 1'addition d'HCl (0,5 N). Par la suite on ajoute successivement : KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM et enfin A-23187 (25 μ M). L'expérience est terminée par 1'addition de Triton



Figure 34 : EFFETS DU A-23187 ET DU MAGNESIUM, SUR LES FLUX DU ¹⁴C-CITRELE ACCUMULE DANS LES LUTOIDES EN ABSENCE DE MG⁺⁺ EXOGENE.

Les lutoïdes (0,3 gr.ml⁻¹) ont été préincubés dans le tampon isotonique contenant du citrate 5 mM et du ¹⁴C-citrate (28 µCi), à pH 7,0 mais en absence de Mg⁺⁺ exogène, pendant l heure. Après centrifugation, les lutoïdes sont remis en suspension dans le même tampon isotonique sans Mg⁺⁺ et en présence de citrate"froid"1 mM. Les additions correspondent successivement à : A-23187 (50 µM) puis MgCl₂5mM et encore 5 mM. En fin d'expérience les lutoïdes sont lysés par l'addition de Triton X-100 (0,1 %)

La Figure 33 représente une expérience réalisée avec des lutoïdes préincubés avec du ¹⁴C-citrate, <u>en présence d'ATP-Mg</u>⁺⁺ (5 mM). Dans ce cas encore, une acidification du milieu d'incubation (diminution du Δ pH), par l'addition d'HC1 reste également sans effet significatif. Seul le magnésium, surtout en présence du ionophore A-23187 induit une perturbation correspondant à une accumulation supplémentaire du citrate à l'intérieur des lutoïdes (de faible amplitude).

L'addition du A-23187, en absence de magnésium extérieur(figure 34) semble provoquer un léger efflux du citrate intralutoïdique, mais le phénomène est loin d'être significatif. L'addition ultérieure de MgCl₂ semble induire une réabsorption du citrate, mais l'amplitude des phénomènes reste très faible. Ces observations sont cependant en faveur de l'intervention du Mg⁺⁺ dans les processus de transport, d'accumulation et de rétention du citrate, au niveau des lutoïdes (MARIN, 1981).

Nous avons expérimenté selon le même protocole (citrate radioactif) <u>divers effecteurs des gradients de protons et de potentiel élec-</u> <u>trique transtonoplastiques</u>. Le NH₄Cl (10 mM) le FCCP ou le CCCP (25 à 100 µM) de même que le MTPP⁺ (jusqu'à 6 mM) ou le KCl (120 mM) en présence de valinomycine <u>n'engendrent aucun efflux notable du citrate radio-</u> <u>actif accumulé in vitro</u>. Cependant, l'addition seule de citrate extérieur 20 mM peut provoquer un léger efflux du citrate radioactif incorporé (échange?). Dans tous les cas, les effets engendrés n'étant pas plus importants que ceux présentés dans les figures 32 à 34, les résultats de ces expérimentations ne sont pas illustrés ici.

II - SÉQUESTRATION INTRAVACUOLAIRE DU CITRATE ACCUMULE IN VIVO :

La quasi-totalité du citrate radioactif accumulé de novo par les lutoïdes intacts in vitro semble séquestrée au sein du compartiment vacuolaire.

Une hypothèse pouvait permettre d'expliquer cette absence d'efflux : la concentration interne en citrate des lutoïdes est de l'ordre de 50 mM. De ce fait, le citrate radioactif absorbé in vitro subit une importante dilution isotopique, si l'on admet toutefois que le citrate absorbé "de novo" forme un "pool unique" non différenciable du citrate initialement présent (accumulé in vivo). Dans nos conditions expérimentales, nous avons estimé qu'on ne pouvait déceler un efflux significatif de la radioactivité si l'on ne provoquait pas un re-



Figure 35 : TENTATIVES D'EFFLUX DU CITRATE LUTOIDIQUE ENDOGENE : EFFETS DU pH.

Les lutoïdes fraîchement isolés sont immédiatement incubés (0,3 gr.ml⁻¹) dans un tampon isotonique (mannitol 0,3 M ; Hepes-Tris 30 mM, MgCl₂ 5mM) pH 7,0 contenant du citrate froid 20 mM (sans citrate radioactif) et

transférés dans la cellule de dialyse. Le milieu est acidifié à pH 5,8 (contrôle pH-mètre) par l'addition de Mops saturé, puis réalcalinisé à pH 8,2 par Tris saturé. Le citrate est dosé enzymatiquement dans le dialysat et les concentrations rapportées en ordonnées correspondent à la concentration en citrate dans le milieu externe de la suspension lutoïdique.



<u>Figure 36</u> : TENTATIVES D'EFFLUX DU CITRATE LUTOIDIQUE ENDOGENE : EFFETS DES AGENTS DEPOLARISANTS MEMBRANAIRES.

Les lutoïdes (0,3 gr.ml⁻¹) sont remis en suspension dans un tampon isotonique à pH 7,0 contenant du citrate froid 3 mM (sans citrate radioactif), et transvasés dans la cellule de dialyse. Les additions correspondent à : KCl 120 mM + valinomycine (10 μ g.ml⁻¹) simultanément, puis TPP⁺ et MTPP⁺ 2mM final. Le citrate est dosé enzymatiquement dans le dialysat, comme dans la figure 35.



 $\underline{Figure 37}$: TENTATIVES D'EFFLUX DU CITRATE LUTOIDIQUE ENDOGENE : EFFETS DE DIVERS EFFECTEURS.

Les lutoïdes (0,3 gr.ml⁻¹) sont remis en suspension dans un tampon isotonique à pH 7,2 contenant du citrate froid 7,5 mM (sans citrate radioactif) et du MgCl₂ 2,5 mM. La suspension est immédiatement transférée dans la cellule de dialyse.

Les additions successives correspondent à : simultanément NADH 1 mM + cytochrome <u>c</u> oxydé 250 μ M). Les lutoïdes sont lysés en fin d'expérience par du Triton X-100 (0,1 %).

largage de citrate équivalent à au moins 15 % (supérieur à 8 mM) du citrate accumulé au sein des lutoïdes *in vivo*. Ce problème de l'enrichissement isotopique en citrate a été également largement évoqué dans le cas des flux transmembranaires de ce soluté étudié avec des vésicules tonoplastiques reconstituées (MARIN, 1981).

Pour lever cette ambiguité, nous avons procédé aux mêmes expériences en dosant enzymatiquement le citrate dans le dialysat. Nous avons vérifié avec cette méthode que des variations de concentration de 1,5 à 2 mM dans le milieu extralutoïdique étaient détectables avec suffisamment de précision (soit un efflux de l'ordre de 3 à 8 % du citrate lutoïdique, selon les concentrations en lutoïdes présentes dans la suspension).

Les figures 35 à 37 présentent les résultats d'expériences effectuées sur des lutoïdes fraîchement isolés du latex, directement remis en suspension dans un tampon isotonique contenant des concentrations variables de citrate non radioactif (3 à 20 mM), et immédiatement transférés dans la cellule de dialyse. Selon les expériences, les volumes intralutoïdiques représentent 20 à 30 % du volume total de la suspension.

Les variations de Δ pH transtonoplastique induites par la modification du pH du milieu d'incubation (figure 35) de même que par le fonctionnement de la NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase pompe à efflux de protons (figure 37), n'engendrent aucun efflux décelable du citrate lutoïdique accumulé *in vivo*. Les additions de cations perméants (MTPP⁺, TPP⁺, K⁺ +valinomycine) qui à fortes concentrations dépolarisent le tonoplaste et abolissent le potentiel de DONNAN transtonoplastique, n'engendre également aucun efflux mesurable du citrate lutoïdique (figures 36 et 37). L 'ionophore A-23187 (figure 37) de même que le FCCP et la nigéricine 50 µM) (non montrés ici) restent aussi sans effet. Enfin des expériences tendant à faire varier la pression osmotique du milieu par l'addition de doses croissantes de mannitol tamponné dans la suspension (0,3 puis 0,45 et enfin 0,6 mM final) n'ont également provoqué aucune exorption significative du citrate lutoïdique dans le milieu d'incubation.

III - CONCLUSION : SÉQUESTRATION D'UN POOL UNIQUE DE CITRATE AU SEIN DES LUTOIDES INTACTS :

Nos expériences confirment les résultats fragmentaires obtenus par MONTARDY et LAMBERT (1977). Ainsi, nous n'avons pu mettre en évidence aucune possibilité d'efflux (supérieur à 5 % du pool intralutoïdique) que ce soit du citrate endogène accumulé *in vivo* ou du citrate radioactif absorbé *in vitro* par le compartiment vacuolaire intact.

PROTOCOLE I	PROTOCOLE II	EFFETS TESTES SUR LES LUTOIDES				
FCCP 25 µM (x) et 50 µM	FCCP 25 et 100 μM CCCP 200 μM	Décharge le ∆pH en augmentant le ∆¥ transtonoplastique				
NADH + Cytochrome <u>c</u>	NADH + Cytochrome	Décharge le ΔpH en augmentant le ΔΨ transtonoplastique				
рн 8 - 7 - 6 (ж)	pH 8 - 7 - 6 - 5 (x))Variation du ∆pH transtono- plastique				
NH ₄ C1 10 mM	NH ₄ C1 10 mM	Décharge totalement les ΔpH et ΔΨ transtonoplastiques				
KC1 100 mM (x)	KC1 100 et 150 mM	Décharge partiellement les ΔpH et ΔΨ transtonoplastiques				
$MTPP^{+}2 a 6 mM$	MTPP 2 mM	Décharge totalement les ΔpH et ΔΨ transtonoplastiques				
Nigericine 10 et 50 µM	Nigericine 50 µM (x))Modifie le ∆pH transtonoplas- tique selon la teneur en K du milieu				
А 23187 : 10 à 50 µM (ж)	A 23187:50 à 100μM	Décharge le gradient de Ca ⁺⁺ (et Mg ⁺⁺) libre; diminue légèrement le ∆pH				
	Mannitol 0,6 M final	Augmente très légèrement le ΔpH transitoirement (0,1 unité en passant de 0,3 à 0,6 M)				

<u>Tableau 16</u> : Liste des différents éffecteurs testés dans les expériences d'exorption du citrate lutoïdique (méthode de cinétique de dialyse). Protocole I : dosage radioactif du citrate - Protocole II : dosage enzymatique du citrate

 (x) l'expérience a également été conduite en présence de différentes concentrations de citrate (3 à 20 mM) extérieur

,

Le tableau l6 rappelle l'ensemble des effecteurs testés avec l'une ou l'autre ou les deux méthodes expérimentales. Ces effecteurs dont on connaît les conséquences sur le gradient (électrochimique) de protons transtonoplastique lutoïdique se sont tous avérés inefficaces à engendrer un efflux net significatif du citrate accumulé *in vivo* comme *in vitro* dans les lutoïdes.

Nos résultats nous conduisent à postuler l'hypothèse selon laquelle le citrate absorbé (*in vivo* comme *in vitro*) forme un pool unique, immobilisé à l'intérieur des lutoïdes intacts, sous une forme dialysable mais non exportable par les transporteurs assurant son influx à l'intérieur du compartiment vacuolaire.

Les forces mises en jeu pour maintenir le citrate immobilisé à l'intérieur des lutoïdes, ne sont pas les mêmes que celles assurant le flux rentrant de ce triacide dans ces organites.

La possibilité d'un efflux important du citrate mise en évidence sur des vésicules reconstituées à partir de lutoïdes lyophylisés (MARIN, 1981), pourrait s'expliquer par la perte de la majeure partie des "facteurs de rétention endogènes intralutoïdiques" lors de la vésiculation du tonoplaste dans un milieu artificiel. Le très faible efflux de citrate radioactif décelé (20 mM) peut rendre compte d'un échange isotopique possible, mais pas d'un efflux net (non mesurable enzymatiquement) du citrate lutoïdique.

0

Il semble donc que la quasi-totalité du citrate soit séquestrée à l'intérieur des lutoïdes intacts. Ce triacide ne peut donc pas être remis à la disposition du métabolisme cytoplasmique par des mécanismes connus tels que, par exemple, ceux assurant les flux de malate transtonoplastiques chez les plantes du type CAM (KLUGE et HEININGER, 1973 ; LÜTTGE et BALL, 1979 ; LÜTTGE et al., 1980 ; LÜTTGE et BALL, 1980).

L'intervention des lutoïdes dans la régulation des teneurs en citrate du cytosol du latex semble donc se limiter essentiellement à un rôle de détoxification. Le compartiment vacuolaire du latex assure en effet la séquestration de la quasi-totalité du citrate excédentaire, favorisant ainsi un fonctionnement optimum du métabolisme cytosolique, et par conséquent la régénération rapide du cytoplasme à l'intérieur des laticifères. Cependant, l'influx et l'accumulation du citrate au sein du compartiment vacuolaire du latex, implique l'existence et l'entretien d'un gradient électrochimique de protons transtonoplastique (MARIN, 1981; MARIN et al., 1981). La compartimentation détoxifiante du citrate est donc sous le contrôle des activités ATPase et NADH"accepteur"oxydoréductase, pompes à protons tonoplastiques.

C - UN ASPECT DU ROLE RÉGULATEUR ET DÉTOXIFIANT DES LUTOIDES IN VIVO : IMPLICATIONS DANS LA RÉGÉNÉRATION ET LA PRO-DUCTION DU LATEX

La production du latex par les hévéas est, au moins en partie, le reflet de l'intensité du métabolisme au sein de leurs tissus laticifères. Nous avons signalé précédemment que les protons et le citrate, à trop fortes concentrations, inhibent efficacement certaines enzymes clefs du métabolisme cytosolique (cf. Introduction). Ces inhibiteurs potentiels sont en général accumulés au sein du compartiment vacuolaire (les lutoïdes) du latex. Il s'en suit que les relations "vacuole-cytosol", et en particulier les flux de H⁺ et de citrate entre ces deux compartiments, contrôlent les teneurs de ces deux solutés inhibiteurs au sein du cytosol, et sont donc susceptibles de moduler l'activité de certaines enzymes cytosoliques. On peut supposer que ces flux transtonoplastiques participent activement à l'orientation du métabolisme laticigène, vers des voies plus ou moins favorables à la régénération du latex, et donc à la productivité des arbres.

Nous avons voulu vérifier si ces hypothèses, déduites essentiellement des études portant sur le métabolisme (enzymologie) du latex et les flux transtonoplastiques de solutés in vitro, trouvaient une confirmation in vivo.

Des relations hautement significatives ont déjà été démontrées à plusieurs reprises, entre la productivité des hévéas et le pH de leur latex (cf. Introduction). Par contre, l'effet des inhibiteurs potentiels du métabolisme, tel le citrate, et surtout le degré de sa détoxification par sa compartimentation *in vivo*, de même que la conjonction des variables pH et citrate du latex, n'ont que peu été étudiées en liaison avec la productivité des arbres. Notons cependant que COUPÉ et LAMBERT (1977) ont mis en évidence une relation directe entre l'aptitude des lutoïdes à accumuler le citrate radioactif *in vitro* et la productivité des arbres.

Nous présentons ici une étude réalisée sur des individus hauts, moyens et bas producteurs, reliant simultanément l'aptitude des lutoïdes à compartimenter les protons et le citrate, <u>in vivo</u>, à la productivité naturelle des Hévéas.

Tableau 17:

MATRICE DES CORRELATIONS RELIANT, PAR COUPLE, LES PARAMETRES DE DISTRIBUTION

COMPARTIMENTALE DES PROTONS ET DU CITRATE AU SEIN DU LATEX, ET LA PRODUCTION DE CAOUTCHOUC

	Production	log Production	(Citrate) luto.	(Citrate) cyto.	(Citrate) L/C	pH cyto.	pH luto.	∆рН	(acides) cyto.
-									
Production g/a/S	1	+0,894 жжж	+0,562 ***	-0,768 ***	+0,755 ***	+0,894 xxx	-0,228	+0,822 ***	+0,476 ***
log.Product.		1	+0,604 ***	-0,845 ***	+0,755 ***	+0,812 ***	-0,260 *	+0,826 ***	+0,456 ***
(Citrate)luto.			1	-0,369 ***	+0,778 ***	+0,675 ***	-0,182	+0,640 жжж	+0,274 ¥
(Citrate)cyto.				1	-0,678 ***	-0,705 ***	+0,170	-0,752 ***	-0,454 ***
L/C citrate					1	+0,765 ***	-0,106	+0,800 ***	+0,429 **
pH cyto.						1	-0,267 *	+0,935 ***	+0,492 ***
pH luto.							1	-0,313 *	-0,247
∆pH C-L								1	+0,457
acides cyto.									1

D'HEVEA BRASILIENSIS

Production (g/a/s); Logarithme de production; (citrate) lutoïdique (mM); (citrate) cytosolique (mM); gradient transtonoplastique de citrate, pH cytosolique (électrode), pH lutoïdique (électrode), gradient de pH transtonoplastique, somme des acides (oxaloacétique+pyruvique) cytosolique (mM)/x significatif (S)/xx hautement significatif (HS)/xxx très hautement significatif (THS). Les analyses portent sur 62 individus sélectionnés et étudiés séparément. I - ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES :

1) SELECTION DES INDIVIDUS ET PARAMETRES PRIS EN COMPTE :

Le latex provient de 62 individus (Hévéas de 22 ans, clone GT1) saignés régulièrement (S,J3/J4), sélectionnés pour leur aspect sain et leur croissance homogène. Afin d'éliminer les arbres dont les faibles productions pouvaient être attribuables à des difficultés d'écoulement (coagulation précoce : cf. Introduction), nous n'avons conservé que des Hévéas présentant un indice d'éclatement de leurs lutoïdes inférieur à 21 % (21 < TE \leq 16 %). On suppose ainsi sélectionner les arbres dont la production rend essentiellement compte de leur potentiel de régénération (activité métabolique des tissus laticifères).

Les latex récoltés à 4°C sont centrifugés individuellement dès le retour au laboratoire (120.000 x g ; 30 min.). Une partie de leur cytosol et de leur sédiment lutoïdique (traité aux ultra-sons) servira aux mesures de pH et des concentrations en citrate de chaque compartiment subcellulaire.

Les paramètres pris en compte dans les analyses multivariées sont les suivantes (les concentrations sont exprimées en mM) :

- concentration de citrate dans le compartiment vacuolaire (les lutoïdes) (notée "citr.vac.")
- concentration de citrate dans le compartiment cytosolique (notée "citr.cyt.")
- le gradient transtonoplastique de citrate calculé (noté "citr.v/c")
- le pH du compartiment cytosolique (noté "pH cyt.")
- le pH du compartiment vacuolaire lutoïdique (noté "pH vac.")
- le gradient de pH transtonoplastique calculé (noté "ApH v-c")
- la somme des concentrations en acides organiques autre que le citrate (pyruvate + oxaloacetate) mesurée par la technique de MOELLERING et GRUBER (1966) (notée "acides cyto.")
- la production individuelle de caoutchouc sec (ou son log), exprimée en grammes de caoutchouc sec/arbre/saignée (notée "g/a/s") (une moyenne de 6 saignées).
2) ANALYSE DE LA MATRICE DES CORRELATIONS PAR COUPLE :

Le tableau 17 présente la matrice des corrélations par couple des paramètres étudiés. L'analyse a été effectuée selon la méthode de régression par les "moindres rectangles". Cette méthode ne privilégie aucune variable, et la matrice de corrélation obtenue est directement utilisable pour les analyses multivariées ultérieures (ACP, CAH,...). L'analyse de cette matrice conduit aux commentaires suivants :

- a) Corrélations entre les paramètres biochimiques du latex et la production de caoutchouc :
 - x Vérification de la relation <u>THS</u> (0,894) <u>positive</u> entre le pH cytosolique et la production (g/a/s). Il s'agit de la plus forte corrélation enregistrée dans cette matrice, liant la production aux paramètres biochimiques. La transformation en log de production n'améliore pas, dans ce cas, la corrélation).
 - * Vérification de la relation <u>THS</u> (+0,822) <u>positive</u> reliant la production au gradient de pH transtonoplastique.
 - * Corrélation <u>inverse THS</u> (-0,768) reliant la production à la concentration en citrate cytosolique. L'expression en log de la production améliore sensiblement la corrélation (-0,845) indiquant un phénomène non linéaire avec un effet seuil probable.
 - * Corrélation positive THS (+0,822) reliant le gradient transtonoplastique de citrate et la production.
 - * Corrélation positive <u>THS</u> (+0,562) entre la concentration en citrate intralutoïdique et la production, ou le log de la production (+0,604).
 - Une corrélation <u>HS</u> (+0,476) positive liant la somme des teneurs en acides oxaloacétique et pyruvique du cytosol, à la production.
 - * Corrélation inverse significative entre le pH intralutoïdique et la production.

- b) Corrélations "internes" entre les paramètres biochimiques :
 - * Les corrélations entre les différents paramètres "citrate" indiquent que les variations des gradients transtonoplastiques du citrate dépendent dans une même proportion des variations de concentrations de ce soluté dans les deux compartiments. C'est-à-dire que les deux compartiments contribuent de la même manière, mais en sens inverse, dans la création du gradient, ou encore qu'il y a flux du citrate d'un compartiment vers l'autre.
 - × Les corrélations entre les différents paramètres "pH" montrent une dissymétrie marquée des contributions des pH de chaque compartiment dans la création du Δ pH : ainsi le pH cytosolique contribue beaucoup plus efficacement (THS) aux variations d'amplitude du Δ pH (r : +0,935), que le pH lutoïdique (r = -0,313).
 En exprimant ce fait en terme de flux transtonoplastiques de protons, on peut interpréter ces observations par l'existence d'un pouvoir tampon beaucoup plus élevé au sein du compartiment lutoïdique que dans le compartiment cytosolique. On peut également supposer que les fortes variations de pH cytosolique, contribuant efficacement à engendrer de fortes variations de Δ pH, ne sont pas dues aux seuls mouvements transtonoplastiques des protons (contribution du pH-Stat biochimique, et flux transplasmalemmiques).
- c) Corrélations entre paramètres "citrate" et "pH" : La corrélation la plus remarquable est celle reliant le gradient de pH et le gradient de citrate transtonoplastique : elle est positive et très hautement significatire ((+0,800).

Dans ce cas encore se sont essentiellement les variations de pH cytoplasmique qui, engendrant de forts gradients de pH, assurent les gradients de citrate les plus élevés (r = +0.765).

3) ANALYSES MULTIVARIABLES EN COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP):

L'analyse porte sur 62 individus (hévéas). Seuls ont été pris en compte les paramètres biochimiques précédemment cités, à l'exclusion du paramètre production, qui n'intervient donc pas en tant que tel, dans les calculs.

Après obtention puis diagonalisation de la matrice de corrélation, et calcul des vecteurs propres, les composantes (axes) principales ont été déterminées, et les coordonnées des points individus calculées dans le nouveau système d'axe.(programme ACP élaboré par M. NOIROT, de l'ORSTOM).

La figure 38 représente le graphe des positions des individus dans le système d'axes définis par les seuls facteurs biochimiques (axel et 3).

Les points individus repérés dans cet "espace biochimique" ont été ensuite affectés de leur "caractère de production" (symboles différents selon l'appartenance des individus aux groupes des arbres hauts-producteurs (•), moyens-producteurs () ou bas-producteurs ().

Les positions relatives des variables biochimiques par rapport au nouveau système d'axe ont été déterminées. Elles figurent en encadrés sur le graphe. Elles rendent compte des zones d'influence maximum d'un paramètre donné par rapport aux autres, et permettent d'interpréter la signification des axes.

Enfin quelques points extrèmes ont été affectés de leurs caractéristiques biochimiques (concentrations en mM) définissant leur position sur le graphe.

- a) Inertie et interprétation des axes (composantes principales) :
 - <u>L'axe I</u> (vertical) rend compte de 67,4 % de la variabilité totale des paramètres biochimiques considérés. Il associe dans le sens décroissant relatif de la contribution de chaque paramètre à l'explication de l'axe I : A pH élevé (THS) ; pH cytoplasmique élevé (THS) ; gradient transtonoplastique de citrate (cit. L/C) élevé (THS) ; (citrate) lutoïdique élevé (THS) ; somme des (acides) cytosoliques (oxaloacétique + pyruvique) élevée (HS), dans le sens positif (ascendant) de l'axe, et inversement.

Leur position sur le graphique montrent que ce sont bien les paramètres : ApH, pH cytosolique et gradient de citrate élevésqui expliquent l'axe I (forte proximité) de même que le pH lutoïdique.

La position de ces critères biochimiques montre bien en outre que le pH cytosolique élevé (alcalin) s'oppose diamétralement à pH lutoïdique élevé (alcalin), autrement dit:un pH cytosolique alcalin correspond à un pH lutoïdique acide (faible). De même les teneurs en citrate lutoïdique élevées sont diamétralement opposées à des teneurs en citrate cytosolique forte, c'est-à-dire qu'une teneur en citrate lutoïdique forte correspond le plus souvent à une faible teneur dans le cytosol (pompage-piégeage du citrate et des H⁺ dans les lutoïdes).

- x L'axe II regroupe 10,8 % de la variabilité totale introduite et ne rend compte que des variations de la somme des teneurs en acides (oxaloacétique + pyruvique) cytosoliques non liées aux variations d'autres paramètres. Cet axe indépendant n'est pas représenté sur le graphique.
- x L'axe III regroupe 9,5 % de la variabilité totale et associe les fortes teneurs en citrate lutoïdique (THS) à de fortes teneurs en citrate cytosolique (HS). Il s'agit du deuxième axe représenté sur le graphique (figure 38).

Les trois premiers axes regroupent au total 87,7 % de la variabilité introduite, les 12,3 % restant se partagent entre les 4 autres axes qui sont donc considérés comme résiduels. L'axe I et III regroupent 76,9 % de l'inertie totale.

b) Interprétation du graphe : liaison caractères biochimiques-production:

La figure 38 montre que le nuage global des individus s'allonge le long de l'axe I.

Ayant affecté leur donnée de production aux individus nous les avons classés en 3 groupes déterminés a priori :

- les "hauts-Producteurs" : Production > 75 g/a/s (\bullet)

- les "moyens-Producteurs" : $40 \le g/a/s \le 75 \ge (\square)$

- les "Bas-Producteurs" : Production < 40 g/a/s (🕲)

La définition de ces classes de production permet de différencier 3 sous-groupes dans l'espace des paramètres biochimiques, qui s'échelonnent le long de l'axe I.



Figure 38 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES : PROJECTION DES INDIVI-DUS(HEVEAS) SUR LE GRAPHE DEFINI PAR LES COMPOSANTES BIOCHIMIQUES DU LATEX. Pour explication se rapporter au texte.

Ainsi, sans tenir compte du paramètre production dans l'analyse ACP et donc par la seule considération des critères biochimiques étudiés, il est possible de regrouper des classes d'arbres, qui correspondent à des classes de production. Ceci revient à dire que ces paramètres biochimiques sont des marqueurs ou des indices fiables des potentialités productrices naturelles des arbres étudiés.Les hauts producteurs se caractérisent par l'ensemble des critères suivants :

- . des teneurs en citrate lutoïdique fortes, indicatrices d'une activité métabolique intense de ces latex, et du bon état de fonctionnement des lutoïdes ;
- . des teneurs en citrate cytosolique faibles, indicatrices, lorsque le gradient de citrate est fort, d'un bon fonctionnement des lutoïdes et d'une bonne détoxification du cytosol, favorable à un métabolisme optimum ;
- des gradients transtonoplastiques de citrate élevés indicateurs du bon état et du rôle détoxifiant des lutoïdes;
- des pH cytosoliques élevés (neutres ou légèrement alcalins) favorables au métabolisme cytoplasmique ;
- . des gradients de protons transtonoplastiques de forte amplitude, indicateurs du bon état et du bon fonctionnement des lutoïdes ;
- la somme des teneurs en acides cytosoliques (oxaloacétique + pyruvique) plutôt élevée, symptôme probable d'activité métaboliques cytoplasmiques particulièrement intenses.

II - CONCLUSIONS

Il apparaît évident à travers ces diverses analyses que la production (régénération) du latex est liée non seulement au pH des deux compartiments du latex, mais aussi aux paramètres de distribution compartimentale de différents solutés potentiellement inhibiteurs, tel le citrate.

On peut émettre l'hypothèse que les arbres à <u>forte activité</u> <u>métabolique</u>, et donc hauts-producteurs, produisent une forte quantité d'acides organiques et en particulier de citrate. En revanche le citrate produit à trop forte concentration étant un élément "toxique" pour le métabolisme cytoplasmique, doit être absorbé et piégé dans les lutoïdes, condition *sine qua non* du maintien d'une activité métabolique optimum.

Le double rôle des lutoïdes dans le contrôle de l'homéostasie cytoplasmique s'en trouve confirmé : grâce au fonctionnement de leurs pompes à protons tonoplastiques, les lutoïdes participent directement au maintien du pH cytosolique au voisinage de la neutralité : premier élément favorable à l'activation de certaines enzymes du métabolisme. Ils interviennent également activement dans le maintien de l'équilibre métabolique, en <u>détoxifiant</u> le cytoplasme par la soustraction de certains métabolites (dont le citrate et les protons), du mílieu ambiant, deuxième élément favorable à l'activité optimum de certaines enzymes.

Enfin, la forte corrélation positive (THS) entre l'amplitude des gradients de pH et de citrate transtonoplastique milite dans le sens de l'intervention du potentiel électrochimique de protons, entretenu par les pompes à protons tonoplastiques, dans les processus d'absorption du citrate par les lutoïdes *in vivo*, comme cela a pu être démontré *in vitro* (MARIN, 1981 ; MARIN et al., 1981-a).

Mentionnons cependant que les modalités de la rétention et le devenir du citrate accumulé au sein des lutoïdes demeurent des problèmes non définitivement résolus. Il semble donc malgré tout que le magnésium intervienne d'une façon ou d'une autre (formation de chélates non perméants?) dans les processus de séquestration de ce triacide à l'intérieur du compartiment vacuolaire.

FLUX TRANSTONOPLASTIQUES ET COMPARTIMENTATION

INTRAVACUOLAIRE DES IONS CALCIUM ET CITRATE

RESUME

Nous avons tenté de préciser si l'accumulation intravacuolaire de certains ions, au sein du latex, correspond à une fonction détoxifiante (piégeage irréversible), ou de stockage (absorption réversible). Notre étude porte sur les flux, et en particulier les possibilités d'efflux, des ions Ca⁺⁺ et citrate, au niveau du tonoplaste de lutoïdes intacts.

1) Le Ca⁺⁺ est intensément absorbé par les lutoïdes intacts, in vitro, même en absence de toute source d'énergie métabolique. Le phénomène ne peut être attribué à un échange isotopique ni à une adsorbtion majeure du cation sur des sites tonoplastiques externes. Diverses expériences montrent que les flux transtonoplastiques de Ca⁺⁺ sont partiellement réversibles et sont liés aux variations de Δ pH transtonoplastique. Par ailleurs, l'accumulation intra-vacuolaire du Ca⁺⁺ s'effectue au dépend du gradient transmembranaire de protons.

Le fonctionnement de l'ATPase pompe à H^+ tonoplastique, induit une accumulation supplémentaire du Ca⁺⁺ dans les lutoïdes. L'accumulation énergisée par l'ATP est inhibée (ou réversée) en présence de FCCP, des ionophores A-23187 ou nigéricine (+K⁺). Ces ionophores n'engendrent par contre qu'un efflux très faible du Ca⁺⁺ accumulé par les lutoïdes en absence d'ATP.

Une large part du pool de Ca^{++} intralutoïdique est relarguée dans le milieu en présence d'agents dépolarisants et déchargeant le potentiel de DONNAN transtonoplastique (TPP⁺, K⁺ + valinomycine,...). Enfin le fonctionnement de la NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase, pompe à efflux de H⁺ tonoplastique, provoque un relargage d'une partie du Ca⁺⁺ intralutoïdique. Le phénomène est plus marqué lorsque l'accumulation du Ca⁺⁺ a été énergisée par un apport d'ATP. Ces différents résultats conduisent à postuler :

- l'existence de deux pools cinétiques de Ca⁺⁺ au sein des lutoïdes. Un pool majeur immobilisé par adsorption sur des structures intravacuolaires. Un pool de Ca⁺⁺ libre, mobile, accumulé en déséquilibre thermodynamique au sein des lutoïdes (dissipé par FCCP et A-23187);
- l'existence d'un processus de transport faisant intervenir un échange Ca^{++}/H^{+} au niveau du tonoplaste ;
- le contrôle des flux transtonoplastiques de Ca⁺⁺ libre par le fonctionnement des deux pompes à protons lutoïdiques antagonistes;
- la participation active du tonoplaste lutoïdique dans la régulation des teneurs en Ca⁺⁺ libre du cytosol.

2) Nous confirmons que l'activité ATPase peut énergiser une accumulation vacuolaire du citrate par l'intermédiaire du Δ µH transtonoplastique qu'elle engendre. Le phénomène est inhibé en présence du protonophore FCCP.

In vitro, toutes les tentatives pour provoquer un efflux du citrate accumulé dans les lutoïdes (in vivo comme in vitro), se sont soldées par un échec. Le citrate reste donc séquestré à l'intérieur des lutoïdes intacts, et ne peut être libéré, ni par la dissipation du Δ pH, du $\Delta\Psi$ ou du Δ $\tilde{\mu}$ H (FCCP; K⁺+valinomycine; MTTP⁺; TPP⁺; Nigéricine + K⁺; activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase,...), ni par la dissipation du gradient transtonoplastique de cations divalents (A-23187), ni enfin en modifiant la composition osmotique du milieu d'incubation (mannitol 0,3 à 0,6 M; citrate l à 20 mM).

3) Des analyses biochimiques portant sur la répartition compartimentale des protons et des acides organiques au sein du latex frais, en fonction de la productivité (caoutchouc) des hévéas, montrent que la production du latex (un reflet de l'intensité du métabolisme au sein des laticifères) est directement liée à la capacité des lutoïdes à accumuler les protons et à séquestrer le citrate, in vivo. 4) L'ensemble des résultats confirme le double rôle du compartiment lutoidque dans le maintien de "l'équilibre ionique" au sein du cytosol laticifère :

- un rôle purement détoxifiant, dont la séquestration apparemment irréversible du citrate constitue un exemple ;
- un rôle de stockage réversible. C'est le cas des H⁺ et du Ca⁺⁺ libres, qui peuvent être remis à la disposition du métabolisme cytosolique. Le contrôle de leurs flux transtonoplastique est assuré par des mécanismes consommateurs d'énergie.

THE TRANSTONOPLASTIC FLUXES AND THE INTRAVACUOLAR

ABSTRACT

We tried to specify whether the intravacuolar accumulation of certain ions within the latex corresponds to a detoxifying (irreversible trapping) or storage function (reversible absorption). Our study deals with the fluxes and particularly with the potential effluxes of Ca^{++} ions and citrate in the tonoplast of the intact lutoids.

I - Ca⁺⁺ is highly absorbed by the intact lutoids in vitro even in the absence of any source of metabolic energy. This phenomenon cannot be due to an isotopic exchange nor to a major cation adsorption in external tonoplastic sites. Various experiments show that Ca⁺⁺ transtonoplastic fluxes are partially reversible and are related to the variations in the transtonoplastic \triangle pH. Moreover, Ca⁺⁺ accumulates in the vacuoles at the expense of the proton transmembrane gradient.

The ATPase tonoplastic H^+ pump induces an additional accumulation of Ca⁺⁺ in the lutoids. The accumulation which is energized by ATP is inhibited (or reversed) in the presence of FCCP, ionophores A-23187 or nigericin (+K⁺). But these ionophores lead only to a very small efflux of Ca⁺⁺ which was accumulated by the lutoids in the absence of ATP.

A great part of intralutoidic Ca^{++} is released in the medium in the presence of depolarizing agents. It contributes to discharge the transtonoplastic DONNAN potential (TPP⁺, K⁺ + valinomycin...). Finally, the NADH-cytochrome <u>c</u> oxidoreductase H⁺ tonoplastic efflux pump leads to free a great part of intralutoidic Ca^{++} . This phenomenon is more pronounced when the Ca^{++} accumulation has been energized by a supply of ATP.

These different results lead to assume :

- The existence of two Ca^{++} kinetic pools within the lutoids. A major pool is fixed by adsorption in intravacuolar structures. A pool

of free and mobile Ca⁺⁺ is accumulated at a thermodynamic imbalance within the lutoids (dissipated by FCCP and A-23187);

- The existence of a transport system which involves a Ca^{++}/H^+ exchange in the tonoplast ;

- The control of the transtonoplastic fluxes of free Ca^{++} by the two different lutoidic proton pumps ;

- The active participation of the lutoidic tonoplast in the regulation of the free Ca⁺⁺ contents of the cytosol.

II - We confirm that the ATPase activity can energize a vacuolar accumulation of citrate through the resulting transtonoplastic Δ H. The phenomenon is inhibited in the presence of the FCCP protonophore.

All the attempts made in vitro in order to lead to an efflux of citrate accumulated in the lutoids (in vivo like in vitro) ended in failure. Therefore, citrate remains trapped within the intact lutoids and it can be released neither by the dissipation of Δ pH, $\Delta\Psi$ or Δ H (FCCP; K⁺ + valinomycin, MTTP⁺; Nigericin + K⁺; NADH-cytochrome <u>c</u> oxidoreductase activity...) nor by the dissipation of the transtonoplastic gradient of the divalent cations (A-23187) nor by modifying the osmotic composition of the incubating medium (0,3 to 0,6 M of mannitol; 1 to 20 mM of citrate).

III - Some biochemical analyses on the compartmental distribution of the protons and of the organic acids within the fresh latex as related to the productivity (rubber) of the heveas show that the latex production (being an indication of the intensity of the metabolism within the laticifers) is directly related to the ability of the lutoids to accumulate the protons and to trap citrate in vivo.

IV - The whole results confirm that the lutoidic compartment plays a double role in the preservation of the "ionic balance" within the laticiferous cytosol :

- a purely detoxifying role exemplified by the apparently irreversible trapping of citrate ;
- a reversible storage role. Such is the case of free H⁺ and Ca⁺⁺ which can be used again in the cytosolic metabolism.

Their transtonoplastic fluxes are controlled by energy-consuming processes.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE III

PERTURBATION DE L'HOMEOSTASIE AU SFIN DES LATICIFÈRES

PAR UN TRAITEMENT HORMONAL

ACTION DE L'ETHREL, GENERATEUR D'ETHYLENE,

SUR L'ACTIVITÉ ATPASE ET LES FLUX TRANSTONOPLASTIQUES

DE PROTONS IN VIVO

PERTURBATION DE L'HOMÉOSTASIE AU SEIN DES LATICIFÈRES PAR UN TRAITEMENT HORMONAL ACTION DE L'ETHREL, GÉNÉRATEUR D'ETHYLÈNE SUR L'ACTIVITÉ ATPASE ET LES FLUX TRANSTONOPLASTIQUES DE PROTONS IN VIVO

Depuis les expériences d'ABRAHAM et al. (1968-b) et de d'AUZAC et RIBAILLIER (1969), le traitement de l'écorce des hévéas au moyen de générateurs d'éthylène, tel l'Ethrel (acide 2-chloro-éthylphosphonique), est couramment utilisé en hévéaculture, pour augmenter la production de latex. Ce procédé, appelé "Stimulation hormonale", provoque une augmentation brutale, souvent de forte amplitude, mais transitoire de la production. Ces effets bénéfiques sont perceptibles dans les 24 premières heures suivant le traitement. Ils sont le plus souvent maximums dans les 48 à 72 heures suivantes, puis se prolongent en s'estompant progressivement pendant 15 à 20 jours après le traitement des arbres (cf. Introduction).

La stimulation hormonale induit de nombreuses perturbations au niveau des paramètres de l'écoulement et des caractéristiques biochimiques du latex. Ils ont fait l'objet d'un chapitre spécial dans l'introduction de ce mémoire. Rappelons simplement qu'il convient de distinguer deux types de phénomènes :

- les phénomènes précoces, induit par l'agent stimulant luimême, détectables dès la première saignée, ou même, lorsque cela est possible, (par microponctions) dans l'intervalle de temps séparant l'application du stimulant et la première saignée ;

- les modifications de la composition du latex lors des saignées suivantes sont la résultante des effets directement attribuables à l'action du stimulant lui-même, additionnés des effets engendrés par les processus de renouvellements cellulaires particulièrement intenses, induits à la suite de l'exportation anormalement massive du cytoplasme cellulaire, dès la première saignée après à la stimulation. Afin de préciser les premiers sites d'action de l'éthylène, et de discriminer les causes primaires des effets secondaires, certains auteurs ont tenté de discerner le plus précocement possible (à l'échelle de quelques heures), les premiers effets directs de la stimulation, sur la composition biochimique du latex. Lorsque les analyses peuvent être réalisées sur des microquantités de latex, une méthode consiste à effectuer des microponctions de latex, échelonnées dans le temps, par simple piqures de l'écorce traitée. Une autre méthode, lorsque les analyses nécessitent des quantités plus importantes de latex (ultracentrifugation,...) consiste alors à décaler l'application du traitement stimulant dans le temps, sur des groupes d'arbres homogènes. Ceux-ci sont alors tous saignés le même jour, évitant ainsi tout artefact attribuable aux variations inter-saignées.

Parmi les paramètres biochimiques du latex les plus précocément affectés on note :

- une forte augmentation de l'indice de polymérisation des ribosomes (polysomes), mesurable dès 12 heures après la stimulation, suggérant une activation précoce de la protéosynthèse au sein du latex (COUPÉ et d'AUZAC, 1974 ; COUPÉ, 1977) ;

- une alcalinisation du latex (RIBAILLIER, 1972 ; TUPY, 1973, 1980) perceptible dans les 24 à 30 premières heures consécutives au traitement stimulant (COUPÉ, 1977 ; PRIMOT et al., 1978). Il est précisé par ailleurs que l'alcalinisation du cytosol laticifère, induits par les traitements à l'éthrel, s'accompagne d'une acidification du compartiment lutoïdique. (COUPÉ, 1977 ; CRETIN, 1979 ; BRZOZOWSKA-HANOWER et al., 1979)/

Dès lors, les variations en sens inverse du pH des deux compartiments majeurs du latex suggèrent une activation des flux transtonoplastiques des protons in vivo, sous l'effet des stimulants hormonaux.

Nous précisons ici la chronologie des variations de pH compartimentales, en relation avec l'activité ATPase tonoplastique et la disponibilité en ATP dans le latex, sous l'influence des traitements stimulants à l'ethrel.

I - CHRONOLOGIE DES EFFETS INDUITS PAR L'APPLICATION DE L'ETHREL, AU NIVEAU DE L'ENCOCHE DE SAIGNÉE

L'expérience a été réalisée sur 21 hévéas (GT1; S J/3 J/4), présélectionnés pour leur homogénéité de croissance, de production et du pH de leur latex. Après deux dosages de contrôle (ATPase lutoïdique, pH cytosolique et lutoïdique, teneurs en ATP) les arbres sont "mis au repos", c'est-à-dire non saignés pendant 10 jours. Ainsi le métabolisme intralaticifère n'est plus affecté par les processus de régénération consécutifs aux saignées régulières. On considère alors que leur métabolisme atteint un état d'équilibre stationnaire. Ils sont ensuite répartis en lots de 3 arbres homogènes : 1 lot témoin et 6 lots traités à l'éthrel (100 m g de matière active par arbre, appliqués sous l'encoche de saignée) respectivement 71 heures puis 48, 33, 21, 13 et 2 heures avant la première saignée "post-stimulatoire". Tous les arbres sont saignés le même jour, aussi bien avant (contrôle) qu'après l'application du traitement stimulant, évitant ainsi tout artefact majeur attribuable aux variations intersaignées. Les latex récoltés individuellement dans un bain de glace sont rapidement transportés au laboratoire et immédiatement traités en vue des diverses analyses. Les teneurs en ATP sont mesurées sur des prélèvements de latex immédiatement "fixées" sur champ (cf. Méthodes).

1) EVOLUTIONS DU pH DES COMPARTIMENTS CYTOSOLIQUE ET VACUOLAIRE:

La figure 39 montre que le traitement de l'écorce (en cours d'exploitation) avec le générateur d'éthylène, provoque, *in vivo*, des variations de pH au sein des deux compartiments majeurs du latex. L'effet de l'éthrel se subdivise en deux phases distinctes :

a) Une phase initiale, s'étalant sur moins de 2 heures après le traitement stimulant, caractérisée par une alcalinisation progressive et constante du compartiment cytosolique, et une légère alcalinisation transitoire (maximum à 13 h.) suivie d'une réacidification progressive du compartiment vacuolaire.

Comme dans cette réponse précoce le pH des deux compartiments évolue dans la même direction et avec une amplitude semblable, le gradient transtonoplastique de protons ne varie pas significativement dans les 15 premières heures. Il commence progressivement à augmenter lorsque le pH des deux compartiments évolue en sens inverse.



Figure 39 : EFFETS DU TRAITEMENT DE L'ECORCE D'HEVEA A L'ETHREL SUR LE pH DU CYTOSOL, LE pH VACUOLAIRE ET LE Δ pH TRANSTONOPLASTIQUE DU LATEX.

L'Ethrel a été appliqué (3 mg.cm⁻²), sur une bande d'écorce grattée au dessous de l'encoche (écorce en cours d'exploitation). Les valeurs des pH cytosolique (), vacuolaire (.....) et des gradients transtonoplastiques de pH () sont exprimées en différences par rapport aux témoins non traités, pondérés par les valeurs initiales (avant traitement) des arbres stimulés.

b) Une réponse plus tardive, mais de forte amplitude, caractérisée par une alcalinisation très marquée du cytosol et une acidification brutale du compartiment vacuolaire. Le pH cytosolique atteint une valeur maximum, 33 heures après la stimulation, dépassant de plus de 0,42 unité le pH cytosolique des arbres témoins. Il se stabilise ensuite pendant au moins deux jours, environ 0,3 unité au-dessus du témoin.

Dans le même temps, le pH intralutoïdique s'acidifie de 0,2 à 0,3 unité par rapport à sa valeur initiale pondérée par celle des lutoïdes des arbres témoins. On enregistre une acidification maximum 48 heures après le traitement stimulant.

Le ApH transtonoplastique, résultant de ces variations inverses augmente rapidement. Il dépasse de 0,57 unité de pH la valeur du témoin 33 heures après le traitement, puis se stabilise à des valeurs élevées.

Bien que les pH des deux compartiments évoluent symétriquement en sens inverse, l'amplitude de leurs variations est significativement différente. Les variations de pH du cytosol sont nettement plus marquées (0,42 unité après 33 h.) que celles du compartiment vacuolaire (0,26 unité dans le même temps). Ce phénomène peut s'expliquer par le pouvoir tampon très différent des milieux cytosolique (figure 40-a) et vacuolaire (figure 40-b) dans la zone physiologique de leurs variations respectives de pH (pH 5,3 à 6,2 pour les lutoïdes ; pH 6,6 à 7,4 pour le cytosol du latex). La capacité tampon plus élevée du milieu intralutoïdique (180 µeq H⁺, pour une variation de 0,5 unité de pH autour de pH 5,7) par rapport à celle du cytosol (70 µeg H⁺, pour une variation de 0,5 unité de pH autour de pH 7,0), suffirait ainsi à expliquer l'amplitude différente des variations de pH des deux compartiments, si l'on postule que ces évolutions symétriques des pH sont essentiellement attribuables à des flux transtonoplastiques de protons. En effet, si l'on considère le volume de chaque compartiment au sein du latex (en moyenne : l volume de lutoïde pour 2,8 volumes de cytosol) et leur pouvoir tampon respectif, les calculs basés sur nos données expérimentales montrent qu'environ 5,1 µeq H⁺ ont disparu du cytosol, et 5,5 µeq H⁺ sont apparus dans le compartiment vacuolaire (au temps 33 h.). La stoechiométrie apparaît ainsi satisfaisante. Nous suggérons donc que les variations en sens inverse (symétrique) du pH des compartiments cytosolique et vacuolaire du latex, caractérisant la réponse "tardive" (24 h.) au traitement hormonal, traduisent une activation des flux transtonoplastiques de protons, induits in vivo, sous l'action de l'éthylène.





<u>Figure 41</u> : EFFETS DE LA STIMULATION A L'ETHREL SUR L'ACIDIFICATION DES LUTOIDES (...) L'ACTIVITE POTENTIELLE DE L'ATPase LUTOIDIQUE () ET LES TENEURS EN ATP DU LATEX (). Les résultats sont exprimés comme explicité dans la fig. 39

. .



<u>Figure 42</u> : MODIFICATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ATPase TONOPLASTIQUE APRES UN TRAITE-MENT DE L'ECORCE D'HEVEA PAR L'ETHREL (72 H) :Lineweaver et Burk).

2) AUGMENTATION DE L'ACTIVITE POTENTIELLE DE L'ATPASE TONOPLASTIQUE :

La figure 41 met en évidence une augmentation brutale de l'activité potentielle de l'ATPase lutoïdique dans les 21 premières heures suivant le traitement stimulant. L'activité spécifique de l'ATPase, pompe à protons tonoplastique, augmente en effet d'environ 40 % (21 h.) puis de 60 % par rapport à l'activité témoin, 48 heures après l'application du générateur d'éthylène.

Des analyses cinétiques réalisées au laboratoire (figure 42) montrent que l'affinité de l'enzyme pour son substrat l'ATP-Mg⁺⁺, n'est pas modifiée (GIDROL, 1984; CRHESTIN et al.1984-a). L'augmentation de l'activité APTase membranaire semble donc essentiellement attribuée à une accélération de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP (Vmax), très probablement grâce à une augmentation du nombre de sites catalytiques au niveau du tonoplaste. Ces données confirment les résultats acquis par GIDROL (1984) et CHRESTIN et al.1984-b) montrant que l'activation de l'ATPase du tonoplaste lutoïdique coïncide avec une activation précoce de la protéosynthèse au sein du latex, en réponse à la stimulation hormonale.

Il semble donc que l'un des effets précoces induit par l'éthylène corresponde, entre autre, à une activation de la synthèse (de novo) de l'ATPase lutoïdique, et donc à une stimulation potentielle des flux transtonoplastiques de protons (influx vacuolaire).

3) EVOLUTIONS DU POOL DES NUCLEOTIDES ADENYLIQUES :

Parmi l'ensemble des caractéristiques biochimiques du latex considérées jusqu'à ce jour (cf.Introduction), il apparaît que la teneur en ATP du latex soit le premier paramètre affecté par la stimulation (figure 41). Dès 2 heures après l'application du générateur d'éthylène, la concentration en ATP du latex chute de 30 %, puis 13 heures après de 48 %, par rapport à celles du témoin. Après cette dépression transitoire (maximum à 13 h.), les teneurs en ATP du latex des hévéas stimulés remontent progressivement, rejoignent celles des témoins après 24 h., puis continuent à augmenter jusqu'à atteindre des valeurs 2,2 fois (33 h.) et 2,4 fois (71 h.) plus élevées que celles du latex des arbres témoins.

Nous avons par ailleurs mesuré les évolutions du pool des nucléotides adényliques totaux du latex (ATP + ADP + AMP), et constaté qu'elles suivent fidèlement celles des teneurs en ATP (non figurées ici). Il s'ensuit que les variations des teneurs en ATP (diminution puis augmentation) ne peuvent s'expliquer par des simples processus de déphosphorylation-rephosphorylation, mais par une consommation puis une synthèse des structures adényliques.

La figure 41 montre que les évolutions du pH intravacuolaire suivent fidèlement les évolutions des teneurs en ATP dans le latex. Aux faibles concentrations en ATP correspondent les pH vacuolaires les moins acides, et inversement. L'analyse de l'ensemble des résultats montre clairement que l'augmentation de l'activité potentielle de l'ATPase tonoplastique (entre 13 et 21 heures), ne s'accompagne pas immédiatement d'une acidification du compartiment vacuolaire. Ainsi, dans la mesure où l'on suppose que l'acidification des lutoïdes peut être attribuée au fonctionnement de l'ATPase pompe à protons tonoplastique, le temps de latence observé entre l'activation de l'ATPase et l'acidification marquée du compartiment vacuolaire, peut s'expliquer par la relative pénurie d'ATP dans le milieu.

En accord avec cette hypothèse, on observe que, même lorsque l'activité potentielle de l'ATPase a déjà fortement augmenté (21 h.), l'acidification vacuolaire et le gradient de pH transtonoplastique n'atteignent leur amplitude maximum que lorsque les teneurs en ATP du latex des arbres stimulés dépassent celles du témoin. Ces observations suggèrent donc que l'activité réelle de l'ATPase tonoplastique et de la pompe à protons qui lui est associée, sont essentiellement sous le contrôle des teneurs en ATP dans le cytosol.

II - AUGMENTATION DES TENEURS EN NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DU LATEX, LORS DU TRAITEMENT DE L'ÉCORCE VIERGE (NON EX-PLOITÉE PAR L'ETHREL

Dans l'expérience précédente, la stimulation à l'ethrel a été pratiquée, à l'instar de la méthode la plus fréquemment utilisée en plantations industrielles, en-dessous de l'encoche de saignée, c'est-à-dire sur l'écorce en cours d'exploitation. Il est maintenant bien admis que l'exploitation régulière de l'Hévéa induit une activation du métabolisme globale des tissus laticifères qui doivent constamment régénérer leur



<u>Figure 43</u> : SCHEMA REPRESENTANT LA SITUATION DES ZONES DE L'APPLICATION DE L'ETHREL ET DES PRELEVEMENTS DE LATEX PAR MICRO-SAIGNEES, AU NIVEAU DE L'ECORCE VIERGE D'UN HEVEA.



<u>Figure 44</u> : EFFET DE LA STIMULATION A L'ETHREL DE L'ECORCE VIERGE DE L'<u>HEVEA</u>, SUR LES TENEURS EN ATP ET EN NUCLEOTIDES ADENYLIQUES TOTAUX DU LATEX PREEXISTANT DANS LES LATICIFERES NON EXPLOITES.

Les teneurs en ATP et an ATP+ADP+AMP ont été mesurées par bioluminescence (voir Techniques). Les teneurs dans le latex des arbres stimulées ont été corrigées pour les variations observées dans le latex des arbres témoins, servant de référence. . **1** 8-

latex (cf. Introduction). Selon TUPY (1973), cet effet activateur engendré par l'exploitation peut induire des flux de solutés et un équilibre métabolique particulier au sein de l'écorce constamment sollicitée, et pourrait masquer ou modifier les effets réellement attribuables à l'éthylène. Afin d'estimer l'interaction de l'activité métabolique de l'écorce traitée, sur la réponse des tissus laticifères à une stimulation éthylènique, nous avons suivi l'évolution des teneurs en nucléotides adényliquesdu latex, après stimulation d'une zone d'écorce "vierge", située largement en-dehors de l'aire activée par les saignées régulières (figure 44). Les quantités de latex strictement nécessaires pour ces analyses (quelques gouttes) ont été prélevées par des séries de micro-saignées (au moyen d'une épingle) de part et d'autre de la zone d'écorce stimulée (figure 43).

La figure 44 montre que la cinétique d'évolution des teneurs en ATP et en nucléotides adényliques totaux du latex issu de l'écorce vierge traitée à l'ethrel est tout à fait comparable à celle décrite précédemment (figure 41). Dans un premier temps (12 h.) les teneurs en ATP et en nucléotides adényliques totaux diminuent simultanément (33 % endessous du témoin), puis remontent progressivement pendant au moins 6 jours. Signalons que dans le même temps la taille des pools de nucléotides adényliques du latex issu de l'écorce vierge des arbres témoins reste relativement stable : (ATP) = 57 \pm 6 µM et (Adénines nucléotides totaux) = 172 \pm 19 µM.

Ces résultats montrent que l'éthylène induit de larges modifications des paramètres biochimiques du latex préexistant au sein des laticifères "au repos". L'évolution des teneurs en ATP constitue un exemple particulièrement frappant. Ainsi, les effets observés au niveau du latex issus de l'écorce exploitée ne correspondent pas à une réponse particulière, caractérisant les tissus laticifères maintenant un métabolisme régénératif intense constamment sollicité par l'exportation régulière de leur latex.

III - CONCLUSION

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que l'effet le plus précoce, induit par la stimulation des Hévéas à l'ethrel, correspond à une forte perturbation des teneurs en nucléotides adényliques du latex, du moins parmi les paramètres biochimiques analysés ici.

La diminution globale du pool des nucléotides adényliques totaux, dans la phase initiale (maximum à 13 h) nous indique que la chute simultanée des teneurs en ATP du latex (- 48 % à 13 h) correspond à la consommation vraie des monomères nucléotidiques en tant que structures chimiques, plutôt qu'à une intensification des processus conduisant à sa déphosphorylation (ADP et AMP). On peut dès lors supposer que cette disparition des nucléotides adényliques correspond, entre autre, à leur "immobilisation" sous forme d'acides nucléiques (ARN), et traduit une activation de la protéosynthèse induite, au sein des laticifères, par l'éthylène. Cette hypothèse est confortée par les résultats de COUPÉ et al. (1976) et COUPE (1977), montrant une forte augmentation des teneurs en polyribosomes et en ARN totaux dans le latex des Hévéas stimulés. La chronologie choisie dans leurs expérimentations a permis à ces auteurs de mettre en évidence une augmentation brutale de l'indice de polymérisation des ribosomes du latex, 12 heuresaprès un traitement à l'ethrel. Tous ces arguments sont donc en faveur d'une activation de la protéosynthèse induite, au sein du latex, dans les premières heures suivant un traitement stimulant. L'une des protéines concernée pourrait être l'ATPase lutoïdique. En effet l'augmentation de l'activité potentielle de l'ATPase tonoplastique, 13 à 21 heures après le traitement stimulant, alors que son Km (ATP-Mg) n'est pas affecté, semble confirmer une synthèse de novo de l'enzyme. Des arguments supplémentaires en faveur de cette hypothèse sont avancés par ailleurs (GIDROL, 1984 ; CHRESTIN et al. 1984) (voir ANNEXE II : 1,2 et 3).

Les effets primaires de la stimulation sur les teneurs en ATP et les activités ATPase tonoplastiques,entraînent des modifications caractéristiques du pH des deux compartiments majeurs du latex.

Les variations en sens inverse des pH du compartiment cytosolique et vacuolaire, de même que la stoéchiométrie satisfaisante de la redistribution compartimentale des H⁺ estimée à partir de nos données, laissent supposer une activation des flux transtonoplastiques des protons au sein du latex, en réponse à la stimulation hormonale.

