

Étude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg.

I. Facteurs agissant sur la coagulation

PAWEL HANOWER*, JANINA BRZOZOWSKA* et CLAUDE LIORET**

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

** Laboratoire de Biologie moléculaire végétale (L.A. au C.N.R.S. n° 40),
Université Paris-Sud, 91405 Orsay

(Manuscrit reçu le 12 mars 1976)

RÉSUMÉ

L'étude de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* a permis de définir des tests de coagulations *in vitro* et a mis en évidence les faits suivants :

— un pH acide, des cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++}), le sérum de la fraction sédimentable (sérum S), l'oxygène, certains composés phénoliques sont des agents favorisant la coagulation. L'addition de trypsine ou de phénol oxydase entraînent une coagulation beaucoup plus rapide que l'addition d'autres protéines;

— le sérum de la fraction surnageant (sérum C), des agents antioxydants, une atmosphère dépourvue d'oxygène, le traitement préalable des arbres par l'éthrel ralentissent la coagulation.

Ces faits sont discutés, un schéma du mécanisme de la coagulation est proposé.

SUMMARY

Coagulation of Hevea brasiliensis latex is studied. The following data are presented:

— *tests of in vitro coagulation are established;*

— *acidic pH, divalent cations (Ca^{++} Mg^{++}), serum of bottom fraction (S serum), oxygen, some phenolic compounds act as coagulation agents. Addition of trypsin or phenol oxydase give a much faster coagulation than addition of other proteins;*

— *serum of supernatant fraction (C serum), antioxidizing agents, atmosphere devoided of O_2 , previous stimulation of trees by ethrel slow down coagulation.*

These facts are discussed. A scheme of the mechanism of coagulation is proposed.

INTRODUCTION

Lorsque l'on sectionne les laticifères, le latex s'écoule, rapidement d'abord, puis la vitesse diminue de plus en plus jusqu'à l'arrêt total de l'écoulement. On observe alors le long de l'encoche une mince pellicule de latex coagulé. Si l'on enlève cette pellicule, certains laticifères laissent apparaître des gouttes de latex liquide, mais l'écoulement reste stoppé. Si toutefois l'on procède à une nouvelle ablation de l'écorce de l'ordre de 1 mm d'épaisseur, l'écoulement du latex reprend (BOATMAN, 1966).

La coagulation apparaît comme un facteur primordial de la production. Trop précoce, elle limite celle-ci. Trop tardive, un écoulement prolongé pourra épuiser l'arbre.

De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer le mécanisme de la coagulation, mais aucune d'elles ne semble être entièrement satisfaisante à la lumière des phénomènes observés.

L'ouverture de vaisseaux laticifères par la saignée entraîne une chute de la pression de turgescence (BUTTERY et BOATMAN, 1967). Ceci provoque la déstabilisation et l'éclatement des particules figurées du latex (lutoïdes principalement) des premières fractions qui s'écoulent (PAKIANATHAN *et al.*, 1966; RIBAILLER, 1972). Selon SOUTHORN et EDWIN (1968), la libération du sérum lutoïdique de pH acide de l'ordre de 5,5, riche en matériel cationique et en protéines à point isoélectrique élevé (RIBAILLIER *et al.*, 1971; RIBAILLIER, 1972; MOIR et TATA, 1960; TATA et MOIR, 1964), contenant diverses hydrolases (PUJARNISCLE, 1968), serait responsable de la formation des microcoagulats qui obturent les laticifères en formant des agglomérats que l'on a pu d'ailleurs observer au microscope électronique (SOUTHORN, 1968).

La haute pression existant tout au début de la saignée arrive à expulser les microcoagulats.

Toutefois, si ce qui précède pouvait expliquer valablement un arrêt d'écoulement peu après ouverture des laticifères, il est difficile d'expliquer de cette façon les raisons de cet arrêt plusieurs heures après la saignée, ce qui se produit effectivement sur les arbres.

Quel est l'agent coagulant libéré par l'éclatement des lutoïdes ainsi que son mode d'action ?

TATA et YIP (1968) rendent responsable un système enzymatique de la fraction sédimentable sans que sa nature soit précisée. Déjà DE VRIES (1920) envisageait la possibilité d'une action enzymatique en évoquant une hypothétique « coagulase ». De même, McMULLEN (1951) suggérait qu'il s'agit des enzymes activées par du calcium ou d'un complexe protéine-calcium relâché par les lutoïdes. Selon un rapport du R.R.I.M. ⁽¹⁾ (1966), la phospholipase D liée à la fraction sédimentable pourrait être impliquée dans la coagulation.

Woo (1973), du même Institut, localise l'enzyme responsable de la coagulation du latex dans le sérum cytoplasmique. Il s'agirait d'une enzyme protéolytique.

(1) Rubber Research Institute of Malaya (rapport interne 1966).

Enfin, d'après SOUTHORN et EDWIN (1968), l'action floculante des protéines du sédiment serait plutôt de nature électrostatique. Cette action serait trop rapide pour être entièrement enzymatique (SOUTHORN et YIP, 1968).

Le problème reste ouvert.

