

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES LUTOÏDES DU LATEX D'HEVEA BRASILIENSIS DIFFÉRENCE ET ANALOGIE AVEC LES LYSOSOMES

Serge PUJARNISCLE

Maître de Recherches à l'O.R.S.T.O.M., Côte d'Ivoire

Nous sommes heureux de publier, à la suite d'un bref résumé faisant ressortir les points essentiels de la thèse soutenue par M. S. Pujarniscle, le 2 juillet 1969, devant la Commission d'Examen réunie à la Faculté des Sciences d'Orsay, la dernière partie de cette thèse donnant la discussion générale et les conclusions de l'auteur.

**

Ce travail apporte une nouvelle contribution à l'ensemble des recherches destinées à approfondir les connaissances sur la composition du latex et les phénomènes physiologiques qui, accompagnant la saignée et la biogenèse du caoutchouc, conditionnent la productivité des hévéas.

Le but de ces recherches a été d'étudier parmi les éléments figurés du latex les lutoïdes, dont l'importance en ce qui concerne le métabolisme de la cellule laticifère et la physiologie de l'écoulement lors de la saignée de l'hévéa est de plus en plus évidente. La structure des lutoïdes et la nature biochimique du sérum qu'ils contiennent ont suggéré à l'auteur l'idée de comparer ces particules aux lysosomes, éléments figurés de la cellule animale et caractérisés en particulier par leurs enzymes hydrolytiques de type acide.

Les expériences ont donc porté sur l'analyse de l'activité de diverses hydrolases (phosphatase acide, phosphodiesterase, cathepsine, β -glucosidase, estérase, β -galactosidase, β -N-acétyl-glucosaminidase, ribonucléase, désoxydibonucléase, phospholipase D) et sur leur localisation au sein du latex. Des techniques de centrifugation différentielle et isopycniqne ont permis d'isoler les lutoïdes et de situer les activités enzymatiques par rapport à cette fraction lutoïdique. Les latex utilisés au cours de ce travail, réalisés à la station de l'ORSTOM d'Adiopodoumé en Côte-d'Ivoire, provenaient d'hévéas de la plantation IRCA.

Il est apparu que la structure des lutoïdes, comme celle des lysosomes, était sensible à certains facteurs déstabilisants; l'influence du choc osmotique, des déter-

gents ioniques ou non, de la lysolécithine, des pH extrêmes, de la température à pH 5 et du vieillissement ont été examinées. La dégradation des particules provoquée par ces différents agents s'accompagne notamment de la libération dans le milieu de suspension de la phosphatase acide.

L'étude des hydrolases du latex citées précédemment a montré qu'elles étaient toutes de type acide. Leur profil de sédimentation les situe en presque totalité dans la fraction lutoïdique, à l'exception de la phospholipase D. La β -galactosidase et l'estérase paraissent, en outre, avoir une distribution plus complexe.

La confirmation de ces résultats a été obtenue à l'aide d'autres méthodes :

- l'action progressive de différents facteurs déstabilisant les lutoïdes provoque effectivement dans le milieu une augmentation pratiquement identique de l'activité des hydrolases localisés, lors des expériences précédentes, dans la fraction lutoïdique ;
- la centrifugation isopycniqne du latex, qui permet une séparation de ses divers éléments figurés (fig. 1), fait ressortir une très bonne coïncidence entre la fraction lutoïdique et la plupart des activités hydrolytiques; la répartition complexe de la β -galactosidase est de nouveau soulignée (fig. 2) ;
- la centrifugation isopycniqne des lutoïdes conduit à des résultats analogues.

Par contre, l'utilisation de ces méthodes a montré que la polyphénol oxydase et la malate déshydrogénase, qui sont deux enzymes d'oxydoréduction, ne sont absolument pas d'origine lutoïdique.