Nos résultats montrent par ailleurs, que l'acidification vacuolaire et l'augmentation du ApH transtonoplastique, suivent fidèlement les évolutions des teneurs en ATP du latex, alors même que l'activité potentielle de l'ATPase tonoplastique est augmentée beaucoup plus précocement, sous l'effet de l'ethrel. Les flux transtonoplastiques dépendent donc essentiellement de l'activité réelle de l'ATPase et celle-ci est contrôlée par la disponibilité en son propre substrat dans le milieu. On sait en effet que le Km de l'ATPase pour l'ATP-Mg, mesuré tant dans un tampon artificiel (d'AUZAC, 1977) que dans le cytosol ultrafiltré du latex (GIDROL, 1984) est de l'ordre de 0,5 à 0,7 mM. Nous avons de plus déterminé la concentration moyenne en ATP dans le latex (Hévéas non stimulés). Elle est de l'ordre de 60 µM, ce qui correspond à une concentration cytosolique maximum d'ATP n'excédant pas 200 µM (le cytosol représente environ 35 % du volume total du latex). L'ATPase pompe à H⁺ tonoplastique fonctionne donc probablement in vivo très en dessous de ses potentialités maximales. Il s'ensuit que toute variation des teneurs en ATP dans le cytosol laticifère doit modifier proportionnellement l'intensité des flux transtonoplastiques de protons contrôlés par l'activité ATPase. La chute initiale des teneurs en ATP du latex (-30 à 45 %) doit diminuer d'autant l'activité vacuolaire transitoire, caractéristique de la réponse initiale au traitement hormonal. Cette interprétation est confortée d'ailleurs par les résultats montrant une dissipation du ApH transtonoplastique induite in vitro par une pénurie d'ATP (figures 15 et 16).

Enfin, l'activité ATPase potentielle élevée, associée à la très forte augmentation des teneurs en ATP dans le latex, lors de la réponse "tardive" (au-delà de 24 h) au traitement stimulant doit se traduire *in vivo* par une stimulation efficace de l'activité ATPase pompe à H⁺, et explique l'augmentation remarquable du gradient de pH transtonoplastique.

L'aumgentation spectaculaire des teneurs en ATP et en nucléotides adényliques totaux dans le latex ne semble pouvoir s'expliquer que par leur synthèse *de novo* sous l'effet de l'éthylène.

Cette disponibilité accrue en énergie (ATP) est bénéfique à double titre pour le métabolisme laticifère :

- Elle active directement les enzymes nécessitant la présence d'ATP (diverses kinases de la glycolyse et de l'anabolisme isoprénique,...)
- Elle apporte le substrat nécessaire à l'ATPase pompe à H⁺ lutoïdique, assurant ainsi une alcalinisation du cytosol et une augmentation du pH transtonoplastique, favorables au métabolisme cytosolique.

PERTURBATION DE L'HOMÉOSTASIE LATICIFÈRE

PAR UN TRAITEMENT HORMONAL

RESUME

Le traitement de l'écorce d'Hevea à l'éthrel, un générateur d'éthylène provoque une alcalinisation du cytosol laticifère, et l'acidification concomitante du compartiment vacuolaire. Ces phénomènes sont accompagnés d'une augmentation de la production du latex attribuée à une activation globale du métabolisme laticifère.

Des études portant sur la chronologie détaillée des phénomènes, montrent que l'effet le plus précoce induit par la stimulation à l'éthrel, correspond à une forte perturbation des teneurs en nucléotides adényliques, et en particulier en ATP, du latex.

Le pool des nucléotides adényliques évolue selon deux phases distinctes. Une phase précoce correspond à la chute simultanée des teneurs en ATP et en nucléotides adényliques totaux (ATP + ADP + AMP), perceptible dans les 2 premières heures, et maximum 13 heures après l'application du traitement stimulant. Cette chute initiale transitoire est suivie d'une augmentation progressive, mais de très forte amplitude des deux pools adényliques. Les teneurs en ATP rejoignent le niveau du témoin 24 heures après le traitement, puis continuent à augmenter jusqu'à atteindre (33 heures après) des valeurs 2,25 fois plus fortes que celles du témoin. L'effet positif dure au moins 6 jours.

Les variations en sens inverse des pH cytosolique et vacuolaire sont attribuées à une stimulation des flux transtonoplastiques de H⁺ due à la conjonction d'une augmentation de l'activité potentielle de l'ATPase tonoplastique pompe à protons, et surtout de la très forte augmentation des teneurs en ATP dans le latex, induits *in vivo*, par l'éthylène. Nous tentons d'expliquer et d'intégrer entre elles les différentes modifications des caractéristiques biochimiques induites précocement, au sein du latex, en réponse au traitement à l'éthrel.

.

THE LATICIFEROUS HOMEOSTASIS UPSET BY AN HORMONAL TREATMENT

ABSTRACT

The treatment of the hevea bark with ethrel, an ethylene generator, leads to an alkalinization of the laticiferous cytosol as well as to the acidification of the vacuolar compartment which are accompanied by an increase in the latex production due to a global activation of the laticiferous metabolism.

Some studies on the detailed chronology of the phenomena show that the ethrel stimulation affects considerably the adenylic nucleotide contents and particularly those of ATP in the latex.

The pool of the adenylic nucleotides develops following two different phases. An early phase corresponds to the simultaneous decline of the ATP and total adenylic nucleotide contents (ATP + ADP + AMP) which can be observed within the first two hours and is maximum 13 hours after having applied the stimulating treatment. This temporary initial decline is followed by a gradual, though considerable increase in the two adenylic pools. The ATP contents amount to the reference level 24 hours after having applied the treatment and they go on increasing until they reach (33 hours later) values which are 2,25 times higher than those of the reference pool. The positive effect lasts at least 6 days.

The opposite variations in the cytosolic and vacuolar pH depend on a stimulation of the transtonoplastic H^+ fluxes due to an increase in the potential activity of the ATPase tonoplastic proton pump and mainly to the very high increase in the ATP contents in the latex which were induced in vivo by ethylene.

We try to explain and combine the different modifications in the previously induced biochemical characteristics within the latex in response to the treatment by ethrel.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE IV

CONCLUSION ET INTEGRATION

DES RESULTATS :

PARTICIPATION ACTIVE DES LUTOIDES DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE CYTOPLASTIQUE AU SEIN DES CELLULES LATICIFERES D'HEVEA

•

CONCLUSION ET INTEGRATION DES RESULTATS ACQUIS DANS LA PREMIERE PARTIE

Le latex d'Hevea brasiliensis est le cytoplasme de cellules anastomosées, spécialisées dans la synthèse du caoutchouc (cis-polyisoprène) : les laticifères. Comme toutes les cellules végétales, le cytoplasme des laticifères renferme un compartiment vacuolaire. Dans le cas du latex ce compartiment vacuolaire, à caractère lysosomal, se présente sous la forme de micro-vacuoles poly-dispercées, dénommées "lutoïdes" (PUJARNISCLE, 1968 ; RIBAILLIER, 1972). Ces dernières peuvent être facilement isolées et purifiées par des techniques simples de centrifugation différentielle, sans mise en oeuvre de traitements drastiques, préjudiciables à l'intégrité des membranes biologiques. Il est donc relativement aisé, à partir de ce matériel, d'étudier les diverses relations existant entre les compartiments cytosolique et vacuolaire d'un cytoplasme végétal.

La production du latex reflète dans une certaine mesure, l'intensité du métabolisme au sein des cellules laticifères. Ce métabolisme doit être suffisant, et "orienté" d'une façon adéquate, pour assurer la régénération et compenser l'exportation massive de ce cytoplasme cellulaire, constamment sollicitée lors de l'exploitation régulière (saignées) des hévéas.

La production du latex est corrélée positivement, d'une manière très hautement significative, au pH du cytosol et négativement au pH du compartiment vacuolaire du latex (les lutoïdes). De plus nous avons montré l'existence de corrélations inverses, hautement significatives, entre les variations du pH du cytosol, et celles du pH intra-vacuolaire, suggérant l'existence de flux vectoriels de protons contrôlés, au niveau du tonoplaste lutoïdique.

Des analyses multivariées nous ont permis de montrer que le latex issu des arbres hauts-producteurs, se caractérise non seulement par un pH cytosolique neutre ou légèrement alcalin ainsi que par un gradient transtonoplastique de protons élevé, mais également par une forte accumulation du citrate à l'intérieur des lutoïdes. Cette accumulation intravacuolaire du citrate, correspond à la mise en place d'un gradient transtonoplastique

de citrate élevé, et en particulier à la présence de faibles concentrations en ce triacide au sein du cytosol du latex issu des arbres hauts-producteurs.

Ces différentes corrélations peuvent s'expliquer d'une façon satisfaisante quand on sait que de nombreuses enzymes clés du métabolisme cytosolique des laticifères sont extrèmement sensibles à de très faibles variations de pH, dans la zone de fluctuations physiologiques. De plus, ces mêmes enzymes sont inhibées efficacement par certains ions tels que le citrate, le magnésium, le calcium et le cuivre, normalement accumulés dans les lutoïdes (JACOB, 1970, 1972 ; JACOB et al., 1977, 1979 ; JACOB ET D'AUZAC, 1967, 1972 ; RIBAILLIER et al., 1971).

L'accumulation des protons au sein des lutoïdes s'effectue grâce à l'intervention de deux phénomènes complémentaires. Un large pool de protons est retenu au sein du compartiment vacuolaire grâce à l'existence d'un potentiel transtonoplastique de DONNAN. La nature des macromolécules à l'origine de cet effet reste à déterminer. Les flux transtonoplastiques de protons "libres", qui déterminent tant le pH du cytosol que celui du compartiment vacuolaire, sont sous le contrôle de deux systèmes antagonistes transporteurs de protons, localisés au niveau du tonoplaste lutoïdique :

- La première pompe à protons est liée au fonctionnement de l'ATPase, mise en évidence sur le tonoplaste des lutoïdes par d'AUZAC (1975, 1977). Cette activité ATPase tonoplastique catalyse le flux (vectoriel) des protons cytosoliques vers l'intérieur de la vacuole. Son fonctionnement aboutit donc à une alcalinisation du cytosol, à une acidification vacuolaire, et par voie de conséquence à une augmentation importante du gradient (électrochimique) de protons transtonoplastique . De ce point de vue nos résultats sont en accord avec ceux de MARIN (1981).

- Une deuxième pompe à protons est couplée au fonctionnement d'un système transporteur d'électrons localisé sur le tonoplaste. Ce système rédox fonctionne avec du NADH comme substrat donneur d'électrons, et du cytochrome <u>c</u> en tant que substrat accepteur artificiel. L'accepteur d'électrons physiologique endogène reste encore à identifier. Enfin, l'identité de systèmes transporteurs d'e fonctionnel au niveau du tonoplaste des lutoïdes intacts et fraîchement isolés du latex avec la NADH-cytochrome <u>c</u> réductase et les cytochromes <u>b</u> mis en évidence par MOREAU et al., (1975), bien que probable, reste à démontrer. Le fonctionnement de cette chaîne rédox, en utilisant des accepteurs artificiels (cytochrome <u>c</u>, DCPIP, fer**ricy**anure...) *in vitro*, catalyse un efflux des protons accumulés en désé-
quilibre thermodynamique au sein des lutoïdes. Son fonctionnement entraîne donc l'acidification du milieu d'incubation, et l'alcalinisation du compartiment vacuolaire, donc une diminution du gradient transtonoplastique de protons. L'activité de cette pompe à protons rédox est insensible aux inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires mitochondriale, fongique ou bactérienne (KCN, antimycine A, roténone, SHAM,...). Cependant le couplage entre l'activité rédox et la pompe à efflux de H⁺ qui lui est associée est extrèmement labile, et peut disparaître complètement après un stockage de quelques heures des lutoïdes, dans différentes conditions de conservation.

La courbe des activités respectives des deux pompes à protons antagonistes (ATPase et système rédox), en fonction du pH du milieu d'incubation, montre que l'ATPase reste au maximum de son activité potentielle dans toute la zone des variations physiologiques du pH, tandis que la pompe rédox à efflux, beaucoup plus sensible aux variations de pH, devient efficiente aux pH légèrement alcalins (au-dessus de 7,5). Ces observations nous conduisent à conclure que toute alcalinisation excédentaire du cytosol, éventuellement engendrée par une hyper-activité ATPase tonoplastique, sera contrecarrée par l'activation de la pompe rédox à efflux de H⁺, activation résultant précisément de cette alcalinisation.

Enfin nous avons montré que ces deux systèmes antagonistes sont fonctionnels lorsque les lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex, sont incubés dans le cytosol du latex déprotéinisé par ultrafiltration, c'est-à-dire dans des conditions de composition ionique du milieu aussi proches que possible de celles existant in vivo. Dans la mesure ou l'ensemble des substrats respectifs nécessaires au fonctionnement de ces deux pompes à protons antagonistes est disponible au sein des laticifères (accepteur d'e endogène, en particulier), ce double pH-STAT bioosmotique tonoplastique doit être fonctionnel <u>in vivo</u>. Il doit donc contribuer efficacement à la régulation fine du pH cytosolique et du gradient électrochimique de protons transtonoplastique, au sein des cellules laticifères.

Le traitement de l'écorce des hévéas à l'Ethrel, produit libérant de l'éthylène utilisé à grande échelle en hévéaculture pour augmenter la production du latex d'*Hevea*, induit une forte activation de l'ATPase tonoplastique. Cette activation de l'ATPase est attribuable, pour partie, à la stimulation d'une protéosynthèse spécifique, et à l'apparition d'un "activateur" thermostable cytosolique, induites au niveau des laticifères, par

l'éthylène (GIDROL, 1984). En fait la majeure partie de l'activation de l'ATPase pompe à protons *in situ*, est due à une augmentation considérable des teneurs en ATP au sein du latex. Les cinétiques d'activation de l'ATPase pompe à protons montrent en effet que celle-ci est sous le contrôle de la disponibilité en ATP (son substrat) dans le milieu.

Cette stimulation par l'éthylène, de l'activité ATPase pompe à protons tonoplastique, induit une forte augmentation du gradient transtonoplastique de protons et une alcalinisation concomitante du cytosol au sein des laticifères. Ces évènements précoces sont au moins pour partie à l'origine de l'activation du métabolisme intralaticifère, et de l'augmentation de la production de latex, provoquée par la stimulation des hévéas à l'Ethrel.

Le citrate, à trop forte concentration (> 7 mM), inhibiteur puissant de nombreuses enzymes clés du métabolisme cytosolique est normalement accumulé *in vivo* au sein du compartiment vacuolaire (40 à 80 mM) (RIBAIL-LIER et al. 1981).

In vitro, les lutoïdes accumulent le citrate exogène contre un gradient de concentration de très forte amplitude (>10), et toute manipulation engendrant une augmentation du gradient électrochimique de protons transtonoplastiques, conduit à une accumulation supplémentaire de citrate à l'intérieur des lutoïdes (MARIN; MARIN *et al.*, 1981). Le fonctionnement de l'ATPase tonoplastique fournit l'énergie nécessaire (pmf) à cette accumulation du citrate. Les phénomènes sont inhibés par les protonophores (MARIN; MARIN *et al.*, 1981). Nous confirmons ici ces résultats sur des lutoïdes intacts fraîchement isolés. Cependant toutes les tentatives envisagées pour provoquer l'efflux du citrate accumulé tant *in vivo* qu'*in vitro*, que ce soit en déchargeant le gradient de protons ou le gradient de potentiel transtonoplastique, ou enfin la résultante de ces deux composantes ($\Delta \mu H^+$) se sont soldées par un échec. L'utilisation du ionophore A-23187, et les variations de pression osmotique se sont également avérées inefficaces.

Nous proposons donc que les lutoïdes, piégent irréversiblement le citrate cytosolique excédentaire, et qu'ils jouent alors un rôle typiquement détoxifiant, évitant ainsi l'inhibition du métabolisme cytosolique par un excédent de ce triacide. La nature des phéromènes à l'origine de ce piégeage irréversible du citrate, de même que le devenir à long terme du citrate accumulé, restent obscurs.

Bien que le calcium soit un élément nécessaire au fonctionnement du métabolisme cellulaire, un excès de ce cation divalent dans le cytosol (>0,5 mM) inhibe efficacement certaines enzymes clés du métabolisme cytosolique. In vivo, le calcium est normalement accumulé au sein du compartiment lutoïdique (RIBAILLIER *et al.*, 1971).

In vitro, les lutoïdes accumulent fortement le calcium exogène, contre un gradient transtonoplastique de concentration élevé. Nous montrons ici que les flux transtonoplastiques de calcium vont dans le même sens que les variations du gradient transtonoplastique de protons (flux de H^+). Le fonctionnement de l'ATPase énergise l'accumulation du calcium libre à l'intérieur du compartiment lutoïdique, et le phénomène est inhibé en présence de protonophores. Une partie du calcium libre accumulé peut être relargué dans le milieu d'incubation lors de l'addition des ionophores des cations divalents (A-23187, X-537A,...), des protonophores (FCCP, CCCP,...), ou lors de l'acidification du milieu extérieur, ou enfin pendant le fonctionnement de la NADH-cytochrome <u>c</u>, réductase, pompe à efflux de H⁺ tonoplastique. L'ensemble de nos résultats suggèrent l'existence d'un transport actif du calcium au travers du tonoplaste lutoïdique, faisant intervenir un mécanisme d'échange $Ca^{++}/(n?)H^+$, dont la stréchiométrie reste à définir.

Ainsi, contrairement à ce qui a été montré pour le citrate, le calcium libre accumulé au sein du compartiment vacuolaire, peut être remis à la disposition du métabolisme cytosolique. Les flux transtonoplastiques du calcium libre demeurent sous le contrôle actif (consommant de l'énergie) des deux pompes à protons tonoplastiques antagonistes.

Prenant en compte le fonctionnement des deux pompes à protons électrogènes antagonistes localisées sur le tonoplaste lutoïdique, nous proposons que les lutoïdes, le compartiment vacuolaire des cellules laticifères, jouent un triple rôle vis-à-vis du métabolisme cytosolique laticigène :

- <u>un rôle de "pH-STAT bioosmotique</u>" (biophysique), capable de réguler très finement le pH du cytosol, dans une zone de variation physiologique modulant efficacement l'activité de certaines enzymes clés du métabolisme cytosolique;
- un rôle de compartiment essentiellement "détoxifiant", accumulant et piégeant irréversiblement (?) un certain nombre de métabolites, qui en excès, sont des inhibiteurs efficaces de certaines enzymes clés du métabolisme cytosolique (citrate, tannins,...);



<u>Schéma 2</u> : ROLE CENTRAL DU COMPARTIMENT VACUOLAIRE (LUTOIDES) DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE AU SEIN DU CYTOSOL DES CELLULES LATICIFERES D'HEVEA.

L'ATPase tonoplastique assure l'influx des protons à l'intérieur du compartiment vacuolaire. La NADH-cytochrome <u>c</u> (accepteur physiologique non identifié) réductase assure un efflux électrogène des protons lutoïdiques. L'activité relative des deux pompes à protons antagonistes contrôle finement le pH du cytosol, siège du métabolisme laticigène, dont certaines enzymes clefs sont extrèmemnt sensibles à de faibles variations de pH. Le fonctionnement différentiel des deux pompes à protons électrogènes engendre une force motrice protonique ($\Delta\mu$ H⁺). Celle-ci contrôle les flux transtonoplastiques de divers solutés, et en particulier l'accumulation à l'intérieur des lutoïdes d'un certain nombre d'ions inhibiteurs du métabolisme (citrate, Mg²⁺, Ca²⁺, H⁺,...). Ceux-ci se répartissent au sein du compartiment lutoïdique entre un pool définitivement immobilisé (cas du citrate) et un pool mobile qui peut être remis à la disponibilité du métabolisme cytosolique (cas des H⁺, du Ca²⁺ et de la Lysine par exemple). - <u>un rôle de compartiment de réserve</u>, accumulant réversiblement certains ions (Ca⁺⁺, H⁺) et métabolites (?), inhibiteurs du métabolisme lorsqu'ils sont en excès dans le cytosol. Ces derniers peuvent cependant être à tout moment remis à la disposition du métabolisme cytosolique, grâce au fonctionnement des deux pompes ioniques (à H⁺) tonoplastiques antagonistes.

Le schéma 2 (ci-contre) résume l'état actuel des connaissances acquises concernant la participation du compartiment vacuolaire dans le maintien de l'homéostasie au sein du cytosol des cellules laticifères. Il met en évidence le rôle central des deux pompes à protons antagonistes, dont le fonctionnement contrôle le pH cytosolique, le gradient de pH transtonoplastique et donc "indirectement" la composition ionique du cytosol (le $\Delta \mu H^+$ transtonoplastique énergisant les flux transtonoplastiques d'un certain nombre de solutés).

Ainsi, en participant activement à la régulation fine du pH et de la composition ionique du cytosol (homéostasie), les lutoïdes jouent un rôle de première importance dans le contrôle de l'intensité du métabolisme au sein des laticifères. Ils jouent donc un rôle déterminant dans les processus gouvernant la production du latex des hévéas.

Ce rôle des lutoïdes dans le maintien de l'homéostasie intralaticifère nécessite une intégrité parfaite de leur membrane. Nous décrivons dans la deuxième partie de ce mémoire des cas d'accidents physiologiques aboutissant à la déstabilisation et à la dégradation du tonoplaste lutoïdique, conduisant à la disfonction puis à la dégénérescence complète des cellules laticifères ("syndrome des encoches sèches").

DEUXIEME PARTIE

ROLE DU COMPARTIMENT VACUOLAIRE DANS LES PHENOMENES DE SENESCENCE ET DE DEGENERESCENCE DES CELLULES LATICIFERES

CAS DU SYNDROME D'ENCOCHE SECHE CHEZ HEVEA BRAZILIENSIS

ROLE DU COMPARTIMENT VACUOLAIRE (LES LUTOIDES) DANS LES PHENOMENES DE SENESCENCE ET DE DEGENERESCENCE DES CELLULES LATICIFERES CHEZ HEVEA : "LE SYNDROME DES ENCOCHES SECHES"

INTRODUCTION

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons montré comment le compartiment vacuolaire du latex intervient, de façon active, dans la régulation du métabolisme cytosolique. Ce rôle des lutoïdes dans le maintien de l'homéostasie au sein des cellules laticifères repose avant tout sur l'intégrité et la stabilité de leur membrane limitante. Nous avons observé en particulier qu'une des composantes du pH-stat bioosmotique tonoplastique semble relativement labile (la pompe à efflux de H^+ couplé au fonctionnement de la NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase).On imagine aisément quelles seraient les conséquences néfastes d'une dégradation, même discrète, des propriétés du tonoplaste lutoïdique *in vivo*.

Le cas extrême de cette déstabilisation membranaire correspond à la lyse des organites, et donc à la décompartimentation totale des constituants et des solutés intracellulaires. Un tel phénomène est généralement considéré comme incompatible avec le maintien de la vie chez les cellules eucaryotes. Il correspond à l'une des phases des processus complexes conduisant à la sénescence et à la dégénérescence cellulaire.

Dans le cas particulier des cellules laticifères, les lutoïdes contiennent, à l'état latent, la quasi totalité des facteurs catalysant la coagulation du latex. La dégradation, même partielle de leur membrane se traduit par la perte de la stabilité colloïdale du latex. Leur lyse totale aboutit à la coagulation rapide du latex. La stabilité de la membrane lutoïdique détermine de ce fait la précocité de la coagulation du latex sur l'encoche de saignée, et donc la productivité des arbres (cf. Introduction). Par ailleurs dans les plantations hévéicoles, un certain nombre d'arbres (10 à 30 %) montrent une cessation définitive de l'écoulement du latex sur une portion plus ou moins importante de leur encoche d'exploitation. Il s'agit du "syndrome des encoches sèches". Les lutoïdes provenant de ces arbres sont particulièrement instables, et l'on peut observer une coagulation du latex au sein des laticifères atteints (cf. Introduction).

Il semble alors primordial de rechercher quels peuvent être les mécanismes impliqués dans la stabilisation ou la déstabilisation des systèmes membranaires au sein des laticifères.

Des considérations exposées dans l'introduction de ce mémoire nous ont engagé à rechercher l'existence de systèmes peroxydatifs capables de dégrader les membranes biologiques au sein des cellules laticifères.

Nous rapportons dans cette deuxième partie, l'existence, au sein du latex, d'une activité NAD(P)H oxydase émettant des "formes agressives" de l'oxygène. Nous montrons que son fonctionnement provoque une dégradation peroxydative des lipides insaturés et la lyse des organites du latex. Dans un 3ème chapitre nous recherchons, dans le latex, quelques mécanismes enzymatiques ou chimiques susceptibles d'assurer une protection des structures membranaires. Un 4ème chapitre traite des relations existant entre les divers mécanismes mis en évidence, la productivité des arbres, et l'état physiologique de leurs tissus laticifères (encoches sèches). Nous évoquons enfin, dans un chapitre suivant, l'effet de la stimulation à l'Ethrel, sur ces divers mécanismes et sur l'apparition des encoches sèches.

Un dernier chapitre regroupe nos conclusions sur le rôle des lutojdes dans les phénomènes de dégénérescence des laticifères.

DEUXIÈME PARTIE

.

.

CHAPITRE I

MISE EN EVIDENCE D'UNE EMISSION D'ANIONS SUPEROXYDES PAR UNE ACTIVITE NAD(P)H-O₂ OXYDOREDUCTASE LUTOIDIQUE

MISE EN EVIDENCE D'UNE EMISSION D'ANIONS SUPEROXYDES PAR UNE ACTIVITE NAD(P)H-O2 OXYDOREDUCTASE LUTOIDIQUE

- A MISE EN ÉVIDENCE D'UNE CONSOMMATION D'OXYGÈNE NAD(P)H DÉPENDANTE AU NIVEAU DU COMPARTIMENT LUTOÏDIQUE DU LATEX
 - A.1 MISE EN EVIDENCE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE NAD(P)H
 DEPENDANTE DANS LA FRACTION SEDIMENTABLE "INTACTE" DU
 LATEX ; DIFFERENCE ENTRE LUTOIDES D'ARBRES HAUTS-PRODUCTEURS
 (HP), BAS-PRODUCTEURS (BP) OU ATTEINTS D'ENCOCHE SECHE (ES) :

Le tableau montre que la consommation d'oxygène de suspensions lutoïdiques (HP, BP, ou ES) fraîche de 5 % (V/V) dans un tampon isotonique (lutoïdes intacts) est négligeable en l'absence de tout effecteur.

L'addition de NADH ou de NAD(P)H se traduit par une consommation immédiate de l'oxygène dissous d'autant plus forte que les lutoïdes proviennent d'arbres bas producteurs ou atteints d'encoche sèche (fig.45).

L'addition de NAD(P) ou de substances réductrices telles la cystéine n'entraîne pas de consommation d'oxygène significative. Seul l'acide ascorbique aboutit à une consommation d'oxygène sensiblement supérieure au témoin sans effecteur.

•							
	μ]	0 ₂ con	sommé •	min ⁻¹	• g ⁻¹	(lutoïdes	;)
Lutoïdes	Tampon	NADH O,5mM	NADPH O,5mM	NAD O,5mM	NADP O,5mM	Cysteine 0,5mM	Ascorbate O,5mM
HP	0,07	1,40	1,60	0,08	0,08	0,06	0,50
BP	0,08	4,80	5,40	0,08	0,08	0,07	0,55
ES	0,55	6,40	6,80	0,08	0,09	0,07	0,52

Tableau 18 : Consommation d'oxygène NAD(P)H dépendante par des suspensions lutoïdiques provenant d'arbres HP, BP ou ES : (mélanges de cinq latex par motif)

(Les lutoïdes ont été préparés et incubés dans des conditions identiques à celles rapportées dans la légende du tableau 19)



<u>Figure 45</u> : CINETIQUE DE L'ABSORPTION D'OXYGENE DEPENDANTE DU NADH, PAR DES SUSPENSIONS DE LUTOIDES SONIQUES.

Les expériences ont été réalisées à pH 7,4, en présence de 250 μ l de lutoïdes traités aux ultrasons. La concentration du NADH est de 0,5 mM (final). Les lutoïdes proviennent du latex d'arbres hauts producteurs (HP), bas producteurs (BP) ou atteints d'encoche sèche partielle (ES). (aucun substrat ni autre effecteur que le NADH n'a été ajouté, le volume total final du milieu réactionnel est de 5 ml; la température est de 27°C). On note une absence totale de spécificité vis-à-vis des cofacteurs réduits (NAD(P)H) : l'addition du NADH ou NADPH entraîne une consommation d'oxygène du même ordre de grandeur.

Enfin, l'addition du substrat des chaînes respiratoires mitochondriales (succinate, malate, ADP,...) (tableau 19) à une suspension de lutoïdes intacts, préparée dans les conditions habituelles de purification partielle des organites du latex, ne montre aucune absorption d'oxygène significative, attribuable à la présence de mitochondries.

μ1 C	$2^{\rm consommé}$.min ⁻¹	. g ⁻¹ (lutoïdes)
	lutoïdes HP	lutoïdes ES
<pre>lutoïdes lutoïdes + NADH lutoïdes + NADH + ATP lutoïdes + ATP lutoïdes + ATP + succinate lutoïdes + ATP + succinate lutoïdes + ATP + malate lutoïdes + malate lutoïdes + malate</pre>	0,06 <u>1,10</u> <u>1,20</u> 0,10 0,10 + ADP 0,12 0,12 0,08 0,14	$ \begin{array}{c} 0,10\\ 3,80\\ 4,10\\ 0,30\\ 0,20\\ 0,30\\ 0,22\\ 0,20\\ 0,28\\ \end{array} $

<u>Tableau 19</u> : Consommation d'oxygène par une suspension du sédiment de latex provenant d'hévéas hauts-producteurs ou atteints d'encoche sèche partielle en présence de substrats mitochondriaux. Les essais ont été réalisés avec des sédiments de latex lavés à 3 reprises dans un tampon isotonique (mannitol 0,3 M; Tris-HCl 50 mM pH 7,4) Les sédiments (30.000 x g) sont remis en suspension dans le même tampon à 27°C, à raison de l gr de lutoïdes frais. ml⁻¹ de tampon. La suspension concentrée (250 mg de lutoïdes) est ajoutée à 4,5 ml du même tampon saturé en air. Après obtention de la ligne de base (oxygraphe) on ajoute 100 µl d'effecteur dans la suspension. Les concentrations correspondent aux concentrations finales dans la cellule de l'oxygraphe (ATP-Mg 250 µM ; ADP 500 µM ; NADH 500 µM ; succinate ou malate 10 mM.

Au vu de ces résultats, les expérimentations suivantes ont été réalisées à partir de sédiments de latex provenant d'arbres BP ou ES présentant les activités les plus fortes. La plupart des essais ont été réalisés en présence de NADH comme substrat.



Figure 46: LOCALISATION COMPARTIMENTALE DE DIVERSES ACTIVITES ENZYMA-TIQUES DU LATEX, SUR GRADIENT DE DENSITE DE SACCHAROSE.

Le sédiment "brut" des organites du latex (120.000 x g) remis en suspension dans le cytosol, a été déposé au sommet d'un gradient linéaire (0,6 - 1,7 M) de saccharose, contenant du mannitol 0,3 M, du tampon Tris-HC1 30 mM à pH 7,0, et centrifugé 90 min à 95.000 x g (à 8°C). La fraction l correspond au coussin de saccharose 2 M, et la fraction 20 sérum cytosolique surnageant. Les activités sont exprimées en % de

l'activité totale mesurée dans le tube de gradient.

A.2 ~ LOCALISATION LUTOIDIQUE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE NAD(P)H DEPENDANTE :

La centrifugation sur gradient de densité (saccharose : 0,6-2,0 M) d'une suspension du sédiment de latex (BP) dans son propre cytoplasme (après élimination du caoutchouc) montre que la répartition des activités de consommation d'oxygène dépendante du NADH, et de l'oxydation du NADH sont strictement superposables à celle des activités phosphatases acides lutoïdiques. Ces résultats démontrent la localisation de l'activité NAD(P)H/O₂ oxydoréductase au niveau des lutoïdes (figure 46).

A.3 ~ EFFET DE L'INTEGRITE DES PARTICULES LUTOIDIQUES :

Le traitement des lutoïdes par les ultrasons aboutità la fragmentation de leur membrane et à la libération de leur contenu. Les résultats exposés dans le tableau 20 montrent que le traitement aux ultrasons provoque en même temps une forte augmentation de la consommation d'oxygène dépendante du NADH. L'intégrité de la membrane lutoïdique semble donc limiter la réaction. Il est vraisemblable, que dans le cas des lutoïdes soniqués, la NAD(P)H oxydase soit alors plus facilement accessible à ses substrats.

	μ10 ₂ consom	nés min	. g ⁻ (lutoïdes)	
	Lutoïdes intacts	Lutoïdes soniqués	Sérum lutoïdique	_
HP	1,16	2,80	0,72	_
BP	4,20	6,80	4,40	
ES	5,20	9,00	4,20	

 $\mu = 10_2$ consommés . min⁻¹ . g⁻¹(lutoïdes)

Tableau 20 : Consommation d'oxygène NADH dépendante par des suspensions de lutoïdes traités ou non aux ultrasons, ou de sérum lutoïdique. Les lutoïdes lavés ont été traités ou non aux ultrasons et les membranes éliminées par centrifugation (30 min; 90.000 x g) dans le cas des serums lutoïdiques. Le milieu réactionnel est identique pour tous les motifs : mannitol 0,3 M; Tris-HCl 50 mM à pH 7,4; NADH 0,5 mM.



Figure 47 : CONSOMMATION D'O2 DEPENDANTE DU NADH, EN FONCTION DE LA QUANTITE DE LUTOIDES (BP + ES) SONIQUES AJOUTEE. (pH 7,4 et NADH 0,5 mM)



Figure 48 : INFLUENCE DU pH DU MILIEU D'INCUBATION SUR LA CON-SOMMATION D'O₂ DEPENDANTE DU NADH PAR DES LUTOIDES (BP + ES) (250 µl de lutoïdes soniqués pour 5 ml total, NADH 0,5 mM et pH 7,0)



Figure 49 : EVALUATION DES Km ET Vm VIS A VIS DU NADH, POUR LA CONSOM-MATION D'OXYGENE DEPENDANTE DU NADH EN PRESENCE OU NON DE CATALYSEURS FERRIQUE CHELATE.

Le milieu réactionnel contient 250 μ l de lutoïdes soniqués pour un volume total de 5 ml. La réaction est effectuée à pH 7,4 en présence ou non de fer ferrique (100 μ M) chélaté par EDTA ou ADP.

L'élimination, par centrifugation, des lambeaux membranaires et des microvésicules résultant du traitement aux ultrasons se traduit par une diminution de la consommation d'oxygène dépendante du NADH. Il semble donc que la présence de constituants membranaires soit nécessaire à une activité maximale, ou encore qu'une certaine fraction de l'activité soit plus ou moins (40 à 60 %) liée à la membrane, et donc soustraite par centrifugation. Quoiqu'il en soit, le sérum intralutoïdique, obtenu à partir de lutoïdes fraîchement isolés du latex et traités aux ultrasons, contieut encore 40 à 60 % de l'activité NADH oxydase, sous forme soluble (tableau 20).

A.4 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN EXTRAIT :

La consommation d'oxygène dépendante du NADH est proportionnelle à la quantité de l'extrait lutoïdique ajouté dans le milieu (lutoïdes ES soniqués) (figure 47). La mise en évidence de cette proportionnalité peut être considérée comme un argument en faveur de la nature enzymatique de cette consommation d'oxygène.

A.5 - INFLUENCE DU pH DU MILIEU :

L'étude de la consommation d'oxygène dépendante du NADH en fonction du pH, en tampon phosphate 0,1 M, montre un optimum d'activité entre le pH 7 et 7,5 (figure 48).

A.6 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN NADH, DETERMINATION D'UN Km APPARENT :

L'étude de la consommation d'oxygène par une suspension lutoïdique provenant d'un mélange de latex (BP + ES) en fonction de la concentration en NADH montre un phénomène de saturation michaelien. La représentation des inverses $1/v = f(\frac{1}{S})$ (Lineweaver & Burk) permet de calculer un Km apparent vis-à-vis du NADH de l'ordre de 45 µM à pH : 7,4 (moyenne de 3 expériences = 45 ± 11 µM) (figure 49). Ceci constitue un argument supplémentaire en faveur d'une catalyse enzymatique de la consommation d'oxygène.



Figure 50 : CONSOMMATION D'OXYGENE DEPENDANTE DU NADH, PAR LES LUTOIDES EN FONCTION DE LA TENEUR RELATIVE EN OXYGENE DU MILIEU.

Les expériences ont été réalisées à pH 7,4 (O 26°C) en présence de NADH O,5 M. La consommation d'oxygène est exprimée en % de la vitesse initiale de la consommation à saturation en air. Les teneurs en oxygène du milieu sont exprimés en % de saturation en air dans les conditions opératoires.

A.7- AFFINITE POUR L'OXYGENE :

Après barbotage dans le tampon, d'un courant d'azote désoxygéné (pyrogallol alcalin), ébullition puis dégazage sous vide, nous avons obtenu un tampon réactionnel "désoxygéné". Dans ces conditions la concentration en oxygène dissous (à 26 °C) ne représente que 17 % d'une solution identique traitée dans les mêmes conditions et réoxygénée par barbotage d'air (100 %). Si l'on considère qu'à saturation, la solution tampon contient 5 μ l d'O₂ dissous par ml (soit une concentration 220 μ M), dans la solution "désoxygénée" (17 %), l'oxygène est donc présent à une concentration environ 37,5 μ M.

A cette faible concentration, la vitesse initiale de la consommation d'O₂ dépendante du NADH par une suspension lutoïdique soniquée (BP + ES) est encore égale à 62 % de sa vitesse en présence de concentrations saturantes en O₂. Si l'on laisse se poursuivre la réaction, celle-ci se prolonge plus lentement jusqu'à épuisement virtuel de l'oxygène. A des concentrations résiduelles en oxygène équivalentes à environ 5 à 10 % de la concentration saturante, la vitesse de sa consommation représente 18 % de la vitesse maximale (tableau 21).

Saturation d'air	100 % (air)	25 % (N ₂) (17 % N ₂ +100°C)	10-5 %
Consommation $\mu 1 \ 0_2 \ .min^{-1} .g^{-1}$	4,60	3,92	2,84	0,84
Activité %	100	81	62	18

Tableau 21 :Effet de la concentration en oxygène sur la consommation d'oxygène NADH dépendante par une suspension de lutoïdes (BP + ES) soniqués (rapportée au g. de lutoïdes)

Les estimations des activités trop approximatives aux faibles concentrations en oxygène dans le milieu ne nous ont pas permis de calculer un Km cohérent pour ce substrat. On peut cependant estimer que le Vmax/2 est atteint pour des concentrations en O_2 situées entre 10 et 15 % de la saturation du milieu en oxygène, ce qui correspondrait à un Km de la réaction situé entre 22 et 30 µM (figure 50). Ces valeurs correspondent à une affinité relativement forte de la NADH oxydase pour ce substrat.



<u>Figure 51</u> : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS FERREUX, OU FERRIQUES CHELATES PAR L'EDTA OU L'ADP, SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DEPENDANTE DU NADH PAR LES LUTOIDES (BP + ES). Le rapport des concentrations dans le cas du Fe³⁺/EDTA est de 1/1,6, et dans le cas de Fe³⁺/ADP de 1/2. Les expériences sont réalisés dans nos conditions standard (250 μ 1 lutoïdes; NADH 0,5 mM; pH 7,4). Le volume total du milieu réactionnel est de 5 ml.

A.8 - INFLUENCE DES IONS FERREUX ET FERRIQUES :

Le rôle activateur du fer dans l'émission des formes toxiques de l'oxygène a été décrit par de nombreux auteurs (cf. introduction). Nous avons recherché les effets de différentes concentrations de diverses formes ioniques du fer sur la consommation d'oxygène dépendante du NADH.

a) Effet de Fe^{2+} :

La figure 51 montre l'effet activateur de l'ion Fe²⁺ à pH 7, pour des concentrations comprises entre 20 et 150 μ M avec un optimum d'activation (+ 50 à 60 %) de la consommation d'oxygène NADH dépendante situé entre 80 et 100 μ M. Au-delà de 150 μ M on peut observer un effet inhibiteur du Fe²⁺.

b) Effet du Fe³⁺/EDTA :

Des études préliminaires ont montré que l'efficacité maximum du système Fer/EDTA nécessitait un rapport de concentration entre le Fe³⁺ et son chélateur de 1/1,6. L'étude des effets de différentes concentrations du mélange Fer/EDTA sur l'absorption d'oxygène dépendante du NAD(P)H par une suspension de lutoïdes (BP + ES) montre une activation maximum (230 %) à partir d'une concentration en Fer 80 μ M complexé par l'EDTA 135 μ M. Aux concentrations plus élevées, le taux d'activation ne semble pas modifié (figure 51).

Les cinétiques reproduites dans la figure 52 et les résultats du tableau 22, montrent que la présence de lutoïdes intacts, ou du moins de protéines lutoïdiques fonctionnelles, est nécessaire à la consommation d'oxygène dépendante du NADH, même en présence de l'activateur Fer/EDTA.

- c) Effets du Fe³⁺/ADP (adénosine diphosphate) : Le même type d'étude a montré que :
 - l'efficacité optimum du système Fe³⁺/ADP nécessitait un rapport de concentration de 1 Fer pour 2 ADP,
 - une activation maximum (+ 140 %) est atteinte dès la concentration en Fe³⁺ 40 µM chélaté par ADP 80 µM (fig. 51)
 - l'activation maximum provoquée par le mélange Fer/ADP est inférieure à celle provoquée par l'addition de Fer/EDTA (+ 140 % et + 230 % respectivement).



Figure 52 : EFFET ACTIVATEUR DU FER-EDTA SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DEPENDANTE DU NADH, PAR DES LUTOIDES.

Les expériences ont été réalisées avec des lutoïdes intacts ou traités pendant 5 minutes à 100°C, provenant d'arbres très bas-producteurs. Le volume total du milieu réactionnel est de 5 ml. Les réactions ont été effectuées dans nos conditions standard : pH 7,4, NADH 0,5 mM, 250 μ l de lutoïdes. La concentration en Fe³⁺ est de 0,1 mM et celle du EDTA de 0,16 mM. d) Effets des différentes formes chélatées du fer sur l'affinité du système NADH/Oxydase pour ses substrats :

- Nous avons mesuré la consommation d'oxygène dépendante du NADH en fonction de la concentration en NADH et en présence ou non de Fe³⁺ chélaté par l'EDTA ou l'ADP, à concentration optimum. Les résultats indiquent que le Fer chélaté ne modifie pas l'affinité de la NADH oxydase pour son substrat NADH (figure 49). Seuls les Vmax caractérisant l'absorption d'oxygène sont sensibles au Fer chélaté : en présence de Fer (100 μ M) ADP (200 μ M) Vmax est multiplié par un facteur l,7 et en présence de Fer (100 μ M) EDTA (160 μ M) Vmax dans les mêmes conditions est multiplié par 2,7.

- Les mesures de la consommation d'oxygène dépendante du NADH, à faible teneur en oxygène (17 % de la saturation), indiquent que le Fer³⁺ chélaté augmente l'affinité du système pour l'oxygène (tableau 22).

	Consommation $0_2 \mu 1$. min ⁻¹					
		Tampon		+ l g lutoïdes (ES+BI		
Saturation en O2 de l'air	NADH O,5 mM	NADH Fe ³⁺ /EDTA	NADH Fe ³⁺ /ADP	NADH NADH NADH 0,5 mM Fe ³⁺ /EDTA Fe ³⁺ /ADI		
100 %	0,08	0,10	0,12	4,40 10,2 7,2 (100%) (100%) (100%)		
17 %	0,00	0,00	0,00	2,64 8,44 5,88 (60%) (83%) (82%)		

<u>Tableau 22</u> : Effet du Fer chélaté sur la consommation d'oxygène NADH dépendante à saturation du milieu en air et à faible teneur en oxygène (les chiffres entre parenthèse indiquent les activités résiduelles exprimées en % par rapport au témoin saturé en air)

Ces différentes observations suggèrent que le Fer³⁺ chélaté active le système catalysant la consommation d'oxygène NADH dépendante en augmentant l'affinité du système pour l'oxygène moléculaire plutôt . que l'affinité du système enzymatique pour le NADH. Selon différents auteurs, les chélateurs agiraient de deux façons (non mutuellement exclusives) sur les systèmes transporteurs d'électrons. Ils éviteraient d'une part la précipitation des sels de fer (PEDER-SON et AUST, 1972 ; HOGBERG *et al.*, 1975 ; STAUDINGER *et al.*, 1964), et d'autre part abaisseraient le potentiel rédox du couple $\mathrm{Fe}^{3+}/\mathrm{Fe}^{2+}$ de 0,77 à 0,14 Volt (NOGUCHI et NAKANO, 1974 . ; LAI et PIETE, 1978). Ils faciliteraient ainsi le transfert des électrons du NADH vers le Fer^{3+} par l'intermédiaire d'une activité NADH oxydase (flavoprotéine ?).

A.9 - EFFETS DE CERTAINS COMPOSES IONIQUES PRESENTS DANS LE LATEX :

RIBAILLIER (1972) en étudiant la composition organo-minérale du latex a précisé le rôle vacuolaire des lutoïdes. C'est ainsi que ces organites accumulent les cations cuivre (50 μ M), calcium (1,5 mM) et magnésium (65 mM), et certains anions tels le phosphate (76 mM) et le citrate (53 mM).

Nous avons testé l'effet de ces différentes formes ioniques sur la consommation d'oxygène dépendante du NADH par des lutoïdes soniqués (BP + ES).

Effecteurs	Concentration mM	% Inhibition
^{MgC1} 2 (x)	10 50 75	- 5 11
CaCl ₂ (x)	0,5 1,5 2	- 4 12
Citrate (x)	10 25 50	- 7 18
Phosphate (x)	10 25 50	 7
ATP	0,34 0,68	16 35

Tableau 23 : Effets de différents ions présents dans le latex (x: essentiellement accumulés dans les lutoïdes) sur la consommation d'oxygène dépendante du NADH

Les résultats rapportés dans le tableau 23 montrent qu'aux <u>con-</u> <u>centrations physiologiques</u> existant dans le latex (cytoplasme ou lutoïdes) le Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, citrate ou phosphate ne présentent pas d'effet marqué sur la consommation d'oxygène dépendante du NADH par des lutoïdes soniqués. Cependant, aux concentrations extrêmes, un léger effet inhibiteur peut être observé et en particulier en présence de citrate. L'ATP par contre, inhibe partiellement la consommation d'oxygène NADH dépendante. Ce résultat est en accord avec celui de BADWEY et KARNOVSKY (1979) mettant en évidence une inhibition compétitive de l'ATP vis-à-vis de la NADH oxydase des leucocytes. Notons que dans le cas du latex, cet effet inhibiteur de l'ATP peut devenir efficient dans le latex des arbres stimulés à l'ethrel, qui voient leurs teneurs en ATP cytosolique tripler (600µM) sous l'effet du traitement stimulant (cf. première partie, chapitre III).

Par contre (figure 53) nous observons une nette activation de la consommation d'oxygène en présence de cuivre, déjà notable aux concentrations physiologiques lutoïdiques (40 à 90 μ M), avec un optimum situé autour de 150 μ M (70 % d'activation).

Il est probable que le cuivre, dont le potentiel redox (+ 0,17 volt) est proche de celui du complexe Fe³⁺/EDTA (+ 0,14 V), agit de même en facilitant le transfert des électrons du système NADH oxydase vers l'oxygène.

A.10 - EFFET DE CERTAINS INHIBITEURS CLASSIQUES DES CHAINES RESPIRA-TOIRES (mitochondriales) :

Afin de rechercher l'éventuelle existence d'une respiration mitochondriale, nous avons testé l'effet des inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires.

Les résultats regroupés dans le tableau 24, montrent que l'absorption d'oxygène dépendante du NADH par des lutoïdes intacts (BP ou ES) ou soniqués, en présence ou absence de Fe³⁺/ADP, est totalement insensible aux inhibiteurs spécifiques des voies cytochromiques mitochondriales tels : l'antimycine A et le 2-n-Heptyl-4 hydroxy quinoline-N-oxyde (HOQNO). On observe cependant une très légère inhibition par la roténone. L'éthanol (solvant de ces inhibiteurs) est également inactif.

L'acide salicyl-hydroxamique (SHAM), inhibiteur de la voie alterne mitochondriale (SCHONBAUM *et al.*, 1971...), non seulement n'inhibe pas la consommation d'oxygène dépendante du NADH caractérisant les lutoïdes, mais au contraire l'active d'un facteur 2.

Le cyanure, inhibiteur des chaînes respiratoires mais aussi de nombreuses enzymes à site actif métallique (Fe³⁺; Cu⁺⁺) inhibe partiellement (1 mM) ou fortement (inhibition de 80 % à 2,5 mM) l'absorption d'oxygène NADH dépendante, et annule dans tous les cas l'effet activateur du Fe³⁺/ADP.



 $\underline{Figure 53}$: EFFET ACTIVATEUR DU SULFATE DE CUIVRE, SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DEPENDANTE DU NADH, PAR DES LUTOIDES.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la légende de la figure 51.

ŝ

			and the second sec	
		Consommatior	μ10 ₂ .min ⁻¹	.g ⁻¹ (lutoïdes)
		Lutoïdes intacts	Lutoïdes soniqués	Lutoïdes soniqués + Fe ³⁺ /ADP
	Tampon	4,48	6,60	13,68
Et	hanol (100 µ1)	4,40	6,68	14,04
Antimycin	e A (25 μM)	4,60	6,40	14,40
Rc	ténone(0,1 µM)	3,84	5,20	12,64
нс	QNO(1 µM)	4,68	6,32	14,10
Anti A +	Roténone + HOQNO	3,72	5,00	12,00
ĸc	1 mM	2,68	3,20	4,32
K U	2,5 mM	0,84	1,20	1,72
SHAM	2,5 mM	8,28	11,60	19,40

<u>Tableau 24</u> : Effet des inhibiteurs des chaînes respiratoires sur la consommation d'oxygène dépendante, par des lutoïdes (BP + ES) intacts et soniqués en présence ou non de Fer³⁺ (50 μ M)/ADP (100 μ M) à pH 7,4 en présence de NADH (500 μ M)(moyenne de 3 essais)

A.11 - ACTION DE DIFFERENTS EFFECTEURS CLASSIQUES DES ENZYMES REDOX (RESPIRATOIRES) SUR L'ABSORPTION D'OXYGENE NADH DEPENDANTE :

Les résultats regroupés dans le tableau 25 montrent que la consommation d'oxygène NADH dépendante est fortement inhibée par le DIECA et l'hydroxylamine et partiellement par l'orthophénantroline (complexant du fer). L'activité du système NADH/O₂ oxydo-réducteur nécessite donc la présence d'un cation métallique (Fer et/ou Cu⁺⁺); de fait l'addition de Fer ou de cuivre semble rétablir partiellement l'activité du système en présence de ces inhibiteurs.

Effecteur	DIECA	O-phénantrolin	e NaN3	Hydroxylamine	Amizo1	н ₂ 02
Concentration (mM)	1 (=**)	10 ⁻³ (*)	0,5 (**)	0,5 (**)	5 (**)	1 (*)
Inhibition %	~62 (11)	-18 (6)		-65 (12)		0 à 22
Activation %			+35 à 180		+ 15 à 60	

<u>Tableau 25</u> : Action de divers effecteurs des "enzymes rédox". Les résultats sont exprimés en % d'activation ou inhibition par rapport à un témoin non traité (une moyenne de 8 (x) ou 2x5 (xx) expériences portant sur des lutoïdes soniqués, isolés de mélanges de latex ; les chiffres entre parenthèses indiquent l'écart-type des valeurs mesurées). Lorsque les effets présentaient une variabilité significative entre différents mélanges, les effets extrêmes ont été mentionnés.

L'amizol de l'azoture de sodium, ne présentent jamais d'effet inhibiteur, mais au contraire un effet activateur, extrèmement variable selon la provenance des lutoïdes. Rappelons que ces deux effecteurs sont considérés comme des inhibiteurs puissants et relativement speécifiques des catalases (cf. chapitre III). L'effet activateur de ces effecteurs pourrait donc être indirect. Une hypothèse susceptible d'expliquer l'effet observé consiste à supposer que l'activité NADH oxydase lutoïdique puisse libérer de l'eau oxygénée dans le milieu. L'H₂O₂ produite est ensuite normalement partiellement recyclée sous forme d'oxygène moléculaire (cf. Introduction) en présence d'activités catalases contenues dans la suspension lutoïdique brute. Le bilan de la consommation nette en oxygène est donc sous-estimé en présence d'activités catalases, et l'activité NADH oxydase, mesurée par le consommation d'oxygène serait apparemment activée lorsque les catalases sont inhibées.

A.12 - EFFETS DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD) DE LA CATALASE ET DE LA PEROXYDASE (HRP) EXOGENES SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE NADH DEPENDANTE (tableau 26) :

a) En absence d'activateur ferrique, la superoxyde dismutase exogène inhibe fortement (70 %) et la catalase exogène seule inhibe partiellement (50 %) la consommation d'oxygène NADH dépendante. La peroxydase

Conso	mmation d'oxyg	ène dépendante	du NADH μ10 ₂ .	min ⁻¹ .g ⁻¹ (lutoï	des)
	Sans Fer	Fer/ADP (50 100)	Fer/EDTA (60 80)	FeC1 ₃ (50)	
Néant	5,0(0)	7,3 (0)	10,4 (0)	6,2 (0)	
Superoxyde dismutase (SOD)	1,5 (-70)	2,2 (-70)	7,4 (-29)	4,8 (-23)	
Catalase (Catal)	2,4 (-52)	3,5 (-51)	8,0 (-23)	4,6 (-26)	
Peroxydase (HRP)	5,9 (+18)	7,5 (+ 3)	10,1 (- 4)	6,5 (+ 4)	
SOD + Catal	0,3 (-94)	1,0 (-86)	6,3 (-39)	3,7 (-40)	
SOD + HRP	3,3 (-34)	4,2 (-42)	7,6 (-27)	4,4 (-29)	
Cat + HRP	2,8 (-44)	3,6 (-51)	8,2 (-21)	5,2 (-16)	
(Catal + SOD) 100°C	4,5 (-10)	6,8 (- 6)	10,3 (- 1)	5,9 (- 4)	
Sérum albumine	4,8 (- 4)	7,2 (- 1)	10,1 (- 3)	6,0 (- 3)	

Tableau 26 : EFFETS DES ENZYMES EXOGENES METABOLISANT LES PEROXYDES.

La réaction (consommation d'O₂) est initiée par l'injection de NADH (0,5 mM final) dans la suspension de lutoïdes soniqués (5% P/V), en présence ou non de Fe³⁺ (50 µM), ADP (100 µM) ou EDTA (80 µM), à pH 7,4. Les enzymes :superoxyde dismutase (SOD), catalase (catal et peroxydase (HRP) sont injectées en cours de réaction, à la concentration de 10 µg.ml⁻¹ de suspension. Un essai de contrôle a été réalisé en présence de SOD + Catal bouillies pendant 10 min (100°C). Les chiffres entre parenthèses indiquent 1e % d'inhibition (~) ou d'activation (+) observé après l'addition de l'effecteur (une moyenne de 3 essais, au moins, réalisés à partir de mélanges de lutoïdes BP + ES lavés et soniqués).

1.1.1





<u>Figure 54</u> : INHIBITION APPARENTE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE ET DE L'EMISSION DE SUPEROXYDES, DEPENDANTES DU NADH EN PRESENCE D'UN EXCES DE SOD ET DE CATALASE EXOGENES.

Les deux types d'expériences ont été réalisées à pH 7,4, en présence de NADH 0,5 mM. On a ajouté environ 300 unités de superoxyde dismutase (SOD) ou de catalase exogènes. La détection des anions superoxydes (O;) est réalisée indépendamment selon la méthode de BEAUCHAMP et FRIDOVICH (1971) (voir partie technique et chap. I/B-3). Figure 55 : INFLUENCE DES DIFFERENTES FORMES CHELATEES DU FER (3+), SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DEPENDANTE DU NADH PAR DES LUTOIDES (BP), EN PRESENCE DE SOD ET DE CATALASE EXOGENES.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles des figures 52 et 54. seule active par contre légèrement le système (tableau 26).

Le mélange SOD+Catalase inhibe presque complètement l'absorption d'O₂ dépendante du NADH. La libération d'oxygène moléculaire dans la suspension, après l'addition de catalase est révélatrice d'une certaine accumulation d'eau oxygénée (figure 54).

Enfin, notons qu'en absence de catalyseur ferrique, l'effet activateur de la peroxydase se retrouve, même lorsqu'elle est associée à la SOD ou à la catalase (tableau 26). Cet effet activateur apparent en présence de peroxydase saturante, peut être attribué à une compétition entre l'activité peroxydase exogène et l'activité catalase endo et exogène, vis-à-vis de l'H₂O₂ libérée par la NADH oxydase lutoïdique. Ainsi, contrairement à "l'effet catalase", cette compétition en faveur de la peroxydase exogène saturante (des substrats phénoliques accepteurs sont présents dans les lutoïdes), aboutit à une consommation de l'H₂O₂ sans libération concomitante d'oxygène moléculaire, et donc à une activation apparente de la consommation nette d'oxygène dépendante du NADH.

Le sérum albumine bovine de même que le mélange SOD + catalase dénaturé par choc thermique (10 min à 100°C) ne présentent pas d'effet significatif.

> b) En présence d'activateur ferrique (figure 55 et tableau 26) Deux cas différents sont à distinguer :

- En présence de Fe³⁺/ADP, la consommation d'oxygène NADH dépendante est activée(+50 %) en absence d'enzyme exogène. L'addition de superoxydes dismutase, de catalase, de peroxydase, ou la combinaison de ces enzymes exogènes, aboutit aux mêmes types d'effets démontrés en absence d'activateur ferrique, les activités résiduelles restant sensiblement supérieures à celles observées en absence de fer.

- En présence de Fe³⁺/EDTA, la consommation d'oxygène dépendante du NADH se trouve doublée par rapport à celle du témoin. L'addition des enzymes exogènes SOD, catalase ou peroxydase ou leur association ne présente que peu d'effet. Tout se passe comme si le flux d'électrons vers l'oxygène n'était pas orienté vers la synthèse d'eau oxygénée, ou que l'eau oxygénée éventuellement produite n'était pas corsommée par la catalase et de ce fait, non recyclée en oxygène moléculaire. Cet effet observé en présence de Fer/EDTA pourrait correspondre à la mise en place d'une compétition entre les activités SOD / catalase, et les réactions



Figure 56 : LATENCE DE L'APPARITION DES ACTIVITES NADH OXYDASES LUTOIDIQUES MAXIMA SELON DIFFERENTS TRAITEMENTS DE "CONSERVATION".

