

## Étude de quelques facteurs intervenant sur la perméabilité et la stabilité de la membrane des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, MULL. ARG. (\*)

Serge PUJARNISCLE

*Laboratoire de Physiologie Végétale, O.R.S.T.O.M., Centre d'Adiopodoumé*

*B.P. 20 Abidjan, Côte-d'Ivoire.*

(Manuscrit reçu le 9 juin 1969)

### RÉSUMÉ

On a étudié les réactions des lutoïdes à divers traitements amenant la lyse de ces particules.

Les résultats obtenus amènent aux conclusions suivantes :

— La membrane des lutoïdes intacts peut être imperméable à certaines substances et perméable à d'autres. Les variations dans la perméabilité de la membrane dépendent de divers facteurs, entre autres le pH du milieu où se trouvent les lutoïdes, ou le degré d'altération des particules.

Il semble que certaines hydrolases soient retenues au sein des lutoïdes, par des liaisons enzyme-membrane, probablement du type polaire.

— Le processus de la déstabilisation des lutoïdes n'est pas simple, et paraît se dérouler en deux temps. Dans un premier stade, les lutoïdes restent intacts, il se produit une augmentation de la perméabilité de la membrane. Par la suite, les lutoïdes éclatent et leurs protéines passent en solution, excepté celles retenues à la membrane par des liaisons polaires.

### SUMMARY

*Reactions of lutoïds particles to some treatments inducing the lysis of these organelles were studied.*

*The results lead to the following conclusions :*

*— The membrane of whole lutoïds particles is permeable to some substances and impermeable to others. This variable permeability of the membrane towards enzyme substrates depends upon various factors like the pH of the suspension medium or the structural state of particles.*

*— Some of the hydrolytic enzymes might be retained by ionic bonds and then, would be localized on the membrane, inside these organelles.*

*— The destabilisation process of lutoïds particles seems to occur in two steps. First, these organelles remain intact, but the membrane permeability towards substrates increases. Later, lutoïds particles burst and release their proteins, although some of them are retained by ionic bonds on the membrane.*

(\*) Cet article constitue l'article principal d'une Thèse de Doctorat d'Etat (Sc. Nat.) enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro A.O.3379 et soutenue le 2 juillet 1969 à la Faculté des Sciences d'Orsay.

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 4071

1 JUIN 1970

## INTRODUCTION

Les lutoïdes, particules qui se rencontrent abondamment dans le latex d'*Hevea brasiliensis*, ont été isolés et décrits en premier lieu par HOMANS et VAN GILS (1948). Au microscope photonique, ils se rencontrent sous forme d'amas assez difficiles à distinguer, du fait de leur indice de réfraction proche de celui du sérum. Leur infrastructure ayant été étudiée par DICKENSON (1964 et 1968) et par SOUTHORN (1966) au microscope électronique, ils se présentent sous l'aspect de vésicules ayant un diamètre de 2 à 3  $\mu$ , limitées par une membrane simple de 80 à 100 Å d'épaisseur. Ils contiennent un liquide aqueux de pH fortement acide, et dans les tissus jeunes, les lutoïdes renferment fréquemment des inclusions fibrillaires de nature protéique qui disparaissent au cours du vieillissement.

Du point de vue biochimique, ils sont caractérisés par la présence de toute une gamme d'hydrolases susceptibles de dégrader les principaux composés biologiques à haut poids moléculaire de la cellule. En outre, ils présentent *in vitro* les mêmes réactions aux facteurs externes que les lysosomes. Ces réactions se traduisent généralement par la libération de leurs hydrolases qui, dans les conditions normales, sont sous forme latente, et donc peu actives. Ces caractéristiques ont permis de suggérer que les lutoïdes sont des structures cellulaires qui, dans le latex, correspondent aux lysosomes de la cellule animale (PUJARNISCLE, 1968).

De par la présence d'un grand nombre d'hydrolases particulièrement actives au sein des lutoïdes, on conçoit que le problème de la stabilité de ces organites présente un intérêt certain en hévéaculture. En effet, instables *in vivo*, ils seraient susceptibles de libérer leur contenu dans la cellule laticifère et de provoquer de graves perturbations aussi bien dans le métabolisme cellulaire que dans la stabilité colloïdale du latex. La conséquence immédiate serait une chute de la production de caoutchouc.

Ainsi, les lutoïdes pourraient-ils jouer un rôle négatif, mais d'une grande importance, sur la productivité de l'Hévéa.

De la stabilité des lutoïdes dépend l'activité biosynthétique du latex, c'est-à-dire sa capacité de transformer *in vitro* l'acétate marqué en caoutchouc radioactif (PUJARNISCLE et RIBAILLIER, 1966). La libération des protéines « lutoïdiques » peut donc perturber et même inhiber la suite des réactions responsables de la formation du caoutchouc. Elle peut aussi provoquer une diminution de la stabilité colloïdale des particules de caoutchouc qui aurait pour conséquence le ralentissement et même l'arrêt total de l'écoulement du latex, par suite de la formation de micro-coagulums, constitués par des lutoïdes et des particules de caoutchouc coagulés, entraînant l'obturation des vaisseaux laticifères (PAKIANATHAN et al., 1966 ; SOUTHORN, 1968).

