

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE D'ADIOPODOUME

B.P. V-51, ABIDJAN (Côte d'Ivoire)



Laboratoire de Physiologie Végétale

vedette :

BILAN DES TRAVAUX EFFECTUÉS DANS LE CADRE DE L'ATP-CNRS :
BASES PHYSIOLOGIQUES ET GÉNÉTIQUES DE LA PRODUCTION
VÉGÉTALE : ASPECTS MÉTABOLIQUES ET CYTOLOGIQUES DE
LA PRODUCTION CHEZ L'HÉVÉA
(EXPIRATION 31.12.80)

RÉSUMÉ DES TRAVAUX EFFECTUÉS 1979-1980

1. Connaissance des phénomènes biochimiques et métaboliques liés à la production : étude des causes de variation de pH au sein du latex
 - L'acidité relative du serum lutoïdique, pour des particules en suspension dans un milieu dépourvu de substrat énergétique, est essentiellement due à un équilibre du type équilibre de DONNAN.
 - L'ATPase localisée au niveau de la membrane lutoïdique se comporte comme une pompe à protons électrogène. Son fonctionnement *in vitro* entraîne une acidification du serum intra-lutoïdique correlative à l'alcalinisation du milieu extérieur (augmentation du Δ pH).
 - La NADH-cytochrome c.oxydoréductase liée à la membrane lutoïdique semble fonctionner comme une pompe à proton antagoniste, entraînant l'alcalinisation du serum intra-lutoïdique et l'acidification du milieu extérieur.
 - Le fonctionnement de ces deux pompes antagonistes contrôle, en partie au moins, l'absorption des acides aminés et du citrate par les lutoïdes.

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 438 ex 1

Cote : B

Date : 23 JUIN 1981

2. Connaissance des phénomènes métaboliques induits par les traitements hormonaux stimulant la production.

- Les arbres haut-producteurs se caractérisent par des teneurs en ATP cytoplasmique plus faibles et des teneurs en ADP plus fortes que les bas producteurs.
- La stimulation hormonale se traduit par une diminution des teneurs en ATP et une augmentation des teneurs en ADP du cytoplasme.

3. Compréhension des processus conduisant à un épuisement des tissus laticifères en cours d'exploitation.

- L'une des causes de l'apparition d'encoches sèches est la coagulation du latex *in situ*, à la suite de l'éclatement des structures membranaires contenant l'essentiel des facteurs coagulants du latex.
- Le latex provenant d'arbres atteints d'encoche sèche se caractérise par des activités génératrices d'"oxygène toxique" (NADH/O₂ oxidoréductase), normalement absentes ou très faibles chez des arbres sains haut-producteurs, et une diminution des systèmes "protecteurs" enzymatiques (superoxyde-dismutase et catalase...) ou non (thiols réduits, acide ascorbique).
- L'addition *in vitro* de NADH à une suspension de lutoïdes d'arbres partiellement atteints d'encoche sèche se traduit par une peroxydation notable de lipides insaturés exogènes, et par un éclatement important des structures membranaires présentes.

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE D'ADIOPODOUME

B.P. V-51, ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

Laboratoire de Physiologie Végétale

BILAN DES TRAVAUX EFFECTUÉS DANS LE CADRE DE L'ATP-CNRS :
BASES PHYSIOLOGIQUES ET GÉNÉTIQUES DE LA PRODUCTION
VÉGÉTALE : ASPECTS MÉTABOLIQUES ET CYTOLOGIQUES DE
LA PRODUCTION CHEZ L'HÉVÉA
(EXPIRATION 31.12.80)

RAPPORT SCIENTIFIQUE ABRÉGÉ (ORSTOM-ADIOPODOUMÉ)

PREMIER THEME : CONNAISSANCE DES PHENOMENES BIOCHIMIQUES ET METABOLIQUES
LIES A LA PRODUCTION - ETUDE DES CAUSES DE VARIATIONS DU
pH AU SEIN DU LATEX.

