



PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *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*. Note (\*) de Hervé Cretin [1], présentée par Roger Buvat.

En présence d'un « accepteur d'électrons » exogène tel que le Cytochrome *c*, l'addition de NADH à une suspension de vacuolysosomes (les lutoïdes) du latex, provoque un efflux transtonoplastique de protons, inhibé par les protonophores, mais insensible aux inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires mitochondriales ou bactériennes. Cette « pompe à efflux », joue probablement un rôle important dans le contrôle du pH du cytosol laticifère et sur la production du latex d'Hévéa.

PLANT PHYSIOLOGY. — A Transtonoplastic Proton Efflux Coupled to Electron Transport (the NADH-Cytochrome *c* Oxidoreductase) in the Membrane of the Vacuolysosomes from the Latex of *Hevea brasiliensis*.

In the presence of an exogenous electron acceptor such as the *c*-Cytochrome, the addition of NADH to a suspension of purified fresh vacuo-lysosomes (the lutoïds) of *Hevea brasiliensis*, leads to a transtonoplastic efflux of protons, reversed by protonophores, while insensitive towards classical inhibitors of the mitochondrial or bacterial respiratory chains. The outward  $H^+$  pumping redox system is probably involved in the control of pH and homeostasis of the laticiferous cytosol, hence in the *Hevea* latex regeneration and rubber production.

INTRODUCTION. — Le latex d'Hévéa à partir duquel est extrait le caoutchouc naturel, constitue le cytoplasme fluide d'un réseau de cellules spécialisées dans le phloème de l'Hévéa [2]. Il est nécessaire que le pH de son cytosol soit maintenu au voisinage de la neutralité pour que soit assuré un métabolisme optimal, orienté vers la synthèse régénérative du latex, et partant vers une production de caoutchouc élevée [3]. De fait, des corrélations très hautement significatives directes ont été établies entre les potentialités productrices naturelles des Hévéas, le pH du sérum cytoplasmique (cytosol) d'une part, et l'amplitude du gradient de pH *in vivo* ( $\Delta pH$ ) entre les compartiments cytosolique et vacuolaire (les lutoïdes) d'autre part ([4], [5]). L'antiparallélisme caractérisant les évolutions des pH cytosolique et intra lutoïdique du latex nous a conduit à rechercher des mécanismes susceptibles de catalyser des flux de protons transtonoplastiques. C'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence, dans un premier temps, le fonctionnement de l'ATPase tonoplastique lutoïdique, caractérisée par d'Auzac ([6], [7]), en tant que pompe à protons catalysant l'influx des protons à l'intérieur du compartiment vacuolaire et l'alcalinisation consécutive du milieu extérieur ([8], [9], [10]).

Nous mettons ici en évidence un efflux de protons transtonoplastique lors du fonctionnement de la NADH-Cytochrome *c* oxydoréductase lutoïdique décrite par Moreau et coll. [10]. Ce système membranaire transporteur d'électrons fonctionne comme une pompe à protons antagoniste de l'ATPase lutoïdique et serait également impliquée dans le contrôle du pH cytosolique du latex.

Abréviations. — NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide; NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite; FCCP : Carbonylcyanide-*p*-trifluorométhoxy-phenylhydrazone; ATPase : Adénosine-triphosphatase.

MÉTHODES. — Le latex récolté dans un flacon entouré de glace fondante est centrifugé pendant 20 mn à 35 000 *g* (10°C). La phase surnageante, correspondant aux particules de caoutchouc en suspension dans le cytosol fluide laticifère, est écartée. Le culot, constitué essentiellement de lutoïdes, est lavé à trois reprises dans cinq fois son volume de tampon (Hepes-Tris, 10 mM; Mannitol 320 mM; pH 7,0). Les lutoïdes « purifiés » sédimentés sont remis en suspension dans le tampon « incubation-dialyse » (Mannitol 320 mM;  $Cl_2Mg$  3 mM; Hepes-Tris 50 ou 100 mM; pH 7,0), et incubés 30 mn, à température ambiante, en

25 OCT. 1983

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

N° : 3533

Date : B

B3533

présence de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine utilisée comme « sonde à protons » ( $\Delta\text{pH}$ ), ou de  $^{86}\text{Rb}$  + valinomycine, pour l'estimation des différences de potentiel transmembranaires ( $\Delta\Psi$ ) ([9], [12], [13]).