Or, le problème de la stabilité des lutoïdes est directement lié à celui de leur membrane. Il apparaît ainsi que l'étude des propriétés de cette membrane se révèle être au moins aussi importante que celle de son contenu.

De cette membrane, on ignore à peu près tout, sauf qu'elle est simple (DICKENSON, 1964), de nature lipo-protéique (PUJARNISCLE, 1965 ; GOMEZ et SOUTHORN, 1968) et relativement fragile.

On va donc essayer d'analyser ici ses réactions en suivant la libération de certains constituants des lutoïdes, à la suite de divers traitements qui provoquent la déstabilisation graduelle de ces particules.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

## I. PRÉLÈVEMENT DU LATEX ET SÉPARATION DES LUTOÏDES

Les latex utilisés dans cette étude proviennent de quelques Hévéas issus de graines clones ou de clones greffés de la Station Expérimentale de l'Institut des Recherches sur le Caoutchouc en Afrique (I.R.C.A.). Les arbres qui ont été sélectionnés ont de 8 à 10 ans d'âge, sont apparemment sains et mis en saignée depuis au moins un an.

L'Hévéa étant saigné, on laisse s'écouler les 20 à 30 premiers ml de latex et les 30 ml suivants sont recueillis dans un Erlenmeyer refroidi par de la glace fondante. Ce latex est ensuite centrifugé le plus rapidement possible pour l'obtention des lutoïdes selon le processus décrit précédemment (PUJARNISCLE, 1968).

## II. MESURE DES ACTIVITÉS HYDROLYTIQUES

— *Phosphatase acide* (E.C.3.1.3.2.): elle est dosée en milieu tampon acétate 0,1 M à pH 5,0 en présence de 10 mM/l de p-nitrophényl-phosphate comme substrat (LINHARDT et WALTER, 1963).

—  *$\beta$ -Glucosidase* (E.C.3.2.1.21.): elle est dosée en milieu tampon acétate 0,1 M à pH 5,0 en présence de 15 mM/l de p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside comme substrat (CONCHIE et LEVY, 1957).

Le volume réactionnel est de 2 ml et les incubations sont effectuées pendant 10 mn à 30 °C. La réaction est ensuite bloquée par addition de 2 ml d'acide trichloracétique N et le mélange est filtré.

Un ml de soude N et 2 ml de tampon glycine-carbonate de sodium 0,15 M sont ajoutés à 2 ml de filtrat. La coloration développée par le p-nitrophénol libéré durant la réaction est mesurée au colorimètre Klett-Summerson muni du filtre violet n° 42. L'étalonnage a été effectué au préalable à l'aide d'une solution de p-nitrophénol.

Pour chaque dosage, on effectue deux mesures et un témoin qui contient tous les réactifs sauf les lutoïdes qui ne sont ajoutés qu'après coagulation trichloracétique. La valeur de ce témoin est soustraite de celle obtenue au cours du dosage.

## III. DOSAGE DES PROTÉINES SOLUBLES

Les protéines ont été mesurées sur le surnageant obtenu après centrifugation des suspensions de lutoïdes, par la méthode de Lowry et *al.* (1951) à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu.

La densité optique de la solution colorée est mesurée au spectrophotomètre Beckman modèle D.U., à 750 nm, contre un témoin pour lequel l'échantillon est remplacé par une même quantité du tampon utilisé à la mise en solution des protéines.

L'étalonnage s'effectue à l'aide d'une solution de sérum-albumine et trois dosages sont effectués pour chaque échantillon.

## IV. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

## a) Activités libres, solubles et totales

Du fait des propriétés spéciales des lutoïdes, il a été possible de distinguer trois types de mesures.

— *Activité libre* (DE DUVE et *al.*, 1955): Elle se mesure obligatoirement en milieu mannitol 0,3 M afin d'éviter la lyse des lutoïdes.

Cette mesure rend compte des enzymes qui, lorsque les lutoïdes sont dans un parfait état d'intégrité, sont accessibles aux substrats. En fait, on mesure dans ces conditions non seulement l'activité des enzymes en solution, mais encore l'activité des enzymes qui, bien qu'enfermés dans les lutoïdes, sont plus ou moins accessibles aux substrats, soit à la suite d'une lésion partielle, soit parce que la membrane est relativement perméable à ces substrats.

— *Activité soluble* (TAPPEL *et al.*, 1963) : Elle se mesure sur le surnageant obtenu après centrifugation des suspensions de lutoïdes à 20 000 tr/mn (g moyen = 24 000) pendant 20 mn dans le rotor 50 de l'ultra-centrifugeuse Spinco.

Cette mesure représente la part des enzymes entièrement libérés par les lutoïdes et qui sont passés en solution dans le milieu de suspension.

Cependant, les enzymes libérés par les lutoïdes peuvent être adsorbés ou partiellement entraînés par les membranes et les particules intactes lors de la centrifugation. Toutefois, cet entraînement semble relativement faible, car lorsque la lyse complète des particules est obtenue après leur traitement au Triton X-114, les activités mesurées directement sur les suspensions (activités libres) sont peu différentes de celles obtenues sur les surnageants après centrifugation des suspensions (activités solubles).