Ces études ont été conduites par la méthode de "flow de dialyse" (voir annexe), technique qui permet la détermination en continu, sur un même échantillon, des variations de concentration dans le milieu extra-lutoïdique, d'un marqueur radioactif-susceptible de se mouvoir entre le compartiment intra-lutoïdique et le milieu extérieur.

Il a été démontré par cette technique les faits suivants :

- 1) Le potentiel de DONNAN, créé par la présence à l'intérieur des lutoïdes de macromolécules chargées négativement, peut rendre compte de la majeure partie du ΔpH (acide à l'intérieur) entre le compartiment lutoïdique et le milieu extérieur. Ce ΔpH peut être ramené de 1,3 à 0,3 par la seule addition de KCl 200 mM, dans une suspension lutoïdique dépourvue "d'aliment énergétique".
- 2) Le fonctionnement de l'ATPase localisée au niveau de la membrane lutoïdique en tant que "POMPE à PROTONS", a pu être démontré sans ambiguïté.

L'addition d'ATP dans le milieu d'incubation peut entraîner une augmentation du ΔpH transmembranaire de l'ordre d'une unité, (intérieur des lutoïdes plus acide).

Le fonctionnement de cette ATPase pompe à protons est électrogène : elle entraîne une dépolarisation de la membrane lutoïdique, le potentiel membranaire passant de la valeur -88 mV (intérieur négatif) dans un milieu "non énergétique, à des valeurs de -20 à 0 mV en présence d'ATP exogène (intérieur moins négatif).

Le fonctionnement de l'ATPase est totalement inhibé par le FCCP ($10 \mu\text{M}$) et partiellement par le NEM et le dCCD.

- 3) La NADH-cytochrome C. oxydoréductase liée à la membrane lutoïdique peut fonctionner comme une pompe à protons antagoniste. Son fonctionnement entraîne une alcalinisation du sérum intra-lutoïdique, et une diminution de ΔpH transmembranaire qui passe de la valeur $1,2$ à $0,6$.

Le fonctionnement de cette pompe antagoniste semble également électrogène : elle provoque une "hyper-polarisation de la membrane dont le potentiel peut dépasser -100 mV (intérieur plus négatif).

- 4) Le fonctionnement de ces deux pompes antagonistes contrôle au moins en partie l'absorption des acides aminés basiques (Lysine et Arginine) et du citrate :
 - L'addition d'ATP dans le milieu d'incubation entraîne une exaltation de l'absorption de ces acides organiques tandis qu'une addition de NADH + Cytochrome C. diminue la capacité d'absorption de ces entités ioniques par les lutoïdes.
 - Par contre, les substrats absorbés lors d'une préincubation en milieu énergétique ou non, ne semblent pas pouvoir être libérés (efflux) par l'addition de FCCP, NH_4Cl ou NADH, bien que ces effecteurs détruisent partiellement ou quasi totalement le gradient de pH qui semble être le moteur de l'absorption.

DEUXIEME THEME : COMPREHENSION DES PHENOMENES METABOLIQUES INDUITS PAR LES TRAITEMENTS HORMONAUX STIMULANT LA PRODUCTION - TENEURS EN ADENINES NUCLEOTIDES? CHARGE ENERGETIQUE DU LATEX.

Quelques dosages d'adénines nucléotides ont été effectués par la méthode de luminescence (luciférine/luciférase). Les résultats rapportés ici n'ont pas de valeur statistique car portent sur un nombre d'échantillons relativement réduit.

Cependant il se dégage d'ores et déjà les indications suivantes :

- Les arbres haut-producteurs du clone GT1 se caractérisent par des teneurs en ATP cytoplasmiques plus faibles (35 à 50 μM) et des teneurs en ADP plus fortes (15 à 25 μM) que les bas producteurs (ATP = 60 à 75 μM ; ADP = 5 à 12 μM).
- La stimulation hormonale (ethrel 2,5%) se traduit par une chute des teneurs en ATP de 50% environ et une augmentation des teneurs en ADP d'un facteur deux à trois.

TROISIEME THEME : COMPREHENSION DES PROCESSUS CONDUISANT A UN EPUISEMENT DES TISSUS LATICIFERES EN COURS D'EXPLOITATION.