Les variations des gradients de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) ou de potentiel ( $\Delta\Psi$ ) transtonoplastiques sont suivies en continu par la méthode de cinétique de dialyse : la suspension lutoïdique radioactive est transférée dans le compartiment supérieur d'une cellule de dialyse, et maintenue sous agitation douce; le tampon de dialyse effluent à vitesse constante du compartiment inférieur, est collecté séquentiellement pour la mesure de sa radioactivité.

Les  $\Delta\text{pH}$  et  $\Delta\Psi$  transtonoplastiques sont estimées à partir de la radioactivité résiduelle (traversant la membrane de dialyse) dans l'effluent, qui traduit proportionnellement l'évolution de la radioactivité dans le milieu d'incubation (extérieur) résultant des mouvements transtonoplastiques des sondes radioactives lipophiles utilisées. La lyse des lutoïdes par le triton X-100, en fin d'expérimentation, permet de calculer la quantité totale de radioactivité accumulée par ces organites.

Les concentrations intraparticulaires des sondes sont calculées après estimation du volume intra-lutoïdique selon les méthodes décrites précédemment [9]. Les activités NADH-Cytochrome *c* oxydoréductase sont déterminées selon Moreau et coll. [11], et les protéines analysées selon la méthode de Lowry et coll. [14].

RÉSULTATS. — La figure 1 montre une expérimentation typique de cinétique de dialyse : 3 à 4 mn après le transfert dans le compartiment supérieur, d'une suspension lutoïdique préincubée en présence de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine, l'équilibre de distribution de la sonde à protons est atteint de part et d'autre de la membrane de dialyse séparant les deux compartiments de la cellule. Ensuite la radioactivité décroît sensiblement et régulièrement dans l'effluent.

L'addition d'une solution de Cytochrome *c*, ajustée au pH de la suspension provoque une légère apparition instantanée de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine dans l'effluent, traduisant un efflux faible mais significatif de la sonde à protons du milieu intralutoïdique vers le milieu d'incubation extérieur. Un nouvel équilibre est rapidement atteint, et l'addition ultérieure de NADH, ajusté au pH de la suspension, provoque une augmentation massive mais progressive de la radioactivité dans le milieu extralutoïdique. L'addition de  $\text{NAD}^+$  reste sans effet significatif.

#### EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Efflux transtonoplastique de  $^{14}\text{C}$ -méthylamine lors du fonctionnement de la NADH-Cytochrome *c* oxido-réductase lutoïdique : 3 ml de suspension lutoïdique à 10% à pH 7, préincubée 30 mn en présence de 15  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -Mea; Cytochrome *c* pH 7 : 500  $\mu\text{M}$  final, NADH (—●—●—) ou NAD (...○...○...) pH 7 : 2 mM final. En fin d'expérience les lutoïdes sont lysés par l'addition de Triton X-100 à 0,05% final.

Fig. 1. — *Transtonoplastic efflux of  $^{14}\text{C}$ -methylamine ( $\Delta\text{pH}$  probe) during the lutoïdic NADH-Cytochrome *c* oxidoreductase working: 3 ml of a lutoïd suspension (10% W/V) preincubated for 30 mn, in the presence of 15  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -MeA at pH 7. Addition of C Cytochrome: 500  $\mu\text{M}$ , pH 7 and then DPNH (—●—●—) or DPN (...○...○...): 2 mM, pH 7. The experiment is ended by the lutoïd lysis with Triton X-100 (0,05%) (final concentrations in the upper chamber).*

Fig. 2. — Inhibition de l'efflux de la sonde à protons en présence du protonophore FCCP 50  $\mu\text{M}$  (...\*...\*...). Contrôle sans FCCP (—●—●—). Effecteurs ajoutés à même concentration que dans la figure 1.

Fig. 2. — *Inhibition of the pH probe efflux in the presence of 50  $\mu\text{M}$  FCCP (...\*...\*...). Control in the absence of the protonophore FCCP (—●—●—). The effectors were added with the same concentration as in figure 1.*

TABEAU

Effets du cyanure, de l'Antimycine A et du FCCP sur l'activité pompe à protons NADH-Cytochrome *c* dépendante (Cytochrome *c* : 500  $\mu$ M; NADH : 2 mM, pH 7,0) après 20 mn d'incubation (une moyenne de trois expériences).