D'autre part, comment expliquer le caractère superficiel de la coagulation ? Nous avons mentionné ci-dessus que l'ablation d'une pellicule de l'ordre de 1 mm est suffisante pour la reprise de l'écoulement. Or les flux élevés de latex, entraînant la déstabilisation des lutoïdes, ont certainement lieu au sein des laticifères à des distances très supérieures à 1 mm. La déstabilisation des lutoïdes n'entraîne donc pas immédiatement la coagulation; il faut en plus que le latex parvienne à la surface de l'encoche.

Ceci nous a amenés à penser que l'oxygène atmosphérique peut participer au processus qui comporterait une réaction d'oxydation.

A la lumière de ce qui précède, la coagulation du latex apparaît comme un processus très complexe auquel participent plusieurs facteurs.

Nous avons abordé les études sur la coagulation sous trois angles différents :

- recherche d'un système déstabilisateur interne;
- étude des facteurs externes agissant sur la coagulation;
- recherche des systèmes enzymatiques impliqués dans les processus.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1) Matériel végétal, exploitation des arbres, traitement stimulant

La grande majorité des expériences décrites ci-dessous ont été réalisées sur le clone PR 107. Dans certains essais les latex provenant des trois clones, TJr1, GT1 et Pb 86, ont également été utilisés.

Les arbres ont été sélectionnés à la plantation de l'Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique (I.R.C.A.) à Bimbresso, en Côte-d'Ivoire, au nombre de 30 pour PR 107, de 8 pour TJr1 et de 6 pour GT1 et Pb 86.

Tous les arbres ont été saignés en spirale entière deux fois par semaine (S J/3 J/4).

Dans le cas d'un traitement stimulant la production, on a utilisé de l'ethrel dont la matière active est l'acide 2-chloroéthylphosphonique (CEPA), générateur de l'éthylène. Le produit, à la concentration de 10 % (mélangé avec de l'huile de palme), a été appliqué sur une bande d'écorce grattée le long de l'encoche (en dessous) et large de 2 cm (RIBAILLIER et d'AUZAC, 1970).

2) Récolte du latex

Le latex qui s'écoule pendant la première minute après la saignée est écarté car il contient des organites ayant le plus souffert du traumatisme causé par la saignée. Les 40 ml suivant sont recueillis dans un tube plongé dans de la glace.

Au laboratoire, les latex provenant des différents arbres sont mélangés et un échantillon moyen est ainsi constitué.

3) Essais de coagulation

Les essais de coagulation *in vitro* sont réalisés :

— soit sur la suspension de la crème de caoutchouc dans de l'eau préparée selon la technique de Woo (1973);

— soit sur le latex dilué, en proportion variable avec de l'eau ou du tampon; les détails expérimentaux concernant différents essais (nature du tampon, pH, rapport latex/tampon, etc.) sont exposés dans le texte ou consignés dans les tableaux;

— soit sur le latex tel quel, non dilué.

a) Critères d'appréciation de la coagulation

La progression de la déstabilisation et de la coagulation du latex est suivie en notant le temps nécessaire pour atteindre les étapes successives du processus. Ces étapes sont les suivantes : dans le cas d'une suspension de caoutchouc dans de l'eau ou d'un latex très dilué :

(i) *Début du crémage*. La crème de caoutchouc commence à remonter à la surface du mélange en formant une couche supérieure plus blanche, plus opaque que le reste du contenu du tube.

(ii) *Crémage net*. L'apparition d'une délimitation bien tranchée entre les deux phases, la phase du bas, nettement plus claire, demeurant encore trouble.

(iii) *Phase inférieure transparente*. La séparation en deux phases distinctes, supérieure (contenant le caoutchouc et éventuellement les éléments figurés du latex) et inférieure (constituée par un sérum aqueux parfaitement translucide), est achevée.

Dans le cas d'un latex peu ou pas dilué :

(i) *Déstabilisation*. L'épaississement du latex qui devient nettement plus dense, plus visqueux.

(ii) *Début de coagulation*. Le début de la formation d'un « bouchon » de caoutchouc compact au sein d'un latex dense mais liquide.

(iii) *Coagulation*. Le bouchon de caoutchouc, bien volumineux, devient dur et ne se déplace plus quand on incline le tube; le reste du latex, quoique très dense, demeure encore liquide.

(iv) *Prise en masse*. Tout le latex est « solidifié », totalement coagulé, on peut retourner complètement le tube sans qu'aucun liquide ne s'écoule.

b) Action du sérum cytoplasmique (sérum C) et du sérum issu de la fraction sédimentable du latex (sérum S)

(i) *Obtention du sérum C et du sérum S*. Le latex est centrifugé 30 minutes à $31\,000 \times g$ (Sorvall, rotor SS 24). La couche supérieure constituée par le caoutchouc est éliminée. Le surnageant trouble et le sédiment brut sont récupérés séparément.

Le surnageant est centrifugé 2 heures à $120\,000 \times g$ (Spinco, rotor Ti 50) et le sérum cytoplasmique clair est récupéré = sérum C.

Le sédiment est lavé une fois avec du tampon Tris (0,05 M)-mannitol (0,3 M) de pH 7,5 et centrifugé 30 minutes à $31\,000 \times g$ (Sorvall, rotor SS 34). Il est ensuite soumis à l'action des ultrasons (5 minutes) afin de faire éclater les organites. La suspension liquéfiée ainsi obtenue est centrifugée 2 heures à $120\,000 \times g$ (Spinco, rotor Ti 50) et le sérum clair d'origine particulière est récupéré = sérum S.