— *Activité totale* (WATTIAUX et DE DUVE, 1956) : Elle se mesure après traitement des lutoïdes par du Triton X-114 de telle façon que la concentration finale de ce détergent non-ionique, lysant les lutoïdes, soit de 0,1 % (v/v). Cette concentration est largement suffisante pour provoquer la lyse totale des lutoïdes et entraîner la solubilisation complète de leurs hydrolases.

Cette mesure représente donc le potentiel actif global des enzymes contenus dans la particule, et d'une façon générale varie peu pour un latex donné. Par contre, les activités libres et solubles sont susceptibles de donner lieu à des variations importantes, et elles représentent assez bien le degré d'altération des lutoïdes.

#### b) Expression des résultats

Le travail exposé ici a pour objet l'étude des réactions de la membrane à divers traitements entraînant la dégradation des lutoïdes et qui se traduisent d'une façon concrète par la libération et la solubilisation de leurs enzymes. Tous les résultats sont donc rapportés, pour les enzymes, aux activités totales mesurées en présence de 0,1 % de Triton X-114, et pour les protéines, au taux de protéines en solution dans ces conditions, ce qui correspond aux protéines initialement en solution augmentées de celles solubilisées par le détergent.

### V. MATÉRIEL UTILISÉ

Le p-nitrophényl-phosphate de sodium, et le p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside proviennent de Koch-Light Laboratories (Angleterre) ; le p-nitrophénol purifié de Touzart et Matignon (France) ; la sérum-albumine de Calbiochem (USA) et le Triton X-114 de Rohm and Haas (USA).

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Dans cette étude, l'activation (libération et solubilisation) de la phosphatase et de la  $\beta$ -glucosidase, ainsi que la solubilisation des protéines, sont mesurées au cours de traitements entraînant une déstabilisation graduelle des lutoïdes. Les traitements mis en œuvre seront :

- la lyse osmotique ;
- des préincubations en présence de différentes quantités de Triton X-114 ;
- la lyse thermique (préincubations à 30 °C) à pH 5,0, 7,0 et 8,5.

### 1. LYSE OSMOTIQUE

Comme on peut le constater sur les graphiques de la figure 1, la diminution de la pression osmotique du milieu de suspension des lutoïdes provoque la solu-

bilisation des protéines ainsi que l'activation des deux hydrolases étudiées, qui manifestent des variations beaucoup plus importantes de leurs activités libres, comparativement à leurs activités solubles.

On notera que les courbes représentant les variations des activités solubles des deux hydrolases en fonction de la concentration en mannitol, sont presque confondues. Par contre, l'activité libre de la  $\beta$ -glucosidase est nettement supérieure à celle de la phosphatase, et ce, quelle que soit la concentration du milieu en mannitol.

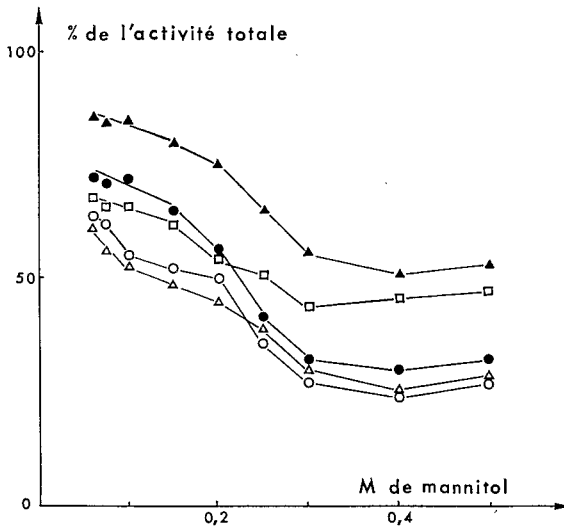


FIG. 1. — Action de la lyse osmotique sur l'activation des enzymes et la solubilisation des protéines des lutoïdes. Des lutoïdes fraîchement préparés sont abandonnés 15 mn, à 0 °C, dans des milieux de concentrations diverses en mannitol.

Les *activités libres* de ces enzymes ont ensuite été mesurées directement sur une aliquote des suspensions, la concentration finale du milieu ayant été ramenée à 0,3 M en mannitol.

Les *activités solubles* de ces enzymes, ainsi que le taux de *protéines en solution* ont été mesurés sur les surnageants obtenus après centrifugation du reste des suspensions.

Phosphatase libre (●) et soluble (○);  $\beta$ -glucosidase libre (▲) et soluble (△); protéines en solution (□); (moyennes de 4 expériences).

## II. ACTION DU TRITON X-114

Les résultats obtenus sont représentés par les graphiques de la figure 2. Ils amènent à des remarques identiques à celles établies précédemment dans le cas de la lyse osmotique, excepté que, dans cette expérience, la déstabilisation des lutoïdes est due à la présence de quantités croissantes de Triton X-114.