*Effects of cyanide, Antimycin A and FCCP on the NADH-C Cytochrome dependent proton pumping activity of the lutoids (C Cytochrome: 500  $\mu$ M; DPNH: 2 mM; pH 7; 20 mn incubation period); (a mean of three experiments).*

	$\Delta$ pH		$d\Delta$ pH	Réduction du Cytochrome <i>c</i>
	T <sub>0</sub>	T <sub>20</sub>	T <sub>20</sub> -T <sub>0</sub>	DO 550 nm D.O. (mn <sup>-1</sup> . ml <sup>-1</sup> )
Témoins . . . . .	1,11	0,68	-0,43	0,542
+KCN 1 mM. . . . .	0,97	0,61	-0,36	0,495
+Antimycine A 50 $\mu$ M. . . . .	1,05	0,65	-0,40	0,480
FCCP 50 $\mu$ M. . . . .	0,48	0,40	-0,08	0,505

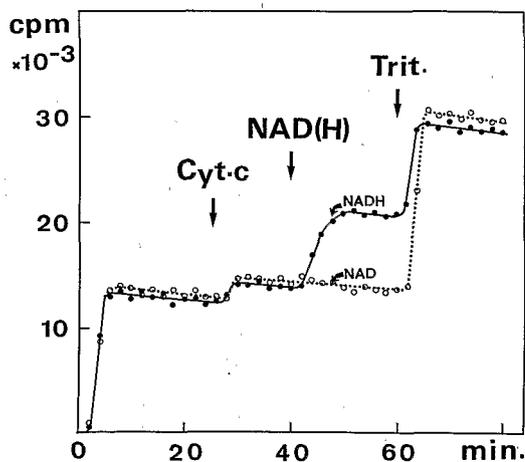


Fig. 1

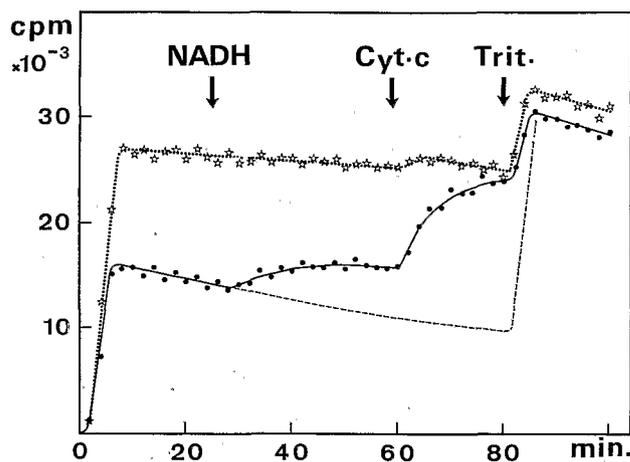
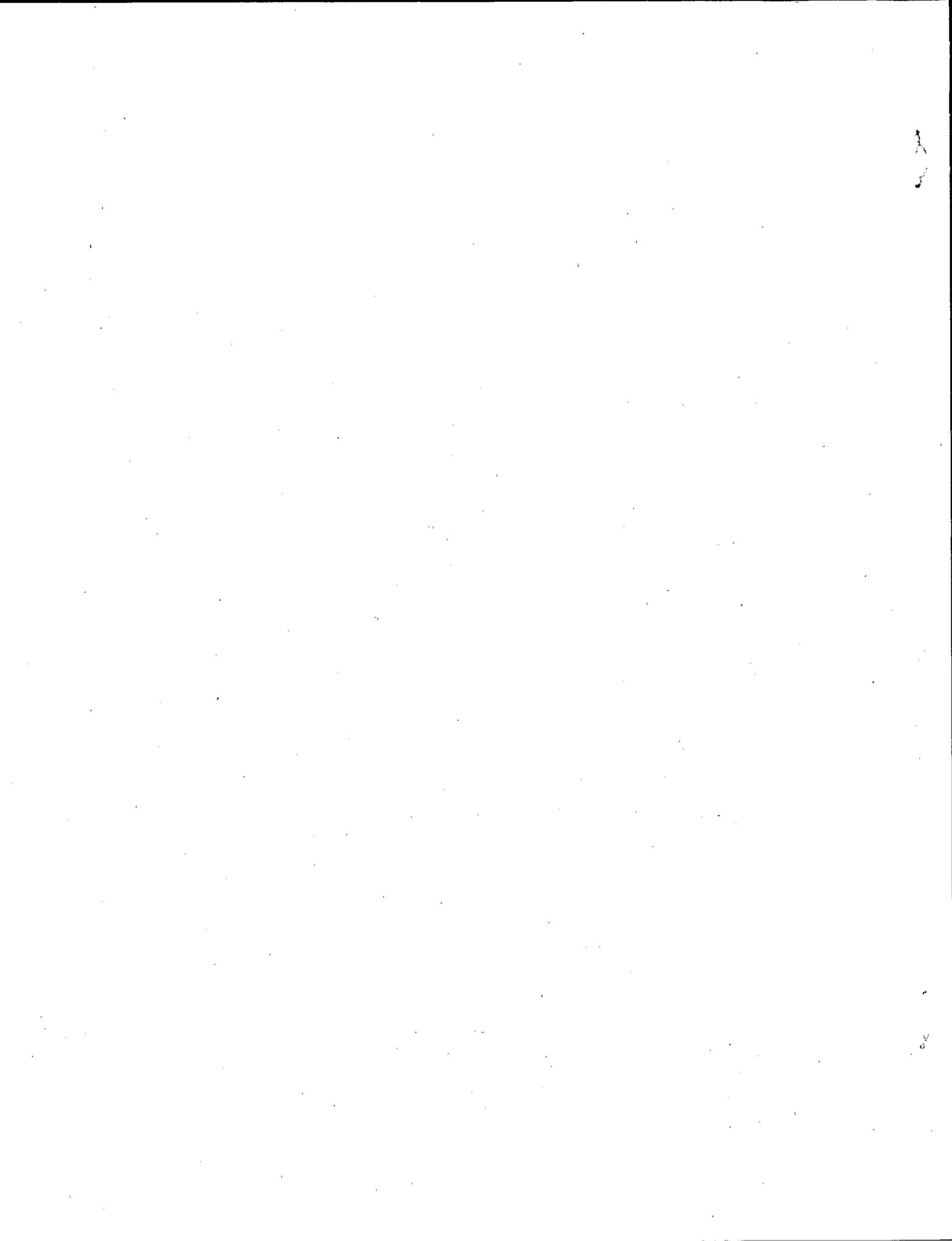