(ii) *Essais*. L'action des sérums C et S sur la coagulation a été testée *in vitro*, après leur adjonction soit aux latex, soit aux suspensions de caoutchouc.

c) Action de l'oxygène et de l'azote

Ces essais ont été effectués de deux manières :

In vivo, sur l'encoche, avec des arbres saignés, à tour de rôle, l'un à l'air libre et l'autre sous azote. On entoure le tronc de l'arbre, destiné à être saigné sous azote, d'une feuille de polyéthylène que l'on soude de façon à obtenir une gaine. On fait passer un courant d'azote circulant pendant toute la durée de l'écoulement. Le latex s'écoule dans une éprouvette graduée placée à l'intérieur de la gaine.

In vitro, en tubes dans lesquels on introduit quelques millilitres de latex prélevé, soit sous azote, soit sous oxygène et à travers lesquels on fait passer un courant de gaz correspondant.

d) *Action de différentes substances exogènes*

Les composés suivants ont été testés *in vitro* :

- cations bivalents Ca^{++} , Mg^{++} et Cu^{++} sous forme des chlorures;
- antioxydants : dithionite de sodium, mercatoéthanol, cystéine, acide ascorbique;
- composés phénoliques : tyrosine, dihydroxyphénylalanine (DOPA), catéchol, acide chlorogénique, acide 3.4-dihydroxybenzoïque, acide *o*-coumarique, coumarine, scopolétine, (Fluka, Suisse);
- enzymes : tyrosinase (polyphénol oxydase) de Champignons, grade III; peroxydase de Raifort, type VI; catalase de foie de Boeuf; trypsine de pancreas de Bœuf, type III; phospholipase-C (lécithinase-C) de *Clostridium welchii*, type I; phospholipase-D (lécithinase-D) de Chou, type I (Sigma, U.S.A.);
- protéine non enzymatique : albumine (albumin bovine) fraction V, B grade (Calbiochem, U.S.A.).

Les détails techniques concernant ces expériences sont exposés avec les résultats.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1) *Actions respectives du sérum S et du sérum C*a) *Essais selon la technique de Woo*

Nous avons repris les expériences de Woo (1973) qui a mis en évidence les faits suivants. L'addition, à une suspension aqueuse de caoutchouc à 9 % (P/V) préalablement chauffée et amenée au pH 4,5, de sérum C conjointement à du CaCl_2 à la concentration finale de $6 \cdot 10^{-3}$ M, provoque une coagulation de la suspension. Aucune déstabilisation ne se produit, ni en présence de chacun de ces facteurs pris séparément, ni en présence du sérum provenant de la fraction sédimentable (bottom fraction), sérum B (équivalent au sérum S défini ici). Toutefois, et toujours en présence du CaCl_2 , le sérum C à faible dose (0,1 ml) agit plus énergiquement qu'à une dose forte (1 ml), fait que l'auteur n'interprète pas.

La mise à l'ébullition du sérum C abolit son pouvoir coagulant. Il s'agit donc d'une protéine.

Les résultats que nous avons obtenus avec une suspension de crème de caoutchouc préparée à partir du latex du clone PR 107 sont réunis dans le tableau I.

Il apparaît, en premier lieu, que le CaCl_2 (≈ 6 mM) à lui seul provoque une coagulation rapide de la suspension. Le sérum C seul non seulement n'a aucun pouvoir coagulant, mais ajouté au CaCl_2 , il affaiblit l'action de ce dernier. Ceci est très net pour la dose forte (1 ml). Les propriétés anticoagulantes du sérum C s'accroissent si celui-ci est préalablement porté à l'ébullition. Aucun signe de déstabilisation n'est observé, pour la dose forte, au bout des 4 heures. Le facteur anticoagulant n'est pas de nature protéique.

Contrairement au sérum C, le sérum S seul exerce une action favorable sur la déstabilisation de la suspension. Un crémage rapide se produit en sa présence. Cette action persiste, mais se trouve nettement affaiblie, si le sérum S est porté à l'ébullition. L'adjonction du CaCl_2 au sérum S, en contenant déjà, semble être sans effet sur son pouvoir coagulant.

Le fait que sous l'action de la température élevée le sérum S a un pouvoir coagulant atténué pourrait indiquer que celui-ci est, pour une part au moins, lié à des protéines.

Dans notre système non tamponné, l'effet d'un changement possible du pH à la suite de l'adjonction, soit du sérum S, soit du sérum C frais, doit être pris en considération. La suspension de caoutchouc ayant été simplement ajustée au pH 4,5

TABLEAU I

Déstabilisation de la suspension du caoutchouc par la technique de Woo (1973)