On notera en outre, qu'au-delà d'une certaine concentration en Triton X-114 (0,75 %) toutes les courbes sont pratiquement confondues.

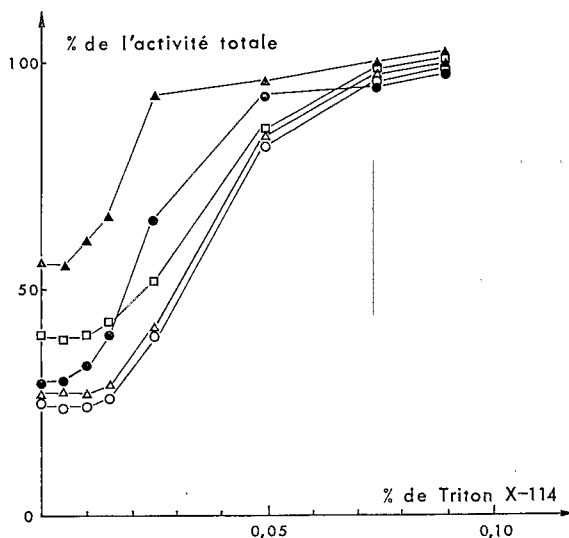


FIG. 2. — Action du Triton X-114 sur l'activation des enzymes et la solubilisation des protéines des lutoïdes. Des lutoïdes fraîchement préparés sont abandonnés 15 mn environ à 0 °C, dans des milieux contenant du mannitol 0,3 M et du Triton X-114 à diverses concentrations.

Les mesures qui on ensuite été effectuées sont les mêmes que celles de la figure 1.

Phosphatase libre (●) et soluble (○); β-glucosidase libre (▲) et soluble (Δ); protéines en solution (□); (moyennes de 4 expériences).

### III. LYSE THERMIQUE À DIVERS pH

On peut constater, à la lumière des résultats représentés par la figure 3, que la lyse thermique a pour conséquence une augmentation plus ou moins grande de l'activité libre des hydrolases au cours du temps. Elle est très importante à pH 5,0, beaucoup moins à pH 8,5, et relativement faible à pH 7,0. Par contre, en ce qui concerne les activités solubles de ces mêmes hydrolases, ce n'est qu'à pH 5,0 que l'on constate leur augmentation au cours du temps; à pH 7,0 et 8,5, elles restent quasiment constantes ou ne s'accroissent que très légèrement durant les préincubations.

En ce qui concerne les protéines, la lyse thermique à pH 5,0 et 7,0 entraîne leur solubilisation au cours du temps, mais à pH 8,5, le taux de protéines en solution reste constant. Cependant, en cette circonstance, dès le temps zéro ce taux est déjà très élevé, de l'ordre de grandeur de celui obtenu après 120 mn de préincubation aux autres pH.

On notera enfin que, comme dans le cas de la lyse osmotique ou de la lyse provoquée par le Triton X-114, la courbe des variations de la phosphatase soluble est pratiquement confondue avec celle de la β-glucosidase soluble et ce, quel que soit le pH auquel s'effectue la lyse thermique. En outre, excepté à pH 7,0, le rapport: activité libre/activité totale, est toujours plus grand dans le cas de la β-glucosidase que dans le cas de la phosphatase.