Les consommations d'oxygène dépendantes du NADH sont mesurées après des temps de conservation plus ou moins longs sous atmosphère d'azote ou à l'air, de lutoïdes (BP+ES) intacts ou soniqués (température de conservation : 7°C environ). Les conditions opératoires sont identiques (pH 7,4 ; NADH 0,5 mM; Saturation en air, 250 µl de suspension lutoïdique pour 5 ml total de milieu réactionnel). non enzymatiques en présence des catalyseurs ferriques (FENTON et HABER-WEISS) vis-à-vis des formes toxiques de l'oxygène produites par la NADH oxydase lutoïdique $(0\frac{1}{2}, H_20_2)$ (cf. Introduction).

- En présence de Fe³⁺ non chélaté, l'action des enzymes exogènes est du même type qu'en présence de Fer³⁺/EDTA, mais les effets sont moins marqués.

A.13 - LATENCE DE L'APPARITION DES ACTIVITES POTENTIELLES MAXIMA NADH/0, OXYDOREDUCTASE :

Les lutoïdes traités ou non aux ultrasons ne présentent pas immédiatement, après leur extraction du latex, leur maximum d'activité consommatrice d'oxygène dépendante du NADH. Les lutoïdes intacts ou soniqués ne présentent que 60 ou 65 % de leur activité potentielle maximum immédiatement après leur extraction et leur activité maximale est atteinte après 90 min de stockage à l'air dans le cas de lutoïdes soniqués et après 180 min dans le cas de lutoïdes intacts (figure 56).

Les lutoïdes intacts stockés sous azote à 7°C présentent une activité initiale égale à 50 % de leur activité maximum, cette dernière est atteinte après 5 heures de stockage sous faible pression partielle d'oxygène.

Après 6 heures de stockage à l'air libre ou 9 heures sous atmosphère d'azote, les activités NADH/O₂ oxydoréductases diminuent sensiblement.

Il semble donc qu'un certain "vieillissement" (destructuration, démasquage de sites ?) et (ou) un certain degré d'oxydation de la suspension lutoïdique (oxydation de "réducteurs internes" inhibiteurs, formation de quinoïdes ?) soient nécessaires au fonctionnement optimal du système. Nous avons par ailleurs observé que les activités maxima pouvaient souvent être observées corrélativement à l'apparition d'un brunissement du matériel lutoïdique. Ceci suggère la participation d'éventuelles formes quinoniques ou semiquinoniques dans l'activité NADH/0₂ oxydoréductase lutoïdique.

A.14 - INFLUENCE DE QUELQUES COMPOSES PHENOLIQUES ET QUINONIQUES. INTERFERENCES AVEC LES PHENOL-OXYDASES ENDOGENES (Tableau 27) :

L'addition de tyrosine, de di-hydroxy-phénylalanine ou de scopolétine augmente fortement la consommation d'oxygène NADH dépendante par les lutoïdes (BP + ES). Mais cette consommation d'oxygène est pour une

large part due à la présence d'activités phénoloxydases endogènes dans les sédiments du latex. Le rapport des activités en présence de NADH montre cependant une activation de 15 à 20 % de la consommation d'oxygène NADH dépendante en présence de ces composés phénoliques (oxydés ou en cours d'oxydation).

Effecteurs ajoutés Con µl O ₂	$\frac{1}{2} \cdot \min^{-1}$	d'oxygène : g ⁻¹ (lutoïdes)	Consommation d'oxygène NADH dépendante %
	Sans NADH (tampon)	avec NADH O,5 mM	
Néant	0,2	5,4	100
Tyrosine	5,0	11,3	121 (+ 21 %)
Di-hydroxyphénylalanine	8,5	14,7	114 (+ 14 %)
Scopolétine	1,9	8,1	118 (+ 18 %)
1-3-naphtoquinone	0,5	9,1	160 (+ 60 %)
1-4-naphtoquinone	0,8	12,6	218 (<u>+118 %</u>)
Gaïacol	0,7	13,4	236 (+136 %)

Tableau 27 : Action de quelques composés phénoliques et quinoniques sur la consommation d'oxygène NADH dépendante par des lutoïdes (BP + ES) soniqués. Interférence avec les activités phénoloxydases. La consommation d'oxygène due aux activités phénol-oxydases est enregistrée avant l'injection de NADH 0,5 mM à pH 7,4. Les pourcentages d'activation ont été calculés en appliquant la formule (VO₂ (NADH + effecteur) - VO₂ (effecteur)/ (VO₂ (NADH) - VO₂ (tampon). Concentration en effecteur = 5,10⁻⁴ M. Les essais ont été réalisés en absence d'activateur ferrique. (VO₂ : vitesse de la consommation d'O₂; SL : Sédiment du latex, lavé).

L'addition de di-quinones (naphtoquinones) augmente considérablement la consommation d'oxygène dépendante du NADH. L'isomère para (1-4) est deux fois plus efficace que l'isomère méta (1-3), et multiplie par deux la consommation d'oxygène dépendante du NADH.

La très forte activation de la consommation d'O₂ dépendante du NADH (+ 136 %) en présence de gaïacol peut s'expliquer par deux phénomènes susceptibles d'agir en synergie :

- la peroxydation du gaïacol en présence des activités peroxydase endogènes (cf. Chapitre III) et de l'H₂O₂ libérée par l'activité NADH-oxydase lutoïdique. Cette compétition entre la peroxydase et la catalase endogène pour le même substrat H₂O₂ se traduit par une activation

ŗ

apparente de la consommation nette $d'0_2$ en présence simultanée du NADH et du gaïacol ;

- la peroxydation du gaïacol libère au moins transitoirement des quinones ou semi-quinones qui peuvent alors jouer un rôle analogue à celui démontré pour les naphtoquinones.

Rappelons que de nombreux composés phénoliques sont présents dans le latex dont: la tyrosine, la di-hydroxyphenyl-alanine, la scopolétine... (HANOWER et al. (1979)), et que des plastoquinones ont été également mises en évidence au niveau des particules sédimentables du latex.

Il est classiquement reconnu que les composés phénoliques ou quinoniques participent activement aux transferts d'électrons dans de nombreux systèmes oxydoréducteurs, et qu'ils semblent impliqués directement eux-mêmes dans la génération de formes toxiques de l'oxygène comme O_2^{-} et l'H₂O₂ (CRANE, 1977 ; BOVERIS et al. 1976 ; ELSTNER, 1982 ; ELSTNER et al.,1976 et 1979 ; HOCHSTEIN et al 1965 ; MISHRA et FRIDOVICH, 1972 ...) Les composés phénoliques et le pool quinonique naturels, au sein du latex, pourraient donc jouer un rôle important, et moduler l'activité de la NADH oxydase lutoIdique.

A.15 - ACTION DES SUBSTANCES REDUCTRICES PHYSIOLOGIQUES ET DES REACTIFS DES GROUPEMENTS THIOLS REDUITS :

La présence de substances réductrices active sensiblement la consommation d'oxygène NADH dépendante par des lutoïdes soniqués. L'acide ascorbique est plus efficace que les composés thiols réduits. On note cependant, une activation de l'ordre de 25 % en présence de glutathion (SH) (tableau 28).

	Consommatic µl O ₂ .min	on d'oxygène ¹ .g ⁻¹ (lut.)	Activation NADH/O ₂ oxydoréductase (%)
	sans NADH	avec NADH	
Néant	0,24	5,12	0
Ascorbate	1,28	8,12	+ 40 %
Glutathion (SH)	0,56	6,72	+ 26 %
Cystéine	0,24	5,84	+ 15 %

Tableau 28 : Action des quelques réducteurs physiologiques sur la consommation d'oxygène NADH dépendante par une suspension lutoïdique (lut.) (BP + ES) soniquée.

Après enregistrement des consommations d'oxygène en présence du réducteur seul (1,5 mM), la consommation d'oxygène NADH dépendante est initiée par l'injection de NADH (0,5 mM). Les essais ont été réalisés à pH 7,4 en absence d'activateur ferrique (une moyenne de 3 essais).

Une des hypothèses susceptibles d'expliquer l'effet activateur des différents composés réducteurs consiste à postuler la participation d'un groupement thiol, maintenu à l'état réduit, au niveau du système de transfert d'électrons lutoïdique. Cependant la très faible sensibilité de la consommation d'oxygène dépendante du NADH vis-à-vis des réactifs des groupements thiols (tableau 29), rend peu vraisemblable cette première hypothèse.

	Consommation d'oxygène NADH dépendante				
	µ1 0 ₂ .min ⁻¹ .g ⁻¹ (lut.)	% d'inhibition			
Néant	6,04	_			
Iodoacétate	5,92	- 2 %			
NEM	5,20	- 14 %			
PCMB	4,72	- 22 %.			

Tableau 29 : Action des réactifs des groupements thiols.

La suspension lutoïdique (BP + ES) a été préincubée 30 minutes en présence ou non des réactifs des thiols (1 mM). La consommation d'oxygène est initiée par l'injection du NADH. Les essais ont été réalisés à pH 7,4 en absence d'activateur ferrique (moyenne de 2 essais). Dès lors, plusieurs hypothèses, non mutuellement exclusives, sont envisageables :

- la présence de composés réducteurs maintient un équilibre oxydoréducteur favorable au transfert des électrons du NADH vers l'oxygène. Ils peuvent par exemple assurer un recyclage sous forme semiquinone, plus réactives du pool quinonique éventuellement impliqué dans les processus de transfert des e ;

- les composés réducteurs piègent les formes toxiques de l'oxygène (H_2O_2 , O_2^- , OH^+ ,...) émises par la NADH oxydase. Ils détoxifient donc chimiquement le système, et entrent en compétition avec la SOD et la catalase endogène, se traduisant par une consommation nette d'oxygène plus importante;

- les réducteurs peuvent agir directement sur la SOD et (ou) la catalase endogènes défavorisant le recyclage des superoxydes et (ou) de l'eau oxygénée en oxygène moléculaire.

A.16 - CONSERVATION ET ACTION DES TEMPERATURES EXTREMES (tableau 30) :

Les lutoïdes soniqués conservés à la température de 10°C atteignent leur activité NADH/O₂ oxydoréductase optimum après deux à six heures de stockage (fig. 56). La suspension lutoïdique conservée à 10°C pendant 4 heures (optimum d'activité) portée à ébullition pendant 10 minutes ne présente plus d'activité NADH/O₂ oxydoréductase confirmant ainsi le caractère totalement enzymatique de la réaction.

Les lutoïdes conservés 24 heures à la températures de 10°C ne présentent plus que la moitié de leur activité maximum initiale.
Consommation d'oxygène NADH dépende								
Températures	Temps	ul 0 ₂ .min ⁻¹ .g ⁻¹ (lut.)	Activité résiduelle %					
+ 10°C	4h	6,40	100					
+ 10 C	24h	3,12	48,5					
Congélations	5h	6,60	103					
- 16°C	24h	2,48	39					
Décongélations successives	48h	1,72	26					
	7j	0,72	11					
- 16°C Continu	7j	2,08	32					
+ 100°C	10'	0,48	7,5					

<u>Tableau 30</u> : Conservation et action des températures "extrêmes" sur la consommation d'oxygène NADH dépendante par des lutoïdes (BP + ES). Les lutoïdes soniqués ont été laissés 4 heures à 10°C puis congelés à -16°C ou chauffés à 100°C pendant 10 minutes.

Les lutoïdes stockés une semaine à -16°C en continu ne présentent plus que le tiers de leur activité maximum initiale.Enfin les transitions thermiques répétées (congélation/décongélation/recongélation) aboutissent à une dégradation rapide des activités : après 3 congélations/ décongélations en 48 heures, l'activité résiduelle représente le quart, et après 4 traitements en une semaine le dixième de l'activité maximum initiale.

La consommation d'oxygène NADH dépendante semble donc relativement labile et très sensible aux transitions thermiques répétées.

B - MISE EN ÉVIDENCE DE L'ÉMISSION D'ANIONS SUPEROXYDES LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH/O2 OXYDASE LUTOÏDIQUE

Les résultats décrits dans les paragraphes précédents définissent certaines caractéristiques de la consommation d'oxygène NAD(P)H dépendante au niveau des lutoïdes. L'inhibition partielle de cette activité par la SOD, et totale par la SOD + Catalase exogènes nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une génération d'anions superoxydes et d'hydroperoxydes par cette activité enzymatique. Nous confirmons ci-dessous cette hypothèse.

B.1 - DETECTION DE L'EMISSION DE SUPEROXYDES PAR LA METHODE DE MISHRA et FRIDOVICH (1972) :

Cette méthode consiste à suivre la co-oxydation de l'épinéphrine (noradrénaline) en adrénochrome, induite par la présence des radicaux $0\frac{1}{2}$.

a) Essais à partir d'une suspension lutoïdique brute (tableau 31) :

Des essais effectués directement sur des sédiments bruts de latex ont montré qu'il existait une très forte activité adrénaline oxydase en absence comme en présence de NADH. La présence de NADH n'active que très légèrement le phénomène. Par ailleurs cette activation par le NADH n'est que partiellement inhibée en présence de SOD.

Le même type d'expérience réalisé sur le cytosol montre l'absance d'activité adrénaline oxydase NADH dépendante ou non.

La structure de la noradrénaline (O -diphenol) suggère que l'activité noradrénaline oxydase en absence de NADH est due à la présence d'activités polyphénoloxydases contaminantes. Nous avons tenté d'éliminer cette interférence en éliminant les activités polyphénoloxydase connues pour être compartimentées dans les particules de FREY-WYSSLING (COUPÉ et al. 1972 ; BRZOZOWSKA ~ HANOWER et al. 1978).

b) La lyse contrôlée de particules de FREY-WYSSLING par la digitonine (tableau 31) :

La digitonine 0,5 mM est connue pour lyser spécifiquement les particules de FREY-WYSSLING sans déstructurer d'une façon appréciable les particules lutoïdiques (COUPÉ et al. 1972).

Après traitement à la digitonine (voir matériel et méthodes) le culot lavé a perdu la quasi totalité de l'activité noradranéline oxydase indépendante du NADH qui se retrouve dans le surnageant du premier traite-

		DO-485(nı (apparit				
	sans 1	NADH	avec	NADH (0,5	mM)	
	- SOD (1)	+ SOD (2)	- SOD (3)	+ SOD (4)	Δ 1	Δ 2
Sédiment brut	2,30	2,25	2,65	2,40	- 0,25	+ 0,35
Cytosol	0,20	0,20	0,30	0,25	- 0,05	+ 0,10
Sédiment Digit.	0,70	0,72	1,52	0,95	- 0,57	+ 0,82
Surnageant Digit.	2,05	2,15	2,00	2,05	+ 0,05	- 0,05
Sédiment saccharose 1,2 < M < 1,8	0,36	0,35	1,28	0,62	- 0,66	+ 0,92

Tableau 31: Détection d'une émission de superoxydes NADH dépendante (méthode de MISHRA et
FRIDOVICH) - Interférence avec les polyphénol-oxydases des particules de FREY-
WYSSLING.

Le cytosol et le sédiment du latex centrifugé (150.000 g) sont séparés et leur aptitude à cooxyder la noradrénaline est testée en présence ou non de NADH (0,5 mM) et de SOD (25 μ g) à pH 7,4. Le test a été réalisé également sur un sédiment traité 2 fois 40 minutes avec de la digitonine (0,5 mM) afin de lyser spécifiquement les particules de FREY-WYSSLING, puis lavé en présence de mannitol 0,3 M. Enfin, le test a été réalisé sur culot "filtré" par densité sur une couche 1,2/1,8 M saccharose.

 \triangle 1 = différence entre (3) et (4) : effet SOD \triangle 2 = différence entre (1) et (3) : effet NADH

(une moyenne de 3 essais par motif.)

ment. Par contre, le culot s'est considérablement "enrichi" en activité noradrénaline oxydase NADH dépendante et sensiblement inhibée par la superoxyde dismutase exogène.

> c) "Filtration" différentielle des lutoïdes et des particules de FREY-WYSSLING sur couche de densité de saccharose : Une suspension du sédiment de latex brut dans du mannitol

0,3 M, Tris-HCl(pH 7,4)est déposée sur un gradient de densité de saccharose (3 couches 0,8 M/1,2 M/1,8 M). Après centrifugation 120 min à 85.000 xg la couche située entre l'interface 1,2 M et 1,8 M est aspirée. Elle contient une forte concentration de lutoïdes dépourvue de particules de FREY-WYSSLING. Cette fraction montre en effet une très faible activité noradrénaline oxydase (indépendante du NADH) et par contre, un bon enrichissement en activité NADH dépendante, inhibée par la SOD exogène (tableau 31).

La méthode de MISHRA et FRIDOVICH est donc critiquable du point de vue de la spécificité de la réaction en ce qui concerne notre matériel végétal. La mise en évidence de l'activité noradrénaline oxydase NADH dépendante et inhibée par la SOD, symptomatique de l'émission de superoxyde, nécessite une certaine purification des lutoïdes. Cette méthode ne sera donc guère utilisable en expérimentation de routine.

B.2 - DETECTION DES SUPEROXYDES PAR LA REDUCTION DU CYTOCHROME C (MC CORD ET FRIDOVICH) :

Cette technique consiste à suivre la réduction non enzymatique du cytochrome c par l'anion superoxyde.

Nous avons testé cette méthode sur des sédiments bruts ou traités à la digitonine, ou encore "filtrés" sur couche de densité selon le même protocole que celui décrit dans le tableau 31.

Les résultats ont montré une très forte activité cytochrome <u>c</u> réductase localisée au niveau des lutoïdes et très peu inhibée par l'adjonction de SOD exogène.

Cette réduction du cytochrome <u>c</u>est très probablement due à l'activité NADH cytochrome <u>c</u> oxydoréductase localisée au niveau de la membrane lutoïdique (MOREAU *et al.* 1975). Cette activité très forte, inséparable de la NADH/O₂ oxydoréductase également lutoïdique masque la détection des superoxydes selon la méthode de Mc CORD et FRIDOVICH, qui s'avère donc inutilisable avec notre matériel végétal.

	DO (560 nm) $.min^{-1}$ $.ml^{-1}$ d'extrait									
	– NADH		+]	NADH (O	,5 mM)					
	-	_ (x)	+ SOD (x)	+ Toco.	+Fer/EDTA	+ Cu.SO4	+ SOD + Fer/EDTA			
xanthine + xox	1,28	1,28	0,37 (71 %)	0,15 (88 %)	0,42 (67 %)	0,60 (53 %)	0,28 (78 %)			
H P (SLS)	0,00	0,28	0,40 (61 %)	0,03 -(90 %)	0,06 (79 %)	0,11 (61 %)	0,05 (81 %)			
BP + ES (SLS)	0,00	0,97	0,56 (42 %)	0,23 (76 %)	0,40 (58 %)	0,43 (56 %)	0,34 (65 %)			

<u>Tableau 32</u> : Mise en évidence de l'émission de superoxydes dépendante du NADH par des suspensions lutoïdiques fraîches originaires d'arbres HP ou BP + ES.

Les culots lutoIdiques ont été lavés à 3 reprises dans un tampon mannitol 0,3 M, Tris-HCl 50 mM à pH 7,4. Les sédiments ont ensuite été traités aux ultrasons.

Une expérience "témoin" avec un générateur d'O; (Xanthine + Xanthine oxydase) a été réalisée en triplicate. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'inhibition (en %) de l'apparition du Formazan (x) (NADH ± SOD : une moyenne sur 14 HP et 14 BP + ES). (NADH : 0,5 mM ; + SOD 100 μ g ; + tocopherol (alcool) 25 μ g ; + Fer/EDTA = 100/160 μ M ; CuSO₄ : 150 μ M ; SLS : sédiment lutoïdique soniqué : 50 μ 1/3 ml milieu réactionnel).

B.3 - DETECTION DES SUPEROXYDES PAR LA REDUCTION DU NITROBLUE TETRAZOLIUM EN FORMAZAN (BEAUCHAMP et FRIDOVICH 1971) :

Le tableau 32 met en évidence l'apparition de formazan NADH dépendante en présence de lutoïdes. Elle paraît trois à quatre fois plus élevée en présence de lutoïdes issus d'arbres bas producteurs ou atteints d'encoche sèche.

Pour vérifier que cette réduction du NBT correspond effectivement à une émission de superoxydes, il suffit de contrôler l'effet inhibiteur de certains "capteurs" connus de ces radicaux, tels que la superoxyde dismutase (MISHRA et FRIDOVICH 1972 ; FRIDOVICH, 1970), les tocophérols (NISHIKIMI et al. 1980) et certains métaux dont le fer (Fe³⁺) et le cuivre (DIGUISSEPI et FRIDOVICH, 1980).

a) Effets de la superoxyde dismutase exogène (SOD) :

En utilisant la SOD du commerce nous avons tout d'abord testé l'efficacité de cetteenzyme sur un système connu, générateur d'anions superoxydes : l'oxydation de la xanthine par la xanthine oxydase (FRIDOVICH, 1970).



La superoxyde dismutase qui consomme 0_2^- pour libérer de l'H₂O₂ entre en compétition avec le NBT pour le piégeage de l'anion superoxyde. L'inhibition de l'apparition du formazan n'est jamais totale.

Pour une quantité élevée de SOD (300 unités dans la cuve) nous avons obtenu une inhibition maximum de l'ordre de 70 %; ordre de grandeur compatible avec les résultats publiés par ailleurs (GIANNOPOLITIS et RIES, 1977 ; ASADA et al. 1974). Les résultats présentés dans le tableau 32 et la figure 54 montrent une inhibition partielle, en présence de SOD, de l'apparition de formagan dépendante du NADH.

Elle est du même ordre de grandeur 60 à 70 % pour des suspensions lutoïdiques provenant d'arbre HP que pour le système xanthine-XOX. Par contre, l'inhibition provoquée par la SOD est plus faible en présence de suspension lutoïdique BP + ES (42 %). Ce phénomène peut être explicable par 3 hypothèses :

- l'apparition de formazan NADH dépendante en présence de sérum lutoïdique n'est pas uniquement due à l'émission de superoxydes,

- il est admis que l'action de la SOD est un phénomène "saturable" (GIANNOPOLIS et al. 1977 ; ASADA et al. 1974). La présence d'une quantité, même très faible de SOD exogène n'aura que peu d'effet inhibiteur supplémentaire sur un extrait présentant déjà une certaine quantité de SOD endogène plus ou moins importante selon l'origine de l'échantillon. Nous serons amené à reconsidérer ce problème, plus en détail plus loin,

- le sérum lutoïdique renferme des composés (tocophérols,Fer complexé,...) qui piègent compétitivement les $0\frac{1}{2}$ jouant un rôle analogue à la SOD exogène. Cet effet est dénommé sous un terme anglo-saxon "effet SOD-like" (WERRINGLOER et al. 1979 ; DIGUISEPPI et FRIDOVICH, 1980).

b) Effet des -tocophérols :

Mc CAY et al. (1971) ont mis en évidence l'oxydation d'**q**tocophérols endogènes lors de l'émission de superoxydes pendant le fonctionnement de la NADH oxydase microsomale.

L'oxydation des tocophérols en solution, par les superoxydes émis lors du fonctionnement du système xanthine-xanthine oxydase, a été confirmée sans ambiguité par NISHIKIMI et al. (1980). Dans ce cas il a été montré que l'oxydation des &-tocophérols est inhibée par la superoxyde dismutase, mais pas affectée par la catalase ou le mannitol (capteurs des radicaux hydroxyles). Finalement il est admis que les &-tocophérols sont bien des capteurs spécifiques des anions superoxydes.

Les résultats rapportés dans le tableau 32 montrent que les &-tocophérols exogènes inhibent fortement l'apparition du formazan, en présence du système xanthine + xox, aussi bien que d'une suspension lutoïdique complémentée de NADH.

Le parallélisme significatif constaté entre l'inhibition de l'apparition du Formazan dépendante de la xanthine + xox, et de celle dépendante du NADH en présence de lutoïdes, constitue un argument supplémentaire en faveur de l'émission d'anions superoxydes lorsque les lutoïdes (BP + ES) sont mis en présence de NADH.

c) Action des métaux à "effet SOD-like" :

Les métaux de transition chélatés (Fe³⁺-EDTA) ou non (CuSO₄) ont été souvent décrits dans la littérature pour leur activité SOD-like. Du fait de leur niveau de potentiel rédox, ils sont en effet capables de détourner une partie du flux d'O₂ vers la formation soit d'eau oxygénée soit de radicaux hydroxyles.Bien que très réactives, ces dernières formes toxiques de l'oxygène sont cependant incapables de réduire le NBT ou le cytochrome <u>c</u>. De ce fait une partie du flux d'anions superoxydes n'est plus disponible pour réduire le NBT, d'où l'inhibition partielle de l'apparition du formazan ("activité SOD-like").

Nous avons montré précédemment (figures 51, 52 et 53) que le Fer chélaté ou le cuivre, activent fortement la consommation d'O₂ dépendante du NADH. Les résultats rapportés dans le tableau 32 indiquent que ces cations métalliques réduisent fortement (55 %) l'apparition du formazan dépendante de la xanthine + XOX ou du NADH en présence de lutoïdes. Ces résultats confirment donc d'une part l'"activité SOD-like" de ces métaux, et d'autre part l'émission d'anions superoxydes par la NADH oxydase lutoïdique.

B.4 - NATURE ENZYMATIQUE DE L'EMISSION DES SUPEROXYDES PAR LA NADH OXYDASE LUTOIDIQUE :

1. Dénaturation thermique et linéarité de la réaction en fonction de la concentration en extrait

La figure 57 (a) met en évidence la linéarité de l'émission des superoxydes dépendante du NADH (réduction du NBT en formazan) en fonction de la concentration en suspension lutoïdique soniquée dans le milieu.

La même expérience réalisée avec une suspension de lutoïdes soniqués, dénaturée par chauffage à 90°C pendant 10 minutes, montre 1a labilité thermique du système générateur de superoxydes (figure 57-b). Ces deux phénomènes sont de bons arguments en faveur de la nature enzymatique de la réaction.



Figure 59 : EFFETS DU pH DU MILIEU SUR LA REDUCTION DU NBT (EMISSION D'0;) PAR DES LUTOIDES EN PRESENCE DE NADH.

(lutoïdes soniqués 100 µ1; saturation en air, NADH 0,5 mM; volume total: 4 ml)

01 U. DO560



L'émission de superoxyde est détectée grâce à leur aptitude à réduire le NBT en formazan (NADH 0,5 mM, pH7 lutoïdes BP+ES dans 4 ml total). Un lot de lutoïdes a été préalablement chauffé 10 min à 90°C.

5



Figure 58 : NECESSITE DE LA PRESENCE SIMULTANEE DU NADH ET D'O, POUR L'EMISSION DE SUPEROXYDES PAR LES LUTOIDES.

Les lutoïdes soniqués (BP+ES; 50 μ l) ont été injectés dans 4 ml du mi-lieu réactionnel (pH 7,4; NBT 1 mg.ml⁻¹) appauvri en 0₂ dissous (environ 27 % de la saturation en air, soit 1,35 µ1.m1-1). Les substrats dégazés sont injectés au travers du film de parafilm fermant la cuve (NADH : 200 μM final/injection). L'air est apporté par suppression du parafilm et un bref bullage d'air.

2. Nécessité de la présence des deux substrats de l'enzyme

L'expérience rapportée dans la figure 58 démontre que le fonctionnement du système générateur d'anions superoxydes lutoïdique nécessite la présence simultanée de deux substrats : le NADH et l'oxygène. Lorsqu'il y a pénurie de l'un de ces deux substrats, la génération de superoxydes s'arrête et ne peut être rétablie que par l'adjonction du substrat limitant. Nous avons tenté d'estimer, même très approximativement, la stoéchimétrie de la réaction, en postulant un enchaînement réactionnel aboutissant à la réduction complète de l'O₂ en eau (NADH + 1/2 O₂ $\frac{2e^-}{H^+}$) NAD + H₂O). Estimant la quantité d'O₂ présente au départ dans la cuve, et épuisée en fin de réaction, à O,24 µmol, et la quantité de NADH nécessaire pour réduire la totalité de l'O₂ à 1,3 µmol, on peut estimer qu'environ 37 % du flux d'e provenant du NADH a été capté par l'O₂, en libérant transitoirement des anions O₂.

3. Effet du pH sur l'émission des superoxydes NADH dépendante

La figure 59 met en évidence une génération optimum d'anions superoxydes entre pH 7 et 8. Dans la zone de pH acide, l'allure de la courbe d'activation lorsque 1'on se rapproche de la neutralité est la même que celle observée pour la consommation d'oxygène dépendante du NADH (figure 49). Dans la zone de pH plus basique, la diminution de la vitesse de l'apparition du formazan est moins brutale. Cette observation traduirait soit une durée de vie plus longue des anions superoxydes émis, donc une probabilité d'interaction plus élevée avec le NBT, soit d'une réactivité plus élevée du NBT, aux pH alcalins (Mac CORD et al., 1977).

4. Estimation des constantes cinétiques pour l'émission d'anions superoxydes par les lutoïdes (fig. 60 a et b)

Utilisant la méthode de détection des superoxydes par la réduction du NBT, nous avons testé l'effet de la concentration du NADH sur l'apparition du Formazan à pH 7,4. La représentation directe V=f (NADH) montrent une allure typiquement michaelienne et la représentation selon les inverses (LINEVEWER et BURK) nous ont permis d'estimer un Km d'environ 52 μ M pour le NADH vis-à-vis de la réduction du NBT et un Vm de l'ordre de 1,17 μ .DO₅₆₀. min⁻¹. ml⁻¹ de sérum lutoïdique (figure 60 a). Ce type d'expérience effectué à plusieurs reprises a montré que le Km (NADH) restait à peu près constant (autour de 50 μ M) alors que le Vm était soumis à de grandes amplitudes de variations selon la provenance des lutoïdes.



 $\frac{\text{Figure 60}}{\text{max}}: \text{ EVALUATION DES V} \text{ ET DES K}_{\text{m}} \text{ VIS A VIS DU NADH POUR LA REDUCTION DU NBT DEPENDANTE DU NADH, ET LA CONSOMMATION DU NADH PAR UNE SUSPENSION LUTOIDIQUE SONIQUEE (BP+ES).}$

Il s'en suit que si l'affinité de l'enzyme pour son substrat NADH reste invariable, l'aptitude de l'enzyme à transférer les électrons sur l'oxygène et à émettre ainsi des anions superoxydes est extrêmement variable selon la provenance du matériel végétal.

Nous avons de même, testé les constantes cinétiques de la consommation du NADH par des suspensions de lutoïdes (figure 60 b) et estimé ainsi un Km pour le NADH vis-à-vis de la consommation du NADH d'environ 50 μ M, (du même ordre de grandeur quelle que soit la provenance des lutoïdes) alors que le Vm de consommation du NADH variait de 35 % autour d'une valeur moyenne Vm = 750 μ moles. min⁻¹. ml⁻¹ SL, selon l'origine des lutoïdes.

Tous les arguments présentés dans ces paragraphes : linéarité de la réaction en fonction de la concentration en extrait, thermolabilité de la réaction, cinétique michaelienne et la sensibilité aux variations de pH physiologiques sont autant de caractéristiques démontrant la nature enzymatique de la génération de superoxydes par les lutoïdes, en présence de NADH.

De plus, les résultats montrent que l'affinité du système pour le NADH (Km (NADH) \simeq 50 μ M) est du même ordre de grandeur d'une part pour la consommation du NADH (sans autres accepteurs exogène que l'oxygène), d'autre part, pour la consommation de l'oxygène et l'apparition du Formazan. Nous avons montré, par ailleurs, la nécessité de la présence simultanée des deux substrats NADH et oxygène pour qu'il y ait émission d'anions superoxydes. Enfin, nous avons mis en évidence une certaine similitude en ce qui concerne la sensibilité de toutes ces réactions vis-à-vis du pH (optimum entre 7 et 8). Tous ces arguments sont en faveur de l'existence d'unemême enzyme ou complexe enzymatique catalysant le transfert d'une partie des électrons du NADH vers l'oxygène moléculaire, pour émettre des anions superoxydes selon le schéma réactionnel :

NADH +
$$H^+$$
 +20² NADH oxydase NAD⁺ + O_2^- + 2 H^+ .

B.5 - EFFETS DES INHIBITEURS DES CHAINES RESPIRATOIRES MITO-CHONDRIALES :

A l'instar des tests effectués sur la consommation d'0₂ dépendante du NADH (tableau 24), nous avons recherché l'effet des inhibiteurs classiques de la respiration mitochondriale sur l'émission de superoxydes. Les résultats sont présentés dans le tableau 33.



<u>Figure 61</u> : EFFETS DE CONCENTRATIONS CROISSANTES EN CYANURE DE POTASSIUM SUR L'EMISSION APPA-RENTE DE SUPEROXYDES PAR LE NADH OXYDASE LUTOIDIQUE.

51.1

.4.3

	(560). min .ml lutoïdes	s (émission d'0°) 2
Effecteurs ajoutés	- SOD	+ SOD
NADH	1,08	0,42
NADH + Antimycine A (10	⁻⁵ M) 0,95	0,34
NADH + Rotenone (10 ^{-/} M)	1,12	0,41
NADH + HOQNO $(10^{-6} M)$	1,15	0,53
NADH + KCN (10^{-3}M)	0,68	0,57
NADH + SHAM $(10^{-3} M)$	1,62	• 0,74
NADH + KCN + SHAM (10^{-3})	1) 1,20	0,70

. -1 ,-1 ,

Tableau 33 : Effets des inhibiteurs des chaînes respiratoires sur l'émission de superoxydes dépendante du NADH et de 0, par des lutoïdes soniqués.

Les essais ont été réalisés à pH 7,4, en absence de catalyseur ferrique (tampon Tris-HC1 50 mM; NADH 0,5 mM; lutoïdes (BP + ES).

Les inhibiteurs des voies cytochromiques tels l'antimycine A, la rotenone, le HOONO n'ont pas d'effet significatif sur l'émission de superoxydes par les lutoïdes. Le cyanure, inhibiteur non spécifique de nombreuses enzymes à Fer ou à cuivre affecte significativement la réaction.

Le cyanure peut présenter des effets inverses selon sa concentration dans le milieu (figure 61). Aux concentrations inférieures à 250 µM (optimum entre 150 et 200 µM) nous avons observé une nette activation de la réduction du NBT en formazan. Cette stimulation, aux faibles concentrations de KCN est d'amplitude extrêmement variable selon la provenance des lutoïdes (+ 15 à 38 %). Au-delà de 400 à 500 µM, le cyanure commence dans tous les cas à inhiber l'apparition du formazan. On atteint ainsi une inhibition maximale (50 % environ) au-delà de 1,5 mM quelle que soit la provenance du matériel végétal.

Ces effets inverses du cyanure peuvent s'expliquer par la superposition de deux phénomènes distincts, lorsque l'on travaille sur des extraits lutoïdiques bruts :

- aux faibles concentrations (400 µM) le cyanure pourrait inhiber spécifiquement des activités SOD (à Cu⁺⁺ -Zn⁺) ou "SOD-like" endogènes (FRIDOVICH, 1975; GIANNOPOLITIS et RIES, 1977; KONO et al. 1979). L'inhibition des activités superoxyde dismutase se traduirait par une activation apparente de l'émission d'0, par l'activité NADH oxydase lutoïdique; - aux fortes concentrations (supérieures à 500 μ M) la NADH oxydase, moins sensible au cyanure que les SOD endogènes, commencerait seulement à être inhibée. Des arguments supplémentaires étayant cette hypothèse seront exposés plus loin(cf. SOD, p. 396).

A l'instar du phénomène mis en évidence lors de la caractérisation de la consommation d'oxygène dépendante du NADH (tableau 24), le SHAM active également sensiblement l'émission de superoxydes par les lutoïdes en présence de NADH. C - DISCUSSION ET CONCLUSION

Le latex renferme donc une activité NAD(P)H oxydase sédimentable, dont le fonctionnement engendre l'émission d'anions superoxydes et d'eau oxygénée.

L' inefficacité (ou le très faible effet) des inhibiteurs classiques des chaines respiratoires mitochondriales cytochromiques (antimycine A, roténone, HOQNO, cyanure 0,5 et 1 mM) ou de la voie alterne (SHAM), sur l'absorption d'oxygène dépendante du NAD(P)H, de même que l' inefficacité du succinate ou du malate à engendrer une consommation d'oxygène en présence d'ATP et d'ADP, écarte à priori l'hypothèse d'une contamination mitochondriale significative.

Les centrifugations isopycniques, montrent que l'activité NAD(P)H oxydase est superposable aux activités phosphatases acides typiquement lutoïdiques La NAD(P)H oxydase du latex serait donc localisée au niveau des lutoïdes. Quelques arguments sont en faveur de sa localisation au moins partielle sur le tonoplaste lutoïdique (adsorption?).

L'activation de la NADH oxydase par les composés phénoliques surtout diquinoniques (ménadione, naphtoquinones) indique que le pool phénolique et quinonique du latex (plastoquinones membranaires) peut constituer un élément de la chaîne de transfert des électrons du NAD(P)H vers l'oxygène.

Des résultats récemment obtenus en collaboration avec J. D'AUZAC à partir d'extraits de lutoïdes lyophylisés ont montré que :

- la ménadione active non seulement la consommation d'O₂ dépendante du NADH, mais également active considérablement l'oxydation du NADH ;

- le propyl gallate, au même titre que le SHAM, active très fortement à la fois la consommation d'oxygène dépendante du NAD(P)H et l'oxydation du NAD(P)H. Rappelons que la structure moléculaire de ces inhibiteurs de la voie alterne mitochondriale et de la lipoxygénase, possèdent en commun un noyau phénolique qui, par leur oxydation, peuvent donner naissance à des noyaux quinoniques ou semiquinoniques.

- la consommation d'oxygène dépendante du NAD(P)H activée par des catalyseurs métalliques ou des structures quinoniques est partiellement inhibée par la SOD et la catalase exogène.

On peut dès lors formuler l'hypothèse, selon laquelle l'activité "NAD (P)H oxydase" lutoïdique correspond à une activité quinone réductase. Elle opèrerait en effectuant le transfert d'un seul électron à la fois, et pourrait donc donner naissance transitoirement à des structures semiquinoniques

393

instables, et facilement auto-oxydables, impliquées classiquement dans l'émission de formes toxiques de l'oxygène $(\overline{O_2} \text{ et } H_2 O_2)$ (CRANE, 1977 ; BOVERIS et al. 1977 ; ELSTNER, 1982 ; ELSTNER et al. 1976, 1979 ; HOCHSTEIN et al. 1965 ; MI**S**RA et FRIDOVICH, 1972...).

RESUME

Les études rapportées dans ce chapitre I mettent en évidence la présence d'une activité enzymatique dans la fraction sédimentable du latex capable de consommer de l'oxygène moléculaire en présence de NAD(P)H, et d'émettre consécutivement des anions superoxydes dans le milieu.

Les activités décrites de ce système enzymatique (consommation d'O₂, consommation du NAD(P)H et émission d'O₂) sont strictement localisées au niveau des lutoïdes et l'hypothèse d'une contamination mitochondriale semble écartée. Le fait que les activités optimales nécessitent la présence de la membrane indique que la majeure partie du système enzymatique est localisée sur la membrane lutoïdique (adsorbée ou constitutive?).

Les caractéristiques cinétiques de ces activités et en particulier les affinités identiques pour le substrat NADH (Km = 50 µM) et leur dépendance vis-à-vis du pH indiquent que ces 3 activités sont le fait d'une seule enzyme ou d'un complexe enzymatique unitaire.

L'activation de la consommation d'oxygène par les ions métalliques (Fer et Cuivre) semble procéder d'une augmentation de l'affinité du système pour l'oxygène et non pour le NAD(P)H.

L'activité optimum semble nécessiter un équilibre oxydoréducteur favorable au transfert des électrons du NADH vers l'oxygène. Des quinones et des ions métalliques multivalents pourraient être impliqués dans le phénomène.

Enfin, le système NAD(P)H oxydase lutoïdique, générateur d'anions superoxydes, montre des variations d'activité de forte amplitude, dépendant de la provenance des lutoïdes. Cette variabilité semble liée à la productivité ou à l'état physiologique des arbres (cf. chap. IV).

ABSTRACT

The studies mentioned in chapter I reveal the presence of an enzymatic activity in the sedimentable fraction of the latex which can consume molecular oxygen in the presence of NAD(P)H and release superoxide anions into the medium.

The activities of this enzymatic system (consuption of 0_2 , consumption of NAD(P)H and release of $\overline{0_2}$) are strictly localized in the lutoids and the hypothesis concerning a mitochondrial contamination seems to be dismissed. The presence of the membrane is necessary for the optimum membrane (adsorbed or constituent?).

The kinetic characteristics of these activities and particularly the similar affinities for the NADH substrate (Km = 50μ M) and their dependence on pH show that these three activities are due to a single enzyme or to a unit enzymatic complex.

The activation of the consumption of oxygen by the metallic ions (iron and copper) seems to result from an increase in the affinity of the system for oxygen and not for NAD(P)H.

The optimum activity seems to require an oxidoreducing equilibrium being favourable to the electron transfer from NADH to oxygen, which could involve quinones and multivalent metallic ions.

Finally, the lutoidic NAD(P)H oxidase system which generates superoxide anions shows some big variations in the activity being dependent on the origin of the lutoids. This variability seems to be related to the productivity or to the physiological state of the trees (cf. chapter IV).

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE II

MISE EN EVIDENCE D'UNE PEROXYDATION DE LIPIDES INSATURES EXOGENES ET ENDOGENES LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH OXYDASE LUTOIDIQUE/IMPACT SUR LA STABILITE DES STRUCTURES MEMBRANAIRES DU

LATEX

.

MISE EN EVIDENCE D'UNE PEROXYDATION DE LIPIDES INSATURES EXOGENES ET ENDOGENES LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH OXYDASE LUTOIDIQUE/IMPACT SUR LA STABILITE DES STRUCTURES MEMBRANAIRES DU LATEX

La dégradation peroxydative des lipides insaturés en présence de "générateurs d'oxygène toxique" a fait l'objet de nombreuses études essentiellement au niveau des organes animaux (cf. Introduction). Nous avons donc recherché dans un premier temps, la capacité de la NADH oxydase lutoIdique, génératrice de superoxydes, à provoquer une peroxydation de lipides insaturés exogènes (acides linoléique et linolénique).

0, et H,0, sont des formes toxiques de l'oxygène, mais restent cependant relativement peu aggressives, en tant que telles, vis-àvis de la plupart des structures organiques (BORS, 1980 ; FEE, 1980 ; CIBA, 1979). De part son potentiel redox positif très élevé (E'o = + 1,8 V ; demi -vie = 1 μs) (WILLSON, 1979 ; ELSTNER, 1982), le radical hydroxyle OH, qui peut être produit par l'interaction des deux autres formes en présence d'un catalyseur métallique (Cf. Introduction), est considéré comme l'une des formes les plus réactives. Son intervention dans la dégradation peroxydative des lysosomes animaux a par exemple été bien démontrée (FONG et al., 1973). Lors d'expériences in vitro, il est donc nécessaire d'éviter l'utilisation de solutés susceptibles de piéger ces formes agressives de l'oxygène. C'est en particulier le cas du mannitol et de l'éthanol qui, à concentration suffisante, piégent et détoxifient le radical OH' (FONG et al., 1973). L'ensemble des expériences rapportées dans ce chapitre a donc été réalisé avec des lutoïdes purifiés et incubés en absence de mannitol et d'éthanol. Dans ce cas l'isotonicité du milieu est maintenue en présence de KCI 170 mM, et les solutés insolubles dans l'eau ont été émulsionnés en présence de DOC et/ou de digitonine.

II.A - DETECTION DES SOUS-PRODUITS DE PEROXYDATION LIPIDIQUE PAR LA DINITROPHENYLHYDRAZINE :

La dégradation peroxydative des lipides insaturés aboutit à la libération de produits à groupements carbonyles(aldéhydes, cétones) détectables par la 2.4 dinitrophénylhydrazine. La figure 62 met en évidence



Figure 62 : DETECTION DES SOUS-PRODUITS A FONCTION CARBONYLE RESULTANT DE LA PEROXYDATION DES LIPIDES DEPENDANTE DU NADH, PAR LE REACTIF A LA DINITROPHENYLHYDRAZINE (2,4-D.H. Phe.Hydr.).

Les lutoïdes (BP + ES) ont été isolés et lavés à 3 reprises puis remis en suspension dans un tampon Tris-Hcl 50 mM pH 7,4, rendu isotonique par KCl 170 mM. Toutes les expériences sont réalisées en présence de digitonine 0,5 %. La teneur en acide linoléique exogène est de 1 % final (NADH 1 mM; Fe³⁺/EDTA 0,1 mM/0,16 mM).

une apparition d'hydrazones plus importante en présence de lutoïdes complémentés en acide linoléique + NADH, qu'en présence de lutoïdes seuls ou de lutoïdes + NADH. L'acide linoléique seul (en absence de lutoïdes ou de NADH) ne montre pas d'évolution significative quant à l'apparition de groupements réactifs à la 2,4-DNPH. Il faut cependant noter que cette méthode peut être assez critiquable du fait de sa non spécificité. En effet l'apparition de produits réagissant à la DNPH peut être due à la somme d'au moins deux réactions distinctes en présence de NADH :

- la formation de sous produits de la dégradation peroxydative des lipides endogènes, à fonction carbonyle (effet recherché) ;

- l'activité d'enzymes lutoïdiques dépendantes du NADH dont les produits spécifiques de réaction seraient des molécules de type aldéhydique ou cétonique ne peut être écartée à priori.

Quoiqu'il en soit, en présence d'acide linoléique exogène, l'addition de NADH à une suspension de lutoïdes (BP + ES), aboutit à la libération de produits à groupements carbonyles beaucoup plus intense qu'en absence d'acides gras insaturés exogènes. La différence de ces deux cinétiques rend compte d'une dégradation peroxydative de l'acide linoléique exogène lors du fonctionnement de la NADH oxydase lutoïdique.

II.B - DETECTION DU MALONDIALDEHYDE (MDA) PAR LE REACTIF A L'ACIDE THIOBARBITURIQUE (TBA) :

Le malondialdéhyde est un sous produit de la dégradation peroxydative de l'acide linolénique et dans une moindre mesure de l'acide linoléique. L'acide thiobarbiturique (TBA), réactif relativement spécifique du MDA, permet de doser colorimétriquement la dégradation peroxydative de ces lipides insaturés (STANCLIFF *et al.*, 1969 ; BARBER et BERNHEIM, 1967).

La figure 63 montre l'apparition de produits réagissant au TBA dans un milieu réactionnel contenant une suspension de lutoïdes soniqués en présence d'acides linoléique + linolénique exogènes et de NADH. La présence de NADH est nécessaire et les lutoïdes seuls ou les acides gras insaturés seuls ne montrent aucune évolution significative en ce qui concerne l'apparition de MDA.



Figure 63: DETECTION DU MALONDIALDEHYDE (MDA) SOUS PRODUIT DE LA DEGRA-DATION DES ACIDES GRAS INSATURES, PAR LE REACTIF A L'ACIDE THIOBARBITU-RIQUE (TBA).

Les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites dans la figure 62, mais en présence d'acide linoléique (0,5 %) et linolénique (0,5 %), émulsionnés avec de la digitonine 0,5 % et du déoxycholate 0,5 %).

4.11

En présence de NADH, mais sans apport d'acides gras insaturés exogènes, la suspension lutoïdique ne donne qu'une très faible réaction au TBA ce qui peut traduire :

- soit une faible proportion d'acide linoléique et (ou) linolénique dans la composition lipidique de la membrane des lutoïdes testés (DUPONT et al. 1976 ; HANOWER, résultats non publiés);

- soit une "accessibilité" très faible de ces lipides lorsqu' ils font partie intégrante de la membrane ;

- soit la présence de "protecteurs" (enzymatiques ou non) à leur proximité (adsorbée sur la membrane par exemple ...).

L'inconvénient de cette méthode (plus spécifique que la méthode de détection des groupements carbonyles par la DNPH) réside dans le fait que les colorations obtenues par le TBA sont de très faibles intensités (0,020 ≤ DO ≤ 0,070) et de ce fait peu précises. Il est cependant à noter que le MDA ne rend compte au maximum que de 10 à 15 % des sous produits de peroxydation des acides gras poly-insaturés (MAY et Mc CAY, 1968) et essentiellement de l'acide linolénique (KWON et OLCOTT, 1966 ; MERZLYACK et al. 1978). De ce fait l'apparition de quantités même très faibles de produits réagissant au TBA rend compte d'une peroxydation significative des acides gras poly-insaturés (linoléique et surtout linolénique). Cette méthode peut donc être considérée qualitativement comme sensible et relativement spécifique, bien que quantitativement peu précise. Signalons par ailleurs que cette méthode exclut toute possibilité d'expérimentation avec des lutoïdes purifiés par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. Nous avons en effet noté que le chauffage en milieu acide de solutions (quelques mM) de saccharose donnait des produits de dégradation réagissant à l'acide thiobarbiturique, et masquait complètement la détection de sous produits de la peroxydation des lipides insaturés.

II.C - EFFETS DES IONS METALLIQUES FER ET CUIVRE, SUR LA PEROXYDATION LIPIDIQUE, LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH OXYDASE LUTOIDIQUE :

Les figures 62 et 63 montrent une activation de la peroxydation lipidique en présence de Fer/EDTA, lors du fonctionnement de la NADH oxydase lutoïdique.

Nous avons voulu tester l'effet des différentes formes chélatées ou non du Fer et du Cuivre, pour lesquelles nous avions mis en évidence une activation de la consommation d'O₂ dépendante du NADH (figures 51, 52 et 53), sur la peroxydation des lipides endo et exogènes.

			malondialdéhyde apparu (milli-DO _{532nm}) après 20 minutes d'incubation								
			100 mg.m1 ⁻¹	100 mg.m1 ⁻¹	acide linolénique						
			seuls	acides linoléniques	seul						
tampon			70	150	100						
tampon	+	NADH	240	510	110						
Fer/EDTA			180	270	180						
Fer/EDTA	+	NADH	320	880	170						
Fer/ADP			150	320	190						
Fer/ADP	+	NADH	300	760	150						
CuSO4			150	300	150						
CuSO ₄	+	NADH	300	<u>720</u>	150						

<u>Tableau 34</u> : Effet des ions Fer et Cuivre sur la peroxydation des lipides endo et exogènes, pendant le fonctionnement ou non de la NADH oxydase. Les lutoïdes (ES) ont été lavés dans un tampon KCl (170 mM) Tris-HCl (50 mM) à pH 7,4. Après traitement aux ultrasons, le lysat est dilué au 1/10 par du tampon Tris-HCl (50 mM) pH 7,4 contenant du DOC (0,1 %) et complémenté éventuellement avec du Fer/EDTA (80/135 μ M), du Fer/ADP (80/160 μ M) ou du Cu SO4(80 μ M). L'acide linonélique émulsifié dans du DOC (0,1 %) est préparé et ajouté extemporénament, à la concentration finale de 0,5 %. La concentration en NADH est de 1 mM. La réaction est arrêtée après 20 minutes d'incubation par l'addition de TCA (0,5 N final). Les résultats rapportés dans le tableau 34 mettent en évidence les phénomènes suivants :

 En présence d'oxygène atmosphérique, les ions métalliques considérés activent systématiquement la peroxydation des lípides, en présence ou non de NADH.

2. La peroxydation des lipides endo et exogènes est multipliée par un facteur 3 à 4 en présence de NADH et de lutoïdes. L'addition des ions métalliques augmente fortement les activités peroxydatives dépendantes du NADH. Dans tous les cas, le Fer/EDTA se montre le catalyseur le plus efficace. Ces résultats confirment donc les résultats acquis précédemment.

Ainsi, selon leur état de chélation, qui détermine leur potentiel rédox, les activateurs métalliques Fer et Cuivre interviendraient de deux façons complémentaires dans les processus de dégradation peroxydative des lipides insaturés :

Ils faciliteraient le transfert des électrons du NADH, par l'intermédiaire de la NADH déshydrogénase, vers l'oxygène moléculaire, activant la NADH oxydase et favorisant l'émission, entre autres, d' $0\overline{\frac{1}{2}}$.

Par les interactions ultérieures qu'ils catalysent entre les différentes formes toxiques de l'oxygène directement émises (réactions de FENTON et d'HABER-WEISS, Cf. Introduction), ils pourraient donner naissance à des formes radicalaires de l'oxygène, extrêmement agressives (OH·).

3. En présence d'oxygène atmosphérique, les ions métalliques catalysent une peroxydation (non enzymatique) non négligeable de l'acide linolénique exogène (et endogène lutoïdique). En absence de NADH oxydase lutoïdique, le NADH avec ou sans catalyseur métallique reste sans effet significatif. Le fonctionnement d'une NADH oxydase est donc nécessaire pour provoquer la peroxydation lipidique dépendante du NADH. Nous avons d'autre part vérifié qu'une suspension lutoïdique bouillie était sans effet, attestant ainsi la <u>nature enzymatique</u> de la dégradation peroxydative des lipides en présence du NADH.

And share

	+ acide linonélique			+ lutoïdes soniqués (ES)			
	Tampon	+ Fer/EDTA	+Cu ⁺⁺	Tampon	+ Fer/EDTA	+ Cu ⁺⁺	
xanthine + xox	380	790	580	210	470	360	
H ₂ O ₂	190	920	460	180	610	470	
xanthine + xox + $H_2^0_2$	460	<u>1390</u>	710	320	<u>810</u>	630	
Lutoïdes + NADH	480	810	620	270	380	360	
Lutoïdes + NADH + H_2O_2	580	1720	<u>900</u>	460	960	<u>680</u>	
Tampon + xanthine	80	120	120	110	190	150	

malondialdéhyde apparue(milli-DO532nm)	après	30	minutes	ď	incubation	
--	-------	----	---------	---	------------	--

Tableau 35: Aptitudes des systèmes "in vitro" générateurs d'oxygène toxique et du systèmeNADH - oxydase, à induire la peroxydation des lipides insaturés endo et
exogènes :

Conditions expérimentales identiques au tableau 34. $(H_2O_2) = 1 \text{ mM}$; (xanthine) = 3 mM; (xanthine oxydase) = (xox) = $5 \cdot 10^{-2}$ unité/essai ; les témoins de lecture sont soit tampon + acide linonéique, soit tampon + lutoïdes, traités au réactif TBA.

• :

II.D - COMPARAISON AVEC DES SYSTEMES "in vitro" GENERATEURS "D'OXYGENE TOXIQUE" :

Certains systèmes générateurs des formes toxiques d'oxygène tels l'anion superoxyde, et les radicaux hydroxyles ont été décrits (HABER et WEISS, 1934 ; FRIDOVICH, 1970), et leur participation aux phénomènes de peroxydation lipidique confirmée (FONG *et al.* 1973 ; LAI et PIETE, 1978). Nous avons donc expérimenté ces systèmes dans nos conditions expérimentales et comparé leur efficacité à engendrer une peroxydation de lipides exo ou endogènes, au système NADH-oxydase lutoïdique.

Le tableau 35 reproduit les résultats les plus significatifs obtenus à partir de nos différentes expériences :

1. Le système xanthine/xanthine oxydase (xox); générateur d'anions superoxydes (FRIDOVICH, 1970) induit une peroxydation significative de l'acide linolénique exogène et dans une moindre mesure des lipides lutoïdiques. Le Fer chélaté amplifie d'un facteur supérieur à 2 les phénomènes de peroxydation (réaction d'HABER et WEISS) ; le cuivre, moins actif en tant que catalyseur, augmente cependant significativement l'efficacité du système xanthine-xox à provoquer la peroxydation des lipides tant exo qu'endogènes.

2.L'eau oxygénée seule, induit également une apparition significative de MDA mais à un degré moindre que le système enzymatique précédent. Cependant en présence de Fer/EDTA, l'activité peroxydative d' H_2O_2 se trouve amplifiée d'un facteur 4 à 5 et ce "système non enzymatique" est plus actif que le système enzymatique décrit précédemment (réaction de FENTON).

3. La combinaison des deux systèmes xanthine + $xox + H_2O_2$, partiellement additifs, se trouve être le plus efficace tant en absence qu'en présence de catalyseur métallique, et provoque une forte peroxydation des lipides tant exogènes qu'endogènes.

4. Comparativement, le système lutoïdes + NADH se comporte d'une manière similaire au système xanthine + xox, attestant encore la capacité de la "NADH oxydase" lutoïdique (ES) à émettre l'anion superoxyde. Les phénomènes peroxydatifs dépendants du NADH ou du H_2O_2 en présence de lutoïdes sont également additifs et activés par les ions métalliques Fer et Cuivre.

	Apparition de MDA après 20 minutes d'incubation $(10^{-2} \times D0532 \text{ nm})$								
	néant	SOD	catalase	SOD + catalase	mannitol	éthanol	SOD +catalase +mannitol		
Lutoïdes + NADH	4,3	3,7	1,7	1,4	2,2	2,8	0,9		
	(100)	(86)	(39)	(32)	(51)	(65)	(21)		
Lutoïdes + NADH+Fer/EDTA	7,7	6,7	3,0	2,9	3,1	3,9	1,0		
	(100)	(87)	(39)	(38)	(40)	(51)	(17)		
xanthine + xox	3,5	2,9	1,2	1,1	2,0	2,1	1,0		
	(100)	(83)	(34)	(31)	(56)	(57)	(29)		
xanthine+xox + Fer/EDTA	8,5	7,4	3,1	2,7	3,2	4,4	0,9		
	(100)	(87)	(36)	(32)	(38)	(52)	(10)		

Tableau 36 : Inhibition de la peroxydation lipidique par des "protecteurs" exogènes "pièges à oxygène toxique". Tous les essais sont réalisés en présence d'acide linolénique exogène 1 % final. Conditions expérimentales identiques au tableau 34 et 35; (SOD et catalase) : 15 unités/ml environ. (ethanol) = 5 mM, (mannitol) = 50 mM

(les chiffres entre parenthèses indiquent l'activité résiduelle en %)

11.E - INHIBITION DE LA DEGRADATION PEROXYDATIVE DE L'ACIDE LINOLENIQUE EXOGENE PAR LES PIEGEAGES DES DIFFERENTES FORMES TOXIQUES DE L'OXYGENE :

Certaines enzymes et produits chimiques sont connus pour leur action plus ou moins spécifique au niveau du piégeage ou de la transformation des différentes formes toxiques de l'oxygène. Ainsi la superoxyde dismutase (SOD) dismute les anions superoxyde en eau oxygénée, et la catalase transforme l'eau oxygénée en eau et oxygène.

L'éthanol et le mannitol sont connus comme des agents piégeant spécifiquement les radicaux hydroxyles OH' qui peuvent naître de l'interaction entre anions superoxydes et eau oxygénée et des réactions du type de FENTON (STAUDINGER et al., 1964) ou d'HABER-WEISS.

Le tableau 36 met en évidence les phénomènes suivants :

1. La superoxyde dismutase exogène n'a que peu d'effet sur la peroxydation lipidique NADH dépendante comme sur celle induite par le système xanthine-xox générateur de superoxyde. Il apparaît donc que l'anion superoxyde émis par ces deux systèmes ne soit pas le principal agent provoquant directement la dégradation peroxydative des lipides insaturés exogènes.