Tube n°	Composition du milieu						Temps nécessaires pour atteindre les étapes successives de déstabilisation			
	Suspension de crème de caoutchouc pH 4,5	H ₂ O	CaCl ₂ 0,1 M	Sérum C		Sérum S		Début du crémage	Crémage net	Phase inférieure transparente
				frais	maintenu 15 mn à 100°C	frais	maintenu 15 mn à 100°C			
1	4 ml	1,25 ml						*	*	*
2	"	1,00 ml	0,25 ml					45 min.	75 min.	3 h 1/2
3	"	0,25 ml		1,00 ml				*	*	*
4	"		0,25 ml	1,00 ml				65 min.	95 min.	*
5	"	1,15 ml		0,10 ml				*	*	*
6	"	0,90 ml	0,25 ml	0,10 ml				50 min.	75 min.	3 h 1/2
7	"	0,25 ml			1,00 ml			*	*	*
8	"		0,25 ml		1,00 ml			*	*	*
9	"	1,15 ml			0,10 ml			*	*	*
10	"	0,90 ml	0,25 ml		0,10 ml			90 min.	2 h	*
11	"	0,25 ml				1,00 ml		45 min.	80 min.	3 h 1/2
12	"		0,25 ml			1,00 ml		50 min.	75 min.	3 h 1/2
13	"	0,25 ml					1,00 ml	75 min.	110 min.	4 h
14	"		0,25 ml				1,00 ml	85 min.	100 min.	4 h

* Aucune phase de déstabilisation n'est perceptible après 4 heures.

par l'addition d'acide chlorhydrique dilué, l'apport du sérum C de pH très proche de la neutralité et ayant un pouvoir tampon, fait certainement plus remonter le pH de la suspension que l'apport du sérum S de pH \approx 5,6.

Afin d'éliminer cet effet possible du pH, d'autres essais ont été réalisés, cette fois-ci avec du latex entier tamponné, soit à pH 4,5, soit à pH 6,5, proche du pH naturel du latex.

b) *Essais avec du latex entier tamponné à pH 4,5 et 6,5*

A pH 6,5 et en présence du tampon cacodylate (tableau II), la coagulation du latex seul est très lente. Les différences entre les motifs apparaissent distinctement.

Le CaCl₂ seul provoque toujours une coagulation très rapide aboutissant à une prise en masse après 17 minutes seulement.

Le sérum S agit dans le même sens en accélérant d'une manière notable, quoique moindre que le CaCl₂, le processus. La coagulation la plus rapide est obtenue par addition simultanée de CaCl₂ et de sérum S.

Le sérum C paraît exercer une action retardatrice très légère sur le phénomène. Malgré sa faible amplitude, nous l'avons constaté systématiquement pour trois essais différents comprenant chacun trois répétitions.

A pH 4,5 (tableau II) et dans les conditions expérimentales utilisées, la coagulation du latex en présence du CaCl_2 additionné ou non du sérum S ou C est quasi instantanée. Elle est très rapide pour tous les autres motifs y compris le contrôle

TABLEAU II

Action du sérum S, du sérum C et du CaCl_2 sur la coagulation du latex à deux pH différents

	Temps nécessaire pour atteindre les étapes successives de coagulation							
	pH 4,5				pH 6,5			
	Destabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse	Destabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
Latex	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.		30 h		
Latex + CaCl_2				instantanée	4 min.	9 min.	12 min.	17 min.
Latex + Sérum S	3 min.	5 min.	10 min.	18 min.	20 min.	25 min.	35 min.	140 min.
Latex + Sérum S + CaCl_2				instantanée	3 min.	8 min.	10 min.	12 min.
Latex + Sérum C	3 min.	5 min.	10 min.	22 min.		38 h		
Latex + Sérum C + CaCl_2				instantanée	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.

Milieu : latex, 3 ml; tampon ABC (acétate-borate-citrate) 0,4 M pH 4,5, ou tampon cacodylate 0,5 M pH 6,5, 1 ml; CaCl_2 5 mM; sérum S ou sérum C, 0,75 ml; H_2O , q. s. p. 5 ml.

(latex additionné du tampon), rendant ainsi leur comparaison malaisée. Les conditions sont proches de celles utilisées dans la coagulation acide du latex, pratiquées sur les plantations : bas pH et présence dans le milieu d'acide acétique qui entre dans la composition du tampon employé.

En modifiant les conditions expérimentales, c'est-à-dire en diluant davantage le latex et en diminuant la concentration finale en CaCl_2 de 5 à 1,25 mM (concentration voisine de celle du sérum lutoïde (RIBAILLIER *et al.*, 1971) (tableau III), nous avons ralenti la coagulation du latex à pH 4,5. Les différences entre les motifs deviennent alors plus perceptibles.

Le CaCl_2 a un effet toujours très marqué.

Le pouvoir coagulant du sérum S s'exerce même à ce pH acide.

Le sérum C seul est sans action, alors qu'utilisé conjointement avec CaCl_2 , il affaiblit les propriétés coagulantes de ce dernier.

D'après ces résultats, et contrairement aux constatations de Woo (1973), même dans les conditions très éloignées des conditions physiologiques, c'est le sérum S et non pas le sérum C qui semble contenir un système déstabilisateur interne. Le

sérum C serait le siège d'un système antagoniste et contiendrait un système inhibiteur non protéique du processus de coagulation. Ces faits deviennent encore plus évidents à pH 6,5, proche du pH naturel du latex.

Le CaCl_2 apparaît comme un facteur coagulant puissant, ce qui est en accord avec de nombreux auteurs.