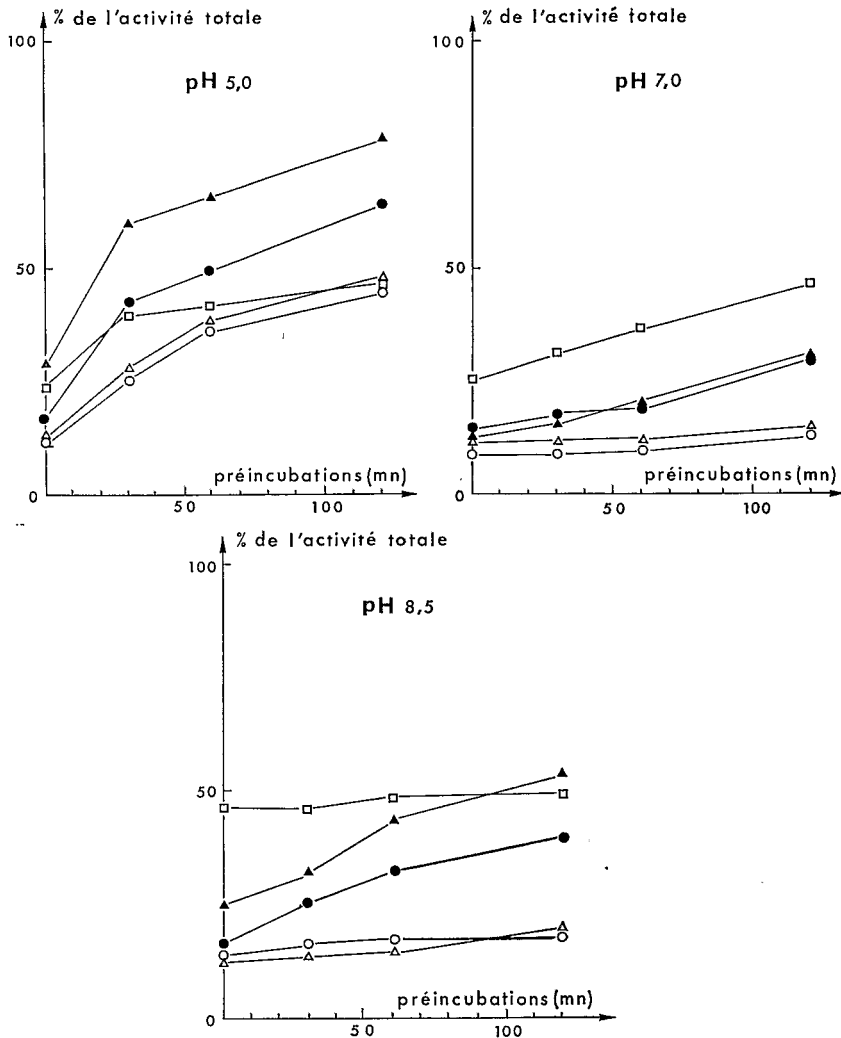


FIG. 3. — Action de la lyse thermique à divers pH sur l'activation des enzymes et la solubilisation des protéines des lutoïdes. Des lutoïdes fraîchement préparés sont mis en suspension dans des milieux contenant du mannitol 0,3 M tamponné à pH 5,0 (acétate 0,1 M), à pH 7,0 (imidazole 0,1 M) ou pH 8,5 (Tris-ClH 0,1 M) et abandonnés à 30 °C A des intervalles de temps déterminés, des prélèvements sont effectués sur chaque suspension.

Les *activités libres* sont mesurées directement sur une aliquote des prélèvements, la concentration en mannitol étant toujours maintenue à 0,3 M.

Les *activités solubles* ainsi que le taux de *protéines en solution* sont mesurés sur les surnageants obtenus après centrifugation de ce qui reste des prélèvements.

*Phosphatase libre* (●) et *soluble* (○); *β-glucosidase libre* (▲) et *soluble* (△); *protéines en solution* (□); (moyennes de 3 expériences).

## DISCUSSION

L'analyse de l'ensemble des résultats qui viennent d'être décrits attire notre attention sur deux points principaux :

— Bien qu'il ait été clairement établi que la phosphatase et la  $\beta$ -glucosidase appartiennent toutes deux aux lutoïdes (PUJARNISCLE, 1968) la valeur du rapport : activité libre/activité totale, est toujours nettement plus importante dans le cas de la  $\beta$ -glucosidase, excepté dans un cas (lyse thermique à pH 7,0).

— Dans le cas où les lutoïdes sont en bon état ou par contre totalement lysés, les valeurs des activités libres et solubles pour chaque hydrolase sont équivalentes. En revanche, lorsqu'ils sont légèrement déstabilisés, ces deux types d'activité présentent parfois des différences très importantes. Cela est particulièrement net dans le cas de la  $\beta$ -glucosidase, et ces différences sont parfois trop importantes pour qu'on puisse en rendre responsables l'adsorption et l'entraînement mécanique des protéines par les membranes ou les particules intactes.

On peut imaginer *a priori* deux hypothèses afin d'éclairer ce comportement des hydrolases « lutoïdiques ».

1) Suivant les conditions expérimentales, la membrane est, ou peut devenir, plus ou moins perméable aux substances en solution dans le milieu environnant.

2) Il est possible que les enzymes soient retenus au sein des lutoïdes par des liaisons protéine-membrane qui font que, même lorsque ces organites sont lésés, les enzymes restent accrochés à la membrane et sont ensuite entraînés dans le culot lors de la centrifugation.

Ces deux points vont donc être examinés à la lumière de nos résultats expérimentaux.

### 1) Perméabilité de la membrane

Rappelons que l'Ecole de Louvain représente les lysosomes comme de petits sacs contenant en solution des hydrolases et dont l'enveloppe est parfaitement imperméable aux substances externes (voir par exemple DE DUVE, 1959). Ce concept se dégage des résultats obtenus lors d'études effectuées sur les lysosomes par APPELMANS et DE DUVE (1955) à partir de tissus hépatiques, par VAES (1965) à partir de tissus osseux et par BOWERS *et al.*, (1967) à partir de tissus lymphatiques. Néanmoins, cette représentation a été contestée par LEVY et CONCHIE (1964), à la suite des observations qu'ils ont faites sur les lysosomes des tissus de la rate. Cette dernière opinion a été recoupée ultérieurement à la suite des résultats obtenus sur les lysosomes hépatiques par HAINSWORTH et WYNN (1966) et par ROSENBERG et JANOFF (1968).

Dans le cas de la phosphatase et de la  $\beta$ -glucosidase, les différences parfois très importantes entre les valeurs de leur rapport : activité libre/activité totale, et cela pour une même préparation de lutoïdes, amènent tout naturellement à admettre que la membrane de ces organites ne présente pas la même perméabilité aux substrats de ces deux hydrolases.



Ce point de vue doit être vérifié. Pour cela, les variations des activités libres et totales de la phosphatase et de la  $\beta$ -glucosidase ont été étudiées en fonction de la concentration en leur substrat respectif.