L'étude de la membrane des lutoïdes a mis en évidence sa nature lipoprotéique; cette membrane est semi-perméable et constitue une barrière infranchissable, à certains substrats. Cependant, elle peut être relativement perméable à d'autres substances. Les variations de la perméabilité de la membrane doivent dépendre de différents facteurs, tels que l'état structural de la particule

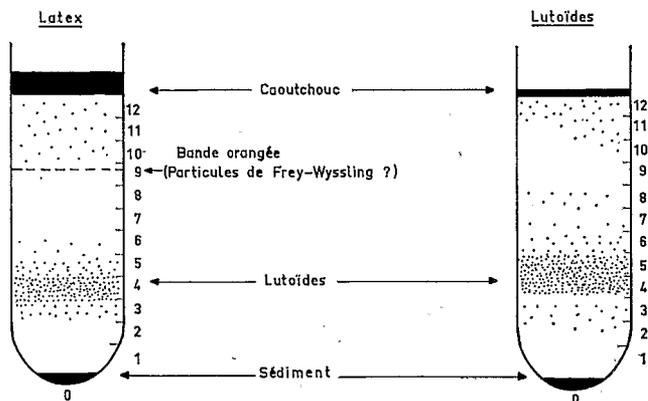
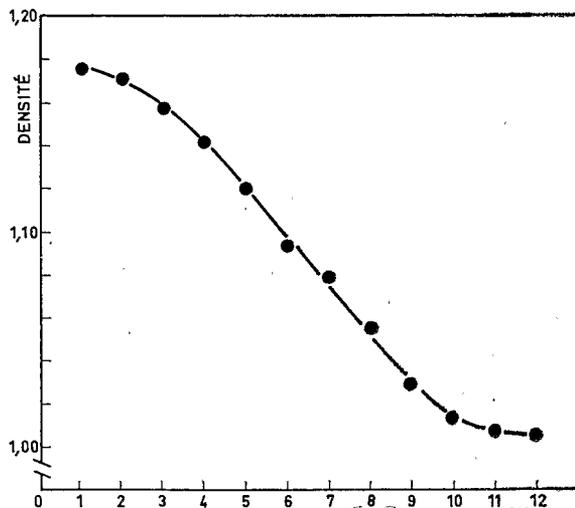


FIG. 1. — Aspects des tubes après centrifugation isopycniqne du latex et des lutoïdes et, à droite, densité des différentes fractions obtenues après percement du fond du tube.