2. La catalase exogène, à quantité (unités) égale à la SOD, provoque une inhibition de l'apparition du malondialdéhyde de 60 à 65 %. Ce phénomène suggère l'intervention de l'eau oxygénée issue de la dismutation spontanée ou enzymatique des anions superoxydes (émis par les systèmes enzymatiques testés) dans les processus peroxydatifs des lipides insaturés. Cette inhibition est du même ordre de grandeur en présence comme en absence de Fer/EDTA.

3. La présence de SOD + catalase n'est pas beaucoup plus efficace que la catalase seule.

4. Les pièges à radicaux hydroxyles, tels le mannitol et l'éthanol, provoquent une inhibition de la dégradation peroxydative des lipides pouvant atteindre 60 %, surtout lorsque cette dernière s'effectue en présence du Fer/EDTA. 5. L'association des systèmes enzymatiques "protecteurs" (SOD + catalase) avec le mannitol provoque une inhibition de l'apparition du malondialdéhyde de 70 à 90 %, l'inhibition est plus efficace dans les systèmes contenant du Fer/EDTA.

Ę.

Ces différents résultats indiquent que le radical hydroxyle est le principal agent catalysant la dégradation peroxydative des lipides insaturés dans nos systèmes testés. Les schémas réactionnels additifs catalysés par la NADH oxydase lutoïdique comme par la xanthine oxydase exogène peuvent se résumer ainsi (FONG et al. 1973):

supposons des systèmes enzymatiques émettant des anions superoxydes tel :

xanthine +
$$0_2 \xrightarrow{xox}$$
 acide urique + 0_2^{\cdot} + H
NADH +2 $0_2 \xrightarrow{oxydase}$ NAD⁺ +2 0_2^{\cdot} + H⁺

ou

les anions superoxydes libérés peuvent soit se dismuter spontanément soit enzymatiquement (SOD) en produisant de l'eau oxygénée

$$o_2^{\overline{}} + o_2^{\overline{}} + 2H^+ \longrightarrow H_2 o_2 + o_2$$

les deux formes en présence peuvent interagir entre elles surtout en présence de catalyseurs métalliques selon la réaction d'HABER-WEISS avec émission du radical hydroxyle:

$$H_2O_2 + O_2^{-} \longrightarrow O_2 + OH^{-} + OH^{-}$$

l'anion superoxyde peut aussi interagir directement avec le catalyseur métallique de potentiel rédox adéquat selon la réaction de FENTON ;

$$o_2^{\overline{}}$$
 + Fe³⁺ /EDTA \longrightarrow o_2 + Fe²⁺ /EDTA
Fe²⁺ /EDTA + H₂O₂ \longrightarrow Fe³⁺ /EDTA + OH⁻ + OH

L'inhibition en présence de mannitol ou d'éthanol seul n'étant pas totale, il est probable que d'autres formes toxiques de l'oxygène tel l'oxygène singulet (SUGIOKA et NAKANO, 1976) interviennent dans les processus de peroxydation lipidique obtenues (l'oxygène singulet peut en effet être libéré suite à la dismutation non enzymatique de $0\frac{1}{2}$).

11.F - AUTOLYSE DES LUTOIDES CONSECUTIVE A LA PEROXYDATION DES LIPIDES INSATURES LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH OXYDASE LUTOIDIQUE IN VITRO :

Par analogie avec les études réalisées sur des lysosomes (FONG et al. 1973 ; CHEN et Mc CAY, 1972), nous avons cherché à vérifier si l'addition de NADH à une suspension lutoïdique entraînait une lyse de ces particules.

Afin d'éviter une simple lyse osmotique nous avons testé différents systèmes peroxydatifs lipidiques dans des milieux d'isotonicités voisines mais de compositions différentes.

Indice d'éclatement des lutoïdes (%)									
-	Mannitol 330 mM		Saco 33	Saccharose 330 mM		KC1 O mM			
temps (min) lutoïdes	0	30	0	30	0	30			
НР	21	24 (+14%)	22	28 (+27%)	24	29 (+21%)			
BP + ES	34	40 (+18%)	32	63 (+97%)	37	79 (+113%)			

Tableau 37 : Lyse des lutoïdes atteints d'encoche sèche lors du fonctionnement de la NADH oxydase lutoïdique, en présence de Fer/ADP. Les lutoïdes intacts (mélange HP ou BP + ES) sont lavés à deux reprises dans du tampon Tris 50 mM, pH 7,4 ; saccharose 0,33 M puis remis en suspension dans des tampons d'isotonicité voisine, à base de mannitol 0,33M, saccharose 0,33 M ou KCl 0,170 M à pH 7,4 en présence de Fer³⁺/ADP (50/ 100 μ M). Au temps "zéro", le NADH 1 mM est ajouté et les suspensions maintenues sous agitation (agitateur giratoire) à température ambiante, à l'air. (Les chiffres entre parenthèses indiquent l'augmentation des indices d'éclatement par rapport aux temps "zéro" où se fait l'addition du NADH pour chaque motif).

Le tableau 37 met en évidence deux types de résultats intéressants :

l. Les essais réalisés en présence de mannitol montrent une très faible augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes 30 minutes après l'addition du NADH. Par contre, en présence de saccharose ou de KCl l'addition du NADH dans le milieu, contenant du Fer/ADP, provoque une forte lyse des lutoïdes. Cette constatation confirme les résultats exposés dans le paragraphe précédent indiquant l'effet protecteur du mannitol. Il est en effet supposé piéger à cette concentration (0,33 M) la quasi totalité des radicaux hydroxyles émis par l'interaction des anions superoxydes émis lors du fonctionnement de la NADH-oxydase lutoïdique. Nous avons vérifié d'autre part que l'émission de superoxydes dépendante du NADH n'était pas significativement inhibée en présence de mannitol (tableau 38) attestant ainsi la spécificité marquée du mannitol en tant que piège à radicaux hydroxyles.Ces résultats confirment donc l'intervention majeure des radicaux hydroxyles dans les processus de dégradation peroxydative des lipides membranaires.

	U.DO(560nm).min ⁻¹ .ml ⁻¹ d'extrait							
	Manni	tol 330 mM	KC1 170 mM					
	néant	+ Fer/ADP	néant	+ Fer/ADP				
Lutoïdes ES + NADH	0,90	0,39	0,96	0,44				
Xanthine + XOX	1,26	0,71	1,32	0,77				

Tableau 38 : Génération de superoxydes lors du fonctionnement de la NADH oxydase lutoïdique en présence de mannitol : piège spécifique à radicaux hydroxyles (50 μ l de suspension lutoïdique soniquée). La détection des 0⁵/₂ est suivie par la réduction du NBT en formazan, à 560 nm.

2. Les lutoïdes provenant d'arbres bas-producteurs ou atteints d'encoche sèche, se caractérisent par un indice d'éclatement initial plus élevé, et une très forte auto-lyse lors du fonctionnement de leur NADH oxydase, *in vitro*, par rapport à leurs homologues provenant d'arbres sains haut -producteurs (tableau 37). Cette constatation est à rapprocher des résultats, rapportés précédemment, montrant que les lutoïdes isolés d'arbres atteints d'encoche sèche se caractérisent par une consommation d'O₂ dépendante du NADH (tableau 18 et figure 46) et une émission de superoxydes en présence de NADH (tableau 32) beaucoup plus importante que les lutoïdes isolés du latex d'arbres sains bon -producteurs.

L'expérience décrite dans la figure 64 met en évidence la simultanéité des différents phénomènes décrits : l'apport de NADH à une suspension isotonique (KCl 170 mM) de lutoïdes à forte activité NADH oxydase ("encoches sèches") déclenche :



Figure 64 : MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE, LORS DU FONCTIONNEMENT DE LA NADH OXYDASE DES LUTOIDES ISOLES D'ARBRES ATTEINTS D'ENCOCHE SECHE.

Les lutoïdes d'arbres atteints d'encoche sèche "partielle" ont été isolés, lavés et remis en suspension dans un même tampon Tris-HCl 40 mM à pH 7,4 rendu isotonique par KCl 170 mM. Le milieu d'incubation est complémenté en NADH 1 mM et en Fe³⁺/ADP (50μ M/100 μ M). Dans le cas du dosage de la peroxydation lipidique par le réactif de l'acide thiobarbiturique (malondialdehyde), la suspension a été complémentée an acide linolénique (0,5 mM) et acide linoléique (0,5 mM) en présence de digitonine + DOC 0,5 %. Les différents dosages sont effectués selon les techniques décrites dans le chapitre matériel et méthodes sur des parties aliquotes de la même suspension initiale.

	Mesures après 10 minutes d'incubation							
	néant	SOD 50 μ.	catalase 50 μ.	mannitol 100 mM	SOD +catalase +mannitol	cytosol HP (25%)	cytosol BP (25%)	
Consommation d'O ₂ (µ1)	14	7,6	7,5	13,5	3,2	7,2	11,8	
Apparition de superoxydes (µ.DO 560)	0,381	0,120	0,305	0,315	0,102	0,178	0,255	
Apparition de malondialdehyde (milli-DO ₅₃₂)	61	58	23	24	13	31	48	
Indice d'éclatement (%)	68	58	43	40	36	50 _.	59	

<u>Tableau 39</u> : Effet des "protecteurs" exogènes et endogènes sur les paramêtres : consommation d'oxygène, apparition de malondialdehyde (acide linolénique 0,1 %) et indice d'éclatement en présence de NADH + Fer/ADP, et de l'apparition d'anions superoxydes en présence de NADH sans catalyseur Ferrique. (Indice d'éclatement initiale = 31 %) - les lutoïdes proviennent d'arbres atteints d'encoche sèche partielle. (La teneur en lutoïdes de la suspension est d'environ 100 mg.ml⁻¹).
- une consommation d'oxygène parallèle à celle du NADH,

- une apparition de malondialdéhyde, produit de la dégradation peroxydative de l'acide linoléique + linolénique ;

- une forte augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes déjà fragiles.

Dans les mêmes conditions, des lutoïdes provenant d'arbres hauts-producteurs sains montrent une consommation d'oxygène NADH dépendante beaucoup plus faible (5 μ l O₂ après 15 minutes d'incubation), une apparition de malondialdéhyde à la limite du détectable (1,8x10⁻² U.DO 532/15 minutes) et une faible augmentation de leur indice d'éclatement qui passe de 18 à 23 % dans le temps.

II.G - EFFETS DE QUELQUES "PROTECTEURS" SUR LES DIFFERENTS PARAMETRES INTERVENANT DANS LA DEGRADATION PEROXYDA-TIVE DES LIPIDES MEMBRANAIRES DES LUTOIDES :

Le tableau 39 présente les résultats les plus significatifs obtenus lors de différentes tentatives en vue d'inhiber les phénomènes impliqués dans la dégradation peroxydative des lipides membranaires lutoïdiques.

1. La SOD exogène, en dismutant l'anion superoxyde émis par l'activité NADH oxydase, et grâce à la présence d'une activité catalase sédimentable endogène, provoque une <u>inhibition apparente</u> de la consommation d'oxygène, et une inhibition réelle de l'accumulation des superoxydes. Par contre la SOD ne provoque aucune inhibition significative de la peroxydation lipidique et ne protège donc pas efficacement les lutoïdes de l'autolyse.

2. La catalase exogène, en recyclant partiellement sous forme d'0₂, l'eau oxygénée produite par la NADH oxydase, provoque une <u>inhibition</u> <u>apparente</u> de la consommation de l'oxygène mais n'a pas d'effet marqué sur l'apparition des anions superoxydes. Par contre, comme mentionné précédemment, la catalase protège les acides gras insaturés de la dégradation peroxydative, et de ce fait stabilise la membrane lutoïdique. 3. Le mannitol n'a aucune action sur la consommation d'oxygène ni sur l'émission de superoxydes. Son action protectrice se situe en aval de la chaîne réactionnelle aboutissant à la peroxydation des lipides et à la dégradation des structures membranaires. Le mannitol semble se comporter comme un agent protecteur des plus efficaces contre la dégradation des lipides insaturés lutoïdiques, confirmant encore l'intervention de radicaux du type hydroxyledans ces processus de peroxydation lipidique.

4. L'association SOD + catalase + mannitol est partiellement additive et inhibe puissamment tous les phénomènes observés.

5. Le sérum cytoplasmique provenant d'un mélange d'arbres hautproducteurs protège plus efficacement les lipides membranaires de leur dégradation peroxydative que le sérum d'arbre BP / ES. Les modalités d'action du sérum cytoplasmique se rapprochent de la "protection" assurée par l'association SOD + Catalase + Mannitol.

Il apparaît donc clair que le sérum cytoplasmique du latex renferme des agents protecteurs enzymatiques ou non, susceptibles de protéger les structures membranaires contre la dégradation peroxydative de leurs lipides insaturés.

RESUME

1. L'activité NAD(P)H lutoïdique du latex, génératrice d'anions superoxydes, provoque la dégradation peroxydative des lipides polyinsaturés exogènes (acides linoléique et surtout linolénique) et endogènes du tonoplaste lutoïdique. La peroxydation de ces lipides aboutit à la lyse des structures membranaires et en particulier des lutoïdes.

2. La peroxydation des lipides induite lors du fonctionnement de la NADH oxydase lutoïdique ne semble pas procéder essentiellement d'une action directe des anions superoxydes sur les lipides insaturés. Elle semble résulter de l'action d'une forme plus réactive de l'oxygène ayant toutes les propriétés du radical hydroxyk (OH[•]). Ce dernier pourrait naître en effet de l'interaction des anions superoxydes entre eux ou avec l'eau oxygénée résultant de leur dismutation. Le phénomène est fortement amplifié en présence de catalyseurs ferriques chélatés, ou d'autres agents de potentiel rédox analogue tel le cuivre.

3. L'activité peroxydative dépendante du NADH est particulièrement élevée chez les arbres bas-producteurs et atteints d'encoche sèche.

4. Selon sa provenance (HP, BP, ES), le cytosol du latex renferme des activités protectrices inhibant plus ou moins efficacement la dégradation peroxydative des lipides exogènes et des structures membranaires.

L'étude de ces "protecteurs" endogènes fait l'objet du chapitre suivant.

ABSTRACT

I. The lutoidic NAD(P)H activity of the latex which generates superoxide anions leads to the peroxidative degradation of the polyunsaturated exogenous (linoleic and mainly linolenic acids) and endogenous lipids of the lutoidic tonoplast. The peroxidation of these lipids results in the lysis of the membrane structures and particularly of the lutoids. 11 (uff. -

II. The peroxidation of the lipids induced in the lutoidic oxidase NADH does not seem to result mainly from a direct action of the superoxide anions on the unsaturated lipids. It seems to result from the action of a more reactive form of oxygen displaying all the properties of the hydroxyl radical (OH°). The latter could originate from the interaction of the superoxide anions among themselves or with the hydrogen peroxide resulting from their dismutation, which is largely developed in the presence of chelate ferric catalysts or other agents whose redox potential is similar such as copper.

III. The NADH- dependent peroxidative activity is particularly high in the low-yielding trees and the trees affected by brown bast.

IV. The cytosol of the latex as related to its origin (HP, BP, ES) contains some protective activities which inhibit more or less effectively the peroxidative degradation of the exogenous lipids and of the membrane structures.

These endogenous "protective agents" are studied in the following chapter.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE III

LES "PROTECTEURS ENZYMATIQUES

ΕT

NON ENZYMATIQUES PRESENTS

DANS LE LATEX FRAIS

LES "PROTECTEURS" ENZYMATIQUES ET NON ENZYMATIQUES PRESENTS

DANS LE LATEX FRAIS

A - LES PROTECTEURS ENZYMATIQUES AGISSANT DIRECTEMENT SUR LES FORMES TOXIQUES DE L'OXYGÈNE

- A. LES PROTECTEURS ENZYMATIQUES AGISSANT DIRECTEMENT SUR LES FORMES TOXIQUES DE L'OXYGENE :
- A.1 LES SUPEROXYDES DISMUTASES (SOD)

Rappelons que cette enzyme catalyse la dismutation rapide des anions superoxydes, présents dans le milieu, en eau oxygénée + oxygène selon la réaction :

 $O_{2}^{-} + O_{2}^{-} + 2 H^{+} \xrightarrow{\text{S.O.D.}} H_{2}O_{2} + O_{2}$

a) Mise en évidence et quantification :

Nous avons utilisé la méthode de BEAUCHAMP et FRIDOVICH (1971) dans laquelle les radicaux superoxydes sont générés par la xanthine 10⁻⁴M en présence de xanthine oxydase et détectés par la réduction du NBT en formazan. L'activité superoxyde dismutase est estimée par l'aptitude de l'échantillon à inhiber l'apparition du formazan grâce au piégeage spécifique des superoxydes par l'enzyme (SOD).

Dans un premier temps nous avons vérifié que la méthode employée permettait, dans nos conditions, une détermination quantitative satisfaisante des activités SOD.

La figure 65 montre une courbe typique d'inhibition de l'apparition du Formazan "xox dépendante", par des quantités croissantes de SOD purifiée du commerce, similaire à celles décrites par ASADA *et* $a\ell$. (1974) et GIANNOPOLITIS *et al*(1977). Le calcul des rapports V/v préconisés par ces auteurs (cf. Méthodes) permet de déterminer la quantité de SOD ajoutée au milieu.

Dans nos conditions opératoires où la dilution de l'échantillon est de 1/51, on détermine un rapport V/v, pour 50 % d'inhibition, égal à 2,1. L'application de l'équation décrite dans le chapitre matériel et méthodes permet donc d'estimer une activité SOD d'environ 56 unités. ml^{-1} , pour environ 59 unités théoriques réellement ajoutées au milieu xanthine + xox.



Figure 65 : INHIBITION DE L'APPARITION DU FORMAZAN DEPENDANTE DE L'ACTIVITE XANTHINE OXYDASE IN VITRO, EN PRESENCE DE QUANTITES CROIS-SANTES DE SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD) DU COMMERCE.

Les anions superoxydes $(0\frac{1}{2})$ sont générés par l'activité xanthine oxydase du commerce à pH 7,4 en présence de xanthine $10^{-4}M$. La détection des superoxydes se fait en suivant la réduction du NBT en formazan à 560 nm. (V max : vitesse d'apparition du formazan en absence de SOD; Vi : vitesse d'apparition du formazan en présence d'une quantité donnée de SOD).



Figure 66 : INHIBITION DE L'APPARITION DU FORMAZAN DEPENDANTE DE L'ACTIVITE XANTHINE OXYDASE *IN VITRO*, EN PRESENCE DE QUANTITES CROIS-SANTES DE "SERUM LUTOIDIQUE".

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites pour la figure 65. On remplace la SOD du commerce par des quantités croissantes de sérum lutoïdique.

Cette méthode de quantification des activités SOD semble donc satisfaisante et appliquable dans nos conditions expérimentales.

b) Activités SOD dans le sédiment (lutoïdes) :

La figure 66 montre le même type d'expérience que celle réalisée dans la figure 65, en testant dans ce cas le pouvoir inhibiteur d'un sérum lutoïdique obtenu par ultra centrifugation (1 h. ; 4°C ; 160.000 g) de lutoïdes soniqués.

On observe également dans ce cas une courbe d'inhibition analogue à celle décrite en utilisant la SOD du commerce. Les 50 % d'inhibition sont atteints lorsqu'environ 68 μ l de sérum lutoïdique ont été ajoutés au milieu xanthine + xox (3 ml). Pour cette valeur, le rapport V/v est égal à 2,4 et permet d'estimer une activité SOD dans les lutoïdes correspondant à environ 63 unités.ml⁻¹.

Différentes expériences de ce type ont pu montrer que la quantité de SOD dans les lutoïdes est éminemment variable selon la provenance du latex (les extrêmes enregistrés étant de 10,8 et 127 unités SOD.ml⁻¹).

Le tableau 40 met en évidence que la majeure partie de l'effet inhibiteur du sérum lutoïdique est attribuable à une activité enzymatique thermolabile et de poids moléculaire supérieur à 10.000.

	Inhibition de l'apparition du formazan		
	Cytosol	sérum lutoïdique	
témoins non traités	48 (100 %)	32 (100 %)	
dénaturation thermique ultrafiltrat PM 10	12 (25 %) 15 (31 %)	5 (16 %) 7 (17 %)	

<u>Tableau 40</u> : Effets de la dénaturation thermique et de la déprotéinisation par ultrafiltration sur les activités SOD du cytosol et du sérum lutoïdique.

Les essais ont été réalisés avec 50 µl d'extrait, non traités, ou dénaturés 3 minutes à 95°C, ou déprotéinisés par ultrafiltration sur membrane AMICON PM 10.000. Les résultats sont exprimés en % d'inhibition de la réduction du NBT en formazan en présence de xanthine + xox, et correspondent à une moyenne de 3 essais. Les chiffres entre parenthèses indiquent le % d'activité résiduelle par rapport aux motifs témoins non traités.



Figure 67 : EXISTENCE D'ACTIVITES SOD DANS LE CYTOSOL DU LATEX (Conditions expérimentales identiques à celles des fig. 65 et 66)



Gel d'amidon

Gel d'acrylamide

Figure 68 : REVELATION SPECIFIQUE DES ACTIVITES SUPEROXYDE DISMUTASES DU CYTOSOL ET DU SEDIMENT DU LATEX, APRES ELECTROPHORESES. Cependant, même après 3 minutes de traitement thermique à 95°C ou après ultra-filtration sur cellule AMICON PM 10, nous constatons sur ces extraits, la persistence d'une activité non négligeable inhibitrice de l'apparition du Formazan.

Cette importance activité résiduelle, très probablement non enzymatique, est sans doute attribuable à des effets "SOD LIKE" que peuvent présenter certains solutés et en particulier les sels de métaux tels le fer ou le cuivre, connus pour catalyser des réactions "parasites" à partir de l'anion superoxyde (voir p.355).

La figure 47 montre que l'activité SOD sédimentable semble essentiellement lutoïdique, bien que cette compartimentation ne soit pas très nette.

c) Activités SOD dans le cytosol :

La figure 67 démontre que le cytosol du latex possède également une activité superoxyde dismutase. Nous avons pu montrer que cette activité SOD cytosolique est généralement moins forte que celle des lutoïdes. Les extrêmes enregistrés sont respectivement de 7,2 et 54,5 U.SOD. ml^{-1} cytosol. La majeure partie des activités SOD du sérum cytosolique est thermolabile et retenue par ultrafiltration sur PM 10 (tableau 40). Cependant il reste encore dans les extraits cytosoliques traités une certaine activité SOD-LIKE souvent plus importante que celle mise en évidence dans le sérum lutoïdique. Cette dernière activité pourrait être attribuable à la présence de solutés piégeant les anions superoxydes (thiols, ...).

d) Mise en évidence par électrophorèse :

- Electrophorèse sur gel d'amidon (figure 68).

Nous constatons l'existence d'au moins 4 isozymes (peutêtre 5), dans les extraits cytosoliques. La bande de moindre intensité (rf : 0,3) peut correspondre à une contamination lutoïdique.

L'extrait lutoïdique semble montrer l'existence de 3 bandes, dont une extrêmement active (de rf : 0,29). Les SOD des 2 compartiments sont de caractère anodique.

- Electrophorèse sur gel d'acrylamide (figure 68).

Sur ce type de gel, les bandes paraissent mieux séparées et beaucoup moins diffuses. Cette technique confirme les résultats précédents : . Il existe 5 bandes dans le cytosol dont 2 particulièrement intenses et de rf élevés (0,82 et 0,76) et une bande de faible intensité, de rf : 0,46, correspondant probablement à une contamination par l'isozyme très active caractéristique du sérum lutoïdique (de rf 0,45).

. On constate la présence d'au moins 3 isozymes lutoïdiques dont l'unetrès largement majoritaire se caractérise par un rf : 0,45, dans nos conditions expérimentales.

e) Inhibiteurs des superoxydes dismutases du latex :

Nous avons testé quelques inhibiteurs possibles des superoxydes dismutases du latex. Les résultats présentés ci-dessous montrent que seul l'ion cyanure semble inhiber fortement l'ensemble des activités SOD des deux compartiments.

	% d'inhibition de la SOD par rapport au témoi		u témoin (0%)	
	KCN 0,25 mM	KCN. 1,5 mM	DIECA 1 mM	Azide 0,5 mM
SOD Cytoplasmique	75 %	92 %	10 %	12 %
SOD Lutoïdique	70 %	83 %	18 %	10 %

Tableau 41 : INHIBITION DES SOD DU LATEX PAR LE CYANURE

Il est donc probable que les différentes isozymes de la SOD des deux compartiments du latex soient des enzymes à Cu-Zn ou à Fer mais pas à Manganèse (BEEM *et al.* 1974 ; PUGET et MICHELSON, 1974 ; KIRBY *et al.* 1980). L'inhibition des activités SOD du latex aux faibles concentrations en cyanure (250 μ M) constitue un argument favorable à l'interprétation des effets du cyanure sur l'émission de superoxydes dépendante du NADH rapportés dans la figure 61.

6) Conclusions sommaires :

Les deux compartiments du latex renferment donc des activités enzymatiques superoxyde dismutases. Ces activités sont extrêmement variables selon la provenance du latex. A.2 - LES CATALASES {Cat.} :

Cette enzyme catalyse la dégradation de l'eau oxygénée selon la réaction globale :

2 $H_2O_2 \xrightarrow{Cat} 2 H_2O + O_2$

a) Mise en évidence et quantification :

Vu la relative turbidité et l'absorption importante des extraits cytoplasmiques et lutoïdiques dans les ultraviolets lointains nous avons préféré mesurer les activités catalases à l'aide d'un oxygraphe, en enregistrant la cinétique de dégagement de l'oxygène au moyen d'une électrode de type CLARK.

Les cinétiques de dégagement d'oxygène obtenues (figure 69) que ce soit en présence de catalase purifiée du commerce ou des extraits du latex sont de type"sigmoïdale".Les activités sont quantifiées par le calcul de la pente maximum au point d'inflexion.

b) Activités catalases dans le sédiment du latex :

Nous confirmons la présence d'activités catalases dans le sédiment du latex (figure 69). La distribution bimodale des activités catalases dans les fractions denses d'un gradient de saccharose (figure 47) confirme les résultats obtenus par COUPÉ et al. (1972). Ainsi, des activités catalases seraient localisées au niveau des lutoïdes, et dans une organite moins dense, différente des particules de FREY-WYSSLING caractérisée par la présence des activités polyphenol oxydases.

Les séries de mesures effectuées nous ont permis de mettre en évidence une variabilité extrêmement importante des activités catalases sédimentables. Les extrêmes enregistrés correspondent respectivement à une consonmation de 3,4 et 67,0 μ mol H_2O_2 . min⁻¹. m1⁻¹ de sédiment soniqué.

c) Activités catalases cytosoliques :

Le cytosol du latex contient également des activités catalases (figure 69 et 47). Les activités catalases cytosoliques sont le plus souvent inférieures aux activités sédimentables, et montrent également une grande variabilité selon la provenance des latex (HP, BP, ES). Les activités sont généralement compris entre 4,3 et 35,0 µmol H_2O_2 consommé •min⁻¹ • ml⁻¹ de cytosol. Nous avons parfois enregistré des activités quasiment nulles.



Figure 69 : CINETIQUES DES ACTIVITES CATALASES DU COMMERCE, DU SEDIMENT ET DU CYTOSOL DU LATEX, MESUREES A L'OXYGRAPHE.

Les essais sont réalisés à pH 7,0 (tampon phosphate 20 mM) en présence d'H₂O₂ (0,7 % final). La première cinétique est effectuée avec de la catalase du commerce. Les cinétiques suivantes sont réalisées respectivement avec 50 μ l de sédiment soniqué et 50 μ l de cytosol, isolés du latex d'Hévéas hauts producteurs.



Figure 70 : REVELATION SPECIFIQUE DES ACTIVITES CATALASES APRES ELECTRO-PHORESES DU CYTOSOL ET DU SERUM DU SEDIMENT DU LATEX.

d) Mise en évidence électrophorétique :

La révélation des isozymes des catalases du latex est souvent difficile, et les bandes visualisées très fugaces.

- Electrophorèses sur gel d'amidon (figure 70) :

La représentation schématique des électrophorégrammes des catalases du cytosol et du sédiment soniqué du latex permet de visualiser :

. La présence de 2 isozymes, dont l'une extrêmement active de rf : 0,21, la secondeisozyme est à peine perceptible.

. Le sérum du sédiment se caractérise par la présence de l ou 2 isozymes (très peu séparés) qui ne migrent quasiment pas dans le champ électrique dans nos conditions opératoires (que ce soit à pH 6 ou à pH 8). Cette faible mobilité électrophorétique pourrait correspondre à une adsorption des catalases sédimentables sur les structures membranaires présentes dans l'échantillon soniqué.

- Electrophorèse sur gel d'acrylamide :

Les électrophorèses sur gel d'acrylamide confirment les résultats décrits ci-dessus (figure 70) :

. Présence de 2 isozymes dans le sérum cytoplasmique dont l'une plus active montre un rf : 0,30

. Présence d'au moins uneisozyme de la catalase, différente des isozymes cytoplasmiques, dans le sédiment. Cette isozyme ne migre pratiquement pas dans nos conditions expérimentales.

e) Les inhibiteurs des catalases :

Nous avons testé l'action de différents inhibiteurs classiques des catalases sur celles du latex : les résultats montrent que comme toutes les catalases, celles du latex renferment au moins un atome¹ de fer au niveau de leur site actif (SCHONBAUM et CHANCE, 1976).

	Inhibition	n des activités catalases du latex (en %)		
_	KCN	Hydroxylamine	Azide(Na)	DIECA
	1 mM	0,5 mM	0,5 mM	1 mM
Catalase sédiment	90 %	88 %	94 %	-
Catalase cytosol	82 %	90 %	95 %	22 %

Tableau 42 : INHIBITION DES CATALASES DU LATEX PAR LES COMPLEXANTS DU FER.

() Conclusion :

Nous avons confirmé dans cette partie que le latex présente des activités catalases dans le sérum cytoplasmique comme dans les particules sédimentables, dont les lutoïdes.

Comme dans le cas de la SOD, les catalases des différents compartiments montrent des activités extrêmement variables selon la provenance du latex d'un même clône. Il semble exister un troisième compartiment dans le latex renfermant au moins des catalases, à l'exclusion des autres activités enzymatiques étudiées ici.

A.3 - LES PEROXYDASES (Perox.) :

Rappelons que ces enzymes, classiquement ferriques, catalysent l'oxydation peroxydative de substrats "donneurs d'hydrogène" (R-H) généralement polyinsaturés, souvent du type noyau phénolique, selon le schéma réactionnel global :

 $R-H + H_2O_2 \xrightarrow{Perox.} R-OH + H_2O$

Le schéma réactionnel détaillé fait intervenir des formes radicalaires quinoniques (Q0[•]), et engendre leur condensation en composés polyphénoliques (mélanines, tannins condensés...). Toutes ces formes sont relativement toxiques, car elles entraînent l'inactivation de certains enzymes et l'agglutination des protéines.

Paradoxalement, dans certains cas, les activités peroxydases peuvent être considérées comme "détoxifiantes". Elles entrent en effet en compétition pour leur substrat : H_2O_2 , avec les mécanismes non enzy-





La réaction est initiée par l'addition de 25 $\mu 1$ de sérum du sédiment du latex à 3 ml d'un tampon cacodylate à pH 6,0, contenant du gaïacol (14 mM), du CaCl₂ (5 mM)et de l'eau oxygénée (1 mM). L'addition d'H₂O₂ lors de l'infléchissement de la cinétique réinitie la

réaction.





Le temps de latence est proportionnel à la quantité de cytosol brut ajoutée (50 et 100 μ l respectivement). Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites pour la fig. 71.



Figure 73 : REVELATION SPECIFIQUE DES ACTIVITES PEROXYDASES APRES ELEC-TROPHORESES DU CYTOSOL ET DU SERUM DU SEDIMENT DU LATEX.

matiques catalysant l'émission des formes les plus "agressives de l'oxygène" tels le radical hydroxyle(OH') et l'oxygène singulet $(0\frac{1}{2})$

a) Mise en évidence et quantification :

Les activités peroxydases sont mesurées avec le gaïacol en tant que substrat donneur d'hydrogène. Sous l'action de la peroxydase, en présence d'H₂O₂, cet <u>o</u>-méthoxyphénol donne naissance aux diméthoxybiphénoquinones de couleur rouge caractéristique.

b) Les activités peroxydases du sédiment :

La figure 71 montre une cinétique typique des activités peroxydasessédimentables. Nous constatons :

- des activités élevées, les extrêmes enregistrés (chez GT1) sont respectivement de 1,85 U.DO (470 nm)min⁻¹ 50 μ l⁻¹ sédiment et des minima de 0,15 U.DO.min⁻¹ 50 μ l⁻¹ séd. L'activité moyenne est de 0,78 ± 0,33 U.DO.min⁻¹ 50 μ l (72 échantillons analysés) ;

- une cinétique linéaire <u>inmédiate</u> (pas de temps de latence sur sédiment lavé) ;

- une inflexion progressive de la cinétique en fin de réaction. Celle-ci peut être au moins partiellement restaurée par l'addition d'H₂O₂ supplémentaire. Ce substrat est en effet rapidement épuisé par les actions conjointes des peroxydases et des catalases présentes dans le sédiment.

La figure 47 confirme la localisation lutoïdique des peroxydases sédimentables.

c) Les activités peroxydases du cytosol :

Les cinétiques présentées dans la figure 72 permettent de constater :

- la présence d'un temps de latence à l'apparition du diméthoxybiphéno-quinone coloré. Celui-ci est proportionnel à la quantité d'extrait cytosolique brut ajouté dans le milieu réactionnel ;

- une cinétique de type sigmoïdal dont la pente au point d'inflexion est proportionnelle à la quantité de sérum cytosolique (enzyme) ajoutée ;

- l'absence de nouveau temps de latence, lorsque, ayant atteint la zone d'infléchissement de la cinétique initiale (pénurie d'H₂O₂), l'eau oxygénée est rajoutée.



Figure 74 : EFFET DE L'ACIDE ASCORBIQUE EXOGENE SUR LA PEROXYDATION ENZYMATIQUE DU GAÏACOL.

Les expériences sont réalisées avec des quantités identiques se sérum lutoïdique. Le temps de latence est proportionnel à la concentration en acide ascorbique exogène dans le milieu.





Ainsi, tout se passe comme si la "substance" provoquant le temps de latence avait été totalement épuisée en début de cinétique. L'identification de la (des) substance(s) responsables de ce temps de latence est rapportée dans le paragraphe "c" (inhibiteurs) de ce chapitre.

d) Electrophorèse :

Seuls les électrophorégrammes effectués sur gel d'amidon, les plus fiables, sont reproduits dans la figure 73. On constate :

- dans le sérum lutoïdique la présence de 4 isozymes "d'intensité" équivalente, à caractère anodique (+ une tâche floue de faible intensité), ainsi que 3 isozymes, à forte activité, cathodiques;

- dans le sérum cytosolique la présence d'une isozyme également très active, à caractère anodique et à forte mobilité électrophorétique, ainsi que d'une bande extrêmement fine et intense (anodique) (aucune bande cathodique n'est décelable).

e) Inhibition des peroxydases du latex :

On distingue les inhibiteurs "indirects", qui ne semblent que peu ou pas agir sur l'enzyme elle-même, et les "inhibiteurs vrais", agissant directement au niveau de l'activité enzymatique.

- Les inhibiteurs"indirects": ce sont en fait des antioxydants qui agissent sur les produits d'oxydation (ou de peroxydation) :

> + l'acide ascorbique à faible concentration n'affecte pas très fortement l'activité de l'enzyme (figure 74 et 75). Par contre, à concentration constante en peroxydase, le temps de latence (apparition du produit coloré) augmente proportionnellement avec la concentration d'acide ascorbique ajouté dans le milieu. Ce temps de latence dépend à la fois de la concentration en acide ascorbique et de la quantité d'enzyme présente (figure 75). Ainsi, à même concentration en ascorbate dans le milieu, si l'on ajoute une quantité double de peroxydase, nous constatons une diminution d'un facteur 2 du temps de latence. Ce phénomène indique que l'acide ascorbique est consommé. A plus fortes concentrations, l'acide ascorbique provoque une inhibition significative de l'enzyme (52 % d'inhibition en présence d'acide ascorbique 4 mM ; figure 75).

L'acide ascorbique retarde donc l'apparition de quinones toxiques et, de ce fait, sans toutefois inhiber très fortement les activités peroxydases, inhibe indirectement l'action potentiellement toxique de ces enzymes.

anti-oxydant	concentration	latence (sec.)	activité peroxydase (% Vm)
néant	-	2	100
d-tocopherols	$10 \ \mu g.m1^{-1}$	13	89
	20 $\mu g.m1^{-1}$	29	83
	50 μ g.ml ⁻¹	68	79
glutathion (SH)) 1 mM	58	32
cystéine	1 mM	50	58
DIECA	1 mM	47	48

Divers autres anti-oxydants (réducteurs) ont été testés (tableau 43).

Tableau 43 : Effets de différents anti-oxydants sur les activités peroxydases lutoïdiques du latex.

+ Les A-tocophérols jouent un rôle similaire à celui de l'. ascorbate : ils affectent peu l'activité enzymatique, mais retardent également considérablement l'apparition des quinones colorées (tableau 41).

+ Les composés thiols tels le glutathion et la cystéine montrent une double action : à concentrations physiologiques ils inhibent efficacement l'activité peroxydase (68 % d'inhibition pour GSH 1 mM) et augmentent le temps de latence. Cependant les composés thiols se montrent moins efficaces pour retarder l'apparition du produit de peroxydation coloré que les anti-oxydants comme les vitamines <u>C</u> et <u>E</u>. (Figure 74 et 75 ; Tableau 43).

+ Le DIECA, semble plus agir sur la réaction par l'intermédiaire de son pouvoir réducteur, que par sa capacité à piéger sélectivement un éventuel cation divalent nécessaire à l'activité enzymatique. Il montre en effet une action du même type que celle mise en évidence pour les composés thiols (temps de latence et inhibition partielle).

inhibiteurs	concentration (mM)	latence (sec.)	activité peroxydase résiduelle (% Vmax)
néant	-	2	100
PCMB	0,1	2	80
NEM	0,5	1	78
NaN3	0,5	2	85
KCN	0,5	2	69
	1,0	2	22
	2,0	2	8

- <u>Les inhibiteurs "vrais</u>" : ils sont supposés agir directement au niveau de l'activité enzymatique sensu stricto :

<u>Tableau 42</u> : Effets de quelques inhibiteurs sur les activités peroxydases lutoïdiques du latex.

Les peroxydases lutoïdiques sont extrêmement peu sensibles aux réactifs des groupements thiols et à l'azoture de soldium. Comme de nombreuses peroxydases elles sont par contre inhibées fortement par le cyanure dès 1 mM (tableau 44).

6) Conclusions :

Nous confirmons ici l'existence d'activités peroxydases au sein des compartiments cytosolique et vacuolaire du latex (TATA et EDWIN, 1970 ; COUPÉ et al. 1972).

Les peroxydases participent à l'élimination de l'eau oxygénée engendrée (accidentellement ou non) par diverses activités enzymatiques rédox. Elles limitent donc son accumulation dans le milieu, et diminuent ainsi les probabilités de l'apparition des formes les plus agressives de l'oxygène (OH· et 0_2^1) (réactions de FENTON et d'HABER-WEISS). Ce rôle détoxifiant des peroxydases est pleinement assuré dans la mesure où le milieu cellulaire contient des teneurs suffisamment élevées en antioxydants (réducteurs). Ces derniers retardent en effet l'apparition des formes quinoniques et de leurs produits de condensation (mélanines, tannins...), également toxiques, engendrées normalement par les activités peroxydases.



Figure 76 : ACTIVITES GLUTATHION PEROXYDASES CYTOSOLIQUE ET SEDIMENTABLE DU LATEX.

 $1 \leq t$

Les activités glutathion peroxydases du sédiment ou du cytosol (ultrafiltré ("U.F.") ou non) ont été testées dans un tampon phosphate 25 mM à pH 6,8 contenant du glutathion réduit (GSH) 2 mM, en présence de tertiobutylhydroperoxyde (100 µM) (cinétiques A) ou d'eau oxydénée (500 µM) (cinétiques B) en tant que substrats donneurs d'électrons. On a ajouté 100 µl de sérum cytosolique ou lutoïdique pour 3 ml de milieu réactionnel. A.4 - ACTIVITES GLUTATHION PEROXYDASES :

Contrairement aux activités catalases et peroxydases, les activités glutathion peroxydases (GSH perox.) présentent l'avantage d'utiliser les peroxydes organiques, tels que les produits de la dégradation peroxydative des acides gras insaturés, comme substrats donneurs d'électrons.

En effet l'oxydation des structures insaturées par les formes toxiques de l'oxygène $(0\frac{1}{2}; 0H^{\circ}; 0\frac{1}{2}...)$ aboutit à la libération de fonctions peroxydes organiques (ROOH) susceptibles d'amorcer des réactioons peroxydatives en chaînes.

Le système détoxifiant GSH peroxydase catalyse la réduction des peroxydes organiques par le glutathion, évitant la propagation de la réaction :

ROOH + 2 GSH $\xrightarrow{\text{GSH Perox.}}$ GSSG + ROH + H₂O

La figure 76 (a) montre l'existence d'activités glutathion peroxydasesdans le latex, en utilisant le tertio-butyl-hydroperoxyde comme substrat. Cette activité est essentiellement localisée dans le cytosol. La faible activité sédimentable est probablement le fait d'une contamination par l'enzyme cytosolique adsorbée sur les structures membranaires du latex. L'expérience témoin réalisée avec du cytosol déprotéinisé par ultrafiltration (PM.10) montre une légère activité résiduelle. Cette dernière est probablement due à la peroxydation non enzymatique du glutathion en présence de peroxydes organiques.

Des expériences analogues, dans lesquelles le t-butyl-hydroperoxyde était remplacé par $1'H_2O_2$ comme substrat donneur d'électrons (figure 76-b), ne nous ont pas permis de distinguer d'une manière irréfutable, une activité enzymatique utilisant $1'H_2O_2$, de la peroxydation non enzymatique du GSH en présence de ce substrat.

Ces résultats permettent néanmoins de mettre en évidence le rôle détoxifiant direct du glutathion. Ce réducteur est en effet capable de piéger rapidement, et de façon non enzymatique, l'eau oxygénée présente dans le milieu.

La présence, au sein du latex, d'une glutathion peroxydase cytosolique, utilisant les peroxydes organiques (t-Bu) et accessoirement H₂O₂, s'avère d'un intérêt capital dans les mécanismes de détoxification.



Figure 77 : MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE GLYOXALASE I DANS LE CYTOSOL DU LATEX.

Dix μ l de cytosol du latex ont été injectés dans un milieu tamponné à pH 6,8 (tampon phosphate 50 mM) contenant du glutathion réduit 2 mM. La réaction est initiée par l'addition de methyl glyoxal (45 μ M final environ). L'apparition du S-lactoyl glutathion est détectée spectrophotométriquement à 240 nm, contre un témoin sans cytosol.

Elle permet en particulier de détoxifier les hydroperoxydes organiques formés lors de l'interaction des formes ultra-toxiques de l'oxygène $(OH, O_2^1 \dots)$ avec les structures moléculaires insaturées. On pense avant tout aux lipides insaturés membranaires, et, dans le cas particulier du latex, aux doubles liaisons des molécules de Cis-poly-isoprène (caoutchouc).

Rappelons que le bon fonctionnement de cette enzyme nécessite un <u>turnover</u> suffisant du glutathion réduit. Le recyclage de ce cofacteur sous sa forme réduite active sera abordé dans un paragraphe ultérieur.

A.5 - LES GLYOXALASES :

Ces enzymes catalysent la détoxification des 2-cétoaldéhydes. Ces substrats(2-cétoaldéhydes) résultent de l'oxydation puis hydratation des fonctions styrènes (R-CH=CH₂) en glycol (R-CHOH-CH₂OH), suivies d'une déshydrogénation par une alcool déshydrogénase (MANNERVIK, 1980). L'oxydation initiale peut résulter de l'interaction des formes agressives de l'O₂ avec les structures insaturées. Les 2-cétoaldéhydes libérés sont des électrophiles présentant de fortes activités cytotoxiques (FRENCH et FREEDLANDER, 1958).

Le rôle essentiellement détoxifiant du système glyoxalase est joué par la glyoxalase I (MANNERVICK, 1980), qui catalyse en présence de glutathion réduit la formation d'un thioester du glutathion, selon la réaction :

R-CO-CHO + GSH (glyoxalase I) R-CHOH-CO-SG

dont le produit ne présente aucune toxicité vis-à-vis des structures biologiques.

Une deuxième étape, catalysée par la glyoxalase II, recycle sous forme réduite le glutathion utilisé par la glyoxalase I, et libère un acide fort (RACKER, 1952) :

R-CHOH-CO-SG + H₂O (glyoxalase II) R-CHOH-COOH + GSH

L'apparition de S-lactoyl-glutathion lorsque quelques µl de cytosol du latex sont mis en présence de GSH et de méthylglyoxal (figure 77) montre l'existence d'une activité glyoxalase I (RACKER, 1952). La pente initiale de la cinétique est linéaire pendant 2 minutes environ. L'infléchissement progressif de la cinétique peut être attribuable à une activité glyoxalase II, métabolisant le produit de la réaction I (glyoxalase I).

Le rôle physiologique de ce système enzymatique demeure obscur, essentiellement à cause d'une relative méconnaissance des précurseurs métaboliques susceptibles de donner naissance aux céto aldéhydes dans les milieux cellulaires (MANNERVIK, 1980). Notons, à ce titre, que chez les végétaux, la double liaison des molécules d'éthylène peut constituer a*priori* une cible d'interaction avec les formes réactives de l'oxygène et constituer de ce fait un précurseur possible du glyoxal, l'un des substrats du système glyoxalase. Rappelons à ce propos que l'oxyde d'éthylène, un intermédiaire obligatoire de l'éventuelle action de l'éthylène avec certaines formes agressives de l'O₂, a été mis en évidence par JERRIE et HALL (1978) comme l'un des produits principaux du métabolisme de l'éthylène exogène chez *Vicia faba*.

Quoiqu'il en soit, la présence de ce système enzymatique dans le cytosol du latex (nous n'avons pas détecté d'activité glyoxalase I dans le sédiment), assure une protection du contenu laticifère en cas d'une libération de ce type d'électrophile toxique, suite à l'émission de formes agressives de l'oxygène.

Insistons enfin sur le fait que, dans la mesure ou le système est présent dans son intégralité (glyoxalase I et II), cette chaîne détoxifiante ne consomme globalement pas de glutathion. Celui-ci est en effet recyclé sous sa forme réduite, au cours de la réaction II.

B - LES PROTECTEURS CHIMIQUES "ANTIOXYDANTS"

Ce sont des composés chimiques naturels, généralement réducteurs, caractérisés par un potentiel rédox compatible avec la capture des électrons des différentes formes toxiques de l'oxygène.

L'oxydation de ces protecteurs à l'intérieur de la cellule, pose cependant le problème de leur régénération, ou de leur recyclage sous leur forme réduite. Ce recyclage peut être assuré par des chaînes d'oxydoréduction, enzymatiques ou non, considérées de ce fait elles-mêmes, comme des systèmes "protecteurs" (indirects).

B.1 - L'ACIDE ASCORBIQUE :

a) Mise en évidence et quantification :

Les analyses portant sur le latex de 70 arbres (clône GT1) montrent que les concentrations moyennes en acide ascorbique réduit cytosolique sont situées autour de 3,3 ± 0,6 mM avec des minima de 2,2 et des maxima enregistrées de l'ordre de 4,8 mM.

Le sérum lutoïdique ne contient pratiquement pas d'acide ascorbique, du moins sous forme réduite.

b) Rôle protecteur :

L'acide ascorbique est un réducteur puissant capable de réduire nombre de substances oxydées à caractère toxique, et en particulier les quinones et les oxyflavones libérées par les activités phénoloxydases et peroxydases largement répandues dans le monde végétal.

Nous avons en particulier vérifié ce pouvoir détoxifiant de l'acide ascorbique, vis-à-vis des produits d'oxydation de la dihydroxyphényl-alanine (DOPA), substrat des polyphénoloxidases du latex.

Pour ce faire, nous avons mesuré les activités polyphénoloxy.dases selon deux méthodes différentes : en suivant à l'oxygraphe la consommation d'O₂ en présence de DOPA d'une part, et en détectant spectrophotométriquement (DO470 nm) l'apparition du produit d'oxydation coloré (rouge).

En absence d'acide ascorbique exogène (figure 78), l'addition de sérum du sédiment (lOO μ l/3ml) induit l'apparition immédiate de la couleur rouge caractéristique d'une émission de quinones oxydées. On constate parallèlement une consommation importante d'oxygène, linéaire en début de cinétique.

L'addition d'ascorbate (100 µM final) entraîne une décoloration immédiate du milieu réactionnel (totale en 1 minute environ) traduisant la réduction des quinones précédemment émises par l'activité polyphénol oxydase. On constate par contre que la consommation d'oxygène se poursuit et semble même s'accélérer. Si l'acide ascorbique est ajouté avant la DOPA, l'addition du sérum du sédiment n'induit qu'une très faible consommation d'O₂. Ce résultat traduit l'absence virtuelle d'ascorbate oxydase dans l'extrait (ou une très faible activité). L'introduction de DOPA dans le milieu provoque une consommation intense d'oxygène due à l'activité PPox, alors que le milieu reste incolore dans un premier temps. La coloration rouge ne débute qu'après un temps de latence (environ 2 minutes dans nos conditions expérimentales) proportionnel à la quantité d'ascorbate initialement présent.



 $\underline{Figure 78}$: EFFETS DE L'ACIDE ASCORBIQUE SUR LA CONSOMMATION D'O₂ EN PRESENCE DE DOPA ET SUR L'APPARITION DES PRODUITS D'OXYDATION COLORES DE LA DOPA, PAR LE SERUM DU SEDIMENT DU LATEX.

On a injecté 100 μ l de sérum du sédiment dans 3 ml de tampon cacodylate 100 mM à pH 6;0 contenant du CaCl₂ (5 mM) et de 1a DOPA (1 mM). L'acide ascorbique est 0,1 mM final.



Figure 79 : REDUCTION NON ENZYMATIQUE DU DEHYDROASCORBATE PAR LE CYTOSOL DU LATEX DEPROTEINISE PAR ULTRAFILTRATION. EFFET D'UN APPORT DE CYSTEINE OU DE GLUTATHION REDUITS.

La réduction du déhydroascorbate est initiée par l'addition de 2 ml de cytosol (HP) à 2 ml d'une solution de déhydroascorbate 2 mM. L'apparition de l'ascorbate réduit est dosé ponctuellement sur des prélèvements du mélange, à l'oxygraphe, en présence d'ascorbate oxydase du commerce. Après 15 minutes d'incubation, on ajoute de la cysteine ou du glutathion réduit 2 mM final. Ces expériences montrent que l'acide ascorbique n'inhibe

pas les activités polyphénoloxydases en tant que telles. Ce réducteur retarde l'apparition des produits d'oxydation coloré, en les recyclant immédiatement et non enzymatiquement sous leur forme réduite non toxique.

Ces résultats confirment le rôle direct de l'acide ascorbique dans la détoxification des fonctions quinoniques toxiques résultant des activités polyphénol oxydases et peroxydases. Ce réducteur participe donc indirectement à l'élimination des formes toxiques de l' 0_2 (H $_20_2$ et Q0°), et de l'excès d'oxygène dissous dans le milieu par l'intermédiaire des activités polyphénol oxydases.

c) Régénération de l'acide ascorbique :

En présence même de traces d'O₂, et des activités oxydases qui en découlent, l'acide ascorbique présent dans le milieu doit être probablement rapidement oxydé. Il est donc nécessaire que son recyclage, sous forme réduite active, soit assuré en permanence.

- Réduction non enzymatique du déhydroascorbate par le cytosol du latex :

Le cytosol du latex, déprotéinisé par ultrafiltration (PM 10) est capable de réduire chimiquement une solution de déhydroascorbate. Dans le cas de la figure 79, l'addition de filtrat de cytosol provenant d'un arbre haut-producteur (ascorbate 4,1 mM et thiols réduits 3,4 mM endogènes) réduit non enzymatiquement environ 65 % d'une solution d'acide déhydroascorbique exogène 2 mM à pH 6,5 en moins de 15 minutes. L'addition ultérieure de cystéine aboutit à la réduction complète du déhydroascorbate exogène en moins de 12 minutes. L'addition de glutathion réduit est beaucoup moins efficace.

La réduction non enzymatique du déhydroascorbate par le cystéine a également été mentionnée par YAMAGUCHI et JOCELYN (1951). Selon ces auteurs cette réaction interférerait fortement dans le dosage de la déhydroascorbate réductase.

- Réduction enzymatique du déhydroascorbate ?

Des activités déhydroascorbate réductase dépendante du glutathion ont été mises en évidence dans de nombreux tissus végétaux (CROOK, 1941 ; COLUMBICK et MATILL, 1941 ; BUDKIN, 1943...). Cette enzyme catalyse la réaction :

déhydroascorbate + 2 GSH (dhA. red.) GSSG + ascorbate

La forte interférence due à la présence d'une quantité élevée de substance réductrice dans le cytosol, ne nous a pas permis de caractériser d'une façon catégorique la présence d'une déhydroascorbate réductase dans le cytosol du latex. L'enzyme n'existe pas dans les organites sédimentables du latex.

c) Conclusion :

En retardant l'apparition de quinones toxiques, sans toutefois fortement inhiber les activités phénoloxydases et peroxydases, l'acide ascorbique inhibe indirectement l'action potentiellement toxique de ces enzymes. Dans la mesure où la concentration en réducteurs est suffisante dans le milieu, on peut considérer que les activités polyphénoloxydases et peroxydases assurent un rôle détoxifiant, en soustrayant les excès d'O₂ et surtout d'H₂O₂ endogènes, potentiellement très toxiques pour les structures cellulaires.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité déhydroascorbate réductase au sein du latex. Cependant, la réduction chimique du déhydroascorbate par les composés réducteurs (thiols) du cytosol peut assurer un recyclage permanent de l'acide ascorbique. Cette assertion repose avant tout sur l'existence de réductase capable de régénérer les thiols eux-mêmes sous leur forme réduite active, au sein du latex.

B.2 - LES COMPOSES THIOLS REDUITS :

a) Mise en évidence et quantification dans le latex :

La présence et la composition d'un pool de composés thiols de bas poids moléculaire au sein du latex a été décrite par Mc MULLEN (1960). Nous avons pu confirmer, par chromatographie, la présence de quantités notables de glutathion, de traces de cystéine et de son dérivé l'acide cystéique. D'autres spots répondant positivement aux divers réactifs des thiols n'ont pu être identifiés (non montré ici).

L'analyse de 70 extraits de latex (clone GTl) nous a permis de déterminer une concentration moyenne en thiols réduits dans le cytosol de 2,2 ± 0,5 mM. Nous avons enregistré des maxima avoisinant 3,7 mM et des minima de 1,2 mM.

Le sérum intralutoïdique ne contient que très peu de composés thiols réduits. Leur concentration est toujours inférieure à 0,25 mM.

b) Rôle protecteur :

Le rôle détoxifiant des composés thiols réduits a été largement abordé dans les paragraphes concernant la mise en évidence des activités glutathion peroxydase et glyoxalase dans le cytosol du latex.

Son rôle protecteur direct, par voie non enzymatique, a également été abordé. Il concerne essentiellement la réduction chimique de l'acide déhydroascorbique, l'inhibition partielle des activités peroxydases du latex, et enfin la réduction non enzymatique des composés phénoliques oxydés, potentiellement toxiques.

Enfin, le rôle détoxifiant direct du glutathion vis-à-vis de l'eau oxygénée a également été discuté lors de la mise en évidence d'une activité glutathion peroxydase cytosolique (figure 76). Nous avons en effet pu montrer que le glutathion réduit peut se comporter comme un véritable piège à H_2O_2 . Il évite ainsi son accumulation, et l'émission potentielle de radicaux hydroxyles et d'oxygène singulet résultant de l'interaction d' H_2O_2 avec d'autres formes toxiques de l' O_2 (réactions de FENTON et d'HABER-WEISS).

c) Recyclage du glutathion sous sa forme réduite (glutathion réductase) :

Le rôle de première importance joué par le glutathion dans les processus de détoxification enzymatique et non enzymatique des formes agressives de l'oxygène, pose le problème fondamental de sa synthèse et surtout de sa régénération sous forme réduite active. Nous aborderons ici uniquement ce dernier point.

+ <u>Mise en évidence d'une activité glutathion réductase dans le</u> <u>latex</u> :

Le cytosol laticifère catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en présence de NADPH ou de NADH (figure 80). Cette activité thermolabile (non montré ici) rend compte de la présence d'une glutathion réductase, utilisant le NAD(P)H dans le cytosol du latex. A concentration égale en cofacteur réduit (1 mM), la glutathion réductase cytosolique est environ 15 fois plus active avec le NADPH comme substrat qu'en présence de son homologue non phosphorylé (NADH).



Figure 81 : MISE EN EVIDENCE ELECTROPHORETIQUE DES ACTIVITES GLUTATHION REDUCTASES DEPENDANTES DU NAD(P)H DANS LE CYTOSOL ET LE SEDIMENT DU LA-TEX.

Electrophorèses sur gel de polyacrylamide réalisées à partir de 15 μ l de cytosol ou de sédiment lavé et soniqué. La révélation des activités en présence et en absence de GSSG (2 mM) permet de différencier les activités glutathion réductases dépendantes du NAD(P)H, des activités NAD(P)H déshydrogénases ("rien réductases").

Il existe également une activité glutathion réductase utilisant le NADPH au niveau des organites sédimentables du latex. Elle reste toujours détectable après trois lavages successifs du sédiment par un tampon isotonique contenant du KCl 100 mM, mais elle est environ 20 fois moins active que l'enzyme soluble dans le cytosol.

