

UN MODELE DE STRUCTURE VACUOLAIRE ISOLEE INTACTE : LES LUTOIDES DU LATEX D'HEVEA BRASILIENSIS I. ACCUMULATION ET PENETRATION DU CITRATE ET DE LA L-LYSINE DANS LES LUTOIDES

J. D'AUZAC, J. BRZOWSKA, P. HANOWER, C. LAMBERT, C. LIORET ET M. NIAMIEN N'GORAN

SUMMARY

Latex, obtained by tapping the bark of *Hevea brasiliensis*, is a protoplasm containing one membrane organelles named lutoïds, which have properties both of lysosomes and vacuoles. They contain a more acidic phase than outside cytoplasm and accumulate *in situ* several metabolites including L-lysine and citrate.

Isolated lutoïds, suspended *in vitro* in isotonic and non energetic medium, can absorb ^{14}C citrate or L-lysine against concentration gradient. Absorptions of substrates are thermosensitive, linear for 30 min, michaelian versus substrate concentration, enhanced indirectly by ATP, weakly inhibited by 2 - 4 DNP and NEM. Citrate absorption appears strongly specific ; L-lysine absorption is competitively inhibited by L-arginine. $NH_4^+Cl^-$ inhibits lysine uptake but not citrate uptake.

ATP enhances pH gradient between cytoplasmic and lutoïdic compartments ; this gradient may act as power source for uptakes.

These results are discussed.

INTRODUCTION

L'*Hevea brasiliensis*, producteur essentiel de caoutchouc naturel, est un arbre possédant un système laticifère localisé dans l'écorce du tronc, des branches et des racines. Ce système est constitué de vaisseaux anastomosés, résultant de la jonction, par disparition des parois transversales, de cellules issues du cambium. Ce dernier a un fonctionnement rythmique qui élabore des "manteaux" (groupements de laticifères) distincts et concentriques. Les manteaux les plus jeunes sont proches du cambium, les plus anciens sont éliminés par la desquamation de l'écorce morte.

Une blessure de l'écorce, ou "saignée", est suivie de l'écoulement temporaire du liquide blanc, "le latex", contenu dans les vaisseaux laticifères. Une saignée, dite en "spirale entière" (c'est à dire faisant le tour complet de l'arbre) permet d'obtenir de 150 à 300 ml de latex.

Les connaissances acquises depuis une vingtaine d'années ont permis d'assimiler ce latex à la partie fluide du cytoplasme des cellules laticifères. Il s'agit d'un cytoplasme particulier, spécialisé dans la synthèse du caoutchouc et enrichi en ce produit.

Le latex, recueilli après saignée, ne contient pratiquement pas de noyaux et de mitochondries qui paraissent appliqués le long du plasmalemma bordant les parois (ARCHER et Mac MULLEN, 1960 ; DICKENSON, 1965). Par centrifugation (entre 40.000 et 50.000g), il est possible de le fractionner en 3 parties:

- a) 1 fraction légère, nommée "crème", comportant essentiellement des particules de caoutchouc. Celles-ci, de 5 μ à 50 μ , sont entourées d'une membrane phospholipidoprotéique.

- b) 1 fraction intermédiaire, nommée "sérum" (que nous nommons dans ce qui suit, "sérum cytoplasmique"), correspond de fait au cytoplasme, possédant