1) L'une des causes de l'apparition d'encoches sèches est la coagulation du latex *in situ*, à la suite de l'éclatement des structures membranaires contenant l'essentiel des facteurs coagulants du latex. Chez les arbres fortement atteints le phénomène se traduit par une très forte augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes qui peut dépasser largement 50%, et l'apparition d'activités poly-phénoloxydase dans le cytoplasme à la suite de l'éclatement des particules de FREY-WYSSLING.

2) Le latex provenant d'arbres atteints d'encoche sèche se caractérise par des activités génératrices "d'oxygène toxique" (ions superoxydes, radicaux hydroxyls et eau oxygénée).

Cette activité NADH dépendante (NADH/0₂ oxydoreductase) localisée au niveau des lutoïdes, normalement absente ou très faible chez les arbres sains haut-producteurs, peut être induite transitoirement par la stimulation des arbres à l'ethrel.

4

Le Km apparent de l'enzyme vis-à-vis du NADH pour la consommation de l'oxygène moléculaire, l'apparition des superoxydes et la consommation du NADH lui même est du même ordre de grandeur et se situe autour de 50 μ M.

Cette activité est insensible à l'antimycine, la rotenone et aux divers inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires mitochondriales ou bactériennes. Elle est par contre sensible au cyanure et à DIECA (30% d'inhibition).

La consommation d'oxygène est partiellement inhibée par l'addition de superoxyde dismutase + catalase exogène, mais fortement activée par la présence de fer (Fe^{3+}) ou de cuivre aux concentrations paraphysiologiques de 25 et 50 μ M respectivement.

3) Chez les arbres atteints d'encoches sèches provoquées par la stimulation, nous avons constaté en même temps que des activités NADH/ O_2 oxydoréductases élevées persistent une diminution des "systèmes anti-oxygènes" protecteurs enzymatiques (super-oxyde dismutase et catalase endogènes) ou non enzymatiques (thiols réduits et acide ascorbique).

4) L'addition *in vitro* de NADH à une suspension de lutoïdes provenant d'arbres partiellement atteints d'encoche sèche se traduit par une peroxydation notable de lipides insaturés exogènes (apparition d'aldéhydes réagissant à l'acide thiobarbiturique ou à la dinitrophényl-hydrazine) et par une augmentation importante de l'éclatement des structures membranaires en suspension. Le phénomène est activé par l'addition de Fer ou de Cuivre et inhibé par DIECA, KCN (1 mM) ou un excès de superoxyde dismutase + catalase exogène.

CONCLUSION

1) Le fonctionnement différentiel des deux pompes à protons antagonistes (ATPase et NADH-CYT C. oxydoréductase) électrogènes est susceptible d'intervenir de deux façons dans le métabolisme cytoplasmique :

- directement par leur capacité de réguler le pH du cytoplasme environnant siège des processus enzymatiques très pH dépendants impliqués dans la régénération du latex ;
- indirectement en contrôlant la composition ionique du cytoplasme (citrate, cations divalents...) déterminante pour "l'équilibre métabolique" du latex.

Leur fonctionnement peut expliquer les corrélations mises en évidence par ailleurs reliant le Δ pH cytoplasme-lutoïde) à la productivité des Hévéas.

2) Les résultats préliminaires acquis sur la charge énergétique du latex semblent d'ores et déjà indiquer que la disponibilité en énergie n'est pas le facteur limitant principal de la synthèse du latex.

Le problème se situerait alors au niveau de l'utilisation de cette énergie disponible.

3) La mise en évidence récente des activités NADH/O₂ oxydo-réductases génératrices "d'oxygène toxique" particulièrement intenses dans les latex d'arbres atteints d'encoche sèche, corrélative à de faibles "activités protectrices" explique l'instabilité des organites figurées du latex constatée antérieurement :

Ces activités se traduiraient par la déstabilisation de toutes les structures membranaires cellulaires, aboutissant à terme à la disfonction des laticifères et, en particulier, à l'éclatement des particules figurées du latex connues pour contenir la quasi totalité des facteurs coagulants.

ANNEXE I

La cellule de dialyse à écoulement continu a été conçue et réalisée au laboratoire.