+ Mise en évidence électrophorétique :

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide (figure 81) montrent l'existence d'une seule glutathion réductase utilisant préférentiellement la NADPH, commune aux deux compartiments. La révélation des zymogrammes en présence et en absence de glutathion oxydé (GSSG) permet de différencier sans équivoque les activités NAD(P)H déshydrogénases ("nothing réductase", NAD(P)H oxydase) des activités glutathion réductases, dans les deux compartiments. La mobilité électrophorétique similaire des "isozymes" cytosoliques et sédimentables, conforte l'hypothèse d'une contamination des organites du latex par une forte adsorption de la glutathion réductase cytosolique sur les structures membranaires. Cette adsorption probable de l'enzyme sur les structures membranaires peut d'ailleurs être significative du rôle protecteur physiologique de la glutathion réductase, vis-à-vis des lipides insaturés membranaires, cibles privilégiées des formes agressives de l'oxygène.

d) Conclusions et discussion :

Les composés thiols, et en particulier le glutathion, jouent un rôle central dans les processus de détoxification enzymatique ou non, de nombreuses formes agressives de l'oxygène ou de leurs dérivés (OH' H_2O_2 , hydroperoxydes organiques, quinones et semi-quinones, déhydroascorbate,...). Très sollicité dans ces processus de détoxification cellulaire, le glutathion est recyclé normalement en permanence sous sa forme réduite active, grâce à une activité glutathion réductase cytosolique, utilisant préférentiellement le NADPH. Cette enzyme a été récemment purifiée et partiellement caractérisée (PREVOT *et al.* 1984). Elle catalyse <u>irréversiblement</u> la réduction du GSSG en GSH. Elle fonctionne effectivement essentiellement avec le NADPH comme cofacteur, et son substrat, le GSSG est très spécifique. Dans la zone physiologique du pH physiologique (6,6 à 7,4), le Km de l'enzyme varie respectivement de 15 à 6 μ M pour le NADPH, entre 7,5 et 8,0. Cette enzyme peut avoir un rôle important en ce qui concerne la physiologie des laticifères. En effet, le GSH qu'elle régénère tient une place essentielle dans la protection des membranes subcellulaires contre les phénomènes d'oxydation pouvant se produire in situ.

B.3 - LES COMPOSES PHENOLIQUES :

Ces composés réducteurs, abondamment réprésentés chez les végétaux, sont le substrat de deux enzymes : les polyphénols oxydases et les peroxydases. Ils participent donc indirectement au piégeage et à l'élimination de tout excès d'O₂ et surtout d'H₂O₂ dans le milieu cellulaire, évitant ainsi l'apparition des formes radicalaires les plus toxiques de l'oxygène. On peut considérer, en première approximation, que leur rôle protecteur sera efficient dans la mesure ou les quinones (ou leurs produits de condensation) potentiellement toxiques résultant de leur oxydation, pourront être elles-mêmes détoxifiées grâce à l'action de réducteurschimiques endogènes puissants (ascorbate + RSH, essentiellement).

Les composés phénoliques du latex ont fait l'objet d'études antérieures (CRETIN, 1979 ; HANOWER *et al*. 1979). Leur concentration dans le latex est extrêmement variable. Elle dépend du cycle saisonnier, du mode d'exploitation des arbres, et des individus eux-mêmes. On peut trouver de 160 à 1100 μ g d'"équivalents noyau phénolique" totaux par ml de latex, ce qui correspond à des concentrations s'étalant entre 1,7 et 11,7 mM.

Rappelons par ailleurs que les valeurs minima et maxima de la somme (ascorbate + RSH) cytosolique sont respectivement de 3,5 à 8,4 mM dans le latex.

On peut admettre ainsi que la somme (phénols + ascorbate + RSH) constitue, dans la phase aqueuse du latex, une "réserve d'hydrogène" recyclable, et donc l'essentiel du pouvoir réducteur, susceptible d'assurer une protection efficace des laticifères vis-à-vis de certaines formes agressives de l'oxygène (H_2O_2 ; O_2 ; $QO \cdot$). Cependant, si le rapport (phénols totaux)/(ascorbate + RSH) est supérieur à l'unité, c'est-à-dire, si les composés phénoliques se trouvent en excès par rapport à la concentration en réducteurs forts, les composés quinoniques, alors non réductibles, sont susceptibles de jouer un rôle éminemment toxique vis-à-vis des structures biologiques (dénaturation et agglutination des protéines,...). Cette situation sera essentiellement réalisée dans le cas de latex se caractérisant par de très fortes activités oxydases et peroxydases.

B.4 - LES TOCOPHEROLS ET LES TOCOTRIENOLS DANS LE LATEX :

Les tocophérols et tocotriénols sont des antioxydants puissants, mais ils sont également très labiles car ils constituent des cibles privilégiées pour les formes les plus toxiques de l'oxygène (NISHIKIMI *et al*. 1980 ; Mc CAY *et al*. 1971). Leur rôle capteur des anions superoxydes a d'ailleurs été vérifié dans nos conditions expérimentales (tableau ³²).

Dans le latex, les tocophérols et tocotriénols sont essentiellement localisés à la périphérie des particules de caoutchouc (DUNPHY et al. 1965 ; WHITTLE et al. 1966). Cette localisation paraît très significative lorsque l'on sait que le caoutchouc naturel est en fait un polymère de cis-polyisoprène. Ses doubles liaisons, comme celles des polyènes analogues, sont susceptibles d'être oxydées puis rompues en présence de radicaux libres ou d'oxygène singulet (BATEMAN, 1946 ; LEONG et al. 1976).

On peut concevoir en l'occurrence qu'une activation des systèmes générateurs d'oxygène toxique (NADH oxydase...) associée à une diminution des activités protectrices (enzymatiques ou non), puisse engendrer une dégradation peroxydative partielle des chaînes de polyisoprène, *in situ*. Une telle attaque peroxydative des doubles liaisons du polyisoprène peut se répercuter sur les propriétés technologiques de caoutchouc (viscosité, plasticité et PRI), qui de ce fait seraient prédéterminées *in situ* (HANOWER *et al.* 1980).

Une partie des tocophérols et tocotriénols est également localisée au niveau des organites sédimentables du latex (ARCHER et al. 1969). Ils doivent dans ce cas assurer une protection efficace des lipides membranaires contre les éventuelles agressions peroxydatives.

C - LES PROTECTEURS DU LATEX : DISCUSSION ET CONCLUSION

Le latex contient donc tout un "arsenal", enzymatique et non enzymatique, capable d'assurer une détoxification efficace vis-à-vis des formes toxiques de l'oxygène, libérées par l'activité NAD(P)H oxydase lutoïdique.

La planche V illustre comment l'enchainement des diverses activités enzymatiques protectrices remplit ce rôle. Dans ce schéma, les "voies horizontales" correspondent aux "voies peroxydatives toxiques", aboutissant à la dégradation de la plupart des structures biologiques (lipides insaturés, acides nucléiques, protéines,...). Les "voies verticales" correspondent aux mécanismes protecteurs.
La première "ligne de défense" est assurée par les activités superoxydes dismutases. Elles évitent, entre autres, l'accumulation des superoxydes, qui, par interaction, peuvent libérer 0_2^1 (très toxique). En "deuxième ligne", les activités catalases, peroxydases non spécifiques et glutathion peroxydases se partagent le rôle d'éliminer l'eau oxygénée libérée dans le milieu. Elles réduisent ainsi les probabilités d'interaction d'H₂ 0 , et l'émission consécutive des formes les plus toxiques de l'oxygène (OH' et 0_2^1). En dernière "ligne de défense", nécessaire seulement dans le cas où des structures insaturées ont malgré tout subi une attaque peroxydative, le glutathion peroxydase reste la seule enzyme capable d'empêcher la propagation de la réaction en chaîne.

Ces voies enzymatiques spécialisées dans la protection des milieux biologiques vis-à-vis des formes agressives de l'oxygène, sont doublées d'une défense "apparemment passive", correspondant aux actions directes et indirectes des anti-oxydants, tels les d-tocophérols, et, dans une moindre mesure, les composés thiols réduits (glutathion) ainsi que l'acide ascorbique. Nous insisterons cependant sur le rôle central joué par le glutathion (GSH). Les schémas présentés dans la plance VI, résument l'intervention du GSH et de l'ascorbate dans la protection directe contre les agressions peroxydatives, et surtout, leur rôle essentiel dans les systèmes de recyclage de l'un des anti-oxydants des plus efficaces : les d-tocophérols. Le recyclage de ces derniers reste sous la stricte dépendance du recyclage du glutathion lui-même sous sa forme réduite active, grâce à l'activité GSSG réductase dépendante du NADPH. A ce titre, la disponibilité en NADPH dans le latex doit jouer un rôle clé.

Toutes les enzymes et les anti-oxydants nécessaires à une protection efficace des structures biologiques contre des agressions peroxydatives sont donc présentes dans le latex. La dégradation peroxydative des structures membranaires, *in situ*, ne peut donc être initiée que dans la mesure où il s'établit un "déséquilibre" anormal, entre activités peroxydatives toxiques et l'ensemble des activités protectrices au sein des laticifères.



PLANCHE V : SYSTEMES ENZYMATIQUES ET NON ENZYMATIQUES ASSURANT LA DETOXIFICATION DES OXYDES, DES HYDRO-PEROXYDES ET PEROXYDES ORGANIQUES BIOLOGIQUES

PLANCHE V



PLANCHE VI

<u>PLANCHE VI</u> : ROLES, INTERFERENCES ET SYSTEMES ASSURANT LE RECYCLAGE, ENZYMATIQUE OU CHIMIQUE, DES ANTI-OXYDANTS (REDUCTEURS) BIOLOGIQUES

- 4.59

LES PROTECTEURS ENZYMATIQUES ET NON ENZYMATIQUES

PRÉSENTS DANS LE LATEX FRAIS

RESUME

Le latex contient tout un "arsenal", enzymatique et non enzymatique, susceptible d'assurer efficacement sa protection vis-à-vis des formes toxiques de l'oxygène $(O_2^{-}, H_2O_2, OH^{-}, ...)$, libérées par l'activité NAD(P)H oxydase lutoïdique.

Nous confirmons l'existence et rapportons quelques caractéristiques, des activités catalases et peroxydases au sein du latex.

Nous mettons en évidence des activités superoxyde dismutases dans le cytosol et les lutoïdes, ainsi que des activités glutathion (GSH) peroxydase, glutathion (GSSG) réductase à NADPH, et glyoxalase I, localisées dans le cytosol du latex. Nous en rapportons également quelques caractéristiques.

Nous confirmons également la présence d'acide ascorbique et de thiols réduits (essentiellement sous forme de glutathion) dans la phase cytosolique du latex. Le rôle de ces anti-oxydants, associés aux tocophérols et aux composés phénoliques, est abordé en relation avec leur incidence dans les systèmes de détoxification du latex, vis-à-vis des formes les plus agressives de l'oxygène. Nous insistons particulièrement sur le rôle central joué par le glutathion.

Nous en concluons que la dégradation peroxydative des structures membranaires <u>in situ</u> ne peut être que le résultat de la mise en place d'un déséquilibre anormal (éventuellement pathologique), entre les activités peroxydatives toxiques NAD(P)H oxydase lutoïdique,..) et l'ensemble des activités protectrices (enzymatiques et non enzymatiques) au sein des cellules laticifères.

THE ENZYMATIC AND NON ENZYMATIC PROTECTIVE AGENTS

IN THE FRESH LATEX

ABSTRACT

The latex contains a whole enzymatic and non enzymatic system likely to protect itself effectively from the toxic forms of oxygen $(\overline{O_2}, H_2O_2, OH^\circ...)$ released by the lutoidic NAD(P)H oxidase activity.

We confirm that the catalase and peroxidase activities exist within the latex and we give a few characteristics of them.

We reveal some dismutase superoxide activities in the cytosol and the latex and we give a few characteristics of them.

We reveal some dismutase superoxide activities in the cytosol and the lutoids as well as some glutathione (GSH), peroxidase, NADPH reductase glutathione (GSSG) and glyoxalase I activities which are localized in the cytosol of the latex. We also give e few characteristics of them.

We also confirm that the ascorbic acid and the reduced thiols (mainly in the form of glutathione) are present in the cytosolic phase of the latex. The role of these antioxidants associated with the tocopherols and the phenolic compounds is studied as related to their influence on the detoxifying systems of the latex as compared to the most aggressive forms of oxygen. We lay particular stress on the main role played by glutathione.

We come to the conclusion that the peroxidative degradation of the <u>in situ</u> membrane structures can result only from an abnormal imbalance (possibly pathological) between the toxic peroxidative activities (lutoidic NAD(P)H oxidase...) and the whole protective activities (enzymatic and non enzymatic) within the latex cells. DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE IV

DESTABILISATION PEROXYDATIVE DES MEMBRANES RELATIONS AVEC LA PRODUCTIVITE ET L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DES LATICIFERES (ENCOCHES SECHES)

DESTABILISATION PEROXYDATIVE DES MEMBRANES, RELATIONS AVEC LA PRODUCTIVITE ET L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DES LATICIFERES (ENCOCHES SECHES)

La productivité des hévéas dépend en premier lieu de la durée de l'écoulement du latex après la saignée. Cette durée d'écoulement est déterminée par le déclenchement plus ou moins précoce des processus conduisant à la coagulation du latex sur l'encoche d'exploitation. A la limite, la coagulation peut être si précoce que le latex "perle" à peine lors de la saignée, et parfois même, ne s'écoule pas du tout, au moins sur une portion de l'encoche. Ces deux derniers cas correspondent au syndrome de l'encoche sèche, bien connu en hévéaculture (cf. Introduction).

Toutes les études menées jusqu'à ce jour montrent que le latex contient, à l'état latent, son propre système interne de coagulation.Les agents coagulants apparaissent tous être compartimentés à l'intérieur d'organites limitées par une membrane simple (lutoïdes) ou double (particules de FREY-WYSSLING) (cf. Introduction). C'est donc de la stabilité de ces membranes que dépendra la précocité de l'initialisation des processus conduisant à la coagulation du latex et l'obstruction des laticifères.

Nous venons de mettre en évidence deux grands types de facteurs biochimiques susceptibles de jouer un rôle déterminant dans la stabilité des systèmes membranaires au sein du latex :

* <u>Des facteurs provoquant la déstabilisation et la dégradation</u> <u>des membranes biologiques</u>. Il s'agit essentiellement de la NAD(P)H oxydase lutoïdique, qui catalyse indirectement la dégradation des lipides insaturés membranaires par émission de formes toxiques de l'oxygène (0⁻₂, H₂O₂, OH[•],...). On y associe dans une certaine mesure, les activités peroxydases, dont l'activité peut libérer, dans certaines conditions, des quinones toxiques QO[•] ou leurs produits de condensation agglutinants.

x <u>Des facteurs "protecteurs" des structures membranaires</u>. Cette protection est assurée avant tout par l'activité de certaines enzymes détoxifiantes, telles les catalases et les superoxyde dismutases. Elle est également assurée par des réducteurs chimiques cytosoliques comme les composés thiols réduits, l'acide ascorbique, les tocophérols,...

Nous avons analysé un certain nombre de ces caractéristiques biochimiques au sein du latex. La motivation de ces analyses est de déterminer comment se structurent ces différents facteurs, et leur relation avec la productivité et l'état physiologique des tissus laticifères des Hévéas.

A - SELECTION DES ARBRES ET CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ANALYSEES :

1) Sélection des arbres :

Dans un premier temps 70 hévéas ont été échantillonnés au vu de leur aspect végétatif homogène et de leur productivité, après avoir vérifié qu'ils sont indemnes d'attaques parasitaires(fomès, chancre,...) Les individus ont été ensuite répartis arbitrairement en 4 catégories :

- les arbres "hauts producteurs" (HP) (g/a/s > 76 g)
- les arbres "moyens producteurs" (MP) (76 < g/a/s < 41 g.)
- les arbres "bas producteurs" (BP) (g/a/s/<41 g)
- les arbres "atteints d'encoche sèche" (ES > 20 %)(g/a/s <40 g)
- 2) Caractéristiques biochimiques du latex analysées :

Dix caractéristiques biochimiques ont été analysées au niveau du latex de chaque individu :

- la consommation d'oxygène dépendante du NADH, par les lutoïdes;

- l'oxydation du NADH par les lutoïdes;
- l'indice d'éclatement des lutoïdes;
- l'activité peroxydase du cytosol;
- l'activité peroxydase des lutoïdes;
- l'activité catalase du cytosol;
- l'activité catalase du sédiment;
- l'activité superoxyde dismutase totale;
- les teneurs en acide ascorbique du cytosol;
- les teneurs en composés thiols réduits du cytosol.

Leur production de caoutchouc sec par saignée, a été systématiquement mesurée.

Ces données ont été traitées par différentes méthodes d'ANALYSE MULTIVARIABLE : Analyse en Composantes Principales (ACP), Analyses Factorielles des Correspondances (AFC), Analyse Discriminante (AD) et Classification Ascendante Hiérarchique (CAH). Seuls sont rapportés ici les résultats obtenus en ACP et CAH.

B - ANALYSES DES DONNEES:

1) Quelques données statistiques :

Le tableau (45) ci-dessous fournit quelques données statistiques concernant la variabilité des paramètres biochimiques du latex étudiés.

Paramètres analysés	Moyenne	écart type	erreur standard	minimum	maximum
thiols cyt.	2,176	0,546	0,065	1,250	3,660
ascorbate cyt.	3,323	0,584	0,070	2,250	4,730
catalase cyt.	18,470	0,052	1,082	6,400	54,000
catalase séd.	36,431	21,903	2,618	5,000	99,500
peroxydase séd.	0,776	0,330	0,039	0,150	1,840
peroxydase cyt.	0,194	0,085	0,010	0,044	0,415
SOD totale	41,586	11,535	1,379	16,000	63,000
0 ₂ consommé	39,929	36,377	4,348	1,000	193,000
NADH oxydase	12,397	10,586	1,265	1,000	58,100
indice éclat.	29,429	10,786	1,289	14,000	52,100
production	51,357	30,997	3,705	10,500	130,000

<u>Tableau 4</u> : Quelques données statistiques concernant les paramètres biochimiques du latex et la productivité. Etude réalisée sur 70 Hévéas (GT1).

Les concentrations sont exprimées en mM, les activités catalases en μ l 0₂ dégagé.min⁻¹; les activités peroxydases en U.DO (480 nm).min⁻¹; les superoxydes dismutases en % d'inhibition U.DO (560 nm); la consommation d'oxygène dépendante du NADH en μ l 0₂.min⁻¹ (lutoïdes soniqués) l'oxydation du NADH par les lutoïdes en μ M.min⁻¹; l'indice d'éclatement des lutoïdes en % la production de caoutchouc sec en g/a/s. (Cyt = cytosol; Séd. = sédiment) Toutes les activités enzymatiques sont rapportées à 50µl d'échantillon à l'exception de la consommation d'0₂ (250 µl lutoïdes).

	thiols	ascorb	.catal. cyt.	c at al . séd.	perox Sed.	perox cyto	SOD totale	O ₂ consom.	NADH oxydé	indice éclat.	Prod.
thiols	1,000										
ascorbate	0,710	1,000									
catalase cyto.	-0,119	-0,023	1,000								
catalase séd.	0,081	0,246	0,636	1,000							
perox séd.	0,197	0,149	-0,403	-0,179	1,000						
perox cyto.	-0,587	-0,639	0,032	-0,257	-0,268	1,000					
SOD latex	-0,022	0,061	0,042	0,129	-0,467	-0,027	1,000				
0, consommé	-0,630	-0,402	0,148	0,034	-0,249	0,551	-0,016	1,000			
NADH oxydé	-0,567	-0,414	0,391	0,142	-0,301	0,524	-0,120	0,751	1,000		
i. éclatement	-0,686	-0,717	0,156	-0,167	-0,340	0,741	-0,022	0,608	0,712	1,000	
production	0,686	0,697	0,029	0,227	0,407	-0,670	-0,163	-0,599	-0,587	-0,794	1,000

<u>Tableau 46</u> : Matrice des corrélations reliant par couple les paramètres biochimiques du latex suivants : teneurs en composés thiols et en ascorbate cytosolique, activités catalases cytosoliques et sédimentables, activités peroxydases sédimentables et cytosoliques, activités superoxydes dismutases totales des deux compartiments, consommation d'oxygène dépendante du NADH par les lutoïdes; oxydation du NADH par les lutoïdes ; Indice d'éclatement des lutoïdes mesuré "au champ"; production en grammes de caoutchouc sec/arbre/ saignée. (Les analyses ont porté sur 70 individus).

1.2 1

On notera, en particulier, l'énorme variabilité enregistrée sur la plupart des activités enzymatiques testées.

2) Matrice des corrélations par couples de paramètres :

Le tableau 46 regroupe les corrélations par couples de paramètres biochimiques étudiés. On remarquera en particulier :

a) <u>les corrélations positives très hautement significatives</u> <u>entre</u> :

- teneurs en acide ascorbique et teneurs en thiols, traduisant le pouvoir réducteur du latex ;

- les teneurs en thiols et en ascorbate avec la production. Ainsi un pouvoir réducteur élevé du latex serait plutôt favorable à la production du latex ;

- la consommation d'O₂ dépendante du NADH par les lutoïdes, et l'oxydation du NADH par les lutoïdes ;

- l'indice d'éclatement et la consommation d'0₂ et de NADH par les lutoïdes. Il y a donc bien une liaison entre l'activité NADH oxydase lutoïdique et l'instabilité de ces organites.

b) <u>Les corrélations inverses, très hautement significatives</u>, <u>entre</u> :

- le "pouvoir réducteur du cytosol" (thiol et/ou ascorbate), et les activités NADH oxydase et peroxydase cytosolique, ainsi que l'indice d'éclatement des lutoïdes ;

- la production et les activités peroxydases cytosoliques. -

Trois des corrélations parmi les plus marquantes sont figurées en annexe : la corrélation négative très hautement significative entre la production (log) et l'indice d'éclatement (AnnexeIIL1), les corrélations positives, également très hautement significatives, entre les teneurs en thiols réduits du cytosol et la production (Annexe III.2) d'une part, et l'indice d'éclatement des lutoïdes et la consommation d'oxygène dépendante du NADH par les lutoïdes (Annexe III.3) d'autre part.

Tableau 4/	Τa	зb	1	e	au	47
------------	----	----	---	---	----	----

INTERPRETATION ET INERTIE DES TROIS PREMIERS AXES DES A.C.P. PRENANT OU NON EN COMPTE LA PRODUCTION

(I) : Variables biochimiques + production ;

(II) : Variables biochimiques seules

	AXE 1 "Activités oxydatives toxiques"			AXE 2	AXE 3		
			"Activités	s catalases"	"Activités	superoxydes dismutases"	
	<u>I</u>	II	I	<u> </u>	<u> </u>	II	
Thiols	-0,828	-0,830	+0.070	+0,109	+0,058	+0,004	
Ascorbate cyt.	-0,777	-0,763	+0,271	+0,303	+0,011	+0,076	
Catalase cyt.	+0,194	+0,256	+0,829	+0,803	+0,276	+0,287	
Catalase Lut.	-0,119	-0,072	+0,840	+0,834	+0,258	+0,312	
Peroxydase Cyt.	+0,810	+0,809	-0,193	-0,230	-0,038	-0,118	
Peroxydase Lut.	-0,418	-0,409	-0,554	-0,560	+0,526	+0,529	
Superoxyde-dismut	tase +0,039	+0,004	+0,355	+0,391	-0,838	-0,825	
Oxygène Cons.Lut	. +0,772	+0,788	+0,103	+0,061	+0,192	+0,146	
Oxydation NADH Lu	ut. +0,787	+0,814	+0,263	+0,215	+0,336	+0 ,3 02	
Indice d'éclateme	entLut. +0,913	+0,907	-0,063	-0,102	+0,022	-0,039	
Production	-0,877		+0,126		+0,242		
INERTIE des axes	(%) 45.36	42.68	18.56	20.24	12.14	12.73	

3) Analyses en composantes principales :

Nous avons dans un premier temps effectué deux analyses en Composantes Principales (ACP) normées. Dans la première ACP ("I"), les variables biochimiques et la production des arbres ont été introduites ensemble, en tant que variables actives. Dans la seconde ACP ("II"), seules les variables biochimiques du latex ont été prises en compte, à l'exclusion du paramètre production.

a) Les résultats de ces deux ACP comparés dans le tableau 47 montrent l'identité des <u>axes</u> :

- La première composante associe les "fortes activités oxydatives toxiques" (NADH oxydase lutoïdique et peroxydases cytosoliques) à de faibles teneurs en réducteurs protecteurs chimiques cytosoliques (acide ascorbique et composés thiols). La conjonction de cet ensemble de paramètres se traduit par des indices d'éclatement des lutoïdes plus élevés, et une diminution corrélative de la production des hévéas. Ce premier axe, qui explique environ 45 % de la variabilité introduite, ne fait pas intervenir les enzymes classiquement détoxifiantes (catalase et SOD). Il s'agit donc d'un axe rendant compte essentiellement du caractère "oxydatif" (ou en sens opposé "réducteur") du milieu intralaticifère.

- Le deuxième axe fait intervenir essentiellement les fortes activités catalases du cytosol et du sédiment, associées à de faibles activités peroxydases lutoïdiques. On peut ainsi assimiler cet axe à un "axe catalase". Il rend compte d'environ 20 % de la variabilité introduite.

- Enfin, le troisième axe oppose de faibles activités superoxyde dismutases, à des "activités oxydatives toxiques" élevées (NADH oxydases et peroxydases lutoïdiques). Cet axe rend compte d'environ 12,5 % de la variabilité introduite.

Ces trois premiers axes regroupent environ 77 % de la variabilité totale observée dans les deux types d'analyses. On considère donc les 7 (I) ou 8 (II) axes, se partageant les 23 % de la variabilité non expliquée par les trois premiers, comme des axes résiduels.



Figure 82 : PROJECTION DES INDIVIDUS HEVEAS DANS LES PLANS (1-2) (fig. 82-A) ET (2-3) (fig. 82-B), DEFINIS PAR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES DU LATEX, ETUDIES DANS L'ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES.

.1

b) <u>Projection des individus dans les plans définis par les</u> variables biochimiques :

La figure 82 représente la projection des individus dans les plans 1-2 et 2-3 définis par les paramètres biochimiques de leur latex. Chaque individu hévéa est affecté d'un symbole différent selon son appartenance à un groupe de productivité (HP, MP, BP) ou son état physiologique (ES).

La figure 82-a montre que dans le plan 1-2, la composante d'"activité oxydasique toxique" (axe l) oppose bien l'ensemble indivisible des arbres haut et moyen - producteurs, aux arbres bas-producteurs et/ou atteints du syndrome d'encoche sèche.

Les deux figures montrent que les activités catalases (axe 2) permettent de différencier les arbres atteints d'encoche sèche d'un groupe particulier d'Hévéas bas producteurs (noté B), caractérisé par de fortes activités catalases mais de faibles activités superoxyde dismutases.

Enfin, la figure 82-b met en évidence que les "activités superoxyde dismutase" (axe 3) séparent le groupe des bas producteurs du "type A" (SOD élevés) des deux groupes d'arbres atteints d'encoche sèche ou bas-producteurs du "type B".

4) Classification ascendante hiérarchique :

La figure 83 présente les résultats de la Classification ascendante hiérarchique (programme ADDAD:UTCAHCO2). La CAH confirme la présence des 4 sous-ensembles, définis de manière quasi-disjonctive par différentes orientations des voies enzymatiques impliquées dans la stabilisation-déstabilisation des structures membranaires au sein du latex d'Hévéa.

On remarquera en particulier que le groupe des arbres hautproducteurs et moyen - producteurs reste parfaitement indivisible. Les variables prises en compte dans cette analyse n'expliquent donc que les variations extrêmes des productivités, en discriminant parfaitement les arbres bon - producteurs des arbres bas producteurs et/ou atteints d'encoche sèche.

On notera également que les encoches sèches constituent un cas particulier des bas-producteurs et ne semblent pas dériver directement des arbres à tendance "haut-producteurs".



Figure 83 : ARBRE DE CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE, DIFFERENCIANT, PAR UN ENSEMBLE DE VARIABLES BIO-CHIMIQUES, DES GROUPES D'HEVEAS, EN FONCTION DE LEUR PRODUCTIVITE OU DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LEURS TISSUS LATICIFERES ("ENCOCHES SECHES").

C - DISCUSSION ET CONCLUSION :

1

Les différentes méthodes d'analyse des données utilisées nous ont permis de montrer que les variables biochimiques étudiées suffisent à expliquer les variations "extrêmes" de la productivité des Hévéas d'une part, et une anomalie physiologique du fonctionnement de leurs tissus laticifères : le syndrome des encoches sèches, d'autre part.

Quelle que soit la méthode d'analyse utilisée (ACP, CAH et AFC (voir CRETIN et NOIROT, 1982)), nous avons pu définir des groupes d'individus caractérisés par des "HYPER-ACTIVITES" ou des "HYPO-ACTIVITES" ENZYMATIQUES. Ces activités correspondent aux composantes décrites par les différentes analyses, à tel point que l'on peut assimiler "une composante principale à une voie enzymatique"!

Nous avons pu ainsi déterminer comment se structurent les différents facteurs stabilisant et déstabilisant les systèmes membranaires en relation avec la productivité et l'état physiologique des tissus laticifères. D'autres types d'analyses biochimiques, concernant l'intensité du métabolisme régénératif intralaticifère (cf. I ch.II) ont déjà permis de discriminer les groupes d'arbres bas producteurs, moyen - producteurs et haut - producteurs. Cependant cette discrimination biochimique rapportée ici entre bas-producteurs et arbres atteints d'encoche sèche, est à notre connaissance, la première qui apparaisse clairement. L'importance des phénomènes d'oxydation des lipides insaturés membranaires, expliquant la fragilité des organites du latex, dans le cas d'hévéas bas producteurs ou atteints d'encoche sèche, s'en trouve singulièrement renforcée.

Notons, en outre, que la déstabilisation membranaire n'atteint pas spécifiquement et uniquement les lutoïdes. Nous avons en effet montré par ailleurs (CRETIN et BANGRATZ, 1983) que d'autres organites du latex, comme les particules de FREY-WYSSLING, sont également lysées dans le cas d'arbres atteints d'encoche sèche. Cette lyse est d'ailleurs proportionnelle à la gravité de l'atteinte. Il semble dès lors très probable que tous les systèmes membranaires intralaticifères (plasmalemme, mitochondries, membrane nucléaires,...) soient également touchés par le phénomène oxydatif. Nous en imaginons aisément les conséquences néfastes au niveau des diverses fonctions cellulaires, incompatibles avec le maintien d'une vie cellulaire normale. Il s'agit là d'un véritable phénomène de sénescence cellulaire ou tissulaire, initié au niveau des lysosomes eux-mêmes (les lutoïdes), au sein du latex.



Figure 84 : AUTO-DESTABILISATION DU TONOPLASTE LUTOIDIQUE/COAGULATION PRECOCE DU LATEX/SENESCENCE DES LATICIFERES ET SYNDROME DES ENCOCHES SECHES.

La figure 84 résume les différentes situations mettant en relation les composantes biochimiques intervenant dans la stabilité et la déstabilisation de la membrane lutoïdique (comme modèle), avec la productivité des hévéas ou l'état physiologique de leurs laticifères.

Les flèches sombres correspondent aux activités oxydatives et peroxydatives à caractère toxique ; les flèches claires correspondent aux activités (enzymatiques ou non) détoxifiantes vis-à-vis des formes agressives de l'oxygène ; enfin la taille des flèches donne une indication des activités relatives de chaque enzyme, ou des teneurs en "protecteurs", impliquées dans le système.

Si les arbres bon- producteurs, se caractérisent par des activités enzymatiques détoxifiantes relativement faibles, ils se caractérisent également par des activités génératrices d'oxygène toxique faibles ou nulles. Ils sont par ailleurs protégés d'une activation accidentelle des enzymes peroxydantes, par de fortes teneurs en composés réduits.

Ainsi, en prenant comme base de comparaison les arbres dits "normaux" (globalement bon - producteurs : HP et MP), les arbres bas producteurs et ceux atteints d'encoche sèche se caractérisent par une hyperactivité NADH oxydase lutoïdique émettant des formes toxiques de l'oxygène $(0\frac{7}{2}$ et H_2O_2).

- en présence de faibles activités catalases et de fortes activités SOD, les "bas-producteurs du type A" vont avoir tendance à accumuler de $1'H_2O_2$. Celle-ci sera utilisée par les fortes activités peroxydase émettant probablement des quinones toxiques du fait des relativement faibles teneurs en réducteurs protecteurs. Une autre partie de $1'H_2O_2$ pourra entrer en interaction avec d'autres formes toxiques de $1'O_2$, et provoquer une certaine dégradation des structures membranaires insaturés.

- en présence de faibles activités SOD, les "bas producteurs du type B" auront tendance à accumuler anormalement les anions superoxydes (0_2^-) . Ceux-ci, en présence de traces d'eau oxygénée et de catalyseur métalliques toujours présents dans le latex, vont entrer en interaction selon une réaction du type HABER-WEISS, et libérer ainsi des radicaux hydroxyles hautement toxiques. Cependant le système reste relativement protégé grâce à la présence de fortes activités catalases qui empêchent toute accumulation d'H₂O₂.

Les bas producteurs ont donc perdu une des deux enzymes clefs de leurs voies détoxifiantes, mais au moins l'une d'elles reste très active (SOD pour "A" et catalase pour "B") limitant ainsi la dégradation complète des structures membranaires. Par ailleurs, les fortes activités peroxydases, bien que toxiques, évitent toute accumulation d' H_2O_2 , et les quinones émises peuvent dans une certaine mesure encore être partiellement détoxifiées par l'intermédiaire de teneurs encore non négligeables en réducteurs protecteurs. Les systèmes membranaires sont donc fragilisés mais pas détruits.

Remarquons enfin que si un bas producteur perd son activité catalase (type B) ou superoxyde dismutase (type A) il semble probable qu'il devienne un arbre atteint d'encoche sèche.

Les arbres atteints d'encoche sèche se caractérisent par des hyper-activités NADH oxydases, de très faibles SOD, et une disparition virtuelle des activités catalases. Il y a donc forte accumulation d'anions superoxydes. Ces derniers peuvent se dismuter spontanément en H_2O_2 (+ lentement) qui s'accumule également. Ils peuvent alors entrer en interaction avec une très forte probabilité, selon les réactions de FENTON et d'HABER-WEISS, et donner naissance aux formes les plus agressives de l'oxygène (OH, O_2^1). Les lipides insaturés sont donc exposés à une intense dégradation peroxydative. En absence de concentration suffisante en réducteurs protecteurs chimiques, les très fortes activités peroxydases contribuent à la dégradation du système en émettant des quinones toxiques et des produits de leur condensation.

Chez les arbres gravement atteints d'encoche sèche, les systèmes membranaires sont donc complètement déstabilisés. L'une des conséquences en est la lyse des lutoïdes, et l'épenchement dans le milieu intralaticifère des facteurs coagulants qu'ils contiennent normalement à l'état latent. Il s'en suit la coagulation du latex in situ et l'arrêt définitif de son écoulement.

DESTABILISATION PEROXYDATIVE DES MEMBRANES : RELATIONS AVEC LA PRODUCTIVITE ET L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES LATICIFÈRES (ENCOCHES SÈCHES)

RESUME

Nous étudions 10 caractéristiques biochimiques du latex rendant compte des activités peroxydatives toxiques et des activités protectrices, supposées impliquées dans les phénomènes de stabilisation/déstabilisation des structures membranaires.

Le latex provient de 70 arbres :

- sains (haut-, moyen- ou bas-producteurs) ;

- ou atteints d'encoche sèche (non délibérément induite).

Différentes méthodes d'analyse multivariable des données (ACP, CAH,...) montrent que les variables biochimiques prises en compte suffisent à expliquer les variations extrèmes de la productivité des hévéas, ainsi que l'anomalie physiologique correspondant au syndrome des encoches sèches. Ainsi, quelle que soit la méthode utilisée, nous avons pu définir des groupes d'individus (hévéas) caractérisés par des "HYPER-ACTIVITES" ou des 'HYPO-ACTIVITES" ENZYMATIQUES. On peut alors déterminer commentse structurent, entre eux, les différents facteurs biochimiques stabilisant et déstabilisant les systèmes membranaires, en relation avec la productivité et l'état physiologique des tissus laticifères.

Le groupe des hévéas bas-producteurs ou atteints d'encoche sèche se différencie du groupe indivisible des arbres haut- et moyen-producteurs, par des "hyper-activités peroxydatives toxiques" (fortes activités NADH oxydase lutoïdique et peroxydase cytosolique) associées à de faibles teneurs en antioxydants cytosoliques (acide ascorbique et thiols réduits). La conjonction de cet ensemble de paramêtres se traduit par une déstabilisation de la membrane lutoïdique (indice d'éclatement élevé), et une diminution corrélative de la production des arbres. Un deuxième facteur, représenté par les activités catalases du latex, permet de différencier le groupe des arbres atteints d'encoche sèche, d'un groupe particulier d'arbres bas-producteurs.

Un troisième facteur, correspondant essentiellement aux activités superoxyde dismutases, sépare un autre groupe d'hévéas bas-producteurs, du groupe des arbres atteints d'encoche sèche.

L'ensemble des résultats acquis nous permettent de modéliser les différentes situations rencontrées :

- les arbres bas-producteurs se caractérisent par des activités NADH oxydases lutoïdiques anormalement élevées, et par la perte de l'une des deux activités enzymatiques clefs impliquées dans les systèmes de détoxification (SOD <u>ou</u> catalase). Cependant l'une d'elles reste encore suffisamment active, et les concentrations en antioxydants cytosoliques encore suffisantes, pour limiter la dégradation des structures membranaires.

- Les arbres gravement atteints d'encoche sèche (non délibérément induite) se caractérisent par des hyper-activités NADH oxydase lutoïdique et peroxydases cytosoliques, ainsi que par la *quasi* disparition des activités SOD <u>et</u> catalases, associée à de très faibles teneurs en antioxydants (protecteurs chimiques). Chez les arbres atteints d'encoche sèche, les structures membranaires du latex sont donc complètement déstabilisées. L'une des conséquences en est la lyse des lutoïdes, et l'épanchement dans le milieu intralaticifère, des facteurs coagulants qu'ils contiennent normalement à l'état latent. Il s'en suit la coagulation du latex *in situ*, et l'arrêt définitif de son écoulement.

Notre théorie postulant l'intervention d'un déséquilibre pathologique entre "activités peroxydatives toxiques" et "activités protectrices" des structures membranaires, au sein des laticifères des arbres atteints d'encoche sèche, se trouve ainsi singulièrement confortée. Le syndrome des encoches correspondrait donc bien à un processus de dégénérescence ou de sénescence précoce des cellules laticifères, induit par un déséquilibre rédox intra-cellulaire, et dont la phase décisive correspond à une autolyse *in situ* des structures lysosomales, que constituent les lutoïdes.

THE PEROXIDATIVE DESTABILIZATION OF THE MEMBRANES :

RELATIONS WITH THE PRODUCTIVITY AND THE PHYSIOLOGICAL STATE

OF THE LATICIFERS (BROWN BAST)

ABSTRACT

We study 10 biochemical characteristics of the latex by accounting for the toxic peroxidative activities and the protective activities which are supposed to be involved in the stabilization/destabilization phenomena of the membrane structures.

The latex originates from 70 trees :

- healthy ones (high, mean, or low-yielding);

- or affected by brown bast (not induced deliberately).

Various methods of multivariate analysis (ACP, CAH...) show that the biochemical variables considered are adequate to account for the extreme variations in the hevea productivity as well as the physiological anomaly corresponding to the syndrome of brown bast. Therefore, whatever the method used may be, we could define some groups of individuals (heveas) characterized by ENZYMATIC "HYPERACTIVITIES" or "HYPOACTIVITIES". Then, one can determine how the different biochemical factors which stabilize and destabilize the membrane systems are structured as related to the productivity and the physiological state of the laticiferous tissues.

The group of low-yielding heveas or of heveas affected by brown bast is distinguished from the indivisible group of the high and mean yielding trees by some "toxic peroxidative hyperactivities" (strong NADH oxidase lutoidic and peroxidase cytosolic activities) associated with low percentages of cytosolic antioxidants (ascorbic acid and reduced thiols). The whole parameters result in a destabilization of the lutoidic membrane (high splitting index) and in a correlative decrease in the tree production. A second factor which is represented by the catalase activities of the latex allows to distinghuish the group of trees affected by brown bast from a specific group of low-yielding trees.

A third factor which corresponds mainly to the dismutase superoxide activities differentiates another group of low-yielding Heveas from the group of trees affected by brown bast.

The whole results obtained allow us to modelize the different situations observed :

- the low-yielding trees are characterized by abnormally high NADH oxidase lutoidic activities and by the loss of one of the two key enzymatic activities involved in the detoxifying systems (SOD or catalase). However, one of them is still active enough and the concentrations of cytosolic antioxidants are still adequate to limit the degradation of the membrane structures.

- the trees which are severely affected by brown bast (not induced deliberately) are characterized by NADH oxidase lutoidic and peroxidase cytosolic hyperactivities as well as by the quasi disappearance of the SOD and catalase activities associated with very low antioxidant contents (chemical protective substances). Therefore, the membrane structures of the latex are totally destabilized in the trees affected by brown bast, thus resulting in the lysis of the lutoids and the overflow in the intralaticiferous medium of the coagulants which are normally contained in them at the latent stage. Then on can observe the coagulation of the latex in situ and the stoppage of its flow.

Our theory which assumes the existence of a pathological imbalance between the "toxic peroxidative activities" and "the protective activities" of the membrane structures within the laticifers of the trees affected by brown bast is particularly confirmed. Therefore, the syndrome of brown bast would, indeed, correspond to a process of early degeneration or senescence of the latex cells which is induced by an intracellular redox imbalance and whose final phase corresponds to an autolysis in situ of the lysosomal structures formed by the lutoids.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE V

INDUCTION D'UN TYPE D'ENCOCHE SECHE LORS DE LA SURSTIMULATION DES HEVEAS PAR L'ETHREL

INDUCTION D'UN TYPE D'ENCOCHE SECHE LORS DE LA STIMULATION DES HEVEAS, PAR L'ETHREL

Les Hévéas atteints d'encoche sèche se caractérisent par une instabilité extrème des organites de leur latex.

Nous avons par ailleurs démontré une corrélation positive entre l'intensité des traitements stimulants à l'Ethrel (fréquence et dose) et le nombre d'arbres, sains au départ, ou le syndrome d'encoche sèche apparaît (CRETIN, 1979-a; BZROZOWSKA-HANOWER et al., 1979). Les arbres chez lesquels le syndrome d'encoche sèche a été volontairement induit par une surexploitation (surstimulation), se caractérisent également par une diminution, voire par une disparition virtuelle, de la fraction sédimentable, après centrifugation de leur latex (cf. page 81, planche III) (CRETIN, 1979-a).

Il semble donc que la surstimulation hormonale des arbres puissent constituer l'un des facteurs causal, induisant l'apparition d'encoches sèches.

Nous avons tenté de vérifier dans quelle mesure la surstimulation des Hévéas par l'Ethrel était capable d'induire une déstabilisation des organites du latex. Pour ce faire, nous avons suivi dans le temps, et au cours de stimulations successives, un certain nombre de paramètres, biochimiques du latex que l'on sait importants dans les processus conduisant à la stabilisation ou à la déstabilisation des structures membranaires au sein du latex.

A - SÉLECTION DES ARBRES ET PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1 - SELECTION ET EXPLOITATION DES ARBRES :

Dans un premier temps, 48 arbres âgés de 16 ans (clône GT1) ont été sélectionnés au vu de leur aspect végétatif homogène et de l'absence de tout symptôme apparent d'encoche sèche. Ces arbres supposés sains au départ, sont catalogués comme "moyen - producteurs" (62 ± 7 grammes de caoutchouc sec/arbre /saignée), et sont saignés en spirale entière, deux foix par semaine (S J/3 J/4), depuis 18 mois au moins, avec 3 stimulations annuelles. La dernière stimulation de tous les arbres a été effectuée 4 mois avant le début de l'expérimentation.

Les 48 arbres sélectionnés sont divisés en 4 lots de 12. Deux lots sont exploités en S J/3 J/4, et non stimulés. Ils correspondent aux arbres "témoins". Les deux autres lots, également saignés en S J/3 J/4, sont stimulés sous encoche, par une <u>surdose d'Ethrel</u> (220 mg de matière active/arbre/ traitement), et en <u>surfréquence</u> (8 fois par an).

2 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET ANALYSES BIOCHIMIQUES EFFECTUEES :

a) Protocole :

Tous les arbres sont saignés le même jour. Dans le cas des arbres stimulés, le traitement stimulant est appliqué systématiquement dans l'intervalle J/4, c'est-à-dire 2 jours après la dernière saignée précédant la stimulation, et 2 jours avant la première saignée consécutive à l'application de l'agent stimulant. Dans la mesure où aucune perturbation (climatique) empêche le prélèvement des échantillons de latex, le latex de l2 hévéas stimulés et l2 hévéas témoins sont prélevés systématiquement, 2 saignées avant la stimulation (notées -2 et -1) puis au cours des 9 saignées suivant la stimulation (notées +1, +2, +3,... +9).

Ne connaissant pas au début de l'expérience la probabilité d'obtenir des arbres atteints du syndrome d'encoche sèche, et par suite des contraintes matérielles (capacité de centrifugation puis d'analyses des échantillons), un lot d'arbres traités et son lot témoin sont suivis le plus régulièrement possible au cours d'une "campagne de stimulation" (2 saignées avant et 9 saignées après) : soit 24 arbres suivis individuellement et simultanément. L'autre lot (traité et témoin) est suivi en alternance au cours de la campagne de stimulation suivante. Dès que dans un lot d'arbres stimulés, les premiers symptomes d'encoche sèche typique ont été perceptibles (fortes difficultés d'écoulement, apparition de zones non productrices), nous avons suivi préférentiellement ce lot d'arbres le plus fortement atteint (constitué au départ) avec son lot témoin .

b) Analyses effectuées :

On a récolté (dans un bain de glace) 20 ml de latex par arbre sur lesquels on a mesuré individuellement l'indice d'éclatement des lutoïdes, puis après centrifugation (75.000 g, 40 min) on a déterminé (voir matériel et techniques), individuellement sur chaque latex :

- l'activité NADH oxydase lutoïdique, en suivant la consommation d'oxygène par les lutoïdes, en présence de NADH (0,5 mM) et de Fe³⁺+ADP (50 et 100 µM respectivement);

- les teneurs en thiols réduits cytosoliques;

- les activités superoxyde dismutases totales;

- les activités catalases du cytosol et du sédiment.

D'autres caractéristiques biochimiques ont été également suivies plus ponctuellement (les teneurs en acide ascorbique cytosolique, les activités peroxydases et polyphénol oxydases, et l'émission de superoxydes par les lutoïdes en présence de NADH).

Les résultats rapportés ici ne concernent que les analyses suivies régulièrement, et les plus significatives.

Les productions sont estimées par peséedes coagulums de "fond de tasse", séchés à l'étuve, corrigée pour les volumes de latex prélevés pour les différentes analyses.

B - RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés en % par rapport aux valeurs de la moyenne des 12 arbres témoins (ligne de base 100 %) calculés pour chaque prélèvement. La valeur moyenne pondérale des caractéristiques du lot d'arbres témoins (12 arbres) et son écart type, calculée pour chaque "campagne de stimulation" (2 saignées avant et 9 saignées après l'application du traitement stimulant sur le lot homologue traité), sont reportées au niveau de la ligne de base de chaque figure. La réponse à la stimulation du lot considéré est scindée en deux courbes :

- une courbe présentant la réponse moyenne des arbres qui sont restés sains (ou apparemment sains) après la septième stimulation (symboles "pleins" et traits "pleins");

- une courbe présentant la réponse moyenne des arbres qui ont présenté des symptomes évidents d'encoche sèche, avant ou à partir du septième traitement stimulant (symboles vides et pointillés).

Ces deux sous ensembles ont été constitué, a posteriori.

1 - APPARITION DES SYMPTOMES D'ENCOCHE SECHE :

a) Sur les douze arbres surstimulés, suivis le plus régulièrement, et <u>tous sains au départ</u>, deux arbres ont présenté des signes caractéristiques <u>d'encoche sèche</u> à la deuxième saignée consécutive <u>à la cinquième stimulation</u> (fin juillet), sous forme d'un tarissement total et définitif d'une portion de leur encoche (18 et 27 % de la longueur totale, dans le tiers supérieur). Deux autres arbres présentaient dans le même temps des <u>difficultés d'écoulement</u> évidents, sans toutefois montrer de zone sèche typique.

Lors de la deuxième saignée consécutive à la <u>septième stimu-</u> <u>lation</u> (fin septembre) les deux arbres précédemment atteints (5ème Sti.) montraient une <u>extension significative</u> et irréversible de la longueur de <u>leur encoche sèche</u> (respectivement 26 et 58 %). L'un des deux arbres présentant des difficultés d'écoulement (5ème Sti.) était <u>atteint d'en-</u> <u>coche sèche typique</u> sur 21 % environ de la longueur de son encoche (dans le tiers inférieur), et le deuxième arbre présentait une <u>encoche irréguliè-</u> <u>rement tarie</u> (18 % au total, répartis sur toute la longueur de son encoche d'exploitation).

Dans le même temps, le lot d'arbres témoins correspondant ne présentait aucun signe véritablement typique du syndrome d'encoche sèche (seul un arbre présentait quelques difficultés d'écoulement, sans jamais toutefois devenir sec, ou partiellement sec).

b) Dans le deuxième groupe d'arbres, dont nous ne rapportons pas ici les résultats des analyses biochimiques trop fragmentaires, deux arbres sur les douze stimulés présentaient des symptomes d'encoche sèche à la cinquième stimulation (10 et 16 % de l'encoche), et trois au total après la septième stimulation (8 et 18 et 25 %), tous situés dans la moitié supérieure de l'encoche). Le groupe correspondant d'arbres témoins n'a montré aucun symptome typique de sécheresse.



SAIGNÉES APRÈS LA STIMULATION

C) Au total, sur les 24 arbres surstimulés, après 10 mois d'expérimentation et 7 stimulations (en sur-dose) 1 arbre était gravement atteint d'encoche sèche (58 %), 2 arbres présentaient des symptomes d'encoche sèche irréversible sur au moins 25 %, et 3 arbres sur au moins 18 % de la longueur totale de leur encoche. Enfin, 1 arbre était irrégulièrement tari ("points secs").

2 - SURSTIMULATION ET PRODUCTION DU LATEX (FIGURE 85) :

a) Lors de la première stimulation (fin janvier) (figure 85-a); les deux sous-groupes d'hévéas (les 8 qui resteront sains, et les 4 qui présenteront ultérieurement des symptomes d'encoche sèche) répondent d'une façon analogue. L'effet est maximum dans les deux cas (> 200 % par rapport au témoins) pendant les trois premières saignées après l'application du traitement stimulant. L'allure des réponses à la stimulation est tout à fait comparable lors des 3 traitements suivants (mi-février, fin avril, début juin) (non figurées ici).

 b) On note une différence sensible des réponses, lors de la 5ème stimulation (fin juillet), entre les deux sous-groupes constitués a posteriori (figure 85-b) :

- le groupe des arbres qui resteront sains tout au long de l'expérimentation, présente une réponse normale, analogue à celle observée lors des stimulations précédentes. Ils ont une production encore sensiblement supérieure à celle des témoins à la 9ème saignée après le traitement stimulant ;

- le groupe des arbres qui présenteront des symptomes d'encoche sèche, montre une réponse d'amplitude normale lors de la première saignée suivant le traitement stimulant. <u>Dès la deuxième saignée, leur réponse à</u> <u>la stimulation diminue fortement</u>, et leur production passe en-dessous de celle du groupe des témoins non stimulés, dès la 4ème saignée. Le déficit <u>de production persiste par la suite</u>, et se stabilise à des valeurs 20 % en-dessous de celles des arbres témoins.

Dès la 2ème saignée, 2 arbres sont partiellement secs (18 et 27 % de l'encoche); et 2 autres présentent des difficultés d'écoulement.

Notons que la réponse à la 6ème stimulation (non figurée) est analogue à celle décrite ci-dessus.





c) Lors de la 7ème stimulation, (fin septembre), le groupe des 8 arbres sains présente une réponse d'allure et d'amplitude normale, leur production reste toujours supérieure à celle des arbres non stimulés.

Les arbres présentant des symptomes avancés d'encoche sèche, ou des difficultés d'écoulement avant cette stimulation, voient une aggravation de leur atteinte. De fait, s'ils gardent encore une capacité à répondre au traitement stimulant, leur réponse est faible, et leur production lors des deux premières saignées consécutives à cette stimulation dépasse à peine celle des témoins. Par la suite, leur production se stabilise à un niveau correspondant à peine à 50 % de la production des arbres non stimulés. A ce stade, 4 arbres présentent des symptomes typiques d'encoche sèche.

3 - SURSTIMULATION ET INDICE D'ECLATEMENT DES LUTOIDES (FIGURE 86) :

Chez les arbres qui resteront sains tout au long de l'expérimentation, la stimulation à l'Ethrel se traduit systématiquement (quelle que soit l'époque) par une très légère augmentation fugace de l'indice d'éclatement de leurs lutoïdes, lors de la première saignée après le traitement stimulant. Au cours des saignées suivantes, l'indice d'éclatement des lutoïdes provenant des arbres stimulés se stabilise en-dessous des valeurs mesurées dans le latex des arbres témoins (15 à 20 %).

Lors de la première stimulation (janvier) (figure 86-a), et des trois stimulations suivantes (non figurées), les lutoïdes des arbres stimulés, qui présenteront ultérieurement des symptomes d'encoche sèche, montrent une réponse analogue à celle des arbres stimulés qui resteront sains.

A la 5ème stimulation (juillet), l'indice d'éclatement dans le latex des arbres susceptibles aux encoches sèches augmente parallèlement à celui mesuré pour les arbres sains, lors de la première saignée après le traitement. Cependant, <u>leur indice d'éclatement continue à augmenter au</u> cours des saignées suivantes. Il se stabilise lors des 7 à 9 saignées, suivant le 5ème traitement stimulant, à des valeurs supérieures de 50 % à celle de la moyenne des arbres témoins non stimulés (figure 86-b).

La 7ème stimulation aggrave encore l'instabilité des lutoïdes issus des arbres susceptibles à l'encoche sèche (figure 86-b).

486 .



SAIGNÉES APRÈS LA STIMULATION

4 - SURSTIMULATION ET ACTIVATION DE LA NADH OXYDASE LUTOIDIQUE :

La figure 87 montre l'effet des stimulations à l'Ethrel sur les activités NADH oxydases lutoïdiques. Elle montre que la stimulation engendre une activation transitoire de l'activité NADH oxydase lutoïdique pendant les deux premières saignées consécutives à l'application du traitement. Lors des saignées suivantes, l'activité NADH oxydase revient à des valeurs normales (témoins) chez les arbres qui resteront sains pendant toute la durée de l'expérience.

Parallèlement à l'augmentation de l'indice d'éclatement, les arbres susceptibles à l'encoche sèche montrent une augmentation transitoire de l'activité NADH oxydase analogue à celles des arbres sains, lors du premier traitement stimulant (figure 87-a), et les 3 suivants (non figurés).

Par contre, le 5ème traitement stimulant (figure 87-b) induit une activation de très forte amplitude, et durable de la NADH oxydase lutoïdique, chez les arbres susceptibles à l'encoche sèche. Après la 7ème stimulation, l'activité NADH oxydase des lutoïdes des arbres atteints d'encoche sèche se stabilise à un niveau 10 à 12 fois supérieur à celui des arbres sains stimulés ou non (figure 87-c).

5 - SURSTIMULATION ET EVOLUTION DES TENEURS EN THIOLS CYTOSOLIQUES :

La stimulation à l'Ethrel induit une diminution des teneurs en thiols réduits cytosoliques pendant les 3 à 4 saignées consécutives aux traitements stimulants (figure 88). Chez les arbres qui resteront sains, l'effet est maximum, entre la 2ème et la 4ème saignée après l'application du traitement. Par la suite les teneurs en thiols réduits cytosoliques remontent, puis dépassent celles du latex des arbres témoins, après la 6ème saignée suivant la stimulation.

Lorsque l'apparition d'encoche sèche est induite (5ème saignée après la stimulation, figure 88-b et c), les arbres atteints voient les teneurs en thiols de leur latex diminuer irréversiblement. Lorsque les symptomes d'encoche sèche sont définitivement installés (7ème stimulation), les teneurs en thiols cytosoliques ne représentent plus que 50 à 60 % de celles mesurables chez les arbres sains (figure 88-c).

Figure 88 : EFFETS DE LA SURSTIMULATION A L'ETHREL SUR LES TENEURS EN THIOLS DU LATEX a/lère stimulation (2,27 ± 0,21 mM) teneurs en thicls reduits du latex (m Z du témoin) b/5ème stimulation (2,42 ± 0,35 mM) O c/7ème stimulation (2,17 ± 0,23 mM) $(-) \stackrel{i}{\leftarrow} \text{Sti} \stackrel{l}{\rightarrow} (+)$

SAIGNÉES APRÈS LA STIMULATION

 $h_{i} = 1 + 1$






6) SURSTIMULATION ET ACTIVITES SUPEROXYDE DISMUTASES DU LATEX :

Chez les arbres sains, ou encore sains mais susceptibles à l'encoche sèche, la stimulation à l'Ethrel induit transitoirement une augmentation sensible des activités superoxyde dismutases du latex. L'effet activateur est détectable dès la première saignée, et se prolonge jusqu'à la quatrième saignée, au moins, après l'application du traitement stimulant, du moins chez les arbres qui resteront sains (figure 85-a).

Chez les arbres susceptibles à l'encoche sèche, le 5ème traitement stimulant (figure 89-b) n'induit aucune augmentation des activités superoxyde dismutases, alors que les activités oxydatives toxiques, sont à leur paroxisme (figure 87-b). Inversement, après les 2ème ou 3ème saignées consécutives aux derniers traitements stimulants, les activités superoxyde dismutases, chez les arbres atteints d'encoche sèche, ne cessent de diminuer. Elles atteignent, en moyenne, après la 7ème stimulation, des valeurs à peine égales à 30 % de celles mesurées chez les arbres sains, témoins ou stimulés.

7) SURSTIMULATION ET ACTIVITES CATALASES DU LATEX :

Les activités catalases du latex "répondent" aux diverses stimulations, d'une façon analogue aux activités superoxyde dismutases. On note en particulier une augmentation transitoire des activités lors des premières saignées consécutives aux stimulations chez les arbres sains. A l'opposé on assiste à un effondrement total des activités catalases chez les arbres atteints d'encoche sèche, suite à la succession des traitements stimulants à l'Ethrel, lorsque les symptomes sont déjà apparents.

C - DISCUSSION ET CONCLUSION

La surstimulation (en dose et fréquence) des hévéas à l'Ethrel, induit l'apparition d'encoches sèches. Après 10 mois d'expérimentation, correspondant à 7 traitements stimulants, 7 arbres sur les 24 traités ont montré des symptomes typiques d'encoche sèche. Dans le cadre de cette expérimentation de relativement courte durée, nous avons constaté, au cours des stimulations successives, une nette propention à l'aggravation des symptomes chez les arbres les plus rapidement atteints, plutôt qu'une augmentation en nombre des arbres présentant des symptomes typiques d'encoche sèche. Il semble de plus que l'ensemble des symptomes, tant macroscopiques que biochimiques, apparaissent assez brutalement. Les phénomènes

observés semblent par ailleurs irréversibles, au moins dans l'intervalle de temps pris en compte dans cette expérimentation.