Fig. 2



La figure 2 montre que, en l'absence d'un 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 *c* accélère et amplifie fortement le phénomène. La lyse des lutoïdes par le Triton libère instantanément la méthylamine résiduelle accumulée par les vacuo-lysosomes lors de la préincubation.

Lorsque les lutoïdes sont préincubés en présence de FCCP (*fig. 2*), la lyse de leur membrane par le Triton démontre que ces organites avaient beaucoup moins accumulé la sonde à protons, confirmant l'effet dépressif de ce protonophore sur le gradient transtonoplastique de pH. En présence de FCCP, l'addition du NADH + Cytochrome *c* reste sans effet significatif. Ce protonophore agit donc comme un agent découplant du système, inhibant quasiment totalement l'efflux transtonoplastique de protons normalement couplé au fonctionnement du système membranaire lutoïdique transporteur d'électrons. Celui-ci reste cependant fonctionnel (tableau).

Le même type d'expérience réalisé en présence d'Antimycine A ou de cyanure aux concentrations inhibant classiquement les chaînes respiratoires mitochondriales ou bactériennes, montre que l'activité NADH-Cytochrome *c* oxydoréductase, ainsi que l'efflux transtonoplastique de protons qui lui est couplé, restent pratiquement inchangés et semblent donc très peu sensibles à ces poisons respiratoires.

Au cours des expérimentations des contrôles périodiques du pH du milieu d'incubation (fortement tamponné afin d'éviter toute modification artéfactuelle du pH externe due au seul apport de substrats exogènes) ne montrent que de très faibles variations (acidification) en fin de réaction, ne pouvant expliquer à elles seules les flux massifs de la sonde à protons.

DISCUSSION. — L'insensibilité du système vis-à-vis de l'Antimycine A ou du cyanure écarte l'hypothèse d'une contamination mitochondriale, bactérienne ou fongique importante.