TABLEAU III

Action du sérum S, du sérum C et du CaCl_2 sur la coagulation du latex à pH 4,5 en milieu dilué

	Temps (minutes) nécessaires pour atteindre les étapes successives de coagulation			
	Déstabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
Latex	15	20	22	31
Latex + CaCl_2	6	8	10	15
Latex + Sérum S	6	8	10	15
Latex + Sérum S + CaCl_2	5	6	8	13
Latex + Sérum C	16	19	23	29
Latex + Sérum C + CaCl_2	8	12	15	21

Milieu : Latex, 1 ml; tampon ABC 0,4 M, 0,25 ml; CaCl_2 1,25 mM; sérum S ou sérum C, 0,25 ml; H_2O , q. s. p. 2 ml.

2) Actions des cations bivalents : Ca^{++} , Mg^{++} et Cu^{++}

La constatation de l'influence du Ca^{++} sur la coagulation nous a incités à tester, en plus du calcium, l'action des deux autres cations bivalents, Mg^{++} et Cu^{++} .

Les données du tableau IV montrent qu'à côté du Ca^{++} dont l'action sur la coagulation est la plus spectaculaire, le Mg^{++} accélère aussi d'une manière notable le processus. Ainsi le fait bien connu des planteurs d'Hevea trouve sa confirmation dans les essais *in vitro* : les latex riches en Mg^{++} sont réputés instables et facilement coagulables.

Le Ca^{++} et le Mg^{++} agissent déjà très nettement à doses physiologiques, c'est-à-dire proches de celles trouvées dans le sérum « lutoïdique » : à la concentration 1 mM pour le Ca^{++} et 50 mM pour le Mg^{++} (RIBAILLIER *et al.*, 1971).

Le Cu^{++} exerce également une action favorable sur la coagulation, mais son effet est plus faible. Ce fait peut, à première vue, surprendre car le cuivre est connu en Heveaculture en tant qu'un stimulant de la production du latex. Toutefois, aux doses utilisées, il peut agir différemment. D'autre part son action peut s'exercer à un tout autre niveau, par exemple au niveau de la synthèse du caoutchouc, en améliorant l'alimentation en glucides et leur utilisation.

TABLEAU IV

Temps nécessaire pour la coagulation complète du latex tamponné à pH 6,5
en présence des doses croissantes des cations bivalents

Cations bivalents	Concentrations - mM									
	0,1	0,25	0,5	1	2	5	10	20	50	100
a)	Tampon cacodylate 0,1 M ; rapport latex/tampon = 4/1									
Ca ⁺⁺		10-15 h	5-6 h	40- 60 min	20- 30 min	3-8 min				
Mg ⁺⁺							12-20 h	45- 60 min	15- 20 min	8-10min
Cu ⁺⁺	20-24 h	12-14 h	10-12 h							
Début de coagulation du témoin, sans l'adjonction des cations bivalents : entre 24 et 36 h										
b)	Tampon phosphate 0,02 M ; rapport latex/tampon = 4/1									
Mg ⁺⁺						6-8 h	2 h	15- 20 min	8 min	2-5 min
Cu ⁺⁺	8-10 h	4 h	3 h							
Début de coagulation du témoin, sans l'adjonction des cations bivalents : entre 8 et 14 h										

Début de coagulation du témoin, sans l'adjonction des cation bivalents : entre 8 et 14 heures.

3) Rôle de l'oxygène atmosphérique

Deux types d'essais ont été entrepris afin de tester le rôle possible de l'oxygène dans le processus de coagulation du latex : les essais *in vitro* et les essais *in vivo* (voir « Matériel et techniques »).

a) Essais *in vitro*

Les essais *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle incontestable de l'oxygène dans la coagulation du latex (tableau V). La coagulation du latex prélevé et conservé en atmosphère d'oxygène est fortement accélérée par rapport à la coagulation à l'air libre. Inversement, un ralentissement notable du processus est observé, pour le latex prélevé et conservé sous l'azote. Il arrive alors que ce latex demeure parfaitement liquide, sans les moindres signes d'épaississement, durant plus de 24 heures.

b) Essais *in vivo*

Les tentatives de reproduire les effets analogues *in vivo*, sur l'encoche, lors de la saignée des arbres, se sont heurtées à des difficultés. Après le choix difficile des arbres rigoureusement semblables quant à leur vitesse et durée d'écoulement ainsi que leur exposition au soleil, il s'est avéré que l'exécution correcte de l'expé-

rience n'est pas facile. Sous la gaine étanche, dont a été entouré le tronc de l'arbre saigné sous azote, la température montait, surtout en temps ensoleillé, favorisant ainsi la coagulation. Une gaine semblable a dû donc être posée sur l'arbre qui devait

TABLEAU V

Action de l'oxygène sur la coagulation du latex in vitro

	Temps nécessaires pour atteindre les étapes successives de coagulation		
	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
	Sous N ₂ à l'air libre	22-25 h	24-30 h
Sous O ₂	4-4 1/2 h	5-6 h	8-10 h
	1 1/2-2 h	2-2 1/2 h	3-3 1/2 h

être saigné à l'air libre ce qui modifiait les conditions habituelles d'écoulement en limitant le contact du latex avec de l'air. De plus s'ajoutait l'effet d'une certaine suppression de l'azote susceptible d'agir sur l'écoulement, la gaine restant gonflée tout au long de l'expérience.