Elle est constituée de deux blocs de résine polyester, rectangulaires, percés d'un trou cylindrique, formant un compartiment supérieur (volume = 6 ml) ouvert aux deux extrémités et un compartiment inférieur de 2,5 ml fermé à une extrémité. Le compartiment inférieur est percé, à mi-hauteur, de deux orifices munis d'une buse en téflon constituant l'entrée et la sortie de l'écoulement continu.

Lors de la mise en fonction de la cellule, les deux compartiments sont accolés et comprimés par un système de boulons, en ayant pris soin de déposer un barreau aimanté dans le compartiment inférieur, et d'intercaler une membrane de dialyse entre leur deux faces dépolies.

L'entrée du "flow" continu de la cuve inférieure est connectée à la réserve de tampon, et la sortie à une pompe péristaltique qui envoie le dialysat au collecteur de fractions. Un micro-barreau aimanté est déposé au-dessus de la membrane de dialyse, et la cellule fixée sur un agitateur magnétique. L'échantillon à étudier est déposé dans le compartiment supérieur et maintenu sous agitation moyenne durant toute la manipulation.

La radioactivité présente dans la suspension lutoïdique déposée dans la cuve supérieure diffuse alors au travers de la membrane de dialyse vers le compartiment inférieur et se trouve entraînée par le "flow" continu de tampon. Le dialysat est alors traité en vue du comptage de radioactivité par scintillation en phase liquide.

Toute variation de concentration en l'élément radioactif dans le tampon de la suspension lutoïdique déposé dans la cuve supérieure se traduit par une variation proportionnelle de la concentration en cet élément dans le dialysat, et traduit donc un mouvement de cet élément entre le compartiment intra et extra-lutoïdique.

Publications relatives aux travaux partiellement financés
par l'ATP-CNRS

(Bases physiologique et génétique de la production végétale).

- CRETIN, (H.) (1979).- Les lutoïdes : "pH-stat" biophysique et particules détoxifiant le cytoplasme du latex d'*Hevea brasiliensis*. Rapport interne multigraphié (ORSTOM, Septembre 1979), 27 p., 12 fig..
- CRETIN, (H.) (1980).- 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 vacuolysosomal membrane of intact lutoïds. 23 p. dactyl., 7 fig., 4 tabl. (2ème version corrigée envoyée à Journal of Membrane Biology - en cours).
- CRETIN, (H.) (1980).- The proton gradient across the vacuo-lysosomal membrane of lutoïds from the latex of *Hevea brasiliensis*.
II. The electrogenic proton efflux coupled to the vacuo-lysosomal membrane bound NADH-cytochrome c. oxidoreductase activity. 21 p., dactyl., 2 fig., 5 tabl. (proposé à Journal of Membrane Biology - 2ème version en cours).
- CRETIN, (H.), JACOB, (J.L.), PREVOT, (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 BANGRATZ, (J.) - Métabolisme des formes toxiques de l'oxygène (superoxydes, radicaux libres hydroxyl et quinoniques, eau oxygénée) au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*.
I. Les enzymes mis en jeu dans la production et la "neutralisation" des formes toxiques de l'oxygène dans le latex : mise en évidence, compartimentation et effecteurs physiologiques. Leurs effets sur la peroxydation des lipides.
II. Impact des activités génératrices et protectrices des formes toxiques de l'oxygène sur la stabilité des membranes particulières du latex (lutoïdes et particules de Frey-Wyssling). Relation avec la production et l'apparition d'encoche sèche. (Rapport interne, ORSTOM - en cours).

ACHATS EFFECTUÉS SUR CRÉDITS - ATP-CNRS PAR LE
LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ORSTOM, ADIOPODOUMÉ

(01.01.79 au 31.12.80)

1. GROS MATERIEL

- Une microcentrifugeuse BECKMAN modèle 152-B
- Un collecteur de fraction GILSON - Microcol-TDC-80
- Une pompe peristaltique GILSON - 4 canaux
pour une valeur totale de 20.000 F.F.

2. Produits chimiques SIGMA pour une valeur de 10.000 F.F.