TABLEAU I

*Influence de la concentration en substrat sur les activités libres et totales de la phosphatase acide et de la  $\beta$ -glucosidase d'une préparation de lutoïdes (moyenne de 2 expériences).*

Concentration en substrat	Lutoïdes fraîchement préparés			Lutoïdes ayant subi une lyse thermique de 30 mn, à 30 °C et à pH 5,0.		
	Act. tot. (U./ml de lutoïdes)	Act. lib. (U./ml de lutoïdes)	Act. lib. / Act. tot. $\times 100$	Act. tot. (U./ml de lutoïdes)	Act. lib. (U./ml de lutoïdes)	Act. lib. / Act. tot. $\times 100$
$\beta$ -glucosidase						
5 mM/l	0,672	0,090	13,4	—	—	—
10 —	0,773	0,121	15,8	—	—	—
15 —	0,861	0,156	18,1	—	—	—
20 —	0,874	0,177	20,3	—	—	—
30 —	0,877	0,218	24,9	—	—	—
50 —	0,923	0,281	30,4	—	—	—
75 —	0,949	0,335	35,3	—	—	—
Phosphatase acide						
5 mM/l	1,170	0,271	23,2	—	—	—
10 —	1,699	0,310	18,2	0,930	0,405	43,5
15 —	1,989	0,334	16,8	—	—	—
20 —	2,086	0,341	16,3	1,256	0,589	46,8
30 —	2,163	0,354	16,4	1,412	0,765	54,2
50 —	2,341	0,386	16,5	1,596	0,875	54,9
75 —	2,398	0,403	16,8	1,649	1,055	64,0

Selon les résultats rapportés dans le tableau I, il est clair que dans les conditions normales, et à partir du moment où le seuil de saturation de l'enzyme est atteint, le rapport entre l'activité libre et l'activité totale reste pratiquement constant dans le cas de la phosphatase. En revanche, il n'en est plus ainsi pour la  $\beta$ -glucosidase ; ce rapport va en augmentant avec la concentration en substrat, ce qui signifie que celui-ci est susceptible de pénétrer dans la particule. En l'occurrence, il ne fait aucun doute que la membrane des lutoïdes présente une barrière infranchissable au p-nitrophényl-phosphate de sodium et que par contre, elle est relativement perméable au p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside.

Toutefois, lorsque les lutoïdes sont partiellement lésés à la suite d'une lyse thermique de 30 mn à 30 °C et à pH 5,0, la phosphatase devient alors relativement accessible à son substrat (tableau I). Il n'a pas été possible, pour le moment, de savoir si les variations dans la perméabilité de la membrane lutoïdique sont réversibles ou pas.

Ces résultats rendent compte, au moins en partie, du fait que l'activité libre d'une hydrolase lutoïdique est généralement plus élevée que son activité soluble lorsque ces organites sont légèrement déstabilisés. En outre, ils expliquent pourquoi, dans la plupart des cas, les valeurs du rapport : activité libre/activité totale, sont plus importantes pour la  $\beta$ -glucosidase.

Il faut cependant remarquer qu'au cours de la lyse thermique à pH 7,0 (fig. 3), les valeurs de ce rapport sont équivalentes pour les deux hydrolases. A ce

pH, la membrane présente donc une perméabilité identique aux deux substrats considérés.

Ainsi, *in vitro*, la perméabilité différentielle de la membrane vis-à-vis des substances dissoutes dans le milieu de suspension peut dépendre de divers facteurs externes, et dans ce cas précis, du pH du milieu.

Ce point présente une grande importance et mérite qu'on s'y attarde quelque peu. Il est en effet possible de supposer que *in vivo*, suivant les conditions physiologiques de la cellule, il se produise par exemple un changement dans le pH du cytoplasme. Certaines molécules peuvent alors éventuellement pénétrer dans les lutoïdes à la suite d'une modification de la perméabilité de leur membrane ; elles sont ainsi susceptibles d'être hydrolysées et les produits de dégradation seraient alors mis à la disposition de la cellule après avoir franchi la membrane en sens inverse pour passer dans le cytoplasme.

Il serait assez séduisant d'invoquer un tel mécanisme, basé sur des variations réversibles et sélectives de la perméabilité de la membrane, pour rendre compte de l'intervention des lutoïdes dans le métabolisme de la cellule laticifère.

## 2) Rôle de certaines liaisons dans la libération des hydrolases et des protéines des lutoïdes

Nous avons vu qu'au cours de la lyse thermique, les activités libres des deux hydrolases de référence augmentent plus ou moins rapidement quel que soit le pH du milieu dans lequel s'effectuent les préincubations. Il n'en est plus ainsi lorsque les activités solubles sont prises en considération ; celles-ci varient peu en milieu neutre ou basique.