TABLEAU VI

Essais in vivo : écoulement de latex à l'air et sous l'azote

Volume, en millilitres, de latex recueilli

Au départ

Arbre 1
212

Arbre 2
206

1^{er} Essai

Sous air
208

Sous azote
249

2^e Essai

Sous azote
232

Sous air
190

3^e Essai

Sous air
188

Sous azote
217

Néanmoins, à trois reprises, nous avons pu constater une augmentation de volume du latex ainsi récolté (tableau VI). Dans deux essais sur trois, cet accroissement de volume atteignait ou dépassait 20 % ce qui n'est pas négligeable.

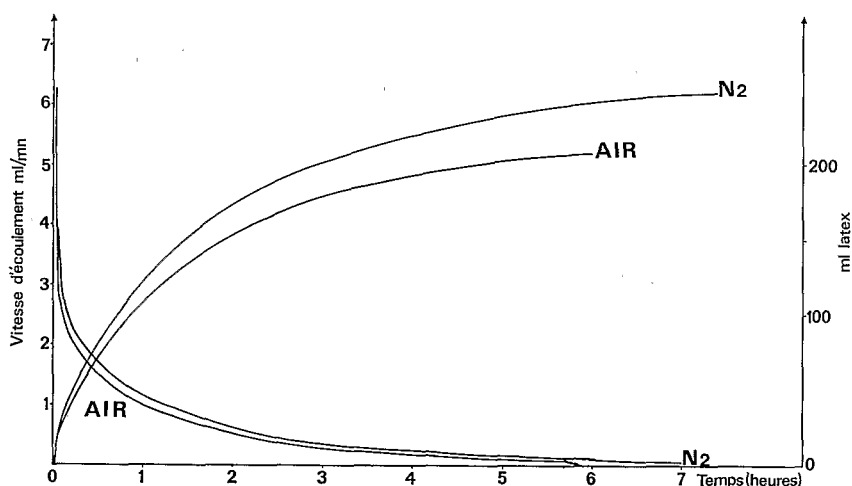
Comme le montre la figure 1 la durée d'écoulement a été prolongée d'environ une heure et demie.

4) Action des antioxydants

Le rôle de l'oxygène ayant été démontré, nous avons testé, *in vitro*, l'action sur la coagulation de quelques substances antioxydantes.

Nous avons constaté que le *mercaptoéthanol*, la *cystéine* et le *dithionite* de sodium exercent tous les trois une action anticoagulante. Utilisés à la concentration 1 mM ils retardent de quelques heures la coagulation du latex tamponné à pH 6,5.

Un retard a été également observé en présence d'*acide ascorbique* (1 mM).



Vitesse d'écoulement (courbe descendante) et volumes cumulés (courbes ascendantes) de latex recueilli en présence d'air ou d'une atmosphère d'azote.

5) Action d'une phénoloxydase

Les réactions d'oxydation jouant un rôle important dans la coagulation du latex, il était logique de supposer que certaines oxydases, et plus particulièrement les phénoloxydases, peuvent être impliquées dans le processus.

Nous avons donc testé *in vitro* l'effet des doses croissantes d'une phénoloxydase commerciale — tyrosinase des Champignons — sur la coagulation du latex tamponné à pH 6,5 (tableau VII). On constate que l'adjonction de la tyrosinase accélère considérablement la coagulation rapide du latex. La vitesse du phénomène croît avec l'augmentation de la dose de l'enzyme ajoutée.

De plus, en présence de tyrosine exogène, l'action de l'enzyme sur la coagulation se trouve accentuée.

Des essais semblables ont été repris plusieurs fois sur des latex différents et dans des conditions expérimentales modifiées (rapport latex/tampon, nature du tampon, doses de l'enzyme) et des résultats analogues ont été obtenus. Ils ont pleinement confirmé l'action de cette enzyme sur la coagulation. L'hypothèse suivant laquelle les phénoloxydases endogènes pourraient jouer un rôle dans la coagulation du latex s'est trouvée ainsi renforcée.

6) Action des quelques composés phénoliques

Le tableau VIII rend compte de l'action de certains composés phénoliques sur la coagulation du latex. Parmi les composés testés, la tyrosine, l'acide *o*-coumarique, la scopolétine et la coumarine sont des composés naturels du latex (résultats inédits).

On constate que ce sont les deux substrats usuels, le catéchol et la DOPA, qui possèdent le plus grand pouvoir coagulant. La tyrosine et l'acide coumarique ont un effet net mais plus faible.

TABLEAU VII

Action de tyrosinase et de tyrosine exogènes sur la coagulation du latex

	Temps nécessaire pour atteindre les étapes successives de coagulation			
	Déstabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
Témoin	21 h	30 h	46 h	72 h
Tyrosinase (1)	120 min	195 min	5 h	8 h
Tyrosinase (2)	60 min	120 min	165 min	5 h
Tyrosinase (3)	35 min	90 min	120 min	150 min
Tyrosinase + Tyrosine (1)	105 min	165 min	255 min	7 h
Tyrosinase + Tyrosine (2)	60 min	105 min	150 min	255 min
Tyrosinase + Tyrosine (3)	30 min	75 min	90 min	120 min

Milieu : latex, 1 ml; tampon cacodylate 0,5 M pH 6,5, 1 ml; tyrosine, 0,5 mM; tyrosinase, (1) 0,5 mg/ml; (2) 1 mg/ml; (3) 1,5 mg/ml.