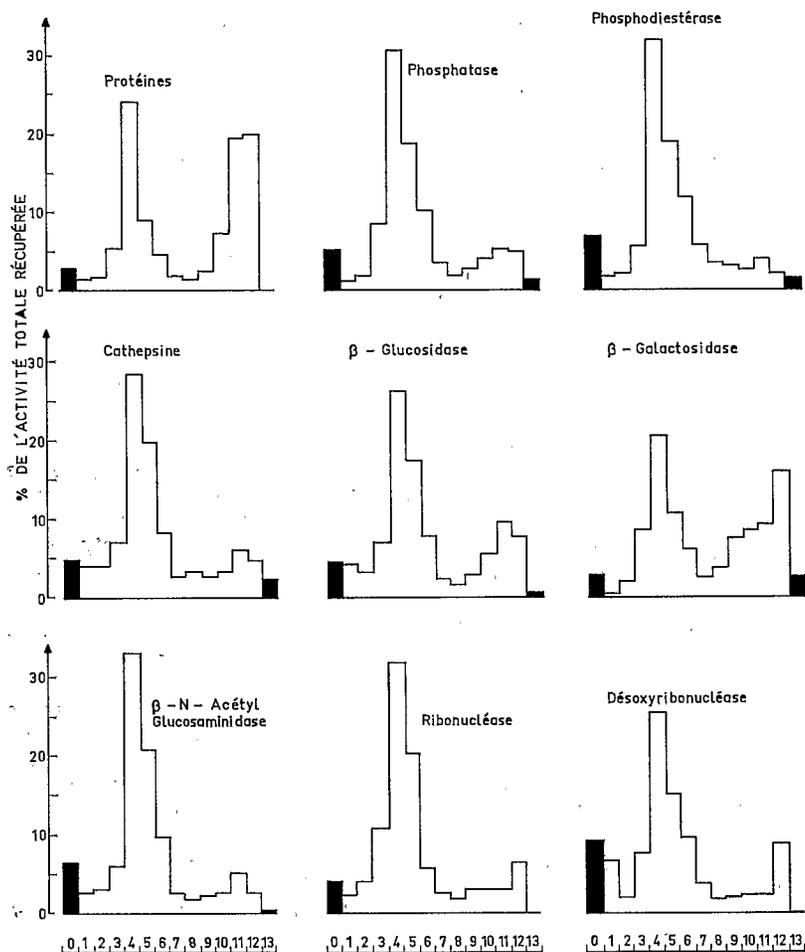


FIG. 2. — Distribution des hydrolases après centrifugation isopycnique du latex. En abscisses, on a représenté le nombre de fractions et, en ordonnées, le pourcentage récupéré pour chaque fraction. La fraction zéro correspond au sédiment et la fraction 13 au caoutchouc.

ou les changements de pH du milieu environnant. Il semble que la libération et l'activation des hydrolases lors de la déstabilisation expérimentale des lutoïdes ne s'effectuent pas selon un processus simple. Une légère déstabilisation aurait pour conséquence une augmentation de la perméabilité de la membrane, permettant la péné-

tration d'un substrat dans la particule morphologiquement intacte. La déstabilisation devenant plus importante, il y aurait rupture de la membrane et solubilisation d'une partie des protéines, le reste étant plus ou moins retenu à la membrane par des liaisons de type vraisemblablement polaire.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Le principal objectif de ce travail était de mettre en évidence le caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Dans cette intention, j'ai fait appel aux principes et à la méthodologie qui ont été codifiés par De Duve (1) en vue du fractionnement et de l'étude des composants structuraux de la cellule.

Les principaux résultats expérimentaux seront brièvement rappelés et les conclusions qui s'en dégageront concernant les propriétés des lutoïdes seront confrontées à celles des lysosomes hépatiques et, lorsque cela sera possible, à celles des organites végétaux présentant également le caractère lysosomal (sphérosomes).

Caractères physiques des lutoïdes.

Bien que je n'aie entrepris aucune étude morphologique des lutoïdes, il me semble cependant nécessaire de rappeler brièvement les principales caractéristiques de ces organites, qui ont été établies à la suite des observations effectuées au microscope électronique par Dickenson (2) et par Southorn (3).

Les lutoïdes se présentent dans le latex comme des vésicules dont le diamètre peut varier de 2 à 10 μ . Ils possèdent une enveloppe constituée par une membrane simple de 80 à 100 Å d'épaisseur et contiennent un stroma relativement dense aux électrons qui présente parfois des inclusions fibrillaires.

Comparativement aux lysosomes dont la taille est comprise entre 0,2 et 0,4 μ et aux sphérosomes ayant un diamètre de 1 μ environ, les lutoïdes sont bien plus volumineux. Cependant, la structure de base (membrane simple, stroma relativement dense aux électrons, présence d'inclusions) est la même pour ces trois types d'organites.

En ce qui concerne la densité des lutoïdes ($d = 1,15$), elle est nettement plus faible que celle des lysosomes ($d = 1,22$) et se rapprocherait assez de celle des sphérosomes ($d = 1,11$) et des prosphérosomes ($d = 1,14$) des feuilles de Tabac et de Maïs. Ces différences seraient sans doute imputables à leur richesse en lipides et phospholipides. Cependant, il ne faut pas attacher une très grande importance à la valeur absolue de la densité des lutoïdes. Elle varie d'une manière assez importante d'un latex à

l'autre. En revanche, pour un latex donné, la distribution des hydrolases lutoïdiques le long d'un gradient paraît plus homogène que celle des enzymes des lysosomes ou des sphérosomes.

Caractères biochimiques des lutoïdes.

Il est évident qu'il ne faut attacher qu'une importance toute relative aux valeurs trouvées dans le cas des lutoïdes, compte tenu de la variabilité inhérente à l'hévéa. En outre, on ne doit pas perdre de vue que les activités enzymatiques du latex dépendent dans une grande mesure de facteurs tels que l'origine clonale, le cycle végétatif, l'âge, etc. Néanmoins, les résultats obtenus ont tout de même l'avantage de permettre de situer les lutoïdes par rapport aux lysosomes des autres cellules et d'en tirer quelques conclusions d'ordre général.