L'apparition brutale des premiers symptomes visibles au niveau de l'encoche, est contemporaine à une forte augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes, au sein du latex des arbres atteints.

Cette fragilisation de la membrane lutoïdique est parallèle à une très forte augmentation des activités NADH oxydases lutoïdiques. Nous avons par ailleurs vérifié que la NADH oxydase activée lors des stimulations à l'Ethrel, présentait les caractéristiques de résistance aux inhibiteurs de la respiration mitochondriale (antimycine A et SHAM) (tableau 48), mis en évidence dans le cas des activités NADH oxydases lutoïdiques des arbres atteints d'encoche sèche non délibérément induite (tableaux 24 et 33).

	consommation d'O ₂ dépendante du NADH (en µ1 O ₂ . min ⁻¹ .g ⁻¹ de lutoïdes)						
- -	sti l		sti 5		sti 7		
	sains	ES	sains	ES	sains	ES	
néant	6,6	7,1	6,0	14,8	3,6	11,4	
antimycine A (10 µM)	7,0	7,3	5,9	14,4	3,8	11,6	
SHAM (2,5 mM)	10,1	11,2	10,0	23,5	6,1	18,4	
Antimycine + SHAM	10,8	10,3	10,0	24,3	6,8	17,9	

Tableau 48 : EFFETS DES INHIBITEURS DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE, SUR L'ACTIVITE NADH OXYDASE SEDIMENTABLE DU LATEX DES ARBRES STIMULES. (Les expériences ont été effectuées sur les lutoïdes isolés du latex des arbres stimulés, sains ou atteints d'encoche sèche (ES); lors de la 2ème saignée après les stimulations 1,5 et 7).

Enfin, chez les arbres atteints d'encoche sèche, l'activation de la NADH oxydase lutoïdique est accompagnée d'une chute alarmante, apparemment définitive, des teneurs en thiols réduits et des activités enzymatiques SOD et catalase de leur latex.

Il apparaît donc un déséquilibre évident entre les activités peroxydatives toxiques (NADH oxydase) et les activités protectrices de "premiere ligne" (SOD, catalase et thiols). Ce déséquilibre induit par la surstimulation à l'Ethrel, se traduit par une dégradation des structures membranaires au sein du latex. L'augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes en constitue une preuve et un exemple particulier.

Chez les arbres stimulés, mais qui sont restés apparemment sains au cours de l'expérimentation, les traitements stimulants induisent également une activation (moindre) de la NADH oxydase lutoïdique. Mais cette activation n'est que transitoire. Par ailleurs l'action potentiellement toxique de l'enzyme est compensée par une augmentation parallèle des activités enzymatiques protectrices "de première ligne" : superoxyde dismutases et catalases.

Cette augmentation des activités SOD et catalases induite par les traitements stimulants est probablement attribuable à une activation de la synthèse de novo de ces deux types d'enzyme (mesure des activités potentielles). De même la chute de ces activités protectrices, chez les arbres atteints d'encoche sèche peut être expliquée en terme de déficit de la synthèse des protéines.

Le cas de la NADH oxydase lutoïdique est beaucoup plus complexe puisqu'elle est dans tous les cas activées, au moins transitoirement, au cours des stimulations successives. Chez les arbres atteints d'encoche sèche, la persistance de cette forte activité NADH oxydase ne peut être attribuée à une activation générale de la protéosynthèse au sein des laticifères, puisque d'autres enzymes (SOD et catalases) voient leur activité potentielle fortement diminuer. On peut alors penser à une dérépression spécifique de la synthèse de cette enzyme ou de l'un des éléments constituant cette chaîne de transfert d'électrons.

Inversement, cette activation de la "NADH oxydase" peut correspondre à l'induction d'une disfonction au niveau d'une chaîne rédox lutoïdique utilisant le NADH. Cette disfonction pourrait correspondre à l'apparition d'activateurs (pool quinonique, catalyseur métalliques,...) dérivant le flux d'électrons du NADH de sa voie normale, vers un accepteur "accidentel" tel l'oxygène moléculaire. Cette activation de la NADH oxydase pourrait également s'expliquer par un déficit de la synthèse d'un "maillon normal"de la chaîne rédox du tonoplaste lutoïdique. On peut par exemple penser à un déficit de la synthèse de l'hypothétique "facteur de couplage" assurant normalement le couplage entre l'activité NADH-cytochrome c (accepteur physiologique?) oxydoréductase et la pompe à efflux de protons labile, caractérisée dans la première partie de ce mémoire (chap.I). Rappelons en effet qu'il semble exister un antagonisme entre l'activité pompe à H⁺ rédox et l'activité NADH oxydase. Ainsi lorsque l'une est fonctionnelle l'autre ne fonctionne pas, ou du moins une des activités semble disparaître au profit de l'autre (tableau 15).

Cette hypothèse postulant l'existence d'un "tronc commun" au niveau de la chaîne rédox assurant le fonctionnement de la pompe à efflux de protons tonoplastique, et au niveau du système NADH oxydase, et supposant que le découplage de la première activité, assure l'induction de la seconde, reste à prouver, mais nous semble plausible. La stimulation engendrerait ainsi, au moins transitoirement, le découplage de la pompe à protons rédox, et l'activation concommitante de la NADH oxydase. Rappelons que le découplage de la pompe à protons rédox induite par la stimulation favoriserait l'alcalinisation du cytosol, et donc activerait le métabolisme dans un sens favorable à la production du latex.

Le schéma 3 illustre l'hypothèse que nous formulons pour expliquer l'ensemble des phénomènes observés.



3: Schéma hypothétique tendant à expliquer le couplage et le découplage de la pompe à efflux de protons et la liaison possible avec le système rédox tonoplastique émetteur de radicaux superoxydes(le système pompe à protons est alors découplé).

INDUCTION D'UN TYPE D'ENCOCHE SECHE LORS DE LA SUR-STIMULATION DES HEVEAS PAR L'ETHREL

RESUME

Nous rapportons les résultats d'une expérimentation, au cours de laquelle nous avons tenté d'induire l'apparition d'encoches sèches par des sur-stimulations à l'Ethrel (en dose et en fréquence : 220 mg d'acide 2-Chloroéthyl-phosphonique/arbre/traitement ; 8 stimulations annuelles).

Chez tous les arbres traités, et qui resteront sains en fin d'expérimentation, la stimulation à l'Ethrel induit, outre l'augmentation transitoire classique de la production, une augmentation également transitoire (3 à 4 saignées) des activités NADH oxydases lutoïdiques en même temps que des activités enzymatiques protectrices SOD et catalases du latex. Les teneurs en thiols cytosoliques diminuent sensiblement dans un premier temps (-20 %) puis remontent et dépassent celles des arbres témoins. L'indice d'éclatement des lutoïdes augmente légèrement transitoirement, lors de la première saignée consécutive aux traitements stimulants, puis diminue sensiblement (-20 % en dessous des témoins) lors des saignées suivantes.

Les premiers symptômes d'encoche sèche typique ne sont perceptibles que lors de la 5ème stimulation (4 arbres atteints/24 traités). Sept arbres sont atteints d'encoche sèche, à des degrés divers, après le 7ème traitement stimulant.

Parmi les facteurs biochimiques du latex étudiés, aucun symptôme n'est réellement détectable précocement, susceptible de laisser prévoir l'induction d'encoches sèches, ni au début de l'expérimentation, ni pendant les 4 premiers traitements stimulants, chez les arbres qui seront ultérieurement atteints.

Lors de la 2ème saignée consécutive à la 5ème stimulation, l'ensemble des symptômes apparait brutalement et simultanément. En même temps qu'apparaissent les premiers signes macroscopiques, visibles au niveau de l'encoche d'exploitation ("zones taries"), les paramêtres biochimiques étudiés différencient les arbres stimulés atteints d'encoche sèche, - une augmentation persistante, et de forte amplitude, de l'activité NADH oxydase lutoïdique (x 12/témoins) ;

- une forte diminution, irréversible des teneurs en thiols réduits cytosoliques (-50 % par rapport aux témoins) ;

- une chute spectaculaire des activités SOD (-70 %) et catalases (-55 %) du latex ;

- une diminution corrélative de la production de caoutchouc, en réponse aux traitements stimulants.

La sur-stimulation des hévéas par l'Ethrel est donc un facteur inducteur du syndrome des encoches sèches. Les symptomes biochimiques indiquent une déstabilisation caractéristique du tonoplaste lutoïdique, attribuable à la mise en place d'un déséquilibre entre les activités "peroxydatives toxiques" et les activités protectrices des structures membranaires, induit par la succession des traitements stimulants à haute dose.

Nous proposons, en conclusion, quelques hypothèses susceptibles de rendre compte de l'ensemble des phénomènes observés. Cette disfonction du métabolisme intra-laticifère semble correspondre à une accélération des processus de sénescence cellulaire, induite par les traitements intensifs de l'écorce des hévéas, par les substrats libérant de l'éthylène.

INDUCTION OF A TYPE OF BROWN BAST

OF THE HEVEAS BY ETHREL THROUGH THE OVERSTIMULATION

ABSTRACT

We give the results of an experiment during which we tried to induce the occurrence of brown bast through overstimulations by ethrel (220 mg of acid 2 Chloroethyl-phosphonic/tree/treatment ;8 annual stimulations).

In all the treated trees which will remain healthy at the end of the experiment, the stimulation by ethrel induces, in addition to the classical temporary increase in production, a temporary increase (3 to 4 tapping cuts) in the NADH oxidase lutoidic activities as well as in the SOD and catalase protective enzymatic activities of the latex. The cytosolic thiol contents first decrease considerably (- 20%) and then they increase again and exceed those of the reference trees. The splitting index of the lutoids increases slightly on a temporary basis when the first tapping cut is made following the stimulating treatments and it decreases considerably (- 20% below the reference trees) when the following tapping cuts are made.

The first symptoms of typical brown bast can be observed only in the fifth stimulation (4 affected trees/24 treated). Seven trees are affected by brown bast at various degrees after having been subjected to the seventh stimulating treatment.

Among the biochemical factors of the latex under study, no symptom can be detected early and is likely to suggest the induction of brown bast neither at the beginning of the expreiment, nor in the course of the first four stimulating treatments in the trees which will be affected later on.

Э

When the second tapping cut following the fifth stimulation is made, the whole symptoms occur suddenly and simultaneously. As the

first macroscopic signs are observed in the tapping cut ("dry zones"), the biochemical parameters studied differentiate the stimulated trees affected by brown bast from the healthy trees. The symptoms persist and become more serious following the seventh stimulating treatment. They correspond to :

- a continuous increase in the splitting index of the lutoids (+ 60% as compared to the healthy trees) ;

- a continuous and considerable increase in the NADH oxidase lutoidic activity (x 12/reference trees) ;

- a considerable and irreversible decrease in the contents of cytosolic reduced thiols (- 50% as compared to the reference trees);

- a considerable decline in the SOD (- 70%) and catalase (- 55%) activities of the latex ;

- a correlative decrease in the rubber production in response to the stimulating treatments.

Therefore, the overstimulation of the heveas by ethrel induces the syndrome of brown bast. The biochemical symptoms show a typical destabilization of the lutoidic tonoplast due to an imbalance between the "toxic peroxidative" activities and the protective activities of the membrane structures induced by the successive high dose stimulating treatments.

In short, we put forward a few hypotheses likely to account for the whole phenomena observed. This dysfunction of the intralaticiferous metabolism seems to correspond to an increase in the processes of cellular senescence induced by the intensive treatments of the hevea bark and by the ethylene-releasing substrates. DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS ET INTEGRATION

 \odot

DES RESULTATS

DE LA DEUXIEME PARTIE

CONCLUSIONS ET INTEGRATION DES RESULTATS DE LA DEUXIEME PARTIE

ROLE DU COMPARTIMENT VACUOLAIRE DANS LES PHENOMENES DE SÉNESCENCE ET DE DÉGÉNÉRESCENCE DES CELLULES LATICIFERES. CAS DU SYNDROME DES ENCOCHES SÈCHES CHEZ HEVEA BRASILIENSIS

LES LUTOIDES EN TANT QUE LYSOSOMES :

Les lutoïdes constituent, au sein des cellules laticifères, un compartiment vacuolaire à caractère lysosomal. Cette fonction lysosomale des lutoïdes a été particulièrement étudiée par PUJARNISCLE (1969, 1971). Cet auteur a en effet mis en évidence, au sein de ces organites, un large spectre d'activités hydrolases, capables de "digérer" la majeure partie des constituants cellulaires. Toutes ces activités hydrolytiques sont présentes sous forme latente à l'intérieur de ces organites. Le compartiment lysosomal ne peut jouer pleinement son rôle, dans le cadre d'une activité compatible avec le maintien de la vie cellulaire, que dans la mesure où les substrats respectifs de chaque enzyme hydrolytique sont capables de franchir la barrière tonoplastique. Pour les solutés de bas poids moléculaire, cette accessibilité implique très probablement l'intervention de processus de "transport média". La digestion des structures macromoléculaires suppose l'existence, au niveau du tonoplaste lutoidique, de processus de phagocytose ou de pinocytose. Notons cependant que ses derniers phénomènes n'ont jamais pu être visualisés ou démontrés chez les lutoïdes.

Dans certains cas de disfonction cellulaire, les enzymes hydrolytiques lysosomales peuvent devenir pleinement fonctionnelles, dans la mesure où la membrane limitante (tonoplaste) est rompue. Un tel phénomène est incompatible avec le maintien de la vie. Il aboutit en effet à l'autodigestion du contenu cellulaire, et dans le cas particulier du latex, à la prise en masse du caoutchouc, phénomène correspondant à la coagulation. Lorsque ce processus se déclenche *in situ*, il correspond à l'un des stades des processus complexes conduisant à la sénescence et à la dégénérescence cellulaire. AUTOLYSE PEROXYDATIVE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE : LA "NAD(P)H OXYDASE" LUTOIDIQUE :

Nous avons montré, dans cette deuxième partie, que les vacuolysosomes du latex portent en eux, un système capable de provoquer l'autolyse de leur membrane.

Ce système correspond à une activité enzymatique, se comportant globalement comme une NAD(P)H oxydase. Ce système est quasi inactif au niveau des lutoïdes provenant d'arbres sains bon-producteurs. Il est par contre fonctionnel chez les arbres très bas-producteurs et très actif chez les arbres atteints du syndrome des encoches sèches.

Cette activité "NAD(P)H oxydase" est insensible aux inhibiteurs classiques des chaines respiratoires cytochromiques mitochondriale, bactérienne ou fongique (Cyanure à faible concentration, antimycine A, roténone, HOQNO,...). Elle est par contre activée par les inhibiteurs de la voie alterne mitochondriale (SHAM et propyl gallate), même en présence des inhibiteurs de la voie cytochromique.

Par ailleurs, ce "système NAD(P)H oxydase" est fortement activé en présence de traces de cations métalliques de transition (Cu²⁺, Fe³⁺), surtout lorsque ces derniers, complexés par de l'ADP ou de l'EDTA, voient leur potentiel rédox abaissé. Enfin, la forte activation de la NAD(P)H oxydase en présence de structures quinoniques (naptoquinones, benzoquinone,...), ou de composés phénoliques susceptibles, par leur oxydation, de donner naissance à des fonctions quinones (scopolétine, gaïacol, DOPA, SHAM, propyl gallate,...), laisse supposer l'intervention de structures quinoniques dans la "chaine" de transfert des e⁻ du NAD(P)H, vers l'oxygène moléculaire. Il semblerait en fait que l'un des "maillons" de cette chaine rédox lutoïdique corresponde à une activité quinone réductase.

Diverses considérations, et en particulier la mise en évidence du fait qu'il y a incompatibilité entre le fonctionnement de la pompe à protons tonoplastique rédox particulièrement labile (mise en évidence dans la première partie), et l'activité NADH oxydase, ou plus exactement, que la première activité peut "disparaître" au profit de la seconde, nous incitent à penser que ces deux activités font partie (au moins partiellement) d'une même chaîne rédox localisée sur le tonoplaste lutoïdique. L'hypothèse est donc émise, selon laquelle l'apparition de l'activité NAD(P)H oxydase serait attribuable à l'établissement d'une disfonction au niveau de la pompe à efflux de protons rédox tonoplastique. Cette

disfonction poúrrait correspondre à la disparition d'un hypothétique facteur de couplage de la pompe à H⁺ rédox. On peut également envisager la mise en place d'une déviation (Shunt) du flux d'e⁻ provenant du NADH, vers l'O₂, attribuable à l'apparition ou au démasquage de structures quinoniques, ou encore de structures contenant des catalyseurs métalliques (Cu²⁺, Fe³⁺, métalloprotéines, cytochromes,...?) activateurs. Bien que restant encore à démontrer, ces hypothèses séduisantes concilient l'ensemble des phénomènes mis en évidence.

En outre, la stimulation des hévéas par l'Ethrel (générateur d'éthylène), induit transitoirement une activation de la NADH oxydase lutoïdique. Nous postulons, en accord avec notre hypothèse, que "la stimulation éthylénique" induit un découplage de la pompe rédox à efflux de H⁺ tonoplastique, et corrélativement le démasquage de l'activité NADH oxydase. Rappelons, à ce titre, que le découplage de cette pompe à protons antagoniste de l'ATPase (qui, elle, est activée lors de la stimulation; cf : Première Partie/chapitre III), favoriserait l'alcalinisation du cytosol et activerait ainsi le métabolisme intralaticifère, dans un sens favorable à l'augmentation de la production de latex, classiquement induite par les traitements stimulants.

Nous avons montré que le fonctionnement de la NAD(P)H oxydase lutoïdique émet des anions superoxydes $(0\frac{1}{2})$ qui, par dismutation (enzymatique et spontanée), libèrent de l'eau oxygénée (H_2O_2) dans le milieu. Le phénomène est également activé en présence de quinones exogènes, suggérant l'intervention de structures semi-quinoniques instables, facilement autooxydables, dans l'enchainement réactionnel débutant par l'oxydation du NAD(P)H, et conduisant à l'émission des formes toxiques de l'oxygène $(0\frac{1}{2}$ et H_2O_2) (HOSCHSTEIN *et al.*, 1965 ; MISRA et FRIDOVICH, 1972 ; ELSTNER *et al.*, 1976 ; BOVERIS *et al.*, 1977 ; CRANE, 1977 ; ELSTNER, 1982,...).

Le fonctionnement de la NAD(P)H oxydase, particulièrement intense chez les lutoïdes provenant d'hévéas bas-producteurs ou surtout, atteints d'encoche sèche, aboutit à la dégradation peroxydative des lipides insaturés endo et exogènes (acides linoléique et linolénique). Elle se traduit par l'autolyse des lutoïdes consécutive à la dégradation peroxydative de leur membrane. L'effet protecteur de la superoxyde dismutase, et surtout de la catalase, du mannitol et des tocophérols, suggère que l'attaque peroxydative des structures insaturées est essentiellement attribuable à l'émission secondaire de formes radicalaires "ultra-toxiques" de l'oxygène (radicaux hydroxyles OH[•], et oxygène singulet $0\frac{1}{2}$). Celles-ci résulteraient de l'interaction entre les anions superoxydes et l'eau oxygénée directement libérée par l'activité NAD(P)H oxydase. Les lutoïdes portent donc bien en eux un système oxydatif, capable d'induire l'autolyse de leur membrane limitante.

PRESENCE DE PROTECTEURS DES STRUCTURES MEMBRANAIRES :

Le latex contient normalement tout un "arsenal" enzymatique et non enzymatique, capable d'assurer une détoxification efficace des formes toxiques de l'oxygène libérées par l'activité NAD(P)H oxydase lutoïdique. Nous avons ainsi confirmé l'existence, au sein du latex, d'activités catalases et peroxydases assurant classiquement l'élimination de l'eau oxygénée. Nous rapportons également l'existence d'activités superoxydes dismutases cytosoliques et lutoïdiques, ainsi que des activités glutathion peroxydase, glutathion réductase (NADPH dépendante) et glyoxalase, toutes trois cytosoliques.

Associées à l'action d'anti-oxydants comme les \checkmark -tocophérols, l'acide ascorbique et les thiols réduits (ainsi qu'à un "réservoir d'hydrogène", sous forme de composés phénoliques), la présence de ces enzymes détoxifiantes, assure normalement, au sein du latex, la protection des structures membranaires, contre les éventuelles agressions peroxydatives. Un rôle central est attribué au glutathion (GSH) dans le schéma général des systèmes détoxifiants. Il constitue d'une part le substrat spécifique de la glutathion peroxydase et de la glyoxalase I, et il est d'autre part capable de piéger directement $0\frac{1}{2}$ et $H_2 O_2$. Il intervient par ailleurs dans les systèmes de recyclage, sous forme réduite, de nombreux autres antioxydants (acide ascorbique, \prec -tocophérols, phénols,...). Il est enfin lui même recyclé sous sa forme réduite active (GSH), par la GSSG réductase à NADPH. La disponibilité en NADPH dans le cytosol est donc susceptible de jouer un rôle crucial dans l'efficacité du système détoxifiant, au sein du latex.

DESEQUILIBRE ENTRE ACTIVITES PEROXYDATIVES TOXIQUES ET ACTIVITES PROTEC-TRICES AU SEIN DU LATEX PROVENANT DES ARBRES ATTEINTS D'ENCOCHE SECHE :

L'analyse du latex provenant d'hévéas sains haut-producteurs et bas-producteurs, ou atteints d'encoche sèche, nous a permis de déterminer comment se structurent les différents facteurs biochimiques intervenant dans la stabilisation/déstabilisation des systèmes membranaires, au sein du latex, en relation avec la productivité et l'état physiologique

des tissus laticifères. Nous montrons ainsi que les arbres atteints <u>d'encoche sèche non délibérément induite</u>, se caractérisent par une "hyperactivité" NADH oxydase lutoïdique, et un effondrement total des activités détoxifiantes, tant enzymatiques (SOD, catalases,...) que non enzymatiques (thiols réduits et ascorbate). Ce déséquilibre entre activités toxiques et protectrices se traduit par une déstabilisation complète, des structures membranaires au sein de leur latex. L'indice d'éclatement particulièrement élevé de leurs lutoïdes, et la libération dans le cytosol des activités o -diphénoloxydases normalement compartimentées dans les particules de FREY-WYSSLING, en constituent des exemples frappants.

LA SURSTIMULATION DES HEVEAS A L'ETHREL : TRAITEMENT INDUCTEUR D'ENCOCHE SECHES:

La surstimulation des hévéas par l'Ethrel induit l'apparition de symptômes typiques de l'encoche sèche. Les analyses biochimiques du latex des arbres atteints, montrent des symptômes similaires à ceux mis en évidence dans le latex des arbres atteints d'encoche sèche non délibérément induite. Ils correspondent également à une déstabilisation des structures membranaires consécutives à une activation persistante de la NADH oxydase lutoïdique, età une chute corrélative des activités protectrices. Tout se passe ainsi comme si, chez certains arbres, des traitements stimulants induisaient une sénescence puis une dégénérescence précoce des cellules laticifères.

STRESS HORMONAL, SENESCENCE ET DEGENERESCENCE CELLULAIRE :

"La stimulation éthylénique" induit donc, d'une façon générale au niveau des laticifères d'Hevea, une activation du système NAD(P)H oxydase lutoïdique. Chez les arbres qui resteront sains, cette activation de la NAD(P)H oxydase n'est que transitoire (3 à 4 saignées après l'application de l'Ethrel). Son action potentiellement toxique est alors compensée par une augmentation parallèle des activités enzymatiques constituant la "première ligne de défense" contre l'accumulation des formes toxiques de l'oxygène engendrées (SOD et catalases). Par ailleurs, la diminution sensible des teneurs en thiols réduits, au sein du latex des arbres stimulés, peut correspondre à une mobilisation de ces réducteurs, dans le but d'assurer la détoxification du latex. A ce titre, le suivi cinétique des variations du rapport RSH/RSSR (ou GSH/GSSG) au sein du l'atex, suite à la stimulation des arbres à l'Ethrel, devrait fournir des indications précieuses sur l'importance de ce paramêtre dans les sytèmes de détoxification. Chez les arbres "susceptibles à l'encoche sèche", l'apparition des premiers symptômes visibles au niveau de l'encoche (zones taries) à la suite de surstimulations répétées, se traduit au niveau de leur latex par une <u>augmentation considérable, et surtout durable</u> (non transitoire) de l'activité NAD(P)H oxydase lutoïdique. A l'inverse des réponses enregistrées chez les arbres sains, les systèmes protecteurs deviennent déficients, et donc incapables d'assurer une protection efficace des structures membranaires vis-à-vis des formes agressives de l'oxygène, chez les arbres atteints.

Le rôle de l'éthylène dans l'induction et la répression de certaines enzymes, chez les végétaux, a fait l'objet de nombreux travaux (ABELES, 1973,...). Plus récemment il est apparu que l'effet semble variable, voire opposé selon la dose d'éthylène appliquée. Par exemple l'éthylène à faible dose (1 ppm) induit une augmentation des activités PPox, peroxydases, catalases et ATPase, au sein des tissus méristématiques d'apex de Nicotiana tabacum, alors qu'aux plus fortes concentrations (10 et surtout 100 ppm), le traitement éthylénique induit au contraire une diminution significative de ces mêmes activités enzymatiques (HENRY et RICHARD, 1979). De même l'éthylène (100 ppm) semble inhiber la synthèse de novo des catalases au sein des tissus d'Ipoméa batatas (ESAKA et al., 1983). Ces deux effets totalement opposés sont révélateurs du double rôle que peut jouer l'éthylène, en fonction de sa concentration au sein des tissus végétaux. A dose "hormonale" (≤1,à quelques ppm) l'éthylène joue un véritable rôle régulateur, et participerait à la modulation de l'expression d'un certain nombre d'activités enzymatiques. A concentration plus élevée, l'éthylène semble essentiellement induire les processus conduisant à la sénescence cellulaire, au niveau de nombreux organes végétaux (ABELES, 1973; LIEBERMANN, 1979). Corrélativement, la production d'éthylène par les organes végétaux en cours de sénescence est un phénomène maintenant bien admis (KENDE et HANSON, 1976, 1977 ; HALL, 1977 ; LIEBER-MANN, 1979 ; KONZE et KENDE, 1979 ; KONZE et al., 1980;...). Il a par ailleurs été démontré que la sénescence induite par un stress mécanique, ou directement par des traitements à l'éthylène, se traduit au sein des tissus traités, par une forte augmentation des teneurs en H20, (BRENNAN et FRENKEL, 1977) et par une déstabilisation des structures membranaires, suite à la dégradation peroxydative de leurs lipides (BEUTELMANN et KENDE, 1977). Plus récemment, des phénomènes analogues correspondant à l'émission de formes toxiques de l'oxygène (II_2O_2 et O_2^{-}), à la peroxydation des lipides insaturés et à la déstabilisation consécutive des systèmes membranaires ont également été mis en évidence au niveau des organes végétaux en voie de sénescence naturelle (STEWARD et BEWLEY, 1980 ; MAYAK *et al.*, 1983 ; LEGGE *et al.*, 1983 ;...). Enfin il semble que l'induction des phénomènes de sénescence se manifestent également par une diminution des activités catalases (KAR et MISHRA, 1976 ; BRABER, 1980 ; DHINSDA *et al.*, 1982), et superoxyde dismutase (DHINSDA *et al.*, 1982), et inversement par une augmentation des activités peroxydases (KAR et MISHRA, 1976 ; BRABER, 1980). Notons enfin que la sénescence induite artificiellement semble retardée chez les végétaux plus riches en anti-oxydants endogènes (MONDAL et CHOU-DHURI, 1981).

L'ensemble des phénomènes biochimiques récemment mis en évidence, caractérisant les processus conduisant à la sénescence (induite ou naturelle) des tissus végétaux, correspondent donc bien aux phénomènes que nous avons également caractérisés dans le latex des arbres atteints d'encoche sèche, délibérément induite ou non. Ils correspondent à l'enchaînement de processus oxydatif aboutissant à la déstabilisation des structures membranaires *in situ*.

PRODUCTION AUTOCATALYTIQUE D'ETHYLENE ET "ENCOCHES SECHES" ?

Nous avons montré que les traitements éthyléniques de l'écorce d'Hevea engendre une activation de la NAD(P)H oxydase lutoïdique, dont le fonctionnement libère dans le milieu des anions superoxydes et de l'eau oxygénée. Les données bibliographiques les plus récentes acquises sur les mécanismes endogènes conduisant à la biosynthèse de l'éthylène chez les végétaux, montrent que l'une des étapes finales correspond à l'attaque peroxydative du précurseur : acide l-aminocyclopropane-l-carboxylique, par des anions superoxydes ou des radicaux hydroxyles (BAKER et al., 1978; APELBAUM et al., 1981 a et b ; LEGGE et al., 1982 ; RAE et al., 1982 ; LEGGE et THOMPSON, 1983). La confirmation récente d'une production endogène autocatalytique d'éthylène par différents organes végétaux, suite à un traitement par de l'éthylène exogène (RIOV et YANG, 1982 ; HUME et LOVELL, 1983), nous conduit à suggérer l'existence d'un phénomène analogue chez l'Hévéa. Nous émettons ainsi l'hypothèse, selon laquelle les traitements hormonaux de l'écorce d'Hevea par des produits libérant de l'éthylène exogène, induiraient, au sein des laticifères, une biosynthèse autocatalytique d'éthylène endogène, stimulée par l'activation de la NAD(P)H oxydase lutoïdique génératrice d'anions superoxydes.

Selon RIOV et YANG (1982), l'amplitude de cette activation de la production endogène d'éthylène suite à des traitements éthyléniques, serait proportionnelle à la dose d'éthylène exogène appliquée. Nous suggérons donc que la surstimulation en dose et en fréquence de l'écorce d'Hevea par l'Ethrel, peut engendrer une activation telle de la biosynthèse d'éthylène *in situ*, que la surconcentration en éthylène entretenue au sein des tissus laticifères, aboutirait à terme, chez des arbres particulièrement "réceptifs", à l'induction irréversible des processus conduisant à la sénescence cellulaire. Ceux-ci correspondraient à la mise en place d'un déséquilibre entre activités peroxydatives toxiques et activités détoxifiantes intracellulaires, et à l'autolyse consécutive des vacuo-lysosomes *in situ*.

64'' H

On peut supposer a priori que tout stress mécanique ou chimique (en particulier toute forme de surexploitation des hévéas) puissent aboutir à une synthèse d'éthylène in situ (COUPE, 1977) et à l'apparition d'encoche sèche (DE FAŸ, 1981).

TROISIEME PARTIE

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Notre étude s'inscrit dans le cadre des recherches tendant à préciser les fonctions du compartiment vacuolaire au sein des cellules végétales. On sait depuis les travaux de RIBAILLIER (1972) et de PUJAR-NISCLE (1968) que, de part leurs caractéristiques biochimiques, les lutoïdes du latex constituent au sein du cytoplasme des cellules laticifères d' *Hevea brasiliensis*, un compartiment vacuolaire à caractère lysosomal.

Ces organites peuvent facilement être isolées et purifiées du latex par des techniques simples de centrifugation différentielle, sans mise en oeuvre de traitements drastiques, préjudiciables à l'intégrité de leur membrane. Nous avons mis à profit cet avantage méthodologique incontestable pour étudier quelques aspects des relations existant entre les compartiments cytosolique et vacuo-lysosomal du cytoplasme des cellules laticifères.

PARTICIPATION ACTIVE DES LUTOIDES DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE, AU SEIN DU LATEX D'HEVEA

La production du latex reflète dans une certaine mesure l'intensité du métabolisme au sein des cellules laticifères. Ce métabolisme doit être suffisamment intense, et "orienté" de façon adéquate, pour assurer la régénération et compenser ainsi l'exportation massive du latex, constamment sollicitée par l'exploitation régulière des hévéas. Il existe ainsi un lien étroit, entre la productivité des arbres et leur capacité à assurer le renouvellement du contenu de leurs laticifères (d'AUZAC 1965-a et b ; JACOB,1970 ; TUPY, 1973 a et b ; TUPY et PRIMOT, 1976,...). Il apparaît maintenant certain que l'intensité du métabolisme régénératif intra-laticifère est essentiellement sous la dépendance du pH et de la détoxification du cytosol, vis-à-vis d'un certain nombre d'ions organiques et minéraux inhibiteurs.

Ainsi, la production du latex est corrélée positivement, d'une manière très hautement significative, au pH du cytosol et négativement au pH du compartiment vacuolaire du latex (les lutoïdes) (COUPÉ, 1977;

0.03

CRETIN, 1979-a ; BZROZOWSKA-HANOWER *et al.*, 1979). De plus nous avons montré l'existence de corrélations inverses, hautement significatives, entre les variations du pH du cytosol, et celles du pH intra-vacuolaire, suggérant l'existence de flux vectoriels de protons contrôlés, au niveau du tonoplaste lutoïdique (CRETIN, 1979-a ; BRZOZOWSKA-HANOWER *et al.*, 1979).

 $[1,1]_{1,1}$

Des analyses multivariées (rapportées dans ce mémoire) nous ont permis de montrer que le latex issu des arbres haut-producteurs, se caractérise non seulement par un pH cytosolique neutre ou légèrement alcalin ainsi que par un gradient transtonoplastique de protons élevé, mais également par une forte accumulation du citrate à l'intérieur des lutoïdes. Cette accumulation intravacuolaire du citrate, correspond à la mise en place d'un gradient transtonoplastique de citrate élevé, et en particulier à la présence de faibles concentrations en ce triacide au sein du cytosol du latex issu des arbres haut-producteurs.

Ces différentes corrélations peuvent s'expliquer d'une façon satisfaisante quand on sait que de nombreuses enzymes clés du métabolisme cytosolique des laticifères sont extrèmement sensibles à de très faibles variations de pH, dans la zone des fluctuations physiologiques. De plus, ces mêmes enzymes sont inhibées efficacement par certains ions tels que le citrate, le magnésium, le calcium et le cuivre, normalement accumulés, *in vivo*, au sein des lutoïdes (JACOB, 1970, 1972 ; JACOB et *al.*, 1977, 1979 ; JACOB et d'AUZAC, 1967, 1969, 1972 ; RIBAILLIER et al., 1971).

LE pH- STAT BIOOSMOTIQUE TONOPLASTIQUE :

L'accumulation des protons au sein des lutoïdes s'effectue grâce à l'intervention de deux phénomènes complémentaires. Un large pool de protons est retenu au sein du compartiment vacuolaire grâce à l'existence d'un potentiel transtonoplastique de DONNAN. La nature des macromolécules à l'origine de cet effet reste à déterminer.

Les flux transtonoplastiques de protons "libres", qui déterminent tant le pH du cytosol que celui du compartiment vacuolaire, sont sous le contrôle de deux systèmes antagonistes transporteurs de protons, localisés au niveau du tonoplaste lutoïdique :

- La première pompe à protons est liée au fonctionnement de l'ATPase, mise en évidence sur le tonoplaste des lutoïdes par d'AUZAC (1975, 1977). Cette activité ATPase tonoplastique catalyse le flux (vectoriel) des protons cytosoliques vers l'intérieur de la vacuole. Son

fonctionnement aboutit donc à une alcalinisation du cytosol, à une acidification vacuolaire, et par voie de conséquence à une augmentation importante du gradient (électrochimique) de protons transtonoplastique. De ce point de vue nos résultats sont en accord avec ceux de MARIN (1981).

- Une deuxième pompe à protons est couplée au fonctionnement d'un système transporteur d'électrons localisé sur le tonoplaste. Ce système rédox fonctionne avec du NADH comme substrat donneur d'électrons, et du cytochrome c en tant que substrat accepteur artificiel.

L'accepteur d'électrons physiologique endogène reste encore à identifier. Enfin, l'identité de ce système transporteur d'e fonctionnel au niveau du tonoplaste des lutoïdes intacts et fraîchement isolés du latex, avec l'activité NADH-cytochrome <u>c</u> oxydoréductase mise en évidence par MOREAU et al.(1975) sur le tonoplaste lutoïdique purifié, reste à démontrer.

En présence d'accepteurs artificiels (cytochrome c, DCPIP, ferricyanure,...), le fonctionnement de chaîne rédox, in vitro, catalyse un efflux des protons accumulés en déséquilibre thermodynamique au sein des lutoïdes. Son fonctionnement entraîne donc une acidification du milieu d'incubation, et l'alcalinisation concomitante du compartiment vacuolaire, donc une diminution du gradient transtonoplastique de protons. L'activité de cette pompe à protons rédox est insensible aux inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires, mitochondriale, fongique ou bactérienne (KCN, antimycine A, roténone, SHAM,...). Cependant, le couplage entre l'activité rédox et la pompe à efflux de H^+ qui lui est associée, est extrèmement labile, et peut disparaître complètement après un stockage de quelques heures des lutoïdes dans différentes conditions de conservation. Il semble par ailleurs que l'activité rédox "découplée" de la pompe reste fonctionnelle, et qu'elle devienne alors capable de transférer une partie du flux d'e provenant du NADH, sur l'oxygène moléculaire, ce dernier jouant alors un rôle "d'accepteur d'e accidentel".

La courbe des activités respectives des deux pompes à protons antagonistes (ATPase et système rédox), en fonction du pH du milieu d'incubation, montre que l'ATPase reste au maximum de son activité potentielle dans toute la zone des variations physiologiques du pH, tandis que la pompe rédox à efflux, beaucoup plus sensible aux variations de pH, devient plus efficiente aux pH légèrement alcalins (au-dessus de 7,5). Ces observations nous conduisent à conclure que toute alcalinisation excédentaire du cytosol, éventuellement engendrée par une hyper-activité ATPase tonoplastique, sera contrecarrée par l'activation de la pompe rédox à efflux

de H⁺, activation résultant précisément de cette alcalinisation.

Enfin nous avons montré, que ces deux systèmes antagonistes sont fonctionnels lorsque les lutoïdes intacts, fraîchement isolés du latex, sont incubés dans le cytosol du latex déprotéinisé par ultrafiltration, c'est-à-dire dans des conditions de composition ionique du milieu aussi proches que possible de celles existant *in vivo*.

Ainsi, dans la mesure où les substrats respectifs, nécessaires au fonctionnement de ces deux pompes à protons antagonistes sont disponibles en quantités non limitantes au sein des laticifères (accepteur d'e⁻, en particulier), ce double pH-STAT bioosmotique tonoplastique doit être fonctionnel <u>in vivo</u>. Il doit donc contribuer efficacement à la régulation fine du pH cytosolique et du gradient électrochimique de protons transtonoplastique, au sein des cellules laticifères.

ACTIVATION DE L'UNE DES COMPOSANTES DU pH-STAT TONOPLASTIQUE (ATPase) PAR L'ETHREL :

Le traitement de l'écorce des hévéas par l'Ethrel, produit libérant de l'éthylène employé couramment en hévéaculture pour augmenter ("stimuler") la production du latex, induit une forte activation de l' ATPase tonoplastique. Cette activation de l'ATPase est attribuable, pour partie, à la stimulation d'une protéosynthèse spécifique et à l'apparition d'un "activateur" thermostable cytosolique, induites, au niveau des laticifères par l'éthylène (GIDROL, 1984; CHRESTIN *et al.*, 1984 a et b). En fait, la majeure partie de l'activation de l'ATPase tonoplastique *in situ* est due à une augmentation considérable en l'ATP au sein du latex. Les cinétiques d'activation de l'ATPase pompe à protons montrent en effet que celle-ci est essentiellement sous le contrôle de la disponibilité en ATP (son substrat), dans le milieu.

Cette stimulation, par l'éthylène, de l'activité ATPase pompe à protons tonoplastique, induit *in situ* une alcalinisation importante du cytosol, et une forte augmentation concomitante du gradient transtonoplastique de protons. Ces évènements précoces sont au moins pour partie à l'origine de l'activation du métabolisme intralaticifère et de l'augmentation de la production de latex, provoquées par la stimulation des hévéas à l'Ethrel.

A trop forte concentration, le citrate est un inhibiteur efficace de certaines enzymes clés du métabolisme cytosolique. Il est accumulé normalement *in vivo*, au sein du compartiment vacuolaire (RIBAILLIER, 1972 ; d'AUZAC et al., 1982).

In vitro, les lutoïdes accumulent le citrate exogène contre un gradient transtonoplastique de concentration de forte amplitude (d'AUZAC et LIORET, 1974 ; MONTARDY et LAMBERT, 1977 ; COUPÉ et LAMBERT, 1977).

Le fonctionnement de l'ATPase tonoplastique semble par ailleurs fournir l'énergie nécessaire à cette accumulation sous forme d'une force promotrice (pmf) (MARIN, 1981 ; MARIN *et al.*, 1981). Nous confirmons dans une certaine mesure ce phénomène, au niveau de lutoïdes intacts, fraîchement isolés. Cependant toutes les tentatives pour provoquer un efflux du citrate accumulé se sont soldées par un échec.

Nous proposons donc que les lutoïdes piègent irréversiblement le citrate cytosolique excédentaire, et qu'ils jouent ainsi un rôle essentiellement détoxifiant, en évitant l'inhibition du métabolisme cytosolique par un excédent de ce triacide. Cependant la nature des phénomènes à l'origine de cette immobilisation définitive du citrate, et le devenir à long terme du citrate accumulé restent obscurs.

LES LUTOIDES EN TANT QUE "COMPARTIMENT DE STOCKAGE" :

Un excès de calcium, au même titre que le citrate, est préjudiciable au fonctionnement du métabolisme cytosolique. Par ailleurs ce cation divalent semble impliqué dans les processus conduisant à la coagulation du latex. In vivo, le calcium est, lui aussi, normalement accumulé au sein des lutoïdes (RIBAILLIER, 1972 ; d'AUZAC et al., 1982).

In vitto, nous montrons que les lutoïdes accumulent intensément le calcium exogène, contre un gradient transtonoplastique de concentration élevé. Par ailleurs les flux transtonoplastiques de calcium vont dans le même sens que les flux de protons. Le fonctionnement de l'ATPase énergise l'accumulation du calcium libre à l'intérieur des lutoïdes, et le fonctionnement de la NADH cytochrome <u>c</u> réductase, pompe à efflux de H⁺ tonoplastique, provoque l'efflux du calcium libre accumulé.

L'ensemble de nos résultats suggèrent l'existence d'un transport actif du calcium au travers du tonoplaste lutoïdique, faisant intervenir un mécanisme d'échange $Ca^{++}/(n?)H^{+}$, dont la stoechiométrie reste à définir. Ainsi le calcium libre accumulé au sein du compartiment vacuolaire peut être remis à la disposition du métabolisme cytosolique. Les blux transtonoplastiques de calcium libre demeurent sous le contrôle actif des deux pompes à protons tonoplastiques antagonistes. Contrairement au cas du citrate, les lutoïdes assurent donc un rôle de <u>stockage réver-</u> <u>sible</u> vis-à-vis des ions calcium.

ROLE DES LUTOIDES DANS L'HOMEOSTASIE CYTOSOLIQUE DU LATEX :

Prenant en compte le fonctionnement des deux pompes à protons él'ectrogènes antagonistes localisées sur le tonoplaste lutoïdique, nous proposons que les lutoïdes : compartiment vacuolaire des cellules laticifères, jouent un triple rôle vis-à-vis du métabolisme cytosolique laticigène :

- un rôle de "pH-STAT bioosmotique" (biophysique), capable de réguler très finement le pH du cytosol, dans une zone de variation physiologique modulant efficacement l'activité de certaines enzymes clés du métabolisme cytosolique ;

- un rôle de compartiment essentiellement "détoxifiant", accumulant et piégeant irréversiblement (?) un certain nombre de métabolites, qui,en excès, sont des inhibiteurs efficaces de certaines enzymes clés du métabolisme cytosolique (citrate, tannins,...) ;

- un rôle de compartiment de réserve, accumulant réversiblement certains ions (Ca^{++}, H^{+}) et métabolites (?), inhibiteurs du métabolisme lorsqu'ils sont en excès dans le cytosol. Ces derniers peuvent cependant être à tout moment remis à la disposition du métabolisme cytosolique, grâce au fonctionnement différentiel des deux pompes ioniques (à H^{+}) tonoplastiques antagonistes.

Ainsi, en participant activement à la régulation fine du pH et de la composition ionique du cytosol (homéostasie), les lutoïdes jouent un rôle de première importance dans le contrôle de l'intensité du métabolisme au sein des laticifères. Ils jouent donc un rôle déterminant dans les processus gouvernant la production du latex des hévéas.

Ce rôle actif des lutoïdes dans le maintien de l'homéostasie correspond essentiellement à la fonction vacuolaire de ces organites. Cette fonction vacuolaire semble donc dépendre, au moins en partie, de processus actifs, consommateurs d'énergie. Elle met en jeu au niveau du tonoplaste lutoïdique un certain nombre de mécanismes régulateurs fournissant l'énergie nécessaire (pompes à H⁺) et catalysant le transport sélectif de divers solutés (récepteurs membranaires spécifiques). Ces mécanismes aboutissent à la mise en place d'une compartimentation intracellulaire de diverses entités moléculaires ou ioniques. Celle-ci paraît nécessaire au fonctionnement optimum du métabolisme cytoplasmique, et très probablement au maintien des conditions compatibles avec la vie. Ce rôle des lutoïdes dans le maintien de l'homéostasie intralaticifère nécessite donc une intégrité parfaite de leur membrane limitante.

FONCTION LYSOSOMALE ET ROLE DES LUTOIDES DANS LA SENESCENCE DES TISSUS LATICIFERES

C'est essentiellement à PUJARNISCLE (1968, 1969), que l'on doit la mise en évidence et la caractérisation de la fonction lysosomale des lutoïdes. Ces organites contiennent en effet un large spectre d'activités hydrolytiques acides, capables de digérer la majeure partie des constituants cellulaires. Présentes donc sous forme latente dans ces organites, ces activités enzymatiques ne peuvent devenir pleinement fonctionnelles au sein de la cellule laticifère, que dans la mesure où la membrane lutoïdique (tonoplaste) est rompue. La lyse du tonoplaste lutoïdique apparaît donc comme un phénomène totalement incompatible avec le maintien de la vie des laticifères. Elle aboutit en effet à l'autodigestion du contenu cellulaire, et dans le cas particulier du latex, à la prise en masse du caoutchouc (coagulation). Lorsque ce processus se déclenche *in situ*, il correspond à l'un des stades des mécanismes complexes conduisant à la dégénérescence et à la sénescence de la cellule.

AUTOLYSE PEROXYDATIVE DE LA MEMBRANE LUTOIDIQUE : LA NAD(P)H OXYDASE VACUO-LYSOSOMALE :

Nous montrons dans ce mémoire que les vacuo-lysosomes du latex (les lutoïdes) portent en eux, un système capable de provoquer l'autolyse de leur membrane.

Ce système déstabilisateur correspond à une activité enzymatiuqe, se comportant globalement comme une NAD(P)H oxydase. Ce système, au moins partiellement membranaire, est quasi inactif au niveau des lutoïdes provenant d'arbres sains bon-producteurs. Il est par contre fonctionnel chez les arbres très bas-producteurs, et particulièrement actif au niveau des lutoïdes provenant d'arbres atteints d'encoche sèche. Son activité est donc liée à la productivité ou à l'état physiologique des tissus laticifères. Insensible aux inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires cytochromiques, cette activité NADH oxydase est par contre fortement activée par les inhibiteurs de la "voie alterne" mitochondriale (SHAM, propyl gallate). Elle est en outre activée en présence de quinones et de traces de cations métalliques de transition chélatés (Fe³⁺ et Cu²⁺). Il semblerait en fait que l'un des "maillons de cette chaîne rédox" corresponde à une activité quinone réductase.

L'apparente incompatibilité entre le fonctionnement de la pompe à protons rédox tonoplastique particulièrement labile, et l'activité NAD(P)H oxydase, ou plus exactement le fait que la première semble disparaître au profit de la seconde, nous incite à penser que ces activités font partie (au moins partiellement) d'une même chaîne rédox localisée sur le tonoplaste lutoïdique. L'"induction" de l'activité NAD(P)H oxydase pourrait ainsi être attribuable au découplage de la pompe à protons rédox par la disparition d'un hypothétique facteur de couplage ou la mise en place d'un "shunt" (pool de quinones, structure comportant un site métallique,...?) au niveau de la chaîne de transfert d'e provenant du NAD(P)H.

Le fonctionnement de la NAD(P)H oxydase libère des anions superoxydes (O_2^-) qui, par dismutation, donnent de l'eau oxygénée. Ces phénomènes sont également activés en présence de quinones exogènes, suggérant l'intervention de structures semi-quinoniques auto-oxydables dans l'enchaînement réactionnel conduisant à la réduction univalente (O_2^-) et divalente (H_2O_2) de l'oxygène par les e du NAD(P)H (MISHRA et FRIDOVICH, 1972 ; ELSTNER et al., 1976 ; BOVERIS et al., CRANE, 1977 ; ELSTNER, 1982,...).

Le fonctionnement de la NAD(P)H oxydase induit la peroxydation des lipides insaturés endo et exogènes. Cette dernière aboutit à l'autolyse des lutoïdes, consécutive à la dégradation peroxydative de leur membrane. L'utilisation d'inhibiteur spécifiques suggèrent que l'attaque peroxydative des structures insaturées est essentiellement attribuable à l'émission de formes radicalaires "ultra-toxiques" de l'oxygène (OH et 0_2^1) résultant des interactions entre $H_2 0_2$ et 0_2^- directement libérés par l'activité NAD(P)H oxydase.

PRESENCE DE PROTECTEURS DES STRUCTURES MEMBRANAIRES :

Le latex contient tout un "arsenal" enzymatique et non enzymatique capable normalement d'assurer une détoxification efficace des formes toxiques de l'oxygène émises par l'activité NAD(P)H oxydase. Nous

confirmons l'existence d'activités catalases et peroxydases (COUPÉ et al. 1972). Nous mettons en évidence la présence d'activités superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, glutathion réductase (à NAD(P)H) et de glyoxalase I, dans le latex. Nous étudions également le rôle des antioxydants (ascorbate, glutathion, ∞ -tocophérols, phénols,...).dans les systèmes de protection contre les dégradations peroxydatives, et en confirmons l'existence au sein du latex.

Nous en concluons qu'une éventuelle déstabilisation des structures membranaires au sein du latex, ne peut être attribuable qu'à la mise en place d'un déséquilibre "pathologique" entre "activités peroxydatives toxiques" et "activités protectrices" des structures insaturées in situ.

DEGRADATION DE LA MEMBRANE VACUOLYSOSOMALE ET SYNDROME D'ENCOCHE SECHE :

Les résultats d'analyses de différents paramètres biochimiques du latex provenant d'arbres sains ou atteints d'encoche sèche, interprétés par des méthodes d'analyse des données multivariables (ACP, CAH,...), montrent que les arbres atteints d'encoche sèche non délibérément induite, et dans une moindre mesure les arbres très bas-producteurs, se caractérisent par une "hyper-activité" NADH oxydase lutoïdique, et un effondrement des activités protectrices tant enzymatiques (SOD et/ou catalases), que non enzymatiques (RSH et ascorbate). Des corrélations entre ces différents facteurs et la productivité ou l'état physiologique des hévéas sont mises en évidence. Ils sont susceptibles de constituer des marqueurs de l'état physiologique des tissus producteurs de latex.

Ce déséquilibre total entre les activités peroxydatives toxiques et les activités protectrices se traduit par une déstabilisation complète des structures membranaires du latex. On constate en particulier une forte augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes.

SURSTIMULATION A L'ETHREL ET APPARITION D'ENCOCHES SECHES :

La surstimulation des hévéas par l'Ethrel induit l'apparition de symptômes typiques de l'encoche sèche. Les analyses biochimiques du latex des arbres atteints, montrent des symptômes similaires à ceux mis en évidence dans le latex des arbres atteints d'encoche sèche non délibérément induite. Ils correspondent également à une déstabilisation des structures membranaires consécutive à une activation persistante de la NADH oxydase lutoïdique, et une chute corrélative des activités protectrices. Tout se passe ainsi comme si, chez certains arbres, des traitements stimulants induisaient une sénescence puis une dégénérescence précoce des cellules laticifères.

Cependant aucun symptôme biochimique ne semble détectable, au niveau du latex, permettant de prévoir précocement l'induction de la "maladie". Ces symptômes biochimiques semblent en effet apparaître en même temps que les premiers signes visibles au niveau de l'encoche.

Nous discutons l'ensemble de ces résultats en insistant sur la relation possible entre le traumatisme hormonal (sur-dose d'Ethrel), et l'induction des phénomènes de dégénérescence et de sénescence classiquement provoqués par l'éthylène endo ou exogène, chez les végétaux. Ceux-ci se traduisent souvent en effet par des symptômes biochimiques analogues à ceux mis en évidence au sein du latex des arbres atteints d'encoche sèche (ABELES, 1973 ; KAR et MISHRA,1976 ; KENDE et HANSON, 1976, 1977 ; HALL, 1977 ; BRENNAN et FRENKEL, 1977 ; BEUTELMANN et KENDE, 1977 ; LIE-BERMANN, 1979 ; KONZE et KENDE, 1979 ; HENRY et RICHARD, 1979 ; KONZE et al., 1980 ;(STEWARD)et BEWLEY, 1980 ; BRABER, 1980 ; MONDAL et CHOUDHURI, 1981 ; DHINSDA et al., 1982 ; MAYAK et al., 1983 ; LEGGE et al., 1982 b ; ESAKA et al., 1983).

STRESS HORMONAL, PRODUCTION AUTOCATALYTIQUE D'ETHYLENE ET ENCOCHES SECHES

Nos résultats montrent que la stimulation de l'écorce des hévéas par l'Ethrel active, au moins transitoirement, la NAD(P)H oxydase lutoïdique, dont le fonctionnement libère dans le milieu, des anions superoxydes et de l'eau oxygénée.

Les données bibliographiques récentes indiquent que la synthèse d'éthylène endogène chez les végétaux implique la conversion de précurseur physiologique acide l-aminocyclopropane-l-carboxylique en éthylène, grâce à une attaque radicalaire par des formes agressives de l'oxygène, probablement $0\frac{1}{2}$ et OH' (BAKER *et al.*, 1978 ; APELBAUM *et al.*,1981 a et b ; LEGGE *et al.*, 1982a; LEGGE et THOMSON, 1983). Par ailleurs la confirmation récente d'une production autocatalytique d'éthylène endogène par différents organes végétaux, suite à un traitement par de l'éthylène exogène (RIOV et YANG, 1982 ; HUME et LOVELL, 1983) nous conduit à suggérer l'existence d'un phénomène analogue chez *Hevea*. On est en droit de penser que tout traitement hormonal, à base de produit libérant de l'<u>éthylène exogène,</u> induit au sein des laticifères une biosynthèse autocatalytique d'éthylène

endogène, stimulée par l'activation de la NAD(P)H oxydase lutoïdique génératrice d'anions superoxydes. Il semble par ailleurs que l'amplitude de cette activation de la production endogène d'éthylène soit proportionnelle à la dose d'éthylène exogène appliquée (RIOV et YANG, 1982). On peut alors supposer que la surstimulation en dose et en fréquence de l'écorce d'Hevea par l'Ethrel, engendre une telle activation de la production d'éthylène endogène, que la sur-concentration en éthylène entretenue au sein des laticifères, aboutit chez certains arbres particulièrement "réceptifs" à l'induction irréversible des processus conduisant à la sénescence cellulaire.

On peut également supposer a priori, que tout stress mécanique, chimique ou hormonal (en particulier toute forme de surexploitation prolongée des arbres) puisse se traduire par une hyper-activation de la synthèse d'éthylène *in situ* (COUPÉ, 1977) et l'apparition d'encoche sèche (DE FAŸ, 1981).

L'induction de ces phénomènes de sénescence précoce, correspondrait à l'établissement d'un déséquilibre entre activités peroxydatives toxiques et détoxifiantes intracellulaires, conduisant à la déstabilisation de toutes les structures membranaires intracellulaires, et en particulier à l'autolyse consécutive des phyto-lysosomes (lutoïdes) in situ.

Bien que l'on ne puisse affirmer qu'il n'existe qu'une seule cause, et un processus unique, conduisant à l'apparition d'encoche sèche, notre théorie reste toutefois compatible, et peut expliquer les phénomènes observés par différents auteurs au niveau des tissus de l'écorce atteints tels :

- la coagulation intralaticifère du latex (DE FAŸ, 1981), correspondant probablement à l'autolyse des lutoïdes ;

- l'apparition de gommes lignifiées et de divers processus de lignification endo et pericellulaire (DE FAŸ, 1981)(nécessitant un apport d'H₂O₂, et de fortes activités peroxydases) ;

- la formation de thyllosoïdes correspondant, au moins pour partie, à une fragilisation de la membrane et de la paroi des laticifères (DE FAŸ, 1981) (explicable éventuellement par la dégradation des structures insaturées) ;

- la formation de tissus nécrotiques (DE FAY, 1981), typiques de l'action lysosomale et peroxydative ; - la formation de tissus néoplastiques (DE FAY, 1981), qui ont été caractérisés dans le monde animal comme déficient en diverses activités protectrices vis-à-vis des formes agressives de l'oxygène (GREENSTEIN, 1947 ; BOZZY et al., 1976 ; PESKIN et al., 1977,...) ;

- la modification de la perméabilité des laticifères (déstabilisation du plasmalemme ?) mise en cause par SCHWEIZER (1949), BEALING et CHUA (1972) et PUSHPADAS et al., (1975).

De notre point de vue, il ne fait aucun doute que les lutoïdes interviennent d'une façon <u>active</u> et déterminante dans les systèmes régulateurs de la production du latex de part leur double fonction vacuolaire et lysosomale.

REFERENCES

.

BIBLIOGRAPHIQUES

· —

•

.

