

PHYSIOLOGIE CELLULAIRE VÉGÉTALE. — *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.*
Note (*) de Hervé Cretin et Jacques Bangratz, présentée par Roger Buvat.

Les lutoïdes, vacuo-lysosomes du latex d'Hévéa, renferment une activité enzymatique génératrice d'anions superoxydes (O_2^-) NAD(P)H dépendante. L'émission des divers radicaux toxiques de l'oxygène qui en résulte, provoque la dégradation peroxydative des lipides insaturés membranaires, la lyse des organites et la décompartmentation consécutive des facteurs coagulants du latex.

Cette activité peroxydative est particulièrement intense au niveau des lutoïdes provenant d'Hévéas atteints d'« encoches sèches » et serait à l'origine de la coagulation du latex à l'intérieur des laticifères, phase ultime de ce syndrome.

PLANT CELL BIOCHEMISTRY. — An Endogenous NAD(P)H Dependent Enzymatic Activity, Responsible for the Peroxidative Degradation of Organelle Membrane and for the Early, as Well as *in situ*, Coagulation of the Latex of *Hevea brasiliensis*.

The lutoïds, vacuo-lysosomes from the hevea latex, contain an enzymatic activity that generates superoxide anions from NAD(P)H and O_2 . The diverse toxic forms of oxygen that are emitted lead to the peroxidatic degradation of the membrane unsaturated lipids, then organelle lysis and the consecutive decompartmentation of the coagulating factors of the latex. This NAD(P)H dependent peroxidatic activity is particularly severe in the lutoïds from hevea with "dry-cuts" (brown bast) syndrome, and is probably responsible for the internal coagulation of the latex within the bark: the ultimate stage of this syndrome.

Le latex d'*Hevea brasiliensis* est le cytoplasme d'un réseau de cellules spécialisées (les laticifères), situé dans le phloème de l'arbre. Une simple blessure de l'écorce, la « saignée », suffit à provoquer son épanchement, jusqu'à ce que des phénomènes de coagulation viennent obturer l'extrémité des laticifères et arrêter son écoulement [1]. La coagulation du latex sur « l'encoche de saignée » constitue de ce fait le facteur limitant principal de la production du caoutchouc d'Hévéa. De plus, dans certains cas de surexploitation des arbres [2], la saignée de l'écorce ne s'accompagne plus de l'épanchement du latex : ce phénomène de « tarissement », connu sous le nom d'« encoches sèches », correspondrait à la coagulation du latex à l'intérieur même des laticifères [3].

Il est maintenant bien admis que la quasi-totalité des facteurs entraînant la coagulation du latex sont compartimentés à l'intérieur des organites de ce cytoplasme, les lutoïdes microvacuoles à caractère lysosomal ([4] à [7]), et les particules de Frey-Wyssling [8]. On conçoit dès lors l'extrême importance de l'intégrité des membranes constituant ces organites, et il est alors intéressant de rechercher les causes expliquant leur plus ou moins forte instabilité.

La présente Note confirme l'extrême fragilité des particules du latex provenant d'Hévéas très bas producteurs ou atteints d'« encoches sèches ». La déstabilisation de ces organites est expliquée par la dégradation peroxydative de leurs lipides insaturés membranaires, due à la présence d'une activité lutoïdique NAD(P)H dépendante, libérant des radicaux superoxyde dans le milieu.

MÉTHODES. — Le latex provient d'Hévéas du clone GT. 1, sélectionnés et répartis en groupes selon leur productivité en caoutchouc sec et la présence ou non de symptômes avancés d'« encoches sèches ». Les échantillons, récoltés individuellement dans des tubes plongés dans la glace fondante sont immédiatement centrifugés à 70 000 g durant 1 h. La phase aqueuse correspondant au cytosol ou sérum cytoplasmique, est prélevée et conservée dans la glace, pour analyses. La phase sédimentée, constituée essentiellement des lutoïdes,

29 DEC. 1983

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

N° : 4009ex1

Cote : B

B4009 ex 1

est « purifiée » ou non par trois lavages/centrifugation successifs avec un tampon Mannitol 0,3 M, Tris-HCL 50 mM à pH 7,4.