A la lumière des observations précédentes concernant les variations dans la perméabilité de la membrane, il serait possible d'interpréter ces résultats en supposant qu'au cours des préincubations à pH 7,0 et 8,5, la membrane devienne de plus en plus perméable aux substrats, les lutoïdes restant structuralement intacts. Une telle explication est cependant peu vraisemblable. Il est en effet difficile d'imaginer que ces organites, maintenus pendant deux heures à 30 °C, n'aient pas subi une destruction même partielle ; d'autant qu'au cours de la lyse thermique à pH 7,0, on peut constater le passage en solution d'une quantité non négligeable de protéines.

Une explication raisonnable de ces résultats pourrait être donnée en envisageant que, malgré une lyse partielle des lutoïdes suivie de la solubilisation des protéines, certains enzymes (phosphatase et  $\beta$ -glucosidase, dans le cas considéré) soient retenus à la membrane. Comme cette rétention dépend du pH du milieu, on peut avancer l'hypothèse selon laquelle des liaisons de nature polaire seraient responsables de la fixation enzyme-membrane.

On remarquera enfin, qu'à pH 8,5 le taux de protéines en solution reste constant tout au long de la préincubation. Toutefois, ce taux est dès le départ très important, de l'ordre de grandeur de celui obtenu au bout d'une lyse thermique de deux heures à pH 5,0 ou 7,0. Tout se passe donc comme si les organites libéraient une partie importante de leurs protéines dès leur mise en suspension dans un milieu basique. Etant donné qu'au démarrage des préincubations, les lutoïdes sont théoriquement intacts, on est amené à admettre que les protéines ainsi libérées proviennent de la surface externe de la membrane où elles seraient probablement fixées sur des sites cationiques.

A l'heure actuelle, la nature des protéines situées sur cette face externe et qui sont facilement libérées en milieu basique est totalement inconnue. Les deux hydrolases prises comme enzymes de référence paraissent être de leur côté liées à la surface interne de la membrane d'une manière identique. Néanmoins, il est hautement probable que ce dernier type de liaison n'est pas général pour toutes les hydrolases lutoïdiques. A ce propos, il a pu être constaté qu'au cours de la lyse thermique à pH 5,0, la solubilisation de la phosphatase et de la  $\beta$ -glucosidase ne se fait pas de manière identique à celle de la phosphodiesterase et de la cathepsine (PUJARNISCLE, 1969). Ce comportement n'est d'ailleurs pas particulier aux lutoïdes, car SAWANT et *al.* (1964) ont déjà observé que, dans le cas de lysosomes hépatiques, il existe des liaisons enzyme-membrane différentes selon les hydrolases.

Enfin, les sites précis de la membrane où se forment ces liaisons nous sont totalement inconnus. Dans le cas des lysosomes de tissus cérébraux, KOENIG et JIBRIL (1962) ont avancé l'hypothèse selon laquelle ces organites n'auraient pas de membrane réelle et consisteraient en un complexe solide ganglioside-protéine dans lequel les hydrolases seraient fixées à l'acide sialique ; la rupture de ces liaisons provoquerait l'activation des enzymes. Ce point de vue a d'ailleurs été violemment combattu. Il est en effet difficile de retenir ce concept concernant la structure des lysosomes, cependant, l'existence d'une telle liaison du type protéine-glucolipide ne peut être rejetée *a priori*. Il n'est donc pas exclu que les hydrolases lutoïdiques soient retenues à la membrane par des liaisons de la nature de celle avancée par ces auteurs, ou bien par des liaisons du type imidazole qui seraient responsables selon EGGER et RAPOPORT (1963) de la séquestration de certains enzymes dans les mitochondries.

## CONCLUSIONS

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude nous apporte quelques précisions concernant le comportement des lutoïdes et plus spécialement concernant les propriétés de leur membrane.

De nature lipo-protéique et semi-perméable, elle constitue une barrière infranchissable à certains substrats ; elle peut cependant être relativement perméable à d'autres substances. Ces variations dans la perméabilité de la membrane dépendent de divers facteurs, entre autre de l'état structural de la particule ou des changements dans le pH du milieu environnant.

On a aussi pu remarquer que l'activation des hydrolases lors de la déstabilisation expérimentale des lutoïdes ne s'effectue pas selon un processus simple. Compte tenu de nos résultats, on peut avancer un schéma hypothétique concernant cette activation :

— Une légère déstabilisation des lutoïdes provoquerait des changements dans la perméabilité de la membrane. Certaines substances pourraient alors pénétrer plus ou moins rapidement dans les particules, alors que celles-ci sont structurellement intactes.

— La déstabilisation devenant plus importante, la membrane se déchirerait entraînant la solubilisation des protéines. Cependant certaines de ces protéines

qui, au sein des lutoïdes seraient fixées à la membrane par des liaisons de nature polaire, resteraient encore retenues plus ou moins fortement à cette membrane.

En fin de compte, l'activation des hydrolases lutoïdiques s'effectuerait en deux temps, d'une manière un peu analogue à celle des lysosomes du tissu rénal (SHIBKO *et al.*, 1965).

### REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à M. D. RIBAILLIER, de l'Institut des Recherches sur le Caoutchouc en Afrique, qui a sélectionné les Hévées utilisés au cours de cette étude, ainsi qu'à M. le Pr C. LIORET, de la Faculté des Sciences d'Orsay, pour les conseils et les encouragements qu'il nous a prodigués au cours de nos travaux.