Les très faibles évolutions du pH du milieu extérieur fortement tamponné, ainsi que l'effet inhibiteur du protonophore FCCP, démontrent sans ambiguïté que les efflux de méthylamine hors des lutoïdes sont essentiellement dus à la diminution du gradient de pH transmembranaire par suite d'efflux transtonoplastiques de protons.

Il apparaît ainsi, qu'un système transporteur d'électrons de la membrane lutoïdique, catalysant l'oxydation du NADH et la réduction corrélative du Cytochrome *c* exogène (absent dans le latex...), est capable de fonctionner comme une pompe à protons, assurant l'efflux transtonoplastique des  $H^+$ . Le fonctionnement de ce système induit l'alcalinisation du compartiment vacuolysosomal, et sans doute l'acidification du milieu environnant, si ce dernier n'est pas excessivement tamponné. La présence simultanée des deux substrats NADH et Cytochrome *c* est nécessaire au fonctionnement optimal du système.

Des expériences préliminaires, non décrites ici, effectuées en présence de  $^{86}Rb$  + valinomycine, semblent montrer que cette pompe est électrogène, rendant l'intérieur des lutoïdes électriquement plus négatif.

L'identité de cette pompe à  $H^+$  « redox » avec la chaîne transporteuse d'électrons membranaire à Cytochromes *b* 563 et *b* 561 (accepteurs endogènes) mise en évidence par Moreau et coll. reste à démontrer [11].

La mise en évidence du fonctionnement de ce système *in vivo* reste liée à l'identification d'un accepteur d'électrons endogène recyclable. Si tel est réellement le cas, le fonctionnement différentiel des deux pompes à protons antagonistes ATPase et NADH-Cytochrome *c*, oxydoréductase du tonoplaste lutoïdique doivent participer activement au

contrôle du pH et au maintien de l'homéostasie du cytosol laticifère, qui conditionne le fonctionnement optimal du métabolisme cellulaire, et partant la régénération donc la production du latex d'Hévéa.

(\*) Remise le 4 octobre 1982, acceptée le 8 novembre 1982.

[1] L'auteur remercie le C.E.A. (France) pour la fourniture gratuite des produits radioactifs. Ces recherches ont été partiellement financées par une A.T.P.-C.N.R.S. : « Conversion de l'énergie dans les membranes biologiques » (n° 031259).

[2] B. L. ARCHER, D. BARNAR, E. G. COCKBAIN, P. B. DICKENSON et A. I. MCMULLEN, *The Chemistry and Physics of Rubber-like Substances*, McLaren and Sons, Ltd London, 1963, p. 41.

[3] J. TUPY, *Physiol. Vég.*, 11, 1973, p. 13.

[4] M. COUPÉ et C. LAMBERT, *Phytochemistry*, 16, 1977, p. 455.

[5] J. BZROZOWSKA-HANOWER, H. CRETIN, P. HANOWER et P. MICHEL, *Physiol. Vég.*, 17, 1979, p. 889.

[6] J. D'AUZAC, *Phytochemistry*, 14, 1975, p. 671.

[7] J. D'AUZAC, *Phytochemistry*, 16, 1977, p. 1881.

[8] B. MARIN, M. MARIN-LANZA et E. KOMOR, *Biochem. J.*, 198, 1981, p. 365.

[9] H. CRETIN, *J. Membrane Biol.*, 65, 1982, p. 175.

[10] H. CRETIN, B. MARIN et J. D'AUZAC, *Plasmalemma and Tonoplast: Their Functions in the Plant Cell*, D. MARMÉ, E. MARRÉ et R. HERTEL, éd., Elsevier Biomedical Press, 7, 1982, p. 201.

[11] F. MOREAU, J. L. JACOB, J. DUPONT et C. LANCE, *Biochim. Biophys. Acta*, 396, 1975, p. 116.

[12] D. J. REINJGOUT et L. M. TAGER, *Biochim. Biophys. Acta*, 297, 1973, p. 174.

[13] K. ALTENDORF, H. HIARATA et F. M. HAROLD, *J. Biol. Chem.*, 250, 1975, p. 1405.

[14] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265.

Laboratoire de Physiologie végétale,  
Centre O.R.S.T.O.M. d'Adiopodoumé, B.P. n° V-51 Abidjan, Côte-d'Ivoire.