— Le latex est beaucoup plus riche en lutoïdes (13 % de l'azote protéique du latex) que le tissu hépatique ne l'est en lysosomes (7 % de l'azote total du tissu). C'est cependant l'endosperme du Tabac qui contient le plus fort pourcentage de protéines dans la fraction correspondant aux sphérosomes.

— La phosphatase acide et la β -glucosidase sont beaucoup plus actives dans les lutoïdes que dans les lysosomes. Par contre, pour ce qui est des autres hydrolases, leur activité est plus élevée dans le cas des lysosomes. Ces résultats doivent vraisemblablement refléter les différences de métabolisme existant entre ces deux types de cellules. On sait que le latex contient de grandes quantités de phosphore sous forme minérale (environ 10 mM de P par litre de latex). La cellule laticifère est, en outre, spécialisée dans la formation de caoutchouc, et la biogenèse de ce corps nécessite énormément d'énergie. Il est donc indispensable que la cellule puisse disposer d'une grande quantité de phosphate qui pourrait lui être fournie par l'intermédiaire de la phosphatase lutoïdique. D'autre part, d'Auzac (4) a attiré l'attention sur le fait que la dégradation des glucides est d'une importance primordiale dans la biogenèse du caoutchouc. Il est possible que ce soit pour cette raison, et sans doute pour d'autres qui nous sont inconnues, que l'activité β -glucosidase est très intense dans les lutoïdes, afin de mettre à la disposition de la cellule les substrats nécessaires à la glycolyse et à la biosynthèse du caoutchouc.

Il n'a pas été trouvé d'enzymes d'oxydo-réduction dans les lutoïdes. Il ne semble pas non plus que les lysosomes en contiennent, bien que Ragab et coll. (5) aient noté la présence d'une déshydrogénase à NADH. Cette observation n'a jamais été confirmée et le problème des oxydases au sein des lysosomes est trop important pour que cette question ne soit pas approfondie. Il est fort possible que cette déshydrogénase soit une impureté en provenance des microsomes. Quant à la présence de deux oxydo-réductases (NADH-cytochrome c réductase et NADH-dichloro-phénol-indophénol diaphorase) et de deux aminotransférases (glutamate-oxalacétate et glutamate-pyruvate transaminase) signalées par Matile (6) dans des particules lysosomales provenant des cellules de racelles de plant de Maïs, elle demande à être vérifiée. Ces deux oxydo-réductases sont connues comme appartenant aux membranes du réticulum endoplasmique, et les deux transaminases, aux mitochondries et à la fraction soluble. Il est possible que ces activités soient des artefacts provenant de débris de membranes adsorbés par des particules lysosomales.

Caractères de la membrane des lutoïdes. Activation et libération des hydrolases.

Comme dans le cas des lysosomes, les lutoïdes possèdent une membrane de nature lipo-protéique. Alors qu'il est généralement admis que le cholestérol est un important constituant de la membrane lysosomale, Gomez et Southorn (7) suggèrent que, dans le cas des lutoïdes, ce corps est remplacé par le β -sistostérol. Le fait que je n'ai

jamais pu observer une action stabilisatrice du cholestérol sur les lutoïdes, alors qu'il est très efficace dans le cas des lysosomes « in vitro », semble apporter quelque soutien à ce point de vue. Il serait toutefois intéressant d'étudier l'action du β -sistostérol sur la stabilité des lutoïdes.

On admet généralement que la membrane des lysosomes intacts est imperméable aux substrats externes. De nombreux résultats expérimentaux sont venus étayer cette conception qui est, par ailleurs, contestée par d'autres auteurs sur la base de leurs propres résultats. Le problème de la perméabilité de la membrane lysosomale reste donc posé. Mais, en ce qui concerne les lutoïdes, il apparaît nettement que ses hydrolases peuvent être plus ou moins accessibles aux substrats. Ces variations dans la perméabilité de la membrane dépendent, par ailleurs, de l'état structural de la particule, ainsi que des conditions externes, et plus particulièrement du pH.