L'indice d'éclatement des lutoïdes a été mesuré en déterminant les activités phosphatases acides lutoïdiques « libres » et « totales » selon la technique décrite par Ribailier [5]. La séparation des organites du latex sur gradient de saccharose, les électrophorèses sur gel d'amidon et les mesures des activités *o*-diphénoloxydases ont été réalisées selon les techniques décrites par Brzozowska et coll. [8]. La consommation d'oxygène NAD(P)H dépendante a été mesurée à l'aide d'un oxygraphe équipé d'une électrode de type Clark. L'oxydation du NADH a été suivie au spectrophotomètre, à 340 nm [9] et la production des radicaux superoxydes estimée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich [10]. Le dosage des thiols réduits cytoplasmiques a été effectué par la méthode à l'acide di-thio-bis-nitrobenzoïque [11], celui du malondialdéhyde (MDA), sous produit de la peroxydation des lipides insaturés, au moyen de l'acide 2-thiobarbiturique selon la méthode de Stancliff et coll. [12].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La figure 1 montre l'existence d'une corrélation négative très hautement significative ($r = -0,839$) entre la productivité des Hévéas (Ln de la production) et l'indice d'éclatement de leurs lutoïdes. Les arbres atteints du syndrome d'« encoches sèches » se caractérisent par les indices d'éclatement lutoïdiques les plus élevés.

L'analyse des activités *o*-diphénoloxydases, normalement compartimentées dans les particules de Frey-Wyssling sédimentables ([13], [8]) met en évidence leur apparition dans le sérum cytoplasmique des arbres atteints d'encoches sèches (tableau). Une vérification

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Corrélation entre la productivité des Hévéas, exprimée par le logarithme népérien de la production en grammes de caoutchouc sec par saignée (g/a/s) et l'indice d'éclatement (IE en %) de leurs lutoïdes. (* : arbres atteints d'« encoches sèches »).

Fig. 1. — Correlation between latex yield (Natural logarithm grams dry weight/tree and tapping) and the bursting index (IE in %) of lutoïds. (* : "dry-cuts" syndrome).

Fig. 2. — Corrélation entre l'indice d'éclatement des lutoïdes et leur consommation d'O₂ NADH dépendante.

Fig. 2. — Correlation between the bursting index of the lutoïds and their DPNH dependent oxygen consumption.

Fig. 3. — Corrélation entre la productivité des Hévéas (g/a/s) et la teneur en composés thiols réduits cytoplasmiques de leur latex (mM).

Fig. 3. — Correlation between latex yield (grams dry weight/tree and tapping) and the thiol group content (RSH) of their latex cytosol (mM).

Fig. 4. — Inhibition simultanée de la consommation d'O₂ lutoïdique et de l'émission de superoxydes, par la superoxyde dismutase et la catalase exogènes (10 unités/ml).

Fig. 4. — Parallel inhibition of the oxygen consumption and the superoxide emission by lutoïds, in the presence of exogenous superoxide dismutase and catalase (10 units/ml).

Fig. 5. — Consommation d'O₂ (en µl) et du NADH (DO-340 nm) par des lutoïdes d'Hévéas atteints d'« encoches sèches » en suspension dans un tampon isotonique à pH 7,4. Apparition simultanée de malondialdéhyde (DO-532 nm), sous-produit de la peroxydation de l'acide linoléique exogène, et évolution concomitante de l'indice d'éclatement des lutoïdes (I.E. : %).

Fig. 5. — Oxygen consumption (µl) and DPNH oxidation (OD-340 nm) by lutoïds from Hevea with "dry-cuts" syndrome, in an isotonic buffer, pH 7.4. Simultaneous malondialdehyde emission (OD-532 nm), a by-product of linolenic acid peroxidation, and lutoïdic bursting index increase.