- ABRAHAM P.D. and TAYLER R.S., 1967 Stimulation of latex flow in Hevea brasiliensis. Exp. Agric., III, 1, 12.
- ABRAHAM P.D., WYCHERLEY P.R. et PAKIANATHAN S.W., 1968 a Stimulation of latex flo in Hevea brasiliensis by 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid and 2-chloroethane phosphonic acid. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 20, 291-305.
- ABRAHAM P.D., BOATMAN S.G., BLACKMAN G.E. et POWELL R.G., 1968 b Effects of plant regulators and other compounds on flow of latex in Hevea brasiliensis. Ann. appl. Biol., 62, 159-173.
- ADMON A., JACOBY B. and OLDSCHMIDT E.E., 1981 Some characteristics of the Mg-ATPase of isolated red beet vacuoles. Plant. Sci. Lett.. 22, 89-96.
- AFFOLTER H. and CARAFOLI E., 1980 The Ca²⁺/Na⁺ antiporter of heart mitochondria operates electroneutrally. Biochem. Biophys. Rech. Commun., 95, 193-196.
- AKERMAN K.E.O., 1978 Effects of pH and Ca²⁺ on the retention of Ca²⁺ by rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 189, 256-262.
- ALIBERT G., BOUDET A.M. and RATABOUL P., 1981 Transport of o-coumaric acid glucoside in Isolated vacuoles of sweet clover. In plasmalemma and Tonoplast. Their Functions in the Plant cell, D. MARME, E. MARRE and H. HERTEL, eds. Elsevier/North Holland Biochemical Press. Amsterdam 193-200.
- ALIBERT G. et BOUDET A., 1982 Progrès, problèmes et perspectives dans l'obtention et l'utilisation de vacuoles isolées. Physiol. Vég., 20, 289-302.
- ALTENDORF K., HIRATA H. et HAROLD F.M., 1975 Accumulation of lipid-soluble ions and of rubidium as indicators of the electrical potential in membrane vesicles of Escherichia colli. J. Biol. Chem., 250, 1405-1412.
- ANDREWS E.H. et DICKENSON P.B., 1960 et 1961 a- Preliminary electron microscope observations on the ultrastructure of the latex vessel and its contents in young tissues of Hevea brasiliensis. Proc. Nat. Rubb. Res. Conf., Huala Lumpur, 1960, 756-765.
- ANDREWS E.H. et DICKENSON P.B., 1961 b Observations préliminaires en microscopie électronique sur l'ultrastructure des vaisseaux laticifères et du latex dans les tissus jeunes de l' Hevea brasiliensis. Rev. Gén. Caout. Plast., 38, 397-402.
- APELBAUM A., BURGOON A.C., ANDERSON J.D., SOLOMOS T. and LIEBERMAN M., 1981 a. Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. Plant. Physiol., 67, 80-84.

- APELBAUM A., WANG S.Y., BURGOON A.C., BAKER J.E. and LIBERMAN M., 1981 b Inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. Plant. Physiol., 67, 74-79.
- APPS D.K. et SCHATZ G., 1979 An adenosine triphosphatase isolated from chromaffin granule membranes is closely similar to F₁-adenosine triphosphatase of mitochondria. Eur. J. Biochem., 100, 411-419.
- APPS D.K., PRYDE J.G., SUTTON R. and PHILLIPS J.H., 1980 Inhibition of adenosine triphosphatase, 5-hydroxytryptamine transport and protontranslocation activities of resealed chromaffin-granule ghosts. Biochem. J., 190, 273-282.
- ARCHER B.L., 1960 The proteins of Hevea brasiliensis latex. 4: Isolation and characterization of crystalline heveine. Biochem. J., 75, 236-240.
- ARCHER B.L., 1976 Hevamine, a crystalline basic protein from Hevea brasiliensis latex. Phytochemistry, 15, 297-300.
- ARCHER B.L., BARNARD D., COCKBAIN E.G., DICKENSON P.B. et Mc MULLEN A.I., 1963 -Structure, composition and biochemistry of Hevea latex in L. BATEMAN. The chemistry and Physics of Rubber-like substances, 43-54, Mc LAREN and sons, Ltd, Londres.
- ARCHER B.L. and AUDLEY B.G.,1967 Biosynthesis of rubber. Adv. Enzymol., 29, 221-234.
- ARCHER B.L., AUDLEY B.G., Mc SWEENEY G.P. et TAN C.H., 1969 Studies on the composition of latex serum and bottom fraction particle. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 560-569.
- ARISZ W.H., 1920 On the flow of latex in the tapping of Hevea. Arch. Rubbercult. 4, 319-323.
- ARISZ W.H., 1928 Physiology van het tappen. Arch. Rubbercult., 12, 21-25.
- ARREGUIN B., BONNER J. and WOOD B.J., 1951 The mecanism of rubber formation in the guayule. III : Experiments with isotopic carbon. Arch. Biochem. Biophys., 31, 234-243.
- ARREGUIN B. et ROCK M.C.,1967 Ciclo de las pentosas en el latex de Hevea brasiliensis Muell. Bol. Inst. Quim. Univers. Nat. Aut. de Mexico, 19, 58-73.
- ASADA K., URANO M. et TAKAHASHI M.,1972 Subcellular location of superoxide dismutase in spinach leaves, and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 36, 257-266.
- ASADA K., TAKAHASHI M. and NAGATO M., 1974 Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. Agric. Biol. Chem. 38, 471-473.
- ASHPLANT H.,1926 Deep tapping versus shallow tapping. R.G.A. Bulletin : 340 (cité par EVERS 1974).

- ASGHAR S.S., LEVIN E. et LEVIN F.M., 1973 Accumulation of neutral amino-acids by Streptococcus faecalis : Energy coupling by a protonmotive force. J. Biol. Chem., 248, 5225-5233.
- d'AUZAC J.,1964 Mise en évidence de la glycolyse et de ses relations avec la biosynthèse du caoutchouc au sein du latex d'Hevea brasíliensis. Rev. Gén. Caout. Plast., 41, 1831-1834
- d'AUZAC J.,1965 a Etude de quelques réactions métaboliques liées, au sein du latex d'Hevea brasiliensis, à la biogénèse du caoutchouc. Thèse Doct. Etat, Sci. Nat., Paris n° A 4600.
- d'AUZAC J.,1965 b Sur quelques relations entre la composition, l'activité biochimique du latex et la productivité de l'Hevea brasiliensis. 2ème Thèse Doct. Etat, Sci. Nat., Paris.
- d'AUZAC J.,1975 Caractérisation d'une ATPase membranaire en présence d'une phosphatase acide dans les lutoïdes d'Hevea brasiliensis. Phytochemistry, 14, 671-675.
- d'AUZAC J.,1976 Etude d'une ATPase liée à la membrane de vacuoles lysosomales : les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis. Ann. Sci. Nat. Bot., 17, 357-360.
- d'AUZAC J.,1977 ATPase membranaire de vacuoles lysosomales : les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis. Phytochemistry, 16, 1881-1885.
- d'AUZAC J., 1978 Intervention des ATPases des plantes supérieures dans l'absorption des solutés. Physiol. Vég., 16, 37-65.
- d'AUZAC J.,1981 Une a -mannosidase dans un système vacuolaire végétal : les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis. C.R. Acad. Sc., 292, (série III), 1085-1087.
- d'AUZAC J. et PUJARNISCLE S., 1959 Sur les différentes formes de phosphore présentes dans le latex d'hévéa. Rev. Gén. Caout., 36, 862-870.
- d'AUZAC J. et PUJARNISCLE S., 1961 Aperçu sur l'étude des glucides de l'hévéa et sur leurs variations. Rev. Gén. Caout., 38, 1131-1139.
- d'AUZAC J. et RIBAILLIER D.,1969 L'éthylène nouvel agent stimulant la production de latex chez l'Hevea brasiliensis. C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. D., 268, 3046-3049 et Rev. Gén. Caout. Plast., 46, 857-858.
- d'AUZAC J. et JACOB J.L., 1969 Regulation of glycolysis in latex of Hevea brasiliensis. J. Rubber. Res. Inst. Malaya, 21, 417-444.
- d'AUZAC J. et LIORET C.,1974 Mise en évidence d'un mécanisme d'accumulation du citrate dans les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis (Kunth) Müll. Arg. Physiol. Vég., 12, 617-635.
- d'AUZAC J., BRZOZOWSKA J., HANOWER P., LAMBERT C. et LIORET C.,1977 Un modèle de structure vacuolaire isolée intacte : les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis : I. Accumulation et pénétration d'ions organiques dans le compartiment lutoïdique. in THELLIER M., MONNIER.A., DEMARTY M., DAINTY J., Echanges ioniques transmembranaires chez les végétaux, Colloque International du C.N.R.S., Rouen, Juillet 1976 : 391-398, Editions de l'Université de Rouen et Editions du CNRS.
d'AUZAC J., DUPONT J., JACOB J.L., LANCE C., MARIN B. et MOREAU F., 1977 – Un modèle de structure vacuolaire isolée intacte ; les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis. II. Caractéristiques de la membrane lutoïdique. in THELLIER M., MONNIER A., DEMARTY M., et DAINTY J., Echanges ioniques transmembranaires chez les végétaux, Colloque International du CNRS, Rouen, Juillet 1976 : 399-406, Editions de l'Université de Rouen et Editions du CNRS.

- d'AUZAC J., CRETIN H., MARIN B. et LIORET C.,1982 A plant vacuolar system the lutoids from Hevea brasiliensis latex. Physiol. Vég., 20, 311-331.
- BADWEY J.A. et KARNOVSKY M.L., 1979 Production of superoxide and hydrogen peroxide by an NADH-oxydase in Guinea Pig polymorphonuclear leucocytes - Modulation by Nucleotides and divalent cations. J. Biol. Chem., 254, 11530-11537.
- BAEHNER R.L. et KARNOVSKY M.L., 1968 Deficiency of Reduces Nicotinamide Adenine Dinucleotide Oxidase in chronic Granulomatous Disease. Science, 162, 1277-1279.
- BAEHNER R.L., GILMAN N. et KARNOVSKY M.L., 1970 Respiration and glucose oxydation in human and Guinea Pig leucocytes : Comparative studies. J. Clin. Invest., 49, 692-700.
- BAKEEV L.E., GRINIUS L.L., JASAITIS A.A., KULIENE V.V., LEVITSKY D.D., LIBERMAN E.A., SEVERINA I.I. et SKULACHEV V.P., 1970 - Conversion of biomembrane-produced energy into electric form : II. Intacts mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 216, 13-21.
- BAKER J.E., LIEBERMAN M. and ANDERSON J.D., 1978 Inhibition of ethylene production in fruit slices by a rhizobitoxine analog and free radical scavengers. *Plant. Physiol.*, 61, 886-888.
- BANCHI Y., 1966 De la participation de la voie des hexoses monophosphates à la desmolyse glucidique au sein du latex in vitro. Inst. Rech. Caout. Vietnam, Arch. nº 7/66.
- BANCHI Y.,1967 Essai de sélection de produits stimulant la production de l'hévéa. Arch. Inst. Rech. Caout. Vietnam, nº 9/67.
- BANCHI Y.,1968 Effets de l'acétylène sur la production en latex de l'Hevea brasiliensis. Arch. Inst. Rech. Caout. Vietnam, n° 9/68.
- BANCHI Y. et POLINIERE J.P., 1969 Effects of minerals introduced directly into the wood and of acetylene applied to the bark of hevea. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 192-206.
- BANDURSKI R.S. et TEAS H.J., 1957 Rubber biosynthesis in latex of Hevea brasiliensis. Plant Physiol., 32, 643-648.
- BANGRATZ J., CRETIN H. et GIDROL X., 1982 Les nucléotides adenyliques et la "charge énergétique du latex d'Hevea brasiliensis : Relations avec la productivité des hévéas. Effets de la stimulation à l'Ethrel. Rapport interne ORSTOM multigraphié, 23 p., 26 fig., 4 tab.

- BAPTIST E.D.C. et DE JONGE P.,1955 Stimulation of yield in Hevea brasiliensis. II. Effect of synthetic growth substances on yield and bark renewal. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 14, 362-382.
- BARBER A. and BERNHEIM F., 1967 Lipid peroxidation : its measurement, occurence and significance in animal tissue. Adv. Gerontol. Res., 2, 355-403.
- BARBIER H. et GUERN J., 1982 Transmembrane potential of isolated vacuoles and sucrose accumulation by Beta vulgaris roots. In Plasmalemma and Tonoplast : Their Functions in the Plant Cell. D. MARME, E. MARRE and J. HERTEL, ed., Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam, 233-240.
- BATEMAN L., 1954 Olefin oxidation. Quart. Reviews, 8, 147-156
- BEALING F.J., CHUA S.E., 1972 Output, composition and metabolic activity of Hevea latex in relation to tapping intensity and the onset of Brown Bast. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 23, 204-231.
- BEAUCHAMP C. and FRIDOVICH I.,1971 Superoxyde dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem., 44, 276-287.
- BEEM K.M., RICH W.E. et RAJAGOPALAN K.V.,1974 Total reconstitution of Copperzinc superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 249, 7298-7305.
- BERGMEYER H.U., 1965 Diphosphopyridine Nucleotide, Reduced; in : Methods of enzymatic analysis – Bergmeyer, H.H., Editor Academic Press pp.1011.
- BERNARDI P. and AZZONE G.F., 1979 ΔpH induced calcium fluxes in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 102, 555-562.
- BEUTELMANN P. and KENDE H., 1977 Membrane lipids in senescing flower tissue of Ipomoea tricolor. Plant. Physiol., 59, 888-893.
- BILDACK W.R. et TAPPEL A.L,1972 A proposed mechanism for the TNPH enzymatic lipid peroxidizing system of rat liver microsomes. Lipids, 7, 564-565.
- BOATMAN S.G., 1966 Preliminary physiological studies on the promotion of latex flow by plant growth regulators. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 19, 243-258.
- BOBILIOFF D.W., 1919 The cause of Brown Bast disease of Hevea brasiliensis. Archf. Rubbercult. 3 , 178.
- BOBILIOFF W., 1923 Anatomy and physiology of Hevea brasiliensis. Zurich Art Inst., Orell Füssli. Par 1.150.
- BOLLER T., 1977 Die arginin-permease der Hefevakuole. Ph. D. Thesis E.T.H. n° 5928, Swiss Federal Institut of Technology, Zurich, 224 p.

- BOLLER T., DURR M. et WIEMKEN A.,1975 Characterization of a specific transport system for arginine in isolated yeast vacuoles. *Eur. J. Biochem.*, 54, 81-91.
- BOLLER T. et KENDE H., 1979 Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. Plant Physiol., 63, 1123-1132.
- BORS W., SARAN M. and CZAPSKI G., 1980 The nature of intermediates during biological oxygen activation. In : Developments in Biochemistmy, Vol. 11 B. New York : Elsevier/North Holland, 1-31.
- BOVERIS A., OSHINO N. and CHANCE B., 1972 The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem. J., 128, 617-630.
- BOVERIS A., CADENAS E. and STOPPANI A., 1976 Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem. J., 156, 435-444.
- BOWMAN B.J., BLASCO F. et SLAYMAN C.W., 1978 Biochemical characterization of the electrogenic proton pump of the Neurospora plasma membrane in DUTTON P.L., LEIGH J.S. et SCARPA A., Frontiers of biological energetics, vol. 1, 525-533, Academic Press, New-york.
- BOZZY A., MOVELLI I., FINAZZI-AGRO A., STROM R., WOLF A.M., MONDOVI B. and ROTILIO G.,1976 - Enzyme defense against reactive oxygen derivatives. II : Erythrocytes and tumor cells. Mol. Cell. Biochem., 10, 11-16.
- BRABER J.M., 1980 Catalase and peroxidase in primary bean leaves during development and senescence. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 97.S. 135-144.
- BRENNAN T. and FRENKEL C., 1977 Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. Plant. Physiol., 59, 411-416.
- BRIGGS R.T., DRATH D.B., KARNOVSKY M.L. et KARNOVSKY M.J.,1975 Localisation of NADH oxydase on the surface of human polymorphonuclear leucocytes by a new cytochemical method. J. Cell., Biol. 67, 566-568.
- BRISKIN D.P. et LEONARD R.T., 1980 Isolation of tonoplast vesicles from tobacco protoplasts. Plant Physiol., 66, 684-687.
- BRZOZOWSKA J., HANOWER P. et CHEZEAU R., 1974 Free amino-acids of Hevea brasiliensis latex. Experientia, 30, 894-895.
- BRZOZOWSKA J., HANOWER P. et LIORET C., 1978 Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'Hevea brasiliensis : Systèmes enzymatiques impliqués dans le processus. I-Phenol oxydases. Physiol. Vég., 16, 231-254.
- BRZOZOWSKA-HANOWER J., CRETIN H., HANOWER P. et MICHEL P., 1979 Variations de pH entre compartiments vacuolaire et cytoplasmatique 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, 889-905.

- BURGES N.A., 1963 Enzymes chemistry of phenolic Compounds, J.B. Pridham Editor. Pergamon Press Oxford.
- BUSER C. et MATILE P., 1977 Malic acid in vacuoles isolated from Bryophyllum leaf cells. Z. Pflanzenphysiol., 82, 462-466.
- BUTTERY B.R. et BOATMAN S.G., 1964 Turgor pressures in phloem. Measurements on hevea latex. Science, 145, 285-286.
- BUTTERY B.R. et BOATMAN S.G., 1966 Manometric measurement of turgor pressures in laticiferous phloem tissues. J. exp. Bot., 17, 283-296.
- BUTTERY B.R. et BOATMAN S.G., 1967 Effect of tapping, wounding and growth regulators on turgor pressure in Hevea brasiliensis Muell. Arg. J. exp. Bot., 18, 644-659.
- CADENAS E., BOVERIS A., TARRAGAN C., and STOPPANI A.O.M.,1977 Production of superoxide Radicals and hydrogen Peroxide by NADH-Ubiquinone reductase and ubiquinol-Cytochrome C reductase from Beef heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 180, 248-257.
- CADENAS E. and BOVERIS A., 1980 Enhancement of hydrogen peroxide formation by protonophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. Biochem. J., 188, 31-37.
- CALDWELL C. and HAUG A.,1980 Kinetic characterization of barley roots plasma membrane-bound Ca²⁺ and Mg²⁺ - dependent adenosine triphosphatase activities. *Physiol. Plant.*, 50, 183-193.
- CALVIN M.,1954 Mercaptans and disulfides : some physics, chemistry and speculation - in : glutathione Colowick et al. Editors. Academic Press. New York pp 30-45
- CAMBRAIA J. and HODGES T.K., 1980 ATPase of plasma membranes of oat roots. In : Plant Membrane Transports : Current Conceptual Issues ; R.M. SPANSWICK, W.J. LUCAS and J. DAINTY, eds ; Elsevier North Holland. Amsterdam. 211-222.
- CASEY R.P. and AZZI A., 1983 An evaluation of the evidence for H^T pumping by reconstitued cytochrome <u>c</u> oxidase in the light of recent criticism. F.E.B.S. Lett., 154, 237-242.
- CASWELL A.H. and PRESSMAN B.C., 1972 Kinetics of transport of divalent cations across sarcoplasmic reticulum vesicles induced by ionophores. Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, 292-304.
- CAVAGNE T., 1983 Les composés phénoliques de la fraction lutoïdique du latex d'Hevea brasiliensis : Relations avec leur compartimentation dans le latex. D.E.A. Sci. Agro., U.S.T.L., Montpellier.
- CHANCE B.,1951 The iron-containing enzymes-C. The enzyme substrate compounds and mechanism of action of the hydroperoxide - In : The Enzymes, edited by J.B. Summer and U Myrbäck - N-Y Acad., 428-453.
- CHANCE B. and MAEHLY A.C., 1955 Assay of catalase and peroxydases. In : Methods in Enzymology, Vol. II, S.P. COLLOWICK and N.O. KAPLAN, ed., Academic Press, New York, 764-775.

- CHARRIERE LADREIX Y., 1976 Répartition intracellulaire du secretat flavonique de Populus nígra L. Planta 129, 167-174.
- CHAYKIN S., LAW J., PHILIPS A., TCHEN T.T. and BLOCK K.,1958 Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 918-1004.
- CHERTERTON C.J. and KECKWICK R.G.O., 1966 Formation of Δ^3 Isopentenyl phosphate by Hevea brasiliensis latex. Biochem. J., 98, 26-27.
- CHOW C.K. and TAPPEL A.L., 1972 An enzymatic protective méchanism vs. lípid peroxidation damage to lungs of oxygen exposed rats. Lípíds, 7, 518-524.
- CHRESTIN H., GIDROL X., MARIN B., JACOB J.L. et d'AUZAC J., 1983 a- Role of the lutoïdic tonoplast in the control of the cytosolic homeostasis within the latex cells of Hevea. (International Symposium Phytochemical Society of Europe : "Membranes and Compartimentation in Regulation of Plant Functions". (Toulouse, septembre 1983). In Zeischrift für Pflanzphysiologie Bd.114 S., 269-277, (1984).
- CHRESTIN H., BANGRATZ J., d'AUZAC J. et JACOB J.L., 1983 b. Role of the lutoïdic tonoplast in the senescence and degenerescence of the latex cells of Hevea brasiliensis. (International Symposium Phytochemical Society of Europe : "Membranes and compartimentation in Regulation of Plant Function Toulouse, septembre. 1983). In : "Zeischrift für Pflanzphysiologie Bd.114 S., 261-268, (1984).
- CHRESTIN H., GIDROL X., BANGRATZ J. and d'AUZAC J.,1984 a Kinetics of ethylene effects on the ATP level, the tonoplastic ATPase activity and the intravacuolar acidification in the latex cells of Hevea brasiliensis. Submitted to Planta.
- CHRESTIN H., GIDROL X. and MOUNOURY G., 1984 b Activation of the tonoplastic ATPase and of proteosynthesis in the latex cells of heveas treated with Ethrel (an ethylene generator). Submitted.
- CHUA S.E., 1967 Physiological changes in Hevea trees under intensive tapping. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 20, 100-105.
- CHURCHILL K.A. and SZE H., 1983 Anion sensitive H⁺ pumping ATPase in membrane vesicles from oat roots. Plant. Physiol. 71, 610-617
- CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM 65 (NS), 1979 Oxygen Free radicals and tissue damage. Amsterdam : Excerpta Medica (381 p.)
- COCKBAIN E.G. et SOUTHORN W.A., 1962 Structure et composition du latex d'Hevea. Rev. Gén. Caout. Plast., 39, 1149-1156
- COHEN G. and HEIKKILA R.E., 1974 The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuronic acid and related cytotoxic agents. J. Biol. Chem., 249, 2447-2452.

- COMPAGNON P. et TIXIER P.,1950 Sur une possibilité d'améliorer la production de l'Hevea brasiliensis par l'apport d'oligoéléments. Rev. Gén. Caout.,27, 525-526, 591-594, 663-665.
- COMPAGNON P. et TIXIER P.,1953 Sur la stimulation de la production de l'Hevea brasiliensis par la méthode d'injection. Arch. Rubbercult., Ext. Numm., 1, 29-49.
- COMPAGNON P., TIXIER P., ROUJANSKY G., 1953 Contribution à l'étude des accidents physiologiques de saignée. A.R.C. extra nº 1.
- COOK A.S. et SEKHAR B.C., 1955 Fractions from Hevea brasiliensis latex centrifuged at 59.000 x g. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 14, 163-167.
- COUPÉ M., 1977 Etudes physiologiques sur le renouvellement du latex d'Hevea brasiliensis. Action de l'ethylène. Importance des polyribosomes. Thèse de Doctorat d'Etat, Sciences Naturelles, Université de Montpellier IIn U.S.T.L., Montpellier, 213 p.
- COUPÉ M. et d'AUZAC J.,1972 Mise en évidence de polysomes fonctionnels dans le latex d'Hevea brasiliensis (Kunth) Müll. - Arg. C.R. Acad. Sci., Ser. D, 274, 1031-1034.
- COUPÉ M., PUJARNISCLE S. et d'AUZAC J.,1972 Compartimentation de diverses oxydo-réductases (peroxydase, <u>o</u>-diphénol-oxydase et malate-deshydrogénase) dans le latex d'Hevea brasiliensis. (Kunth) Müll.-Arg. Physiol. Vég., 10, 459-480.
- COUPÉ M. et d'AUZAC J.,1974 a -Action de l'acide chloro-2-éthyl phosphonique (Ethrel) sur les polysomes du latex d'Hevea brasiliensis (Kunth) Müll. - Arg. Physiol. Vég., 12, 1-11.
- COUPÉ M. et d'AUZAC J.,1974 b Caractéristiques de l'incorporation d'acides aminés par les polysomes isolés du latex d'Hevea brasiliensis. Phytochemistry, 13, 85-88.
- COUPÉ M., LAMBERT C. et d'AUZAC J., 1976 Etude comparative des polyribosomes du latex d'Hevea sous l'action de l'ethrel et d'autres produits augmentant l'écoulement du latex. Physiol. Vég., 14, 391-406.
- COUPÉ M. et LAMBERT C., 1977 Absorption of citrate by the lutoïds of latex and rubber production by Hevea. Phytochemistry, 16, 455-458.
- CRANE F.L., 1977 Hydroquinone dehydrogenases. Ann. Rev. Plant Physiol., 28, 440-470.
- COLLOWICK S.P. and WOMACK F.C., 1969 Binding of diffusible molecules ; rapid measurement by rate of dialysis. J. Biol. Chem., 244, 774-776.
- CRETIN H., 1979 a Contribution à l'étude des facteurs limitant la production du latex chez Hevea brasiliensis : 1) Composés phénoliques du latex et coagulation. 2) pH des compartiments du latex et régénération du latex au sein des laticifères. 3) Le "syndrome des encoches sèches". Rapport d'élève ORSTOM multigraphié, 118 pages, 21 figures et 11 tableaux (janvier 1979).

- CRETIN H., 1979 b Les lutoïdes :"pH stat" biophysique et particules détoxifiant le cytoplasme du latex d'Hevea brasiliensis. Mise en évidence de systèmes translocateurs de protons au niveau de la membrane lutoïdique. Processus énergisant l'absorption des ions (L. lysine). Rapport interne multigraphié ORSTOM : 31 pages, 12 figures, 1 tableau.
- CRETIN H., 1979 c Influences de quelques paramètres écoclimatiques et de la stimulation à l'Ethrel, sur la production et certaines caractéristiques physico-chimiques de latex d'Hevea brasiliensis en Basse Côte d'Ivoire. D.E.A. d'Ecologie tropicale (1978). Université d'Abidjan (République de Côte d'Ivoire).
- CRETIN H., 1982 The proton gradient across the vacuo-lysosomal membrane of lutoïds from the latex of Hevea brasiliensis : I. Further evidence for a proton-translocating ATPase on the vacuo-lysosomal membrane of intact lutoïds. J. Membrane biol. 65, 175-184.
- CRETIN H.,1983 Efflux transtonoplastique de protons lors du fonctionnement d'un système transporteur d'électrons (la NADH-cytochrome c réductase) membranaire des vacuolysosomes du latex d'Hevea brasiliensis. C.R. Acad. Sc. Paris, série III, t.296, 137-142.
- CRETIN H., JACOB J.L., PREVOST J.C. et d'AUZAC J.,1980 pH du latex d'hévéa, son influence sur la production et les éléments de sa régulation Dans : Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques n° 603, pp. 111-114.
- CRETIN H. et NOIROT M., 1982 Utilisation comparée de méthodes d'analyses des données dans l'étude de quelques composantes biochimiques du rendement et d'une anomalie physiologique ("syndrome des encoches sèches") chez Hevea brasiliensis. (Comm. 11e Conférence Internationale de Biométrie "Biométrie 82" Toulouse, septembre 1982). 6 p., 4 fig., 2 tabl.
- CRETIN H., MARIN B. et d'AUZAC J., 1982 Characterization of a magnesiumdependent proton translocating ATPase on the Hevea latex tonoplast (Comm. int. Workshop Strasbourg, sept. 1981); in : Plasmalemma and Tonoplast : Their Functions in the plant Cell/D.MARME, E. MARRE and R. HERTEL Editors. Elsevier Biomedical Press, pp. 201-208.
- CRETIN H. et BANGRATZ J., 1983 Une activité enzymatique endogène (NAD(P)H dépendante, responsable de la dégradation peroxydative des organites membranaires et de la coagulation précoce, ou in situ, du latex d'Hevea brasiliensis. C.R. Acad. Sc. Paris. Série III, t.296, 101-106.
- CRETIN H., GIDROL X. et MOUNOURY G., 1983 Ethylène stimulation of the ATPdependent transtonoplastic protons fluxes in Hevea latex cells. (abstr. Poster Symposium "Membrane transport in Plants", Prague, August 1983). In "Membrane Transports in Plants"; Czechoslovack Academy of Sciences publishing house and Wiley & Sons, Ltd (1984); (2 p.).

٠

CRETIN H., GIDROL X., PEAN M. et MARIN B., 1983 - The control of the cytosolic homeostasis by tonoplast and vacuoles, in the latex cells of Hevea brasiliensis (abstract, Poster Symposium "Membrane Transports in Plants", Prague, August 1983). In : "Membrane transport in Plants ; Czecholavack Academy of Sciences Publishing house and Wiley & Sons, Ltd 1984. DAVIES D.D., 1973 - Control of and by pH. Symp. Soc. Exp. Biol., 27, 513-529.

- DAVIES D.D., 1973 Metabolic control in higher plants. In : Biosynthesis and its control in Plants, ed. B.V. MILLBOROW. London Academic 1-20.
- DAVIES D.D., 1977 Control of pH and glycolysis. Phytochem. Soc. Symp., 14, ed. H. SMITH. New York : Academic, 41-62.
- DAVIES D.D., 1979 The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. Ann. Rew. Plant. Physiol., 30, 131-158.
- DAVIS W.C., HUBER H., DOUGLAS S. et FUDENBURGH., 1968 A defect in circulating Monocuclear phagocytes in chronic granulomatous desease of childhood (communication J. Immunol., 101, 1093-1095.
- DELL'ANTONE P., 1979 Evidence for an ATP-driven "proton pump" in rat liver lysosomal by basic dyes uptake. Biochem. Biophys. Res. Commun., 86, 180-189.
- DHINDSA R.S., PLUMB-DHINDSA P.L. and REID D., 1982 Leaf senescence and lipid peroxidation : Effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiol. Plant.*, 56, 453-457.
- DICKENSON P.B., 1965 The ultra-structure of the latex of Hevea brasiliensis. Proc. Nat. Rubb. Prod. Res. Ass., Jubilee Conf., Cambridge, 1964, 52-56, Mc Laren and Sons Ltd., Londres.
- DICKENSON P.B., 1969 Electron microscopical studies of the latex vessel system of Hevea brasiliensis. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 543-559.
- DIETER P. and MARME D., 1980 Calmodulin activation of plant microsomal Ca²⁺ uptake. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7311-7314.
- DIETER P. and MARME D., 1980 Ca²⁺ transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher plants. Planta, 150, 1-8.
- DIETER P. and MARME D.,1982 Calmodulin activation of the microsomal Ca²⁺ uptake and of the Ca²⁺ transport ATPase. In : Plasmalemma and Tonoplast : Their Functions in the Plant Cell ; D. MARME, E. MARRE and R. HERTEL, eds, Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam, 353-360.
- DIETER P. and MARME D., 1984 The role of calcium and calmodulin in higher Plants. In : Membranes and Compartmentation in the regulation of plant functions ; A.M. BOUDET, G. ALLIBERT, G. MARIGO and P.J LEA, eds ; Annual Proceeding of the Phytochemical Society of Europe, Vol. 24, Oxford University Press.
- DIGUISEPPI J. and FRIDOVICH I.,1980 Ethylene from 2 keto-4-thiomethyl butiric acid : the Haber-Weiss reaction - Arch. Biochem. Biophys. 205, 323-329.
- DIZENGREMEL P., 1980 Modification des transports d'électrons mitochondriaux au cours de la durvie de tranches de tubercules de pommes de terre (Solanum tuberosum L.). Thèse de Doctorat d'Etat, Sciences Naturelles, Université Pierre et Marie Curie, Paris.

- DOLL S. and HAUER R., 1981 Determination of the membrane potential of vacuoles isolated from red-beet storage tissue. Planta, 152, 153-158.
- DOLL S., RODIER F. and WILLENBRINK.J., 1979 Accumulation of sucrose in vacuoles isolated from red-beet tissue. *Planta*, 144, 407-411.
- DOUCE R., HOLTZ R.B. et BENSON A.A., 1973 a Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. J. Biol. Chem., 248, 7215-7222.
- DOUCE R., MANELLA C.A. et BONNER W.D., Jr., 1973 b The external NADH-deshydrogenases of intact plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 292, 105-116.
- DUCET G.,1982 Les mécanismes respiratoires chez les végétaux. Bull. Soc. Bot. Fr.,129, Actual. Bot. 2, 7-17.
- DUNPHY P.J., WHITTLE K.J., PENNOCK J.F. et MORTON R.A., 1965 Identification and estimation of tocotrienols in hevea latex. Nature London, 207, 521.
- DUPONT J., MOREAU F., LANCE C. et JACOB J.L., 1976 Phospholipid composition of the membrane of lutoïds from Hevea brasiliensis latex. Phytochemistry, 15, 1215-1217.
- DUPONT F. and LEONARD R.T., 1980 Solubilisation and partial purification of the adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. Plant. Physiol., 65, 931-938.
- DUPONT F.M., BURKE R.M. and SPANSWICK R.M., 1981 Characterization of a partially purified adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. *Plant. Physiol.*, 67, 59-63.
- DUPONT F.P., GIORGI D.L. and SPANSWICK R., 1982 Characterization of a protontranslocating ATPase in microsomal vesicles from corn roots. *Plant. Physiol.*, 70, 1694-1699.
- DUPONT F.M., BENNETT A.B. and SPANSWICK R.M., 1982 Localisation of a protontranslocating ATPase on sucrose gradients. Plant. Physiol., 70, 115-119.
- DURR M., BOLLER T. et WIEMKEN A., 1976 Action of proteinases on the arginine transport of purified vacuoles from Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun., 73, 193-199.
- DURR M., URECH K., BOLLER T., WIEMKEN A., SCHWENCKE J. et NAGY M., 1979 -Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (Saccharomyces cerevisiae). Arch. Microbiol., 121, 169-175.
- DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS F.,1955 -Tissue fractionation studies. VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem. J.,60, 604-617.
- DE DUVE C. and BAUDHUIN P.,1966 Peroxisomes (microbodies and related particles). Physicl. Rev., 46, 323-357.

- EDDY A.A., 1978 Proton-dependent solute transport in micro-organisms. Cur. Top. Membr. Transport, 10, 279-360.
- ELEMA R.P., MICHELS P.A.M. and KONINGS W.N., 1978 Response of 9-aminoacridine fluorescence to transmembrane pH gradient in chromatophores from Rhodopseudomonas spheroïdes. Fur. J. Biochem., 92, 381-387.
- ELIMANN G.L., 1959 Tissue sulfhydryl groups Arch. Biochem. Biophys., 82, 70-77.
- ELSTNER E.F., 1982 Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev. Plant. Physiol., 33, 73-96.
- ELSTNER E.F. and FROMMEYER D., 1979 Analysis of different mechanisms of photosynthetic oxygen reduction. Z. Natutforsch, Teil C., 33, 276-279.
- ELSTNER E.F., KONZE J.R., SELMAN B. and STOFFER C., 1976 Ethylene formation in sugar beet leaves. Evidence for the involvement of 3hydroxytyramine and phenoloxidase after wounding. Plant. Physiol. 58, 163-168.
- ESAKA M., TAKAHASHI T. and ASAHI T., 1983 Effect of ethylene on the increase in catalase activity through micobody Development in wounded sweet potato root tissue. Plant and Cell Physiol., 24, 625-633.
- ESCHBACH J.M., VAN DE SYPE H., ROUSSEL D. and JACOB J.L., 1983 The study of several physiological parameters of latex and their relationships with production mechanisms. Int. Rubb. Res. Dev. Board. Symposium; Pekin (12-14 may).
- ESCHBACH J.M., ROUSSEL D., VAN DE SYPE H. and JACOB J.L., 1984 Relationships between yield and clonal physiological characteristics of latex from Hevea brasiliensis (accepté pour publication dans Physiol. Veg.)
- EVERS, 1974 L'équilibre croissance production chez l'Hévéa et son influence sur les accidents physiologiques de saignée. Projet d'article communiqué à l'IRCA (Paris).
- FAIRBAIRN J.W., HAKIM F. et ELKHEIR Y., 1974 Alkaloïdal storage, metabolism and translocation in the vesicles of Papaver somniferum latex. Phytochemistry, 13, 1133-1139.
- de FAŸ E.,1981 Histophysiologie comparée des écorces saines (Maladies des encoches sèches) de l'Hevea brasiliensis. Thèse doctorat 3ème cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- FEE J.A., 1980 Is superoxyde toxic ? In : Developments in biochimistry, Vol. 11 B. New York : Elsevier/North Holland, 41-48.
- FEENY P.P., 1969 Inhibitory effect of oak leaf tannins on the hydrolysis of proteins by trypsin - Phytochemistry. 8, 2119-2126.
- FLATMARK, I., TERLAND O. and HELLE K.B., 1971 Electron carriers of the bovine adrenal chromaffin granules. Biochim. Biophys. Acta, 226, 9-19.

- FONG K.L., Mc CAY P.B., POYER J.L., KEELE B.B. et MISRA H., 1973 Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. J. Biol. Chem., 248, 7792-7797.
- FRENCH F.A. and FREEDLANDER B.L., 1958 Carcinostatic action of polycarbonyl compounds and their derivatives. I : 3-ethoxy-2-ketobutyraldehyde and related compounds. Cancer Res., 18, 172-175.
- FREY-WYSSLING A., 1929 a Microscopich anderzoch haar het voorkomen van harsen in latex van hevea. Arch. Rubbercult., 13, 394-434-453
- FREY-WYSSLING A., 1929 b Théorie des Blutens. Ber. dt. Bot. Ges., 47, 434.
- FREY-WYSSLING A., 1932 Investigations on the dilution reaction and the movement of the latex of Hevea brasiliensis during tapping. Arch. Rubbercult., 16, 285 -299
- FREY-WYSSLING A., 1952 Latex flow. In Deformation and flow in biological systems. FREY-WYSSLING éd. North Holland and Publishing Co. Amsterdam. p. 322-331
- FRIDOVICH I., 1970 Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase J. Biol. Chem., 245, 4053-4057.
- FRIDOVICH I., 1975 Superoxide dismutase Ann. Rev. Biochem., 44, 147-159.
- FROELICH J.P. and TAYLOR E.W., 1976 Transient state kinetic studies of sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem., 251, 2013-2021
- GABIG T. and BABIOR B.M., 1979 The 0_2^{-} forming oxydase responsible for the respiratory burst in Human neutrophils. J. Biol. Chem., 254, 9070-9074.
- GAHAN P.B., 1973 Plant lysosomes. In DINGLE J.T., Lysosomes in Biology and Pathology, vol. 3 : 69-85 ; North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Londres.
- GIANNOPOLITIS C.N. and RIES S.K., 1977 Superoxide dismutases-1-Occurence in higher plants. Plant. Physiol., 59, 309-314.
- GIDROL X.,1984 Caractérisation de l'ATPase tonoplastique de la cellule laticifère. Thèse de 3ème Cycle. Marseille-Luminy.
- GIDROL X., MARIN B., CHRESTIN H. and d'AUZAC J., 1984 Comparaison of Hevea Adenosine - triphosphatase from freshly isolated vacuoles and lyophilized tonoplast vesicles. Z. Pflanzenphysiol. (à paraître).
- GILLIES R.J. and DEAMER D.W., 1979 Intracellular pH/Methods and applications, In : Current Topics in bioenergetics. D.R. SANADI ed., Academic Press, New York/San Francisco/London, Vol. 9, 63-87.
- GOLDMAN R. et ROTTENBERG H.n 1973 Ion distribution in lysosomal suspensions. F.E.B.S. Letters, 33, 233-238.

- GOLDSTEIN A.H., ANDERSON J.O. and Mc DANIEL R.G., 1980 Cyanide insensitive and cyanide-sensitive 0, uptake in wheat. I : Gradientpurified mitochondria. *Plant. Physiol.*, 66, 488-493.
- GOMEZ J.B., 1982 Anatomy of Hevea and its influence on latex production. Malaysian Rubber Research and Development Board, 75 p.
- GOMEZ J.B. et SOUTHORN W.A., 1969 Studies on lutoïd membrane ultrastructure. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 513-523.
- GOODING E.G.B., 1952 Studies in the physiology of latex. II. Latex flow on tapping Hevea brasiliensis : Associated changes in trunk diameter and latex concentration. New Phtol., 51, 11-29.
- GOSCIN S.A. and FRIDOVICH I., 1972 The role of superoxide radical in a nonenzymatic hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys., 153, 778-783.
- GRABER P. and WITT H.T., 1976 Relations between the electrical potential pH gradient, proton flux and phosphorylation in the photosynthetic membrane. Biochem. Biophys. Acta, 423, 141-163.
- GRAPO J.D., 1977 The role of the superoxide dismutases in pulmonary oxygen toxicity - In : Superoxide and superoxide dismutases - Michelson; Mc. Cord. et Fridovich Ed. - Academic Press. London. 231-238.
- GREENSTEIN J.P., 1947 In : Biochemistry of cancer. New York Ácademic, 202-205 et 321-329.
- GREGORY E.M. and FRIDOVICH I., 1973 a Induction of superoxide dismutases by molecular oxygene.J. Bacteriol., 114, 543-548.
- GREGORY E.M. et FRIDOVICH I., 1973 b Oxygene toxicity and superoxide dismutases J. Bacteriol., 114, 1193-1197.
- GRIFFITHS P.A. and LIOYD J.B., 1979 Evidence for lysosomal reduction of cystine residues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 89, 428-434.
- GRIGNON C., 1974 Etude des flux et de la distribution endocellulaire du potassium chez les cellules libres d'Acer pseudoplatanus L. Thèse de Doctorat d'Etat, mention Sciences Naturelles, Université de Paris VII.
- GRINIUS L.L., JASAITIS A.A., KADZIAUSKAS J.P., LIBERMAN E.A., SKULACHEV V.P., TOPALI V.P., TEOFINA L.M. et VLADMIROVA M.A., 1970 - Conversion of biomembrane-produced energy into electric form : I. Submitochondrial particles. Biochim. Biophys. Acta, 216, 1-12.
- GROSS J., 1982 Oxalate enhanced active calcium uptake in membrane fractions from zucchini squash. In : Plasmalemma and Tonoplast. Their function in the plant cell ; D. MARME, E. MARRE, R. HERTEL, eds, Elsevier Biomedical, Amsterdam, 369-376.
- GROSS J. and MARME D., 1978 ATP-dependent Ca²⁺ uptake into plant membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1232-1236.
- GYORGY P. and ROSE C.S., 1948 Effect of dietary factors on early mortality and hemoglobinuria in rats following administration of allocan. Science, 108, 716-718.

- HABER F. et WEISS J., 1934 The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. R. Soc. London. (Ser.A.) 147, 332-351.
- HALL M.A., 1977 Ethylene involvement in senescence processes. Ann. Appl. Biol., 85, 424-428.
- HALLE F. et MARTIN R., 1968 Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa (Hevea brasiliensis Müll. Arg. Euphorbiacées - Crotonoïdées). Andansonía, sér. 2, 8, 475-503.
- HAMILTON G.A. and LIBBY R.D., 1973 The valence of copper and the role of superoxide in the D-galactose oxidase catalyzed reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 333-345.
- HANOWER P., BRZOZOWSKA J. et LIORET C., 1976 Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'Hevea brasiliensis (Kunth) Müll.Arg. : I. Facteurs agissant sur la coagulation. Physiol. Vég., 14, 677-693.
- HANOWER P., BRZOZOWSKA J. et NIAMIEN N'GORAN M., 1977 Absorption des acides aminés par les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis. Physiol. Plant, 39, 299-304.
- HANOWER P., BRZOZOWSKA-HANOWER J., CRETIN H. et CHEZEAU R., 1979 Composés phénoliques du latex d'Hevea brasiliensis. Phytochemistry, 18, 686-687.
- HANOWER P., CRETIN H., MICHEL P., MOUTON G., ROUDEIX H., DE LIVONNIERE H., 1980 - Influences des conditions climatiques et d'exploitation sur le PRI du caoutchouc naturel récolté par saignées cumulées. Dans : Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques n° 605, 85-90.
- HAROLD F.M., 1977 a Membranes and energy transduction in bacteria. Curr. Top. Bioenerg., 6, 83-149.
- HAROLD F.M., 1977 b Ion currents and physiological functions in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., 31, 181-203.
- HAROLD F.M. et PAPINEAU J.M., 1972 Cation transport and electrogenesis by Streptococcus faecalis : I. The membrane potential. J. Membrane Biol., 8, 27-44.
- HARRIS H. and HOPKINSON D.A., 1976 Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland publishing Company, Amsterdam, Oxford, American Elsevier publishing Company, Inc., New York.
- HARRIS V.R. and KECKWICK R.G.O., 1961 The incorporation of (2-¹⁴C)-acetate into rubber by the latex of Hevea brasiliensis. Biochem. J., 80, 10-20.
- HASLAM E., 1974 Polyphenol protein interactions. Biochem. J., 139, 285-288.
- HATTORI H., 1961 Studies on labile, stable NADI oxidase and peroxidase staining reactions in the isolated particles of horse granulocytes. Nogaya J. Med. Sci., 23, 362-378.

- HEBANT C., de FAY E., 1980 Functional organisation of the bark of Hevea brasiliensis (Rubber tree) : A structural and histoenzymological study. Z. Pflanzenphysiol. 97, 391-398.
- HELDT H.W., WERDAN K., MILOVANCEV M. et GELLER G., 1973 Alcalinization of the chloroplast stroma caused by light-dependant proton flux into the thylakoïd space. Biochim. Biophys. Acta, 314, 224-241.
- HENDRIX D.L. and KENNEDY R.M., 1977 Adenosine triphosphatase from soybean callus and root cells. Plant. Physiol., 59, 264-267.
- HENDRIX D.L. and PIERCE W.S., 1980 Preliminary characterization of an anionstimulated ATPase from Pisum plasma membrane. Plant. Sci. Lett., 18, 365-373.
- HENNING R., 1975 pH gradient across the lysosomal membrane generated by selective cation permeability and Donnan equilibrium. Biochim. Biophys. Acta, 401, 307-316.
- HENRY M.F. and NYNS E.J., 1975 Cyanide insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. Subb-Cell. Biochem., 4, 1-65.
- HENRY E.W. and RICHARD L.B., 1979 A study of the effects of applied Ethephon on enzyme (polyphenol oxidase, peroxidase, catalase, ATPase) activity in tobacco (Nicotianna tabacum) apical tissue chloroplasts. Z. Phlenzenphysiol., 92, 11-22.
- HEPPER C.M.,1967 The metabolism of βhydroxy-β-methylglutaryl CoA in Hevea brasiliensis latex and the biosynthesis of rubber. Thesis for degree of Master of Sciences. Welvyn garden City, Hertfordshire. U.K.
- HEPPER C.M. and AUDLEY B.G., 1969 The biosynthesis of rubber from hydroxymethyl-glutaryl CoA in Hevea brasiliensis latex. Biochem. J., 114, 379-386.
- HO C.Y.,1975 Clonal caracters determining the yield of Hevea brasiliensis Proc. Int. Rubb. Conf., Kuala Lumpur, 2, 27-44.
- HO C.Y. et PAARDEKOOPER E.C., 1965 Application of stimulants to the virgin bark in clone trials. Planter's bulletin, R R I M, 80, 150-157.
- HOCHSTEIN P., LASZLO J. and MILLER D., 1965 A unique, dicoumarol sensitive, non-phosphorylating oxidation of DPNH and TPNH catalysed by streptonigrin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 289-295.
- HOGBERG J., ORRENIUS S. and LARSON R.E., 1975 Lipid peroxidation in isolated hepatocytes. Eur. J. Biochem., 50, 595-602.

- HOLLEMANS M., REIJNGOUD D.J. et TAGER J.M., 1979 Evidence against an Mg-ATP dependent proton pump in rat liver lysosomes. Biochim. Biophys. Acta, 551, 55-66.
- HOLLEMANS M., DONKER KOOPMAN W. et TAGER J.M., 1980 A critical examination of the evidence for an Mg-ATP-dependent proton pump in rat liver lysosomes. Biochim. Biophys. Acta, 603, 171-177.
- HOMANS L.N.S. et VAN GILS G.E., 1949 Fresh Hevea latex : a complex colloidal system. Proc. 2nd Rubb. Technol. Conf. Londres, 1948, 292-302, W. Heffer and Sons ltd., Cambridge.
- HUME B. and LOVELL P., 1983 Role of aminocyclopropane-l-carboxylic acid in ethylene release by distal tissues following localized application of Ethephon in Curcubita pepo. Physiol. Plant., 58, 101-106.
- HUBER-WALCHI U. et WIEMKEN A., 1979 Differential extraction of soluble pools from the cytosol and vacuoles of yeast ((Candida utilis) using DEAE-destran. Arch. Microbiol., 120, 141-149.
- INDGE K.J.,1968 Polyphosphates of the yeast cell vacuoles.J. Gen. Microbiol., 51, 447-455.
- IYER G.Y. and QUASTEL J.H., 1967 NADPH and NADH oxydation by guinea pig polymorphonuclear leukocytes. Can. J. Biochem. Physiol., 41, 427-434.
- JACOB J.L., 1976 In : Rapport annuel IRCA.
- JACOB J.L., 1970 a Particularités de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'Hevea brasiliensis. Thèse Doct. Etat Sci. Nat. Orsay CNRS n° AO 4129.
- JACOB J.L., 1970 b Particularités de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'Hevea brasiliensis. Physiol. Vég., 8, 395-411.
- JACOB J.L. et d'AUZAC J.,1967 Sur l'existence conjointe d'une hexokinase et d'une fructokinase au sein du latex d'Hevea brasiliensis. C.R. Acad. Sci. París, Sér. D. 235, 260-263.
- JACOB J.L. et d'AUZAC J.,1969 Sur quelques caractéristiques originales de la pyruvate-kinase du latex d'Hevea-brasiliensis. Bull. Soc. Chim. bicl., 51, 511-525.
- 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. et SONTAG N., 1974 Purification et étude de la phosphatase acide lutoïdique du latex d'Hevea brasiliensis. Biochimie, 56, 1315-1322.
- JACOB J.L., PREVÔT J.C. et PRIMOT L., 1977. Métabolisme du latex d'Hevea brasiliensis. Le carrefour phosphoénol-pyruvique. I-La phosphoénolpyruvate carboxylase. Rapport de Recherches I.R.C.A. nº 14/77, 112 p., 39 fig.
- JACOB J.L., NOUVEL A. et PREVÔT 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., PREVÔT J.C., PRIMOT L. et d'AUZAC J.,1978 Phosphoénolpyruvate carboxylase and pH in Hevea brasiliensis latex. Symposium I.R.R.D.B., 15-18 mai 1978. Kuala Lumpur.
- JACOB J.L., PREVÔT J.C. et PRIMOT L., 1979 a Métabolisme du latex d'Hevea brasiliensis. Le carrefour phosphoénol-pyruvique. II-La Pyruvate kinase. Rapport de Recherches I.R.C.A. N° 35/79, 96 p., 28 fig.
- JACOB J.L., PREVÔT J.C. et PRIMOT L., 1979 b. Purification et étude de la phosphoénolpyruvate carboxylase du latex d'Hevea brasiliensis. Physiol. Veg., 17,501-516.
- JACOB J.L., PREVÔT J.C. and PRIMOT L., 1981 La pyruvate-kinase du latex d'Hevea. Caout. et Plast., 58, 89-91.
- JACOB J.L., PREVÔT J.C. and d'AUZAC J., 1982 Physiological activators of invertase from Hevea brasiliensis latex. Phytochemistry, 21, 851-853.
- JACOB J.L., PREVÔT J.C. et VELASQUEZ B.,1982 Régénération du pouvoir réducteur nécessaire à la synthèse isoprénique : l'enzyme malique, caractéristiques et implications physiologiques. Rapport de recherches IRCA, 87 p., 30 fág.
- JACOB J.L., CRETIN H., d'AUZAC J. et PREVOT J.C., 1983 Regulation of latex synthesis and production in hevea. (Communication International Congress of Biochemistry, décembre 1983, Bangkok). Sous Presse.
- JACOB J.L., PREVÔT J.C. and d'AUZAC J., 1983 Emploi de l'éthylène pour augmenter la production de l'Hévéa. Les mécanismes mis en jeu C.R. Colloque Columa : les substances de croissance et leur utilisation en agriculture. Paris (2-3 février), Vol.2, 372-379.
- JACOB J.L., PREVÔT J.C. and d'AUZAC J., 1983 Physiological regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from a non-chlorophyllian system: The Hevea latex. Physiol. Veg., 21, 1013-1019.
- JAVILLIER et al, 1962 Vitamine C In : Traité de Biochimie Générale II, 1, Masson et Cie Ed., 325-348.
- JERIE P.H. and HALL M.A., 1978 The identification of ethylene oxide as a major métabolite of ethylene in Vícía faba. Proc. R. Soc. London Ser. B, 200, 87-94.

DE JONGE P., 1953 - Stimulation of yield in Hevea brasiliensis. Arch. Rubbercult. Extra Num., 1, 7-26.

- DE JONGE P., 1955 Stimulation of yield in Hevea brasiliensis. III-Further observations on the effects of yield stimulants. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 14, 383-406.
- DE JONGE P., 1957 Stimulation of bark renewal of hevea and its effects on yield of latex. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 15, 53-71.
- KAKINUMA Y., OHSUMI Y. and ANRAKU Y., 1981 Properties of H⁺ translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membrane of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., 256, 997-1008.
- KAR M. and MISHRA D., 1976 Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant. Physiol., 57, 315-319.
- KARNOVSKY M.L., BADWEY J., BRIGGS R., KARNOVSKY M.J. and LAZDINS J., 1980 Mononuclear Phagocytes -Functional Aspects, ed. R. Van Eurth. The hague : Martinus Vijhoff Medical Division.
- KARUNAKARAN A., MOIR G.F.J. et TATA S.J., 1961 The proteins of Hevea latex: Ion exchange chromatography and starch gel electrophoresis. Proc. Nat. Rubb. Res. Conf., Kuala Lumpur, 1960, 798-807.
- KEEZE B.B., Mc CORD J.M. and FRIDOVICH I., 1970 Superoxide dismutase from Escherichia Coli.B - A new manganese containing enzyme - J. Biol. Chem., 245, 6176-6181.
- KEILIN D. and HARTREE E.F., 1945 Properties of catalase-catalysis of coupled oxidation of alcohols. Biochem J.; 39, 293-301.
- KELL B., JOHN P. and FERGUSON S.J., 1978 The proton motive force in phosphorylating vesicles from Paracoccus denitrificans. Magnitude, sites of generation and comparison with the phosphorylation potential. Biochem. J., 174, 257-266.
- KENDE H. and HANSON A.D., 1976 Relationship between ethylene evolution and senescence in morning glory flower tissue. Plant. Physiol., 57, 523-527.
- KENDE H. and HANSON A.D., 1977 On the role of ethylene in aging. Proc. 9th Int. Conf. Plant Growth Substances, Plant Growth regulation, ed.P. E. PILET. Berlin, Heidelberg; Springer-Verlag; 172-180.
- KEUCHENIUS P.E., 1924 Considerations on Brown Bast disease of Rubber-tree Archf. Rubbercult., 8, 810-816.
- KIRBY T., BLUM J., KAHANE I. and FRIDOVICH I., 1980 Distinguishing between Mg-containing and Fe-containing superoxide dismutase in grude extracts of cells. Arch. Biochem. Biophys., 210, 551-555.
- KLEE C.B., CROUCH T.H. and RICHMAN P.G., 1980 Calmodulin. Ann. Rev. Biochem. 49, 489-515.

- KONO Y., TAKAHASHI M. and ASADA K., 1979 Superoxide dismutases from kidney bean leaves. Plant and Cell Physiol., 20, 1229-1235.
- KONZE J.R. and KENDE H., 1979 Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of etiolated pea seedlings. Planta, 146, 293-302.
- KONZE J.R., JONES J.F.; BOLLER T. and KENDE H., 1980 Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on production of ethylene in senescing flowers of Ipomea tricolor. Plant. Physiol., 66, 566-571.
- KRAMER R., KOPP F., NIEDERMEYER W. et FUHRMANN G.F.,978 Comparative studies of the structure and composition of the plasmalemma and the tonoplast in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta, 507, 369-380.
- KRAUSS-FRIEDMANN N., BIBER J., MURER H. and CARAGOLI E., 1982 Calcium uptake in isolated hepatic plasma membrane vesicles. Eur. J. Biochem., 129, 7-12.
- KRETSINGER R.H., 1976 Calcium-binding proteins. Ann. Rev. Biochem., 45, 239-266.
- KURKDJIAN A. and GUERN J., 1981 Vacuolar pH measurement in higher plant Cells. I : Evaluation of the methylamine method. Plant. Physiol. 67, 953-957.
- KWON T.W. and OLCOTT H.S., 1966 Malonaldehyde from autoxidation of methyl linoleate. Nature, 210-214.
- LAMBERT C.,1975 Influence de l'ATP sur le pH intralutoïdique et sur la pénétration du citrate dans les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis. C.R. Acad. Sci., Ser. D, 281, 1705-1708.
- LANCE C., 1963 Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés in vitro. Thèse Doct. Etat, Sci. Nat., Paris; CNRS, n° A.O. 4063.
- LANCE C., 1981 Cyanide-insensitive respiration in fruits and vegetables. In : Recent adances in the biochemistry of fruits and vegetables. Academic Press, London, 63-87.
- LANKIN V.Z. and GUREVICH S.M., 1976 Inhibition of the peroxidation of lipids and detoxification of lipoperoxydes by protective enzyme systems (superoxide dismutase, glutathion peroxidase and glutathionereductase) in experimental malignant growth. Doklady Biochem. 226, 36-39.
- LAI C.S. and PIETE L.H., 1978 Spin trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys., 190, 27-38.

B 21

- LAWRENCE R.A. and BURK R.F., 1976 Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 952-958.
- LEGGE R.L., THOMPSON J.E. and BAKER J.E., 1982 a- Free radical-mediated formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid : a spin-trap study. Plant and Cell Physiol., 23, 171-177.
- LEGGE R.L., THOMPSON J.E., MURR D.P. and TSUJITA M.J., 1982 b- Sequential changes in lipid fluidity and phase properties of microsomal membranes from senescing rose petals. J. Exp. Bot., 33, 303-312.
- LEGGE R.L. and THOMPSON E., 1983 Involvement of hydroperoxides and an ACCderived free radical in the formation of ethylene. *Phytochemistry*, 22, 2161-2166.
- LEIGH R.A. et BRANTON D., 1976 Isolation of vacuoles from root storage tissue of Beta vulgaris L. Plant Physiol., 58, 656-662.
- LEIGH R.A. et WALKER R.R., 1980 ATPase and acid phosphatase activities associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (Beta vulgaris L.) Planta, 150, 222-229.
- LEONG W.H. SAM T.W. and TOH. H.K, 1976 Polyene oxydation, the oxidation of squalene with singlet oxygen. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 24, 4, 215-219.
- LIEBERMAN M., 1979 Biosynthesis and action of ethylene. Ann. Rev. Plant. Physiol., 30, 533-591.
- LIBERMAN E.A. et SKULACHEV V.P., 1970 Conversion of biomembrane produced energy electrical form : IV. General discussion. Biochim. Biophys. Acta, 216, 30-42.
- LIM C.M., SOUTHORN W.A., GOMEZ J.B. et YIP E., 1969 Electrophysiological phenomena in Hevea brasiliensis. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 524-542.
- LIN W., WAGNER G.J. et HIND G., 1977 The proton pump and membrane potential of intact vacuoles isolated from Tulipa petals. Plant Physiol., 59 suppl., S-85, p. 471.
- LIN W., WAGNER G.J., SIEGELMAN H.W. et HIND G.,1977 Membrane-bound ATPase of intact vacuoles and tonoplasts isolated from mature plant tissue. Biochim. Biophys. Acta, 465, 110-117.
- LINEWEAVER M. et BURK D., 1934 The determination of enzyme dissociation constants. J. Ann. Chem. Soc., 56, 568-666.
- LINHARDT K. et WALTER K., 1965 Phosphatases (Phosphomonoesterases) : Détermination in serum with p-nitrophenylphosphate. In Methods of enzymatic analysis, H.U. BERGMEYER ed., Academic Press, New York & London, p. 784.
- LIORET J. CL., RIBAILLIER D., COMBE J.Cl.,1978 Cinétique d'écoulement du latex d'Hevea brasiliensis après saignée. Rev. Gen. Caout. Plast., 17, 91-98.