L'acide *o*-coumarique exerce aussi un effet favorable sur la coagulation.

En présence des coumarines, le processus de coagulation est lent. Ceci est particulièrement net pour la scopolétine où la véritable coagulation ne se produit pas, même après 18 heures. A ce propos, il est intéressant de rappeler que les coumarines sont connues comme des agents anti-coagulants en biochimie animale.

Les composés phénoliques, suivant leur nature, peuvent avoir des effets très différents sur la coagulation du latex d'où leur rôle possible dans un système régulateur interne des processus de coagulation.

7) Pouvoir coagulant de quelques protéines

Nous avons également testé l'effet sur la coagulation de quelques protéines, enzymatiques ou non. L'action de la phénoloxydase exogène pourrait, en partie au moins, être attribuée à un simple apport de protéine.

Quatre d'entre les protéines enzymatiques testées (tableau IX) sont présentes dans le latex : phénoloxydase, peroxydase, catalase et phospholipase D. Rappelons que la phospholipase D a été considérée comme l'enzyme impliquée dans le processus

de coagulation par SMITH (1953). Cette hypothèse a été d'abord écartée par le même auteur, puis reprise (rapport du R.R.I.M., 1966) pour être à nouveau abandonnée par WOO (1973).

La trypsine a été testée, comme protéase. En effet WOO (1973) a montré qu'à pH 4,5 les enzymes protéolytiques provoquent plus rapidement la déstabilisation de la suspension du caoutchouc; il en a déduit que l'hypothétique « coagulase » du latex est une protéase.

TABLEAU VIII

Actions des quelques composés phénoliques sur la coagulation du latex

Composés phénoliques testés	Temps nécessaire pour atteindre des étapes successives de coagulation			
	Destabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
O	6 h	10 h - 18 h		
Tyrosine	2 h	3 h	8 h	
Dopa	40 min.	60 min.	2 h	4 h 1/2
Catéchol	30 min.	45 min.	90 min.	4 h
Acide chlorogénique	4 h	5 h		
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	2 h	3 h 1/2	6 h	
Acide O-coumarique	90 min.	110 min.	3 h	8 h
Coumarine	2 h	5 h	7 h	8 h
Scopolétine	2 h	6 h		

Milieu : Latex, 2 ml; tampon cacodylate 0,5 M pH 6,0, 0,5 ml; composés phénoliques, 3 mM; H₂O, q. s. p. 3 ml.

L'albumine a été testée pour voir dans quelle mesure l'apport d'une simple protéine non enzymatique agit sur la coagulation.

Les essais ont été réalisés à pH 6,0, lequel n'est certainement pas le pH optimal pour toutes les enzymes testées.

Cette restriction faite, on constate que la trypsine a le plus grand pouvoir coagulant. Elle est suivie de près par la phénoloxydase.

La phospholipase C exerce également une action favorable sur la coagulation, quoique de loin moins puissante.

L'effet de la peroxydase et de catalase est comparable à celui de l'albumine, d'où on peut déduire que leur action n'est due qu'à l'adjonction des protéines. Un apport d'une protéine non enzymatique, l'albumine, n'est pas sans effet sur le processus de la coagulation; on constate une accélération de la coagulation du latex par rapport au témoin (0) où, au bout des 5 heures, aucun signe de déstabilisation n'a été observé.

La phospholipase D a moins d'effet que l'albumine, mais il n'est pas exclu que sa solubilisation ait été incomplète. En tout cas elle n'apparaît pas comme l'enzyme responsable du phénomène.

Des résultats obtenus, il ressort que d'autres enzymes que la polyphénol-oxydase, dont l'action se trouve une fois de plus confirmée, pourraient être impliquées dans le processus de la coagulation du latex : certaines protéases ou même certaines phospholipases du type de la phospholipase C, s'il y en a dans le latex.

TABLEAU IX

Pouvoir coagulant de quelques protéines enzymatiques ou non

Enzyme ou protéine testée	Temps (minutes) nécessaire pour atteindre les étapes successives de coagulation			
	Déstabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
O	*	*	*	*
Trypsine	2	5	9	30
Polyphénoloxydase	5	25	30	65
Peroxydase	170	180	300	
Catalase	180	190	300	
Phospholipase C	80	100	120	180
Phospholipase D	240	260		
Albumine	180	190	300	

Milieu : 2 ml de latex + 1 ml de tampon cacodylate 0,5 M pH 6,0; concentration en enzyme (ou protéine) ajoutée : 1 mg/ml. Les quantités de protéines (enzymatiques ou non) ajoutées, représentent 15 % des protéines totales du milieu réactionnel; on opère donc en activité enzymatique probablement non limitante.

* Pour le témoin, aucun signe de déstabilisation n'est observé après 5 heures.

8) Action de la stimulation sur les propriétés coagulantes du latex

On sait que l'effet principal de la stimulation des arbres par l'éthrel générateur de l'éthylène, est, *in vivo*, la prolongation de la durée de l'écoulement du latex après la saignée, correspondant à un retard de la coagulation sur encoche. La stimulation semble donc modifier les propriétés coagulantes du latex.

Nous avons testé ce phénomène *in vitro*, soit sur des latex entiers non dilués, soit sur des latex dilués avec de l'eau (tableau X).