Enfin, les traitements mettant en cause l'intégrité de la membrane des lutoïdes entraînent « ipso facto » l'activation des hydrolases. Le processus de cette activation semblerait se dérouler en deux temps. Au début, lorsque la déstabilisation est légère, la perméabilité de la membrane augmenterait, permettant ainsi aux enzymes d'attaquer leurs substrats. Il y aurait ensuite rupture de la membrane et libération des protéines lutoïdiques. Une partie passerait alors en suspension dans le milieu externe; le reste serait retenu à la membrane par des liaisons de type vraisemblablement polaire.

Les traitements provoquant la lyse des lutoïdes sont de même nature que ceux qui entraînent la déstabilisation des lysosomes.

Fonctions des lutoïdes.

Alors que les différents aspects fonctionnels des lysosomes dans la cellule commencent à être bien connus, on est réduit dans le cas des lutoïdes à des hypothèses et à des présomptions quant à leur rôle au sein de la cellule laticifère.

La présence d'un large spectre d'hydrolases dans les lutoïdes implique nécessairement un rôle dans les phénomènes de dégradation. Le problème est de savoir si le processus qui se déroule est le même que dans les cellules animales où le corps à digérer est absorbé par des phagosomes qui, après fusion avec des lysosomes primaires, forment des vacuoles digestives dans lesquelles s'effectuent les phénomènes de dégradation.

De nombreux auteurs ont souligné l'étroite relation entre l'absorption de colorants vitaux, comme le rouge neutre, et celle des protéines, car ils se concentrent dans les mêmes types d'organites. Or, il est bien connu que les lutoïdes absorbent facilement le rouge neutre. Je l'ai vérifié de mon côté et j'ai pu constater que cette absorption est de nature passive, c'est-à-dire qu'elle a lieu même avec des lutoïdes séparés du latex. En outre, après avoir provoqué une lyse totale des lutoïdes colorés au rouge neutre, une faible partie seulement du colorant passe en solution, la majorité restant fixée aux membranes. Il est plus que probable que ce colorant basique se concentre dans les lutoïdes en raison de la nature cationique de ces protéines, et que cette absorption purement physique n'a rien de commun avec la pinocytose.

J'ai alors essayé de mettre en évidence d'une autre manière cette pinocytose: en ajoutant au latex fraîchement recueilli soit du prométhéum colloïdal préparé selon la méthode de Rahman et Lindenbaum (8), soit de la ribonucléase, soit de la ferritine. Dans aucun cas je n'ai pu constater une absorption de ces produits par les lutoïdes. Enfin, il n'est signalé nulle part dans la littérature que l'on ait observé des organites, tels que des mitochondries par exemple, en voie de digestion dans les lutoïdes.

Ces échecs dans les tentatives de mise en évidence d'une éventuelle « activité pinocytique » des lutoïdes ne signifient nullement que ces particules ne soient pas

aptes à remplir une telle fonction, mais il n'y a à l'heure actuelle aucune preuve expérimentale permettant de parler de pinocytose dans le cas des lutoïdes. Il faut cependant reconnaître que les méthodes biochimiques sont assez mal adaptées pour effectuer de telles recherches. Ce problème pourrait être abordé plus aisément en faisant appel à la microscopie électronique, mieux appropriée à ce genre d'étude.

Dans le domaine de la physiologie de l'écoulement du latex, le rôle des lutoïdes devient plus clair. Ils interviennent dans ce processus d'une manière négative, qui présente toutefois une certaine importance.

De la stabilité des lutoïdes dépend l'activité biosynthétique du latex, c'est-à-dire sa capacité à transformer l'acétate marqué en caoutchouc radioactif. En outre, lorsqu'ils libèrent leur contenu, les lutoïdes peuvent provoquer des perturbations dans la stabilité colloïdale du latex, ainsi que l'arrêt de son écoulement par suite de la formation de microbouchons de coagulum entraînant l'obturation des laticifères.

A la suite de la lyse de lutoïdes, on peut admettre que la libération des hydrolases, et particulièrement de la cathepsine, provoque la dégradation de la couche lipo-protéique qui maintient la stabilité colloïdale des particules de caoutchouc. De plus, les lutoïdes contiennent des ions calcium : leur libération dans le latex, où il existe une phospholipase, peut entraîner l'activation de cet enzyme qui viendrait ainsi augmenter les effets de la cathepsine sur la couche protectrice des particules de caoutchouc.