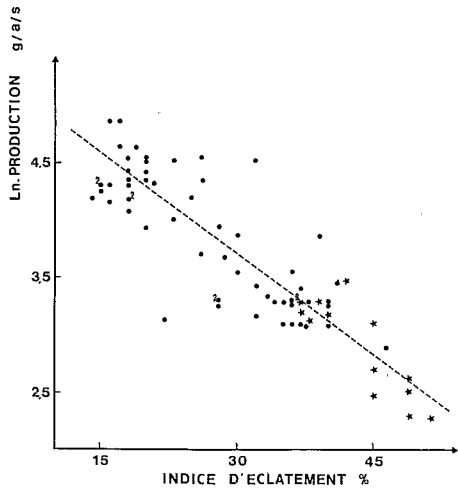


Fig. 1

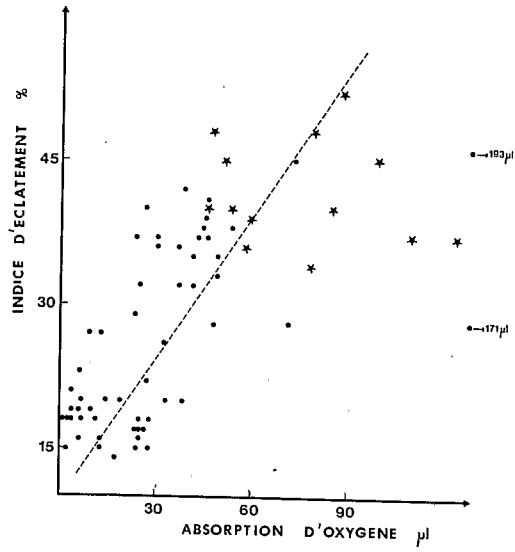


Fig. 2

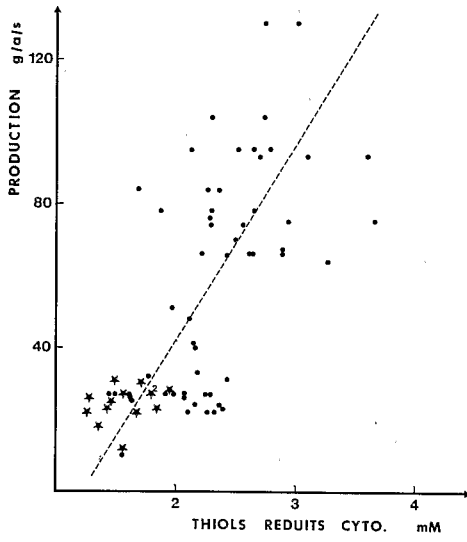


Fig. 3

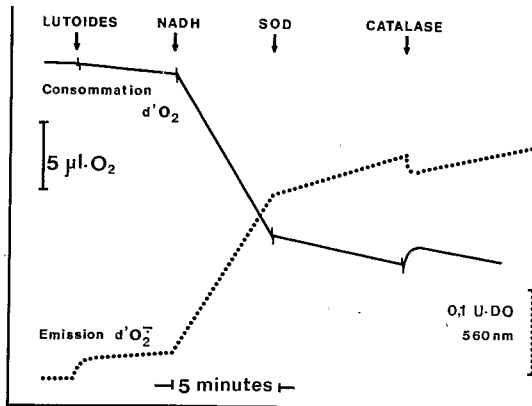


Fig. 4

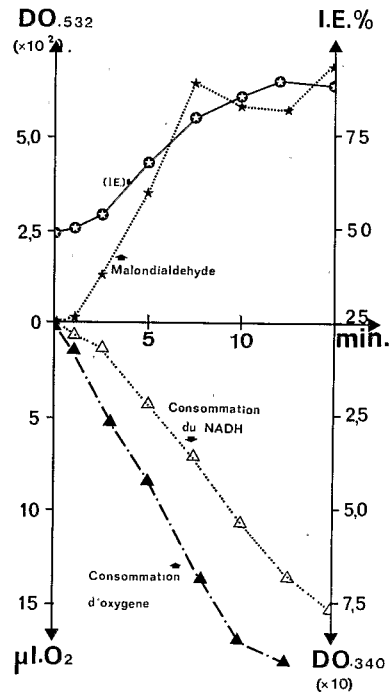


Fig. 5



par électrophorèse sur gel d'amidon montre que ces enzymes, retrouvés dans le cytoplasme, sont effectivement originaires des particules de Frey-Wyssling. Leurs activités sont toutefois largement sous évaluées compte tenu du pouvoir inhibiteur (70 à 90%) du sérum cytoplasmique [8]. Ainsi la diminution des activités sédimentables corrélative à l'augmentation des activités cytoplasmiques, traduit bien la lyse des particules de Frey-Wyssling dans les latex provenant d'arbres « malades ».

L'ensemble de ces résultats confirme l'instabilité extrême des organites du latex provenant des Hévéas atteints d'« encoches sèches », et dans une moindre mesure des arbres à coagulation précoce, très bas producteurs.

Nous avons recherché s'il existait dans ces latex, un mécanisme biochimique susceptible de rendre compte de la déstabilisation de ces organites *in situ*.

Nous avons mis en évidence dans le sédiment lutoïdique du latex une activité NAD(P)H oxydase génératrice de formes éminemment toxiques de l'oxygène, liée positivement ($r = +0,608$) à l'indice d'éclatement des lutoïdes (*fig. 2*). Les activités les plus élevées caractérisent les lutoïdes les plus instables des arbres atteints d'« encoches sèches » et dans une moindre mesure des arbres très bas producteurs. Cette activité enzymatique localisée au niveau des lutoïdes se traduit par une absorption d'oxygène NAD(P)H dépendante insensible aux inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires mitochondriales ou microbiennes et l'émission d'anions superoxydes (O_2^-) résultat du transfert direct d'une partie des électrons du NAD(P)H sur l'oxygène moléculaire dissous (*fig. 4*).

L'addition de superoxyde dismutase ([14], [15]) et de catalase inhibe à la fois l'absorption d'oxygène et la réduction du bleu nitré de tetrazolium, ce qui confirme l'émission de radicaux superoxydes et d'eau oxygénée par le système.

Ce système enzymatique montre une activité optimale à pH neutre, il est activé par des concentrations physiologiques en Fe^{3+} ou Cu^{2+} .