Dans les deux cas on a constaté un retard net (allant jusqu'à plusieurs heures) dans la coagulation des latex provenant des arbres stimulés par rapport à ceux des arbres témoins, non stimulés. La stimulation paraît avoir diminué le pouvoir coagulant.

TABLEAU X

Effet de la stimulation sur la coagulation du latex

	Temps (heures) nécessaires pour atteindre les étapes successives de la coagulation			
	Déstabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
Latex complet non dilué : 5 ml				
Témoins	1 - 2	3 - 5	5 - 8	9 - 12
Stimulés	3 - 5	7 - 9	8 - 12	15 - 18
Latex dilué avec de l'eau : 4 ml latex + 1 ml H ₂ O				
Témoins	1/2	1	1 - 2	2 1/2 - 3
Stimulés	3 - 4	5 - 6	*	*

* Pas de coagulation après 8 heures.

CONCLUSION

SOUTHORN et EDWIN (1968) ont nettement mis en évidence que la coagulation était liée à une décompartmentation des différentes phases du latex correspondant aux infrastructures. Ces auteurs insistaient principalement sur les lutoïdes, négligeant les particules de FREY-WYSSLING.

A notre sens, le déterminisme de cette décompartmentation ne paraît pas avoir reçu d'interprétation satisfaisante à ce jour. L'éclatement des particules (lutoïdes FREY-WYSSLING et autres) nous paraît, de façon beaucoup plus probable, être dû à la décompression brusque (pouvant atteindre plus de 10 atm) qui suit immédiatement la saignée et qui a été mise en évidence par BUTTERY et BOATMAN (1967). Cette décompression est du même type (pour des particules dont les membranes ont une résistance mécanique faible) que celle que l'on obtient en utilisant la presse de FRENCH.

L'éclatement des structures met alors en présence des constituants antérieurement séparés.

Il en résulte :

- un abaissement du pH;
- une libération dans le sérum de cations divalents Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺;
- la formation, lorsque l'oxygène est à une tension suffisante (sans doute près de l'encoche) et, du fait de la décompartmentation de la phénoloxydase des particules de FREY-WYSSLING, de quinones et de mélanines.

Le fait que, soit une activité protéase (trypsine), soit une activité phénoloxydase (provoquant la formation d'agents dénaturant les protéines), favorisent la coagulation, amène à la conclusion qu'un des événements de cette coagulation est la destruction ou la dénaturation de protéines. On peut émettre l'hypothèse que, parmi

les protéines atteintes, il y aurait celles de la membrane des particules de caoutchouc. La destruction de cette membrane démasquerait les charges électronégatives de ces particules. En présence d'un pH plus acide, de cations divalents pouvant former des ponts, et des autres colloïdes positifs, il se formerait, comme l'ont proposé SOUTHORN et YIP (1968), des flocculats s'agglomérant.

Ces phénomènes sont freinés :

— par un constituant encore indéterminé mais non protéique du sérum cytoplasmique;

— au début de l'écoulement, par un flux rapide évacuant les microcoagulats naissants.

Différentes hypothèses peuvent être proposées pour rendre compte de l'écoulement prolongé constaté avec les hauts producteurs ou les arbres stimulés :

(a) une activité phénoloxydase plus faible;

(b) une teneur plus élevée du facteur sérique antagoniste;

(c) un pH sérique plus élevé;

(d) une résistance mécanique plus élevée des membranes des éléments figurés du latex.

Cette diversité d'hypothèses souligne le vaste champ de recherche existant encore.

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- BUTTERY B. R. et BOATMAN S. G., 1967. — Effects of tapping wounding and growth regulators on turgor pressure in *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. *J. exp. Bot.*, **18**, 644-659.
- DE VRIES G., 1920. — Estate Rubber : Its preparation, Properties and Testing, p. 115. Batavia : Durkkerijen Ruggrok.
- McMULLEN A. I., 1951. — Some aspects of theories of spontaneous coagulation. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **13**, 133-139.
- MOIR G. F. J. 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.
- 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.
- PUJARNISCLE S., 1968. — Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Physiol. Vég.*, **6**, 27-46.
- RIBAILLIER D., 1972. — 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 Doc. d'État Sc. Nat.*, Abidjan.
- RIBAILLIER D. et d'AUZAC J., 1970. — Nouvelles perspectives de stimulation hormonale de la production chez l'*Hevea brasiliensis*. *Rev. gen. Caout. Plast.*, **47**, 433-439.
- 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.
- SMITH R. H., 1953. — The phosphatides of the latex of *Hevea brasiliensis* I. Biochemical changes. *Biochem J.*, **56**, 240-246.

- SOUTHORN W. A., 1968. — Latex flow studies I. Electron microscopy of *Hevea brasiliensis* on the region of the tapping cut. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **20**, 226-235.
- SOUTHORN W. A. et EDWIN E. 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. — Latex flow studies III. Electrostatic considerations in the colloidal stability of fresh latex from *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **20**, 201-215.
- TATA S. J. et MOIR G. F. J., 1964. — The protein 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 B serum with strong destabilising activity on latex. *Res. Arch. Rubb. Res. Inst. Malaya*, Docum. 59, Diffusion restreinte.
- Woo C. H., 1973. — Rubber coagulation by enzymes of *Hevea brasiliensis* latex. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **23**, 323-331.