### BIBLIOGRAPHIE

- APPELMANS F. et DE DUVE C., 1955. — Tissue fractionation studies. 3. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles. *Biochem. J.*, **59**, 426-433.
- BOWERS W.E., FINKENSTAEDT J.T. et DE DUVE C., 1967. — Lysosomes in lymphoid tissues. I. The measurements of hydrolytic activities in whole homogenates. *J. Cell Biol.*, **32**, 325-337.
- CONCHIE J. et LEVY G.A., 1957. — Inhibition of glycosidase by aldonolactones of corresponding configuration. *Biochem. J.*, **65**, 389-395.
- DICKENSON P.B., 1964. — The ultrastructure of latex vessel of *Hevea brasiliensis*. *Proc. Nat. Rubb. Prod. Res. Ass., Jubilee Conf., Cambridge*, McLaren and Son, Londres, 52-56.
- DICKENSON P.B., 1968. — Electron microscopical studies of the latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. *Nat. Rubb. Conf., Kuala-Lumpur*. Preprint.
- DE DUVE C., 1959. — Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In *Subcellular particles*. Hayashi T., éd. The Ronald Press Co., New York, 128-159.
- DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS F., 1955. — Tissue fractionation studies. 6) Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, **60**, 604-617.
- EGGER E. et RAPOPORT S., 1963. — Role of non-covalent bonds for the holding, activation and release of mitochondrial enzymes. *Nature*, **200**, 240-242.
- GOMEZ J.B. et SOUTHERN W.A., 1968. — Studies on lutoïd membrane ultrastructure. *Nat. Rubb. Conf., Kuala-Lumpur*, Preprint.
- HAINSWORTH B. et WYNN C.H., 1966. — The permeability of lysosomal membrane to glycerol, sorbose and p-nitrophenol. *Biochem. J.*, **101**, 9P.
- HOMANS L.N.S. et VAN GILS G.E., 1948. — Fresh Hevea latex. A complex colloïdal system. *Proc. Sd. Rubb. Technol. Conf., Londres*, 292-302.
- KOENIG H. et JIBRIL A., 1962. — Acid glycolipids and the role of ionic bonds in the structure-linked latency of lysosomal hydrolases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **65**, 543-545.
- LEVY G.A. et CONCHIE J., 1964. — The subcellular localization of lysosomal enzymes and its biological significance. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **14**, 107-128.
- LINHARDT K. et WALTER K., 1963. — Phosphatases; Determination in serum with p-nitrophenyl phosphate. In *Methods in Enzymatic Analysis*. Bergmeyer H.U. éd., Acad. Press, New York et Londres, 783-785.
- LOWRY O.W., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. — Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.

- 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., 1965. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*: Analogie avec les lysosomes. *C.R. Acad. Sci.*, **261**, 2127-2130.
- PUJARNISCLE S., 1968. — Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, *Mull. Arg. Physiol. Vég.*, **6**, 27-46.
- PUJARNISCLE S., 1969. — Etude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, *Mull. Arg. Différences et Analogies avec les lysosomes. Thèse Doctorat d'Etat.* (Sc. Nat.) Fac. Sc. Orsay, n° CNRS: A.O.3379.
- PUJARNISCLE S. et RIBAILLIER D., 1966. — Etude préliminaire sur les lutoïdes du latex et leur possibilité d'intervention dans la biosynthèse du caoutchouc. *Rev. gén. Caoutch. Plast.*, **43**, 226-228.
- ROSENBERG M. et JANOFF A., 1968. — Hydrolytic activities within intact lysosomes *in vitro*. *Biochem. J.*, **108**, 889-891.
- SAWANT P.L., DESAI J.D. et TAPPEL A.L., 1964. — Factors affecting the lysosomal membrane and availability of enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 247-253.
- SHIBKO S., PANGBORN J. et TAPPEL A.L., 1965. — Studies on the release of lysosomal enzyme from kidney lysosomes. *J. Cell Biol.*, **25**, 479-483.
- SOUTHORN W.A., 1966. — Electron microscope studies on the latex of *Hevea brasiliensis*. *6th Int. Congr. Elect. Micros. Kyoto*, 385-386.
- SOUTHORN W.A., 1968. — Physiology of Hevea (latex Flow) — *Nat. Rubb. Conf. Kuala-Lumpur*, Preprint.
- TAPPEL A.L., SAWANT P.L. et SHIBKO S., 1963. — Lysosomes: distribution in animal, hydrolytic capacity and other properties. In *Lysosomes Ciba Fund. Symp.*, De Reuck A.V.S. et Cameron M.P. éd., J. et A. Churchill, Londres, 78-108.
- VAES G., 1965. — Studies on bone enzymes. The activation and release of latent acid hydrolases and catalase in bone-tissue homogenates. *Biochem. J.*, **97**, 393-402.
- WATTIAUX R. et DE DUVE C., 1956. — Tissue fractionation studies. 7. Release of bound hydrolases by means of Triton X-100. *Biochem. J.*, **63**, 606-608.