L'addition, *in vitro*, de NADH (0,5 mM) à une suspension lutoïdique purifiée provenant d'arbres atteints d'« encoches sèches » se traduit par une intense consommation d'oxygène corrélative à la disparition du NADH exogène, et par une très forte augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes. Le même type d'expérience réalisé en présence d'acides gras insaturés exogènes aboutit à la libération de malondialdéhyde, sous produit de la dégradation peroxydative de ces acides gras (*fig. 5*); ces activités restent à peine décelables au niveau des lutoïdes provenant d'arbres sains, haut-producteurs.

Des analyses portant sur la présence de « protecteurs » endogènes susceptibles de détoxifier le latex vis-à-vis des différentes formes agressives de l'oxygène ont permis de démontrer la présence de superoxyde-dismutases [14] et de confirmer la présence de catalases dans les différents compartiments du latex [13]. Les arbres atteints d'« encoches sèches » se caractérisent par une diminution significative de ces activités protectrices

TABLEAU

Libération des activités ortho-diphénol oxydases (O-DPox) des particules de Frey-Wyssling sédimentables (Sed.) dans le cytosol du latex d'Hévéas atteints d'« encoches sèches » (DO/0,1 ml/mn).

Release of the o-diphenol oxidase activities (O-DPox) from the sedimentable Frey-Wyssling particles (Sed.), in the cytosol of the latex from Hevea with "dry-cuts" syndrome (OD/0.1 ml/min.).

	O-DPox-Sed.	O-DPox-cyto.
Arbres sains	1,63	0,00
« encoches sèches » (30%)	0,63	0,054
« encoches sèches » (70%)	0,49	0,168

enzymatiques. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence une corrélation positive hautement significative entre la productivité des arbres ($r=0,685$) (fig. 3), et la teneur en thiols réduits cytoplasmiques, capteurs potentiels de certaines formes toxiques de l'oxygène [16].

Ainsi, la coagulation précoce du latex sur l'encoche de saignée de même que la coagulation *in situ* dans le cas d'arbres atteints d'« encoches sèches » correspond à une forte instabilité des membranes constitutives des organites figurées du latex et s'explique chronologiquement par :

- le démasquage d'activités enzymatiques génératrices de formes très toxiques de l'oxygène, accompagné d'une diminution des protecteurs endogènes;
- la dégradation peroxydative des lipides membranaires insaturés;
- la déstabilisation consécutive de certaines membranes biologiques.

L'une des conséquences en est la décompartmentation des agents coagulants présents sous forme latente dans les organites, suivie de la coagulation précoce du latex sur l'encoche chez les Hévéas bas-producteurs, et à l'intérieur de l'écorce chez les arbres atteints d'« encoches sèches ».

(*) Remise le 7 juin 1982, acceptée après révision le 22 novembre 1982.

- [1] W. A. SOUTHORN, *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, 1969, p. 494.
- [2] J. BRZOWSKA-HANOWER, H. CRETIN, P. HANOWER et P. MICHEL, *Physiol. Veg.*, 17, 1979, p. 851.
- [3] E. DE FAY et C. HEBANT, *Comptes rendus*, 291, série D, 1980, p. 865.
- [4] S. PUJARNISLCE, *Thèse d'État Sc. Nat.*, 1969, Orsay, A.O. 3379.
- [5] D. RIBAILLIER, *Thèse d'État Sc. Nat.*, 1972, Abidjan, A.O. 7716.
- [6] W. A. SOUTHORN et E. E. EDWIN, *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 20, 1968, p. 187.
- [7] P. HANOWER, J. BRZOWSKA et C. LIORET, *Physiol. Veg.*, 14, 1976, p. 677.
- [8] J. BRZOWSKA-HANOWER, P. HANOWER et C. LIORET, *Physiol. Veg.*, 16, 1978, p. 231.
- [9] H. U. BERGMAYER, *Methods in Enzymatic Analysis*, 2^e éd., Acad. Press, 1965, p. 1011.
- [10] C. BEAUCHAMP et I. FRIDOVICH, *Anal. Biochem.*, 11, 1971, p. 276.
- [11] G. L. ELIMANN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 1959, p. 70.
- [12] R. C. STANCLIFF, M. A. WILLIAMS, K. UTSUMI et L. PACKER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 131, 1969, p. 629.
- [13] M. COUPE, S. PUJARNISLCE et J. D'AUZAC, *Physiol. Veg.*, 10, 1972, p. 459.
- [14] I. FRIDOVICH, *Adv. Enz.*, 41, 1974, p. 45.
- [15] K. L. FONG, P. B. MCCAY et J. C. POYER, *J. Biol. Chem.*, 248, 1973, p. 7792.
- [16] D. S. TARBELL, *Organic Sulfur Compounds*, N. KHARASCH, éd., Pergamon Press, 1, 1961, p. 97.

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