Cependant, Southorn pense que la déstabilisation du latex par les lutoïdes serait due en très grande partie à la neutralisation des protéines du sérum, qui sont principalement du type anionique, par les protéines cationiques des lutoïdes. En outre, Tata et Yip (9) ont séparé des lutoïdes une protéine de point isoélectrique très haut, qui possède une très forte action déstabilisatrice sur le latex.

En fin de compte, si le mode d'action des lutoïdes sur la coagulation du latex n'est pas encore clair, leur rôle dans la stabilité colloïdale des particules de caoutchouc semble bien établi et même primordial.

Enfin, dans les cas extrêmes, leur stabilisation « in vivo » pourrait être la cause des accidents physiologiques de saignée, connus sous le nom de « brown-bast disease ». Ces accidents atteignent plus particulièrement les hévéas hauts producteurs ou ceux soumis à une exploitation intensive. Ils se manifestent généralement par un brunissement de l'écorce, ainsi que l'éclatement du panneau de saignée, et, dans les cas les plus graves, l'écorce peut se nécroser. Il est à noter que ce genre de phénomène

présente de grandes analogies avec les nécroses tissulaires provoquées par la déstabilisation des lysosomes. C'est encore un point commun supplémentaire entre les lutoïdes et les lysosomes.

✱

L'ensemble de toutes ces observations permet maintenant de définir les lutoïdes avec suffisamment de précision. Leurs principales caractéristiques sont les suivantes :

— Les particules sont entourées d'une membrane simple, semi-perméable, et de nature lipo-protéique.

— Ils contiennent un large spectre d'enzymes hydrolytiques du type acide susceptibles de dégrader la majorité des composés biologiques de la cellule. Normalement, ces hydrolases ne sont pas, ou sont difficilement, accessibles aux substrats externes.

— Lorsqu'il y a lyse de la particule, elle entraîne la libération des enzymes qui deviennent alors pleinement actifs. Cette lyse peut être obtenue expérimentalement par divers traitements mettant en cause l'intégrité de la membrane.

Ces caractéristiques répondent parfaitement à la définition physico-chimique des lysosomes. Il existe cependant certaines différences entre ces deux types d'organites : entre autres, leur taille, leur bagage enzymatique ainsi que l'activité de leurs enzymes. En outre, leurs réactions vis-à-vis de certains traitements ne sont pas identiques ; les lutoïdes, par exemple, sont plus résistants que les lysosomes à la lyse osmotique et à la lyse thermique.

Ces différences sont cependant minimes et, somme toute, assez normales quand on songe que ces deux types de particules proviennent de cellules totalement différentes. Par contre, comme on vient de le voir, ils possèdent de très nombreux points communs. Les analogies sont en fin de compte nettement plus importantes que les différences. Il semble donc justifié de considérer les lutoïdes comme des structures cellulaires qui, dans le latex, correspondent aux lysosomes de la cellule animale.

Références.

- (1) G. DE DUVE, *J. Theor. Biol.* 6, 33 (1964).
- (2) P.B. DICKENSON, *Proceed. Nat. Rubb. Prod. Res. Assoc. Jubilee Conf.*, Cambridge, 52 (1964), *J.R.R.I.M.* 22, Part. 2, 165 (1969).
- (3) W.A. SOUTHORN, *J.R.R.I.M.* 20, Part. 2, 226 (1968).
- (4) J. D'AUZAC, Thèse Doctorat d'Etat, n° 5447, Paris (1965).
- (5) H. RAGAB, M. HASSIB et A.L. TAPPEL, *Int. Congr. Biochem.* 6, 663 (1964).
- (6) P. MATILE, *Z. Naturforsch.* 21b, 871 (1966) ; *Planta* 79, 181 (1968).
- (7) J.B. GOMEZ et W.A. SOUTHORN, *Nat. Rubb. Conf. Kuala Lumpur*, preprint (1968).
- (8) Y.E. RAHMAN et A. LINDENBAUM, *Rad. Res.* 21, 575 (1964).
- (9) S.J. TATA et E. YIP, *Docum.* 89, *Res. Arch. Rubb. Res. Inst. Malaya* (1968).