- LOWE J.S., 1964 Cooper sulfate as a yield stimulant for Hevea brasiliensis. II. Technique for the application of cooper sulfate. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 18, 261-268
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.I., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1961 Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- LUNDBORG T., WIDELL S. and LARSSON C., 1981 Distribution of ATPase in wheat root membranes separated by phase partition. Physiol. Plant., 52, 89-95.
- LUSTINEC J., CHAI KIM CHUN et RESING W.L., 1966 L'aire drainée chez les jeunes arbres de l'Hevea brasiliensis. Rev. Gen. Caout. Plast., 43, 1343-1354.
- LUSTINEC J. et RESING W.L.,1967 Etude de la productivité et de quelques propriétés du latex de différentes parties du tronc de l'hévéa. Rev. Gen. Caout. Plast.44, 345-352.
- LUSTINEC J., LANGLOIS S., RESING W.L. et CHAI KIM CHUN,1967 La stimulation de l'hévéa par les acides chlorophénoxyacétiques et son influence sur l'aire drainée. Rev. Gen. Caout. Plast., 44, 635-641.
- LÜTTGE U., 1980 Malic acid transport across the tonoplast of leaf cells : tonoplast biophysics and biochemistry in relation to crassulacean acid metabolism (CAM). in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J. et DAINTY J., Plant membrane transport : Current conceptual Issues, 39-60, Elsevier ; Nort Holland Biomedical Press, Amsterdam, New-York, Oxford.
- LÜTTGE U. et BALL E., 1979 Electrochemical investigation of active malic acid transport at the tonoplast into the vacuoles of the CAM plant Kalanchoe daigremontiana. J. Membrane Biol. 47, 401-422.
- LÜTTGE U. et HIGINBOTHAM N., 1979 Transport in plants. Springer-Verlag, New-York, Heidelberg, New York.
- LÜTTGE U. et BALL E., 1980 2 H⁺: 1 malate ²⁻ stoichiometry during crassulacean acid metabolism is unaffected by lipophilic cations. Plant. cell and environment, 3, 195-200.
- LYNEN F., 1963 La biosynthèse du caoutchouc dans les plantes. Rev. Gen. Caout. Plast., 40, 83-90.
- LYNEN F., 1967 Biosynthetic pathways from acetate to natural products. Pure Appl. Chem., 14, 137-168.
- LYNEN F., 1969 Biochemical problems of rubber synthesis. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 389-403.
- LYNEN F., EGGER H., HENNING U. and KESSEL I., 1958 Farnesyl-pyrophosphate und 3-methyl- Δ^3 -butenyl-pyrophosphate, die biolgischen vorstufen des squalen (Zur Biosynthese der Terpene : III). Angerv. Chem., 70, 738-751.

- Mac CAY P.B., POYER J.L., PREIFER P.M., MAY H.E. and GILLIAM J.M., 1971 -A function for a Tocopherols : stabilisation of the microsomal membrane from radical. Attack during TPNH dependent oxidation. Lipids 6, 297-306.
- Mac CORD J.M., 1974 Free radicals and inflammation production of synovial fluid, inhibition by superoxide dismutase. Science, 185, 529-531.
- Mac CORD J.M. et FRIDOVICH I., 1968 The reduction of cytochrome by milk xanthine oxydase. J. Biol. Chem., 243, 5753-5760.
- Mac CORD J.M. and FRIDOVICH I., 1969 Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein. J. Biol. Chem., 244, 6049-6055.
- Mac CORD J.M. et FRIDOVICH I., 1970 The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. J. Biol. Chem., 245, 1374-1377.
- Mac CORD J.M., KEELE B.B. et FRIDOVICH I., 1971 An enzyme based theory of obligatory anaerobiosis : the physiological function of superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1024-1027.
- Mac CORD J.M., CRAPO J.D. et FRIDOVICH I.,1977 Superoxide dismutase. A review of methodology. in : Superoxide and superoxide dismutases MICHELSON, McCORD & FRIDOVICH E. d. Academic Press. London pp.11-17.
- Mac ROBBIE E.A.C., 1975 Ion transport in plant cells. Curr. Top. Membr. Transport, 7, 1-48.
- MADEIRA V.M.C., 1980 Proton movements across the membranes of sarcoplasmic reticulum during the uptake of calcium ions. Arch. Biochem. Biophys. 200, 319-325.
- MANDALA S., METTLER I. and TALZ L., 1982 Localization of a H⁺ pump of corn coleoptile microsomal membranes by density gradient. *Plant. Physiol.* 70, 1743-1747.
- MANNERVIK B., 1980 Glyoxalase I. In : Enzymatic Basis of Detoxication. Vol. II; JACOBY W.M., ed.; Academic Press, New York; 263-273.
- MARIN B.,1976 Les problèmes posés par l'existence d'acides ribonucléiques dans les compartiments lysosomaux végétaux. Ann. Scí. Nat. Bot. Veg., 17, 361-374.
- MARIN B., 1980.- Some evidence about the occurence of a Mg-ATP-dependent proton pump in plant vacuo-lysosomal compartment. in SPANSWICK R.M., LUCAS W.J. et DAINTY J., Plant Membrane transport : Current conceptual issues: 435-436, Elsevier : North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New-York, Oxford.
- MARIN B.,1981 Le fonctionnement du transporteur tonoplastique du citrate du latex d'Hevea brasiliensis : relations avec l'activité adénosinetriphosphatase membranaire. Thèse Doct. Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.

- MARIN B., TROUSLOT P. et PUJARNISCLE S., 1974 Some evidence for the occurence of ribonucleic acid in the lutoïd fraction (lysosomal compartment) from Hevea brasiliensis latex. Biochem. J., 143, 479-481.
- MARIN B. et TROUSLOT P., 1975 The occurence of ribonucleic acid in the lutoïd fraction (lysosomal compartment) from Hevea brasiliensis Müll.-Arg. (Kunth) latex. Planta, 124, 31-41.
- MARIN B., MARIN M., d'AUZAC J. et KOMOR E.,1979 Une activité adénosine triphosphatasique associée à la membrane vacuo-lysosomale du latex d'Hevea brasiliensis. Relations possibles avec le gradient transmembranaire de protons et le potentiel membranaire existant au niveau de ce compartiment vacuo-lysosomal. in Résumés du XIème Congrès International de Biochimie, Toronto, Canada, 8-13 juillet 1979, Résumé n° 06-1-R14, p. 423, C.N.R.C., S.C.B. et U.I.B.
- MARIN B., SMITH J.A.C., LÜTTGE U. et d'AUZAC J., 1980 Citrate transport and the proton-motive force in vacuo-lysosomal vesicles from Hevea brasiliensis. In IInd Congress of Federation of European Societies of Plant Physiology, Santiago de Compostela, 27 juillet-1er août 1980, Abstracts of lectures and poster demonstrations : 474-475.
- MARIN B., SMITH A. et LÜTTGE U., 1981 The proton-motive force and its influence on citrate uptake in vacuolar vesicles of Hevea brasiliensis latex. Planta.
- MARIN B., MARIN-LANZA M. and KOMOR E., 1981 a The proton-motive potential difference across the vacuo-lysosomal membrane of Hevea brasiliensis (rubber tree) and its modification by a membrane-bound adenosine-triphosphatase. Biochem.J. 198, 365-372.
- MARIN B., SMITH J.A.C. and LÜTTGE U., 1981 b The electrochemical proton gradient and its influence on citrate uptake in tonoplast vesicles of Hevea brasiliensis. Planta, 153, 486-493.
- MARIN B. and BLASCO F., 1982 Further evidence for the proton pumping work of tonoplast ATPase from Hevea latex. Biochem. Biophys. Res. Commun. XX, 105, 354-361.
- MARIN B., CRETIN H. and d'AUZAC J., 1982 Energization of solute transport and accumulation in the Hevea latex vacuome. In plasmalemma and Tonoplast. Their Functions in the Plant Cell. D. MARME, E. MARRE and R. HERTEL, ed., Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 209-216.
- MARME D., 1981 In : Inorganic plant nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology. New series, Vol. 12; LAUCHLI A. and BIELESKI R.L.; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- MARME D. and DIETER P., 1982 Calcium and calmodulin-dependent enzyme regulation in higher plants. In : Plasmalemma and Tonoplast : Their Functions in the Plant Cell. D. MARME, E. MARRE and R. HERTEL, eds., Elsevier Biomedical Press B,V, 111-118.
- MARTINOIA E., HECK U., BOLLER T., WIEMKEN A. et MATILE P.,1979 Some properties of vacuoles isolated from Neurospora crassa slime variant. Arch. Microbiol.,120, 31-34.

- MARTY F., 1968 Infrastructure des laticifères différenciés d'Euphorbia characias L. C.R. Acad. Sci., Ser.D, 267, 299-302.
- MARTY F. et BRANTON D., 1980 Analytical characterization of beet vacuole membrane. J. Cell. Biol., 87, 72-83.
- MATILE P.,1968 Lysosomes of root tip cells in corn seedlings. Planta,79, 181-196.
- MATILE P., 1969 Plant lysosomes. in DINGLE J.T. et FELL D.B., Lysosomes in Biology and Pathology, vol.1, 406-430, North Holland Publish. Co., Amsterdam, Londres.
- MATILE P., 1975 Cell Biology Monographs : Vol. 1 The Lytic compartment of plant Cells. Springer-Verlag, Vienne, New-York.
- MATILE P.,1976 Localization of alkaloïds and mechanism of their accumulation in vacuoles of Chelidonium majus laticifers. in LUCKNER M., MOTHES K. et NOVER L., Leopoldina Symposium on Secondary Metabilism and Coevolution, Leopoldina Hall (Saale, Allemagne de l'Est), 19-21 avril 1974, Nova acta Leopold., 7 suppl. : 139-155, Warburg : Eisenach DDR, Stsch. Akad. Naturforsch.
- MATILE P., 1978 Biochemistry and functions of vacuoles. Ann. Rev. Plant Physiol., 29, 193-213.
- MATILE P. et WIEMKEN A., 1967 The vacuoles as the lysosome of the yeast cell. Arch. Microbiol., 56, 148-155.
- MATILE P. et WIEMKEN A., 1976 Interactions between cytoplasm and vacuole. in STOCKING C.R. et HEBER U., Encyclopedia of Plant phsiology, New series, 3, part A, : 255-287, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- MAY H.E. and Mc CAY P., 1968 Reduced Triphosphopyridine Nucleotides oxidase-catalyzed alterations of Membrane Phospholipids. II. Enzymatic properties and stoichiometry. J. Biol. Chem. 243, 9,2296-2305.
- MAYAK S., LEGGE R. and THOMPSON J.E., 1983 Superoxide radical production by microsomal membranes from senescing carnation flowers : an effet on membrane fluidity. *Phytochemistry*, 22, 1375-1380.
- MEGO J.L., FARB R.M. et BARNES J., 1972 An adenosine triphosphate-dependent stabilization of proteolytic activity in hetero-lysosomes : évidence for a proton pump. Biochem. J., 128, 763-769.
- MERZLIAK N.M., POGOSYAN S.I., YUFEROVA S.G. and SHEVYREVA V.V., 1978 Use of 2-thiobarbituric acid to investigate lipid peroxidation in plant tissues. Biol. Nauki, 9, 86-99.
- METTLER I.J. et LEONARD R.J., 1979 Isolation an partial characterization of vacuoles from tobacco protoplasts. Plant Physiol., 64, 1114-1120.
- MICHAELIS L. et MENTEN M.C., 1913 Die kinetic der Invertase wirkung. Biochem. Z., 49, 333-369.

B 27

- DE MICHELIS M.I., RAVEN J.A. et JAYASURIYA H.D., 1979 Measurement of cytoplasmic pH by the DMO technique in Hydrodictyon africanum. J. Exptl. Bot., 30, 681-695.
- MILFORD G.F.J., PAARDEKOOPER E.C. et HO CHAI YEE,1969 Latex vessel plugging, its importance to yield and clonal behaviour. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 274-282.
- MILLARD J.A., GERARD K.W. et SCHNEIDER D.L., 1979 The isolation from rat peritoneal leukocytes of plasma membrane enriched in alkaline phosphatase and a <u>b</u> type cytochrome- Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 312-319.
- MILLS G.C., 1957 Haemoglobin catabolism : 1/glutathiomeperoxidase, an erythrocyte enzyme which protects haemoglobin from oxidative breadkown -J. Biol. Chem. 229, 189-197.
- MILLS G.C., 1960 Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. Arch. Biochem. Biophys., 86,1-5.
- MISHRA H.P.et FRIDOVICH I.,1972 The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 247, 3170-3175.
- MITCHELL P.,1961 Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, 191, 144-148.
- MITCHELL P., 1966 Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Glynn Research Ltd., Bodmin, Grande Bretagne.
- MITCHELL P., 1968 Chemiosmotic coupling and Energy transduction. Glynn Research Ltd., Bodmin, Grande Bretagne.
- MITCHELL P., 1976 Vectorial chemistry and the molecular mechanisms of chemiosmotic coupling : power transmission by proticity. Biochem. Soc. Trans., 4, 399-430.
- MITCHELL P. and MOYLE J., 1969 Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. Ewr. J. Biochem., 7, 471-484.
- MITCHELL P. and MOYLE J., 1983 Alternative hypothesis of proton ejection in cytochrome oxidase vesicles. Transmembrane proton pumping or redox linked deprotonation of phospholipid-cytochrome <u>c</u> complex. F.E.B.S. Lett., 151, 167-178.
- MOELLERING H. et GRUBER N., 1966 Determination of citrate with citrate lyase. Anal. Biochem., 17, 369-376.
- MOIR G.F.U. et TATA S.J., 1960 The proteins of Hevea brasiliensis latex. III. The soluble proteins of "bottom fraction". J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 16, 155-165.
- MONDAL R. and CHOUDHURI M.A., 1981 Role of hydrogen peroxide in senescence of excised leaves of rice and maize. Biochem. Physiol. Pflanzen, 176, 700-709.

- MONESTIEZ M., LAMANT A. et HELLER R., 1982 Endocellular distribution of calcium and Ca²⁺ - ATPase in horse-bean roots : possible relations to the ecological status of plant. Physiol. Plant., 55, 445-452.
- MONESTIEZ M. and RONA J.P., 1983 ATP-dependent Ca²⁺ transport and Ca²⁺ -Mg²⁺ - ATPase activities : Is their a link with the proton pump and with ecological status. Abstract : International Symposium Phytochemical Society of Europe, Membrane and compartmentation in the regulation of plant functions (Toulouse, sept. 13-16, 1983).
- MONTARDY M.C. et LAMBERT C.,1977 Diverses propriétés de l'absorption du citrate, du malate et du succinate par les lutoïdes du latex d' Hevea brasiliensis. Phytochemistry, 16, 677-680.
- MONTENY B.A., BARBIER J.M. and BERNOS C.M., 1983 Determination of the energy exchanges of a forest type culture ; Hevea brasiliensis. Forest environment Measurement. Oak Ridge, USA.
- MONTENY B.A., BARBIER J.M. et OMONT C., 1983 Mesure des flux de CO, au niveau d'un couvert d'Hevea brasiliensis. (31 pp.) Colloqué de l'Action incitative MRI-PIREN sur le cycle du Carbone-C.N.R.S., Meudon (France, mars 1983).
- MOREAU F., JACOB J.L., DUPONT J. et LANCE C.,1975 Electron transport in the membrane of lutoïdes from the latex of Hevea brasiliensis. Biochim. Biophys. Acta, 396, 116-124.
- Mc MULLEN A.I., 1960 Thiols of low molecular weight in Hevea brasiliensis latex-Biochim. Biophys. Acta, 41, 152 - 159
- MUNCH et CRAFT, 1930 Cité par HELLER dans : Biologie Végétale, Tome II, p. 544, Masson et Cie. eds., 1969
- NARAYANAN R., GOMEZ J.B., CHEN K.T., 1973 Some structural factors affecting the productivies of Hevea brasiliensis II. Correlation studies between structural factors and yield. J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 23, 4, 285-304
- NARAYANAN R. and HO C.Y., 1973 Clonal nursery studies in Hevea II. Relationship between yield and girth. J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 23:5, 332-344
- NEUDMANN D. et MULLER E.,1967 Intrazellularen Nachweis von Alkaloïden in Pflanzen-zellen im licht- und elektronenmikroskopischen Maßstab. Flora, 158 A + 479-491.
- NEUMAN J. and JAGENDORF A.T., 1964 Light induced pH changes related to phosphorylation by chloroplast. Arch. Biochem. Biophys., 107, 109-119.
- N'GORAN NIAMIEN M.,1982 Absorption des acides aminés basiques par les lutoïdes d'Hevea. Thèse d'Université; Abidjan (République de Côte d'Ivoire)
- NICHOLIS P.,1965 Activity of catalase in the red cell. Biochem. Biophys. Acta, 99, 286-297.

- NIGGLI V., SIGEL E. and CARAFOLI E., 1982 The purified Ca²⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyses an electroneutral Ca²⁺/H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems. J. Biol. Chem., 257, 2350-2356.
- NINANE F.,1970 Les aspects écophysiologiques de la productivité chez Hevea brasiliensis Müell. Arg. au Cambodge. Thèse Doct. Sci. Agronomiques Université Catholique de Louvain.
- NISHIKIMI M., YAMADO H. and YAGI K., 1980 Oxidation by superoxide of Tocopherols dispersed in aqueous media with derxycholate. Biol. Biophys. Acta, 627, 101-108.
- NISHIMURA M. et BEEVERS H., 1978 Hydrolases in vacuoles from castor bean endosperm. Plant physiol., 62, 44-48.
- NOGUCHI T. and NAKANO M.,1974 Effect of ferrous ions on microsomal phospholipid peroxidation and related light emission. Biochem. Biophys. Acat, 368, 446-455.
- NOHL H. and HEGNER D., 1978 Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat heart mitochondria F.E.B.S. lett., 89, 126-130.
- OCHOA S.,1955 Malic dehydrogenase from pig-heart. In : Methods in Enzymology COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O., eds, Academic Press, New York,1, 735-739.
- OKOROKOV L.A., KULAKOVSKAYA T.V. and KULAEV I.S., 1982 Solubilization and partial purification of vacuolar ATPase of yeast Saccharomyces carlbergensis.F.E.B.S. Lett., 145, 160-162.
- O'NEIL S., BENNETT A.B. and SPANSWICK R.M., 1983 Characterization of a NO₃sensitive H⁺-ATPase from corn roots. Plant. Physiol., 72, 837-846.
- ORNSTEIN L. and DAVIS B.J., 1964 Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins- Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- PAARDEKOOPER E.C. et SANIT SAMOSORN, 1969 Clonal variation in latex flow pattern. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 264-273.
- PADAN E. and ROTTENBERG H., 1973 Respiratory control and the proton electrochemical gradient in mitochondria. Eur. J. Biochem., 40, 431-437.
- PAKIANATHAN S.W., 1967 Determination of osmolarity of small latex samples by vapour pressure osmometer. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 20, 23-34.
- PAKIANATHAN S.W., BOATMAN S.G. et TAYSUM D.H., 1966 Particle aggregation following dilution of hevea latex : A possible mechanism for the closure of latex vessels after tapping : J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 19, 259-271.
- PAKIANATHAN S.W., SAMSIDAR BTE HAMZAH, SIVAKUMARAN S. and GOMEZ J.B., 1982 -Physiological and anatomical investigations on long-terme Etephonstimulated trees. J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 30, 63-79.
- PARANJOTHY K., GOMEZ J.B., YEANG H.Y., 1975 Physiological aspects of Brown Bast development. International Rubber Conf. Kuala Lumpur; 1-22.

- PARANJOTHY K., YEANG H.Y., 1977 A consideration of the nature and control of Brown Bast. Proc. R.R.I.M. Planter's Conf. 74-90.
- PATON F.J.,1953 The significance of yellow fraction in spontaneous coagulation. Arch. Rubbercult. Extra Num., 2, 93-96.
- PEDERSON T.C. and AUST S.D., 1972 NADH Dependent lipid peroxidation catalyzed by purified NADPH-cytochrome <u>c</u> réductase from rat liver microsomes - Biochem. Biophys. Res. Comm., 48, 789-795.
- PENNARUM A.M., 1980 Mécanismes de la distribution endocellulaire des ions sodium dans les cellules libres d'Acer pseudoplatanus L. Thèse de Doctorat d'Etat, Mention Sciences Naturelles, Université de Paris VII.
- PESKIN A.V., KOEN Y.M. and ZBARSKY I.B., 1977 Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors. F.E.B.S. Lett., 78, 41-45.
- PETCH T., 1921 Non parasitic diseases: In The diseases and pests of the Rubber tree. Mac Millan and Co. London.
- PHILLIPS J.H. et ALLISON Y.P., 1978 Proton translocation by the bovine chromaffin-granule membrane. Biochem. J., 170, 661-672.
- POOLE R.J., 1978 Energy coupling for membrane transport. Ann. Rev. Plant Physiol., 29, 437-460.
- POYER J.L. et Mc CAY P.B., 1971 Reduced triphosphopyridine nycleotide oxydasecatalyzed alteration of membrane phospholipids. J. Biol. Chem., 246, 263-269.
- PRADET A., 1967 Etude des adénosines 5'-mono, di et tri-phosphates dans les tissus végétaux. I : Dosage enzymatique. Physiol. Vég., 5, 209-221.
- PRESSMAN B.C., 1976 Biological applications of ionophores. Ann. Rev. Biochem. 45, 501-530.
- PRIMOT L., COUPÉ M., JACOB J.L. and d'AUZAC J., 1978 Relations between latex pH and yield, action of stimulation. International Rubber Research Development board, Symposium Kuala-Lumpur; 29-42.
- PRIMOT L., JACOB J.L., d'AUZAC J. and PREVÔT J.C.,1979 Evolution chronologique après stimulation de quelques caractéristiques du latex d' Hevea brasiliensis. Caout. et Plast., 56, 63-66.
- PREVÔT J.C., CRETIN H. et JACOB J.L., 1984 Mise en évidence d'une glutathion réductase dans le sérum cytoplasmique du latex d'Hevea brasiliensis; C.R. Acad. Sc. Paris Série III - t. 298 ; 2, 35-38.
- PROTEAU G., WRIGGLESWORTH J.M. and NICHOLLS P., 1983 Proton-motive functions of cytochrome <u>c</u> oxidase in reconstituted vesicles. Influence of turnover rate on proton translocation. *Biochem. J.*, 210, 199-205.
- PUGET K. and MICHELSON A.M., 1974 Iron-containning superoxide dismutases from luminous bacteria. Biochimie, 56, 1255-1267.
- PUJARNISCLE S., 1965 Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis. Analogie avec les lysosomes. C.R. Acad. Sci., Sér. D, 261, 2127-2130.

- PUJARNISCLE S.,1966 Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis. Distribution de la phosphatase acide, de la β-glucosidase et de la cathepsine dans le latex. C.R. Acad. Sci., Sér. D, 262, 923-925.
- PUJARNISCLE S., 1968 Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis Müll.-Arg. Physiol. Vég., 6, 27-46.
- PUJARNISCLE S. et RIBAILLIER D., 1966 Etude préliminaire sur les lutoïdes du latex et leur possibilité d'intervention dans la biosynthèse du caoutchouc. Rev. Gén. Caout. Plast., 43, 226-228.
- PUJARNISCLE S., 1969 a Etude de quelques facteurs intervenant sur la perméabilité et la stabilité de la membrane des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis Müll.-Arg. Physiol. Véq., 7, 391-403.
- PUJARNISCLE S., 1969 b Etude biochimique des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis Müll. Arg. Différences et analogies avec les lysosomes. Thèse Doct. Etat Sci. Nat., Orsay, CNRS nº A.O 3379.
- PUJARNISCLE S., 1971 Etude biochimique des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis Müll.-Arg. Différences et analogies avec les lysosomes. Mémoires de l'ORSTOM n° 48, ORSTOM ed., ITQA, Cahors.
- PUSHPADAS M.V., NAIR K.K., KRISHNAKUMARI M. and AMMA M.K., 1975 Brown bast and nutrition : a case study. Rubb. Bd. Bull. (India) 12. 83-95.
- PUSHPARAJAH E., SIVANADYAN K., SUBRAMAMIAN A. and TAN K.T.,1975 Influence of soil fertilisers on nutriment content, flow and properties of Hevea latex. Proc. Inst. Rubb. Conf.,1975; Kuala Lumpur, 3; 122-131 (1976).
- PYKE E.E., 1941 Trunk diameter of tree of Hevea brasiliensis; experiments with new dendrometers. Nature, 148, 51-52.
- RACKER E.,1952 Spectrophotometric measurements of the metabolic formation and degradation of thiol esters and ene-diols compounds. Biochim. Biophs. Acta. 9, 577-578.
- RAE Mc D.G., BAKER J.E. and THOMPSON J.E., 1982 Evidence for the involvement of superoxyde radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by pea microsomal membranes. Plant and Cell Physiol. 23, 375-383.
- RAJAGOPALAN K.V. et HANDER P., 1968 in T.P. Singer, Biological oxidations, interscience, New York (1968) p. 314.
- RAMOS S., SCHULDINER S. and KABACK H.R., 1976 The electrochemical gradient of proton and its relationship to active transport in Escherichia coli membrane vesicles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 1892-1896.
- RANDS R.D., 1921 Brown Bast disease of plantation Rubber. Its cause and prevention. Archí. Rubbercult. Ned. Indie 5, 223-278.

RASI-CALDOGNO A., DE MICHELIS M. and PUGLIARELLO M., 1982 - Ca²⁺ transport in purified membrane vesicles from pea internodes. Relationship between ATP-dependent Ca²⁺ uptake and ATP-dependent electrogenic proton transport. In : Plasmalemma and Tonoplast : Their Functions in the plant cells., D. MARME, E. MARRE and R. HERTEL, eds, Elsevier Biomedical, Amsterdam; 361-367.

- RASMUSSEN H., 1970 Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate. Science, 170, 404-412.
- RASMUSSEN H., JENSEN P., LAKE W., FRIEDMAN N. and GOODMAN D., 1975 -Cyclic nucleotides and cellular calcium metabolism. Adv. Cyclic. Nucleotides Res., 5, 375-384.
- RAVEN J.A., 1983 The role of membranes in the regulation of pH. Communication in : International Phytochemical Society of Europe, (Toulouse, sept. 13-16). To be published in : Membranes and Compartmentation in the Regulation of Plant Functions. Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Vol. 24, A.M. BOUDET, G. ALIBERT, G. MARIGO and J. LEA, eds. Oxford Université Press (1984).
- RAVEN J.A. et SMITH F.A., 1978 Effect of temperature and external pH on the cytoplasmic pH of Chara corallina. J. Exptl. Bot., 29, 853-866.
- RAVEN J.A. et SMITH F.A., 1979 Intracellular pH and its regulation. Ann. Rev. Plant Physiol., 30, 289-311.
- REED P.W. and LARDY H.A., 1972 A23187 : A divalent cation ionophore. J. Biol. Chem., 247, 6970-6977.
- REEVES J.P., 1971 Transient pH changes during D-lactate oxidation by membrane vesicles. Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 931-936.
- REEVES J.P.,1984 The lysosomal proton pump is electrogenic. In : Lysosomes in Biology and pathology; Vol. 7 (sous presse), DINGLE J.T. et al., eds, North-Holland Amsterdam.
- REEVES J.P., 1984 The mechanism of lysosomal acidification. J. Biol. Chem.; (sous presse)
- REIJNGOUD D.J. et TAGER J.M., 1973 Measurement of intralysosomal pH. Biochim. Biophys. Acta, 297, 174-178.
- REIJNGOUD D.J., OUD P.S., KAS J. et TAGER J.M., 1976 Relationship between medium pH and that of the lysosomal matrix as studied by two independent methods. Biochim. Biophys. Acta, 448, 290-302.
- REIJNGOUD D.J., OUD P.S. et TAGER J.M., 1976 Effects of ionophores on intralysosomal pH. Biochim. Biophys. Acta, 448, 303-313.
- REINJGOUD D.J. et TAGER J.M., 1977 The permeability properties of the lysosomal membrane. Biochim. Biophys. Acta, 472, 419-449.

RESING W.L., 1955 - Variability of Hevea latex. Arch. Rubb. Cult., 32, 75-212.

RHODES E.,1930 - Brown Bast. Some consideration as to its nature. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 2, 1-11.

RIBAILLIER D., 1970 c - IRCA - Rapport de recherche 1/70.

- RIBAILLIER D.,1970 d Importance des lutoïdes quant à l'écoulement du latex et à la productivité de l'Hevea brasiliensis Müll. Arg. Leur stabilisation par la stimulation hormonale. D.E.S. Université d'Abidjan.
- RIBAILLIER D.,1971 Etude de la variation saisonnière de quelques propriétés du latex d'Hevea brasiliensis. Rapp. Rech. IRCA n° 15/71 et Rev. gén. Caout. Plast., 48, 1091-1093.
- RIBAILLIER D.,1972 a Quelques aspects du rôle des lutoïdes dans la physiologie et l'écoulement du latex d'Hevea brasiliensis (Kunth) Müll. Arg. Action de produits libérant de l'éthylène. Thèse Doct. Etat, Sci. Nat. Abidjan CNRS n° A.0.7716.
- RIBAILLIER D., 1972 b IRCA Rapport de recherche 1/72.
- RIBAILLIER D., JACOB J.L. et d'AUZAC J.,1971 Sur certains caractères vacuolaires des lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis Müll. Arg. Physiol. Vég., 9, 423-437.
- RICH P.R., BOVERIS A., BONNER W.D. and MOORE A.L., 1976 Hydrogen peroxide generation by the alternate oxidase of higher plants. Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 695-703.
- RICH P.R and BONNER W.D.,1978 The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. Arc. Biochem. Biophys.,188, 206-213.
- RICHES J.P. et GOODING E.G.B., 1952 Studies in the physiology of latex. I. Latex flow on tapping. Theoretical considerations. New Phytol. 51, 1-10.
- RIOV J. and YANG S.F., 1982 Effects of exogenous ethylene on ethylene production in Citrus leaf tissue. Plant. Physiol., 70; 136-141.
- ROE H.J., 1964 Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids - in : Methods of Biochemical Analysis (1) Dawid Glick Editor (3rd Ed.) - Interscience Publishers Inc. N.Y., 115-139.
- ROE C.P. and EWART R.H., 1942 An electrophoretic study of the proteins in rubber latex serum. J. Amer. Chem. Soc., 64; 2628-2632.
- ROSIER R.N., TUCKER D.A., MEERDINK S. JAIN I. and GUNTER T.E., 1981 Ca²⁺ transport against its electrochemical gradient in cytochrome oxidase vesicles reconstituted with mitochondrial hydrophobic proteins. Arch. Biochem.Biophys., 210; 549-564.
- ROSSI F., ZABUCCHI G. and ROMEO D., 1975 Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology, ed. R. Van Eurth, London: Blackwell, 441-462.

- ROTTENBERG H., 1979 The measurement of membrane potential and ΔpH in cells, organelles and vesicles in COLOWICK S.P., KAPLAN N.O., Methods in Enzymology, 55, Part.F, 547-569, Academic Press, New-York, San Francisco et Londres.
- ROTTENBERG H., GRUNWALD T. et AVRON M.,1972 Determination of ΔpH in chloroplasts : I; Distribution of ¹⁴C-methylamine. Ewt. J. Biochem., 25 54-63.
- RUNJIE J.M. and WISKICH J.T., 1973 Salt-stimulated adenosine triphosphatase from smooth microsomes of turnip. *Plant. Physiol.*, 51; 1064-1068.
- SAGLIO P.H., DANIELS M.J. and PRADET A., 1979 ATP and energy charge as criteria of growth and metabolic activity of mollicutes : application to Spiroplasma citri. J. Gen. Microbiol., 110, 13-20
- SALIN M.L. and BRIDGES S.M., 1980 Isolation and characterization of an Iron containing superoxide dismutase from an Eucaryote. Branica campestris. Arch. Biochem. Biophys., 201, 369-374.
- SAMSUDDIN Z.,1980 Differences in stomatal density, dimentions and conductances to water vapour diffusion in seven Hevea species. Biol. Plant., 14, 173-177.
- SAMSUDDIN Z. and IMPENS I., 1978 Water vapour and carbon dioxide diffusion resistances of four Hevea brasiliensis clonal seedlings. Expl. Agri., 14, 173-177.
- SAMSUDDIN Z. and IMPENS I., 1979 Photosynthetic rates and diffusion resistances of seven Hevea brasiliensis clones. Biol. Plant., 21, 154-156.

SANDERSON A., SUTCLIFFE H., 1921 - Brown Bast. R.G.A. London.

- SASS J.E., 1958 Botanical microtechnique. Iowa State University Press, Ames. Iowa.
- SARKADI B., 1980 Active calcium transport in human red cells. Biochim. Biophys. Acta, 604, 159-190.
- SAUNDERS J.A., 1979 Investigations on vacuoles isolated from tobacco I. Quantitation of nicotine. Plant Physiol., 64, 74-78.
- SAUNDIERS B.C., HOLNES SIEDLE A.G. and STARK B.P., 1964 The detection of peroxidase. In : Peroxidase - Bulter - worths Scientific Publications London pp. 158-168.
- SAWADA Y., OHYAMA T. et YAMAZAKI I.,1972 Preparation and physicochemical properties of green Pea superoxide dismutase. Biochem. Biophys. Acta., 268, 305-312.
- SCARBOROUGH G.A., 1976 The Neurospora plasma membrane ATPase is an electrogenic pump. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1485-1488.

- SCARBOROUGH G.A., 1980 Proton translocation catalyzed by the electrogenic ATPase in the plasma membrane of Neurospora. Biochemistry, 19, 2925-2931.
- SCHNEIDER D.L., 1977 Membranous localization and properties of ATPase of rat liver lysosomes. J. Membrane Biol., 34, 247-261.
- SCHNEIDER D.L., 1979 ATPase and acidification of rat liver lysosomes. In LEE C.P., SCHATZ G. et ERNSTER L., Membrane Bioenergetics : 495-506, Addison-Wesley Publishing Co., London, Amsterdam, Don Mills.
- SCHNEIDER D.L., 1979 The acidification of rat liver lysosomes in vitro : a role for the membranous ATPase as a proton pump. Biochem. Biophys. Res. Commun., 87, 559-565.
- SCHNEIDER D.L., 1981 ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump. J. Biol. Chem. 256, 3858-3864.
- SCHONBAUM G.R., BONNER W.D., STOREY B.T. and BAHR J.T., 1971 Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. Plant. Physiol., 47, 124-128.
- SCHONBAUM G.R. and B. CHANCE, 1976 Catalase. In : the Enzyme. (2nd ed.) edited by P.D. BOYER, New York Academic. Vol. XIII p. 363-408.
- SCHULZ G.V. and MULLA A., 1961 New investigations on the size, form and flexibility of the rubber molecules. Proc. Int. Rubb. Res. Conf. Kuala Lumpur (1960), 602-609.
- SCHWEIZER J., 1949 Hevea latex as a biological substance. Archf. Rubbercult. 26, 345-397.
- SCHWEIZER J., 1953 The physiology of latex as basis for tapping systems. Archí. Rubbercult., extra nº 1.
- SEGAL A.W., JONES O.T., WEBSTER D. and ALLISON A.C., 1978 Absence of a newly described cytochrome <u>b</u> from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. Lancet, 2, 446-449.
- SHAEDDLE M. and BASSHAM J.A., 1977 Chloroplast glutathione reductase. Plant. Physiol., 59, 1011-1012.
- SHARPLES A., 1936 Brown Bast. In The diseases and pests of the Rubber tree 11 228-237.
- SHARPLES A., LAMBOURNE J., 1924 Field experiments relating to Brown Bast disease of Hevea brasiliensis; Malaya Agricult. J. 12, 290-343.
- SHAW C.R. and PRASAD R., 1970 Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. Biochemical genetics, 4, 297-320.
- SHOSHAW V., Mac LENNAN D.H. and WOOD D.S., 1983 Tetraphenylboron causes Ca²⁺ release in isolated sarcoplasmic reticulum and in skinned muscle fibers. J. Biol. Chem., 258, 2837-2842.

- SIEDOW J. and GIRVIN M.E., 1980 Alternative respiratory pathway. Its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. Plant. Physiol., 65, 669-674.
- SIEGEL E. and CARAFOLI E., 1978 The proton pump of cytochrome <u>c</u> oxidase and its stoichiometry. Eur. J. Biochem., 89, 119-123.
- SIPAT A.B., 1982 Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) in the latex of Hevea brasiliensis. Phytochemistry, 21, 851-853.
- SKULACHEV V.P., 1971 Energy transformation in the respiratory chain. Curr. Top. Bioenerg., 4, 127-190.
- SLAYMAN C.L., 1974 Proton pumping and generalized energetics of transport: a review : In : Membrane Transport in Plants; ZIMMERMANN U. and DAINTY J., eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberb, 107-119.
- SLAYMAN C.L., LONG W.S. et LU C.Y.H., 1973 The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of Neurospora crassa. J. Membrane Biol., 14, 305-338.
- SLAYMAN C.W. et SLAYMAN C.L., 1975 Energy coupling in the plasma membrane of Neurospora ATP-dependent proton transport and proton-dependent sugar co-transport. in KABACK H.R., NEURATH H., RADDA G.K., SCHWYER R. et WILEY W.R., Molecular aspects of membrane phenomena: 233-248, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SMITH F.A. et WALKER N.A., 1976 Chloride transport in Chara corallina and the electrochemical potential difference for hydrogen ions. J. Exptl. Bot. 27, 451-459.
- SMITH F.A. et RAVEN J.A., 1979 Intracellular pH and its regulation. Ann. Rev. Plant Physiol., 30, 289-311.
- SMITHIES 0.,1955 Zone electrophoresis starch gels group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J., 61, 629-641.
- SORGATO G.L., FERGUSSON S.J., KELL D.B. and JOHN P.,1978 The proton motive force in bovine heart submitochondrial vesicles particles: magnitude, site of generation and comparison with the phosphorylation potential. Biochem. J., 174, 237-256.
- SOUTHORN W.A., 1961 Thread-like reticulum in latex from Hevea brasiliensis and its relation to latex particles. Nature, 189; 1000-1001.
- SOUTHORN W.A., 1964 A complex sub-cellular component of widespread occurrence in plant latices. J. Exp. Bot., 15, 616-621.
- SOUTHORN W.A., 1968 Latex flow studies. I. Electron microscopy of Hevea brasiliensis in the region of the tapping cut. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 20, 176-186.
- SOUTHORN W.A., 1969 Physiology of Hevea (latex flow). J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 494-512.
- SOUTHORN W.A. et EDWIN E., 1968 Latex flow studies. II. Influence of lutoïds on the stability and flow of Hevea latex. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 20, 187-200.

- SOUTHORN W.A. et YIP E., 1968 a Latex flow studies. III. Electrostatic considerations in the colloïdal stability of fresh latex from Hevea brasiliensis. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 20, 201-215.
- SOUTHORN W.A. et YIP E., 1968 b Latex flow studies. V. Rheology of fresh hevea latex flow in capillaries. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 20, 236-247.
- SPANSWICK R.M., 1981 Electrogenic ion pumps. Ann. Rev. Plant. Physiol., 32, 267-289.
- STANCLIFF R.C., WILLIAMS M.A., UTSUMI K. and PACKER L., 1969 Essential fatty acid deficiency and mitochondrial function. Arch. Biochem. Biophys., 131, 629-642.
- STAUDINGER H.J., KEREKJARTO B., ULLRICH V. and ZUBRZYCKI Z.,1964 A study of the mechanism of microsomal hydroxylation. In : Oxidases and related redox systemes. Vol. 2; 815-842
 - R.R. and BEWLEY J.D., 1980 Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant. Physiol., 65 245-248.
- STOSIC V., PENEL C., MARME D. and GREPPIN H., 1983 Distribution of calmodulin stimulated Ca²⁺ transport into membrane vesicles from green spinach leaves. Plant. Physiol., 72, 1136-1138.
- STOSSEL T.P., POLLAR T.D., MASSON R. & VAUGHAN M.,1971 Isolation and properties of phagocytic vesicles from polymorphonuclear leucocytes. J. Clin. Invest., 50, 1745-1757.
- STREHLER B.L. and TOTTER J.R., 1952 Firefly luminescence in the study of energy transfer mecanism. I : Substrate and enzyme determination Arch. Biochem. Biophys., 40, 28-41.
- STRITTMATER P. et VELICK S.F., 1957 The purification and properties of microsomal cytochrome reductase. J. Biol. Chem., 228, 785-799.
- STROOBANT P. and SCARBOROUGH G.A., 1979 Active transport of calcium in Neurospora plasma membrane vesicles. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 76, 3102-3106.
- SUGIOKA K. and NAKANO M., 1976 A possible mechanism of the generation of singlet molecular oxygen in NADPH-dependent microsomal lipid peroxydation. Biochim. Biophys. Acta, 423, 2, 203-216.
- SWAIN T., 1965 plant Biochemistry. J. BONNER and J.E. VARNER Editors; Academic Press, New York.
- SZE H., 1980 Nigericin-stimulated ATPase activity in microsomal vesicles of tobacco callus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5904-5908.
- SZE H.,1982 Characterization of nigericin-stimulated ATPase from sealed microsomal vesicles of tobacco callus. Plant. Physiol.,70, 498-505.
- TAKERSHIGE K., TAKAYANAGI R. and MINAKAMI S.,1980 Lipid peroxidation and the reduction of ADP-Fe³⁺ chelate by NADH-ubiquinone reductase preparation from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.*, 192, 861-866.

B 37

- TANCHEE HONG et AUDLEY, 1968 Ergothioneine and hercynine in Hevea brasi-Liensis latex phytochemistry 7, 109-111
- TANNER W., KOMOR E., FENZL F. and DECKER M., 1977 Sugar-proton cotransport systems. In : Regulation of cell membrane activities in plants. Ed. E. MARRE, and O. CIFFRRI; Amsterdam North Holland, 79-90.
- TARBELL D.S., 1961 The mechanism of oxidation of thiols to dissulfides. In : Organic sulfur Compound; Khorash N. Editor. Pergamon Press pp 97-102.
- TATA S.J. et MOIR G.R.J., 1964 The proteins of Hevea brasiliensis latex.
 V. Starch gel electrophoresis of C-serum proteins. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 18, 97-108.
- TATA S.J. et YIP E., 1968 A protein fraction from S-serum with strong destabilising activity on latex. Res. Arch. Rubb. Res. Inst. Malaya, Docum. 59 (diffusion restreinte).
- TATA S.J., BOYCE A.N., ARCHER B.L. and AUDLEY B.G., 1976 Lysozymes major components of the sedimentable phase of Hevea brasiliensis latex. J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 24, 233-236.
- TATA S.J. et EDWIN E.E., 1970 Hevea latex enzymes detected by zymogram technique after starch gel electrophoresis. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 23, 1-12.
- TAYSUM D.H., 1961 Effect of ethylene oxide on the tapping of Hevea brasiliensis. Nature, 191, 1319-1320.
- TERLAND O. and FLATMARK T., 1980 Oxidoreductase activities of chromaffin granule ghosts isolated from the bovine adrenal medulla. Biochim. Biophys. Acta, 597, 318-330.
- THEOLOGIS A. and LATIES G.G., 1978 Antimycin-insensitive cytochrome-mediated respiration in fresh and aged potato slices. *Plant. Physiol.*, 62, 238-242.
- THEOLOGIS A. and LATIES G.G., 1982 Selective enhancement of alternative path capacity in plant storage organs in response to ethylene plus oxygen : a comparative study. Plant. Physiol., 69, 1036-1039.
- THOM M., MARETZKI A. and KOMOR E., 1982 Vacuoles from sugarcane suspension cultures. I : Isolation and partial characterization. Plant. Physiol., 69, 1315-1319.
- TELFER A. and EVANS M.C.W., 1972 Evidence for a chemiosmotic coupling of electron transport to ATP synthesis in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta., 256, 625-637.
- TRANCARD J., 1979 Cellules à tannins et tubes laticifères dans le liber d'Hevea brasiliensis Müll. Arg. Rev. Cyt. Biol. Veget. - Bot 2, 1-6.
- TRAVIS R.L. and BOOZ M.L., 1979 Partial characterization of a potassium stimulated adenosine triphosphatase from the plasma membrane of meristematic and mature soybean root tissue. Plant. Physiol., 63, 573-577.

- TUPY J.,1969 b Stimulatory effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1-naphtylacetic acid on sucrose level, invertase activity and sucrose utilization in the latex of Hevea brasiliensis. Planta, 88, 144-153.
- TUPY J.,1973 a Influence de la stimulation hormonale de la production sur la teneur en saccharose du latex d'Hevea brasiliensis. Rev. Gén. 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 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. Dependance of the metabolic activity of the treated tissue. Physiol. Veg., 11, 12-23.
- TUPY J., 1980 Modification of pH of latex cytoplasm by ethylene. Phytochemistry, 19, 505-511.
- TUPY J.,1982 Physiologie de la productivité de l'Hevea. Rapport de mission, assistance technique AIEA (IVC/5/010), 50 p.
- TUPY J. et RESING W.L., 1967 Substrat et métabolisme de la formation de gaz carbonique dans le latex de l'hévéa in vitro. Rev. Gén. Caout. Plast., 14, 1525-1526.
- 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.
- TUPY J. and PRIMOT L., 1982 Sucrose synthetase (EC-2.4.1.13) in the latex of Hevea brasiliensis. J. Exp. Bot., 33; 988-995.
- TURRENS J.F. and BOVERIS A., 1980 Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem. J., 191, 421-427.
- VAN DE SYPE H., 1981 Encoches sèches. Rapport semestriel I.R.C.A., Série Agronomie Physiologie (2ème semestre), 68-101.
- VAN GILS G.E., 1951 Studies on the viscosity of latex. I. Influence of the ' dry rubber content. Arch. Rubbercult., 28, 61-66.
- VARA F. and SERRANO R., 1982 Partial purification and properties of the proton translocating ATPase of plant plasma membrane (oat roots) J. Biol. Chem., 257, 12826-12830.
- VOLLEMA J.S., 1949 Enige waarne mingen over Het optreden der bruine binnen bastziekte. De Bergcultures 18, 243-249

VON JAGOV G., 1980 - b-type cytochromes. Ann. Rev. Biochem., 49, 281-314.
١

- WAGNER G.,1979 Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino-acids and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiol., 64, 88-93.
- WAGNER G.J., 1979 Accumulation in higher plants ; the role of the vacuole. Plant Physiol., 63 suppl., 63-s-5.
- WAGNER G.J., 1981 Enzymic and protein character of tonoplast from Hippeastrom Vacuoles. Plant. Physiol., 68, 499-503.
- WALKER N.A. et SMITH F.A., 1975 Intracellular pH in Chara corallina measured by D.M.O. distribution. Plant. Sci. Letters, 4. 125-132.
- WATTIAUX R. et de DUVE C.,1966 Tissue fractionation studies. VII. Release of bound hydrolases by means of Triton X-100. Biochem. J., 63, 606-608.
- WEISIGER R.A. et FRIDOVICH I., 1973 Superoxide dismutase rganelle specificity - J. Biol. Chem., 248, 3582-3592.
- WERRINGLOER J., KAWANO S., CHACOS N. and ESTABROOK R.W., 1979 The interaction of divalent copper and the microsomal electron transport system. A re-examination of the effects of copper chelates on the function of cytochrome P-450. J. Biol. Chem., 254, 11839-11846.
- WHEELER H. and HUMPHREYS T., 1979 Properties of a plasmalemma ATPase of the maize scutellum. Phytochemistry, 18, 555-560.
- WHITTLE K.J., DUNPHY P.J. et PENNOCK J.F., 1966 The isolation and properties of a-tocotrienol from Hevea latex. Biochem. J., 100-138.
- WIEMKEN A., 1969 Eigenschaften der Hefevakuole. Ph. D. Thesis. E.T.H., n° 4340, Zurich, Suisse.
- WIEMKEN A., 1975 Isolation of vacuoles from yeasts. in PRESCOTT D.M., Methods in cell Biology, XII, 99-109, Academic Press Inc., Londres.
- WIEMKEN A. et DURR M., 1974 Characterization of amino-acid pools in the vacuolar compartment of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 101, 45-57.
- WIEMKEN A., SCHELLENBERG M. et URECH K., 1979 Vacuoles ; the sole compartments of digestive enzymes in yeast (Saccharomyces cerevisiae). Arch. Microbiol., 123, 23-35.

WIERSUM L.K., 1957 - Enkele latex problemen. Vakbl. Biol., 37, 17-25.

WILLIAMSON R.E,1981 - Free Ca²⁺ concentration in the cytoplasm : a regulator of plant cell function. What's New in Plant Physiology. 12, 45-48.

WILLIAMSON I.P. and KECKWICK R.G.O., 1965 - The formation of 5-phosphomevalonate by mevalonate kinase in Hevea brasiliensis latex. Biochem. J., 96, 862-871.

~

- WILLIS E.D., 1969 Lipid peroxide formation in microsomes. General considerations. Biochem. J., 113, 315-324.
- WILLSON R.L., 1979 Hydroxyl radicals and biological damage in vitro : what relevance in vivo ? In : Oxygen free radicals and Tissue damage. Amsterdam : Excerpta Medica, 19-42.
- WILSON T.L., 1977 Theoretical analysis of the effects of two pH regulation patterns on the temperature sensitivities of biological systems in nonhomeothermic animals. Arch. Biochem. Biophys., 182, 409-419.
- WILSON R.H. and GRAESSER RLJ., 1976 In : Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Vol. 3. Springer Berlin-Heidelberg - New York, 377-397.
- WINGSTRAND G. and LINDBERG S., 1982 Effects of phlorizin, metayanadate and oligomycin on membrane bound (Na⁺ + K⁺ + Mg²⁺) ATPase activity in sugar beet roots. Plant. Physiol., 56, 333-338.
- WOO C.H., 1973 Rubber coagulation by enzymes of Hevea brasiliensis latex. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 23, 323-331.
- YAMAGUCHI M. and JOCELYN M.A., 1951 Investigations of ascorbic acid dehydrogenase of peas (pisum sativum) and its distribution in the developping plant. Plant. Physiol., 26, 757-772.
- YEANG H.Y. and PARANJOTHY K., 1982 Initial physiological changes in Hevea latex and latex flow characteristics associated with intensive tapping. J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 30, 31-44.
- YIP E. and GOMEZ J.B., 1978 Destabilization of rubber particules by bark extract : a possible mechanism for cessation of latex flow after tapping. Int. Rubb. Res. Dev. Board Symposium, Kuala Lumpur (may. 15-18).
- ZAKOWSKI J.J. and TAPPEL A.L., 1978 A semiautomated system for measurement of glutathione in the essay of glutathione peroxidase. Anal., Biochem. 89, 430-436.
- ZAREMBA S. and HOGUE-ANGELETTI R., 1982 NAD : acceptor oxodireductase from bovine adrenal medulla chromaffin granules. Arch. Biochem. Biophys., 219, 297-305.
- ZIMNIAK P. and RACKER E., 1978 Electrogenicity of Ca⁺⁺ transport catalyzed by the Ca⁺⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 253, 4631-4637.

ANNEXE I



ALCALINISATION DU MILIEU D'INCUBATION FAIBLEMENT TAMPONNE LORS DU FONC-TIONNEMENT DE L'ATPase DU TONOPLASTE LUTOIDIQUE.

Les lutoïdes (1 gr) sont en suspension dans un tampon Hepes-Tris 5 mM à pH 7,45, rendu isotonique par du mannitol 0,3 M et contenant MgSO4 3 mM, et du molybdate d'ammonium 0,1 mM (le volume total de la suspension est de 5 m1).

Les variations de pH du milieu sont suivies au moyen d'une électrode de pH (semi-micro combinée), sous agitation douce de la suspension.

Lorsque le pH de la suspension atteint la valeur de 7,40, c'est-à-dire précisément la valeur de pH à laquelle a été ajustée la solution d'ATP, on injecte l'ATP (2 mM final) dans la suspension.

Après 5 minutes de réaction, on a prélevé et précipité au PCA 0,5 ml de la suspension afin de doser l'ATP hydrolysé.



Figure II.1 : ACTIVATION DE L'ATPase LUTOIDIQUE APRES UNE STIMULATION DES HEVEAS PAR L'ETHREL.

Mesures effectuées sur lutoïdes entiers lavés (GIDROL, 1984).



Figure II.2 : ACTIVATION DE L'ATPase TONOPLASTIQUE PAR L'ETHREL. Mesures effectuées sur le tonoplaste purifié (GIDROL, 1984).







Les résultats sont exprimés en % par rapport aux témoins non stimulés (GIDROL, 1984). On a superposé les résultats obtenus par COUPE (1977) sur l'augmentation de l'indice de polymérisation (IP) des ribosomes dans le latex, suite à la stimulation hormonale des arbres. <u>A-III-1</u>: CORRELATION ENTRE LA PRODUCTIVITE DES HEVEAS ET L' INDICE D'ECLATEMENT DE LEURS LUTOIDES. Logarithme népérien de la production (g/s/s). Indice d'écla-

tement des lutoïdes en %
(x arbres atteints d'encoche
sèche)





<u>A-III-2</u>: CORRELATION ENTRE LA PRODUCTIVITE DES HEVEAS ET LA CONCENTRATION EN THIOLS REDUITS CYTOSOLIQUE DE LEUR LATEX. La production est exprimée en grammes de caoutchouc/arbre/ saignée (g/a/s), et la concentration en thiols du cytosol en mM (x arbres atteints d'encoche

sèche)

<u>A-III-3</u>: CORRELATION ENTRE L' INDICE D'ECLATEMENT DES LUTOI-DES ET LEUR CONSOMMATION D' OXYGENE EN PRESENCE DE NADH.

(indice d'éclatement en %, et consommation d'oxygène en µl 0_.min-1. g⁻¹ de lutoïdes). (x arbres atteints d'encoche sèche)



ANNEXE IV	ANNEXE IV		- Mg ⁺⁺ dependent ATPase ACTIVITY			ATP-DEPENDENT H ⁺ PUMPING ACTIVITY		
(n.d.= not determined; µg=µg/ml; + = activation; -= inhibition)		ARTIFICIAL BUFFER (U.F.) CYTOSO		(U.F.) Cytosol	ARTIFICIAL BUFFER (U.F.) CYTOSOL			
		LYOPHYLIZED INTACT - FRESH LUTOIDS LUTOIDS		LYOPHYL1ZED LUTO1DS	YOPHYLIZED INTACT - FRESH LUTOIDS LUTOIDS			
GENERAL CHARACTERISTICS	KM (ATP;mM)	2	1	0.75	n.d.	0.8	0.5	
	VM (umol/min/	n.d.	3	3	n.d.	n.d.	n.d.	
	OPTIMUM PH	6.5 - 8	6.5 - 8	6.77	6.5 - 7.5	6.75	6.75	
ATPASE INHIBITORS	OLIGOMYCIN	+20% [·] (40 μg)	0% (40 µg)	0% (40µg)	n.d.	0% (40 µg)	(40 µg) %0	
	Na N 3	+30% (1 mM)	0% (1 mM)	0% (1 mM)	n.đ:	0% (1mM)	0% (1 mM)	
	o-Vanadate	0% (0.1 mM)	0% (0.1 mM)	0% (Q1 mM)	n.d.	0% (0.1 mM)	0% (0.1 mM	
	D.E.S.	0% (3mM)	-76% (3 mM)	-75% (1 mM)	n.d.	-100% (3mM)	-100% (1 mM)	
	Nystatine	n.d.	(gug) 0% (5	n.d.	n.d.	0% (5 μg)	– 24% (5 µg	
Other INHIBITORS	DĊCD	-90% (1 mM)	83% (1 mM)	-63% _, (1 mM)	n.d.	-100% (1 mM)	-100% (1 mM)	
	DIDS	n.d.	-98% (0.1 mM)	-90% (Q.1 mM)	n.d.	- 83% (0.1 mM)	n.d.	
	NEM & MERSALYL	~46% (0.5 mM)	-100% 0.5mM)	-51% (0:5 mM)	n.d.	-100% (0.5 mM)	-100% (0.3mM	
	FLAVONOLS	n.d.	-95% (0.15mM	-95% (015mM)	n.d.	-98% (015mM)	n.d.	
	Cu ⁺⁺	n.d.	-90% (0.1 mM)	n.d.	n.d.	-90% (0.1 mM)	n.d.	
IONOPHORES	GRAMICIDIN	n.d.	+33% (10 μg)	+ 8% (10 µg)	n.d.	–90% (10µg)	–100% (10µg)	
	NIGERICIN	n.d.	0%	+10% (10 μg)	0% .	-100%(10µg)	–100% (10µg)	
	VALINOMYCIN (-10	n.d.	0%	+25% (10 μg)	0%	+50% (10µg)	n.d.	
	A - 23187	n.d.	+15% (10 μM)	–24% (10 µM)	n.d.	-70% (10µM)	-84% (10 μM)	
	FCCP	-25% (0.5mM	+30% (20 µМ)	+25% (20 μM)	-75% (25 µM)	-70% (20µM)	-85% (25 µM)	
	S - 13	n.d.	-50% (10 µg)	0%	-80%	-55% (10µg)	-100%(10 µg)	
	2-4 DNP	-21% (10 mM)	+20% (10 µM)	+15% (10 μM)	n.d.	-80% (10µM)	-100% (1о́ µМ	

TONOPLASTIC H⁺PUMPING ATPASE CHARACTERISTICS OF FRESH OR LYOPHYLIZED LUTOIDS IN BUFFER OR ULTRAFILTRED CYTOSOL. (d'après GIDROL, 1984;GIDROL <u>et al.</u>, 1984) 575

ORSTOM Éditeur Dépôt légal : 4e trim. 1985 ISSN : (en cours) ISBN : 2-7099-0775-5

.

,

ISSN : (en cours) ISBN : 2-7099-0775-5 Éditions de l'ORSTOM 70 route d'Aulnay F-93140 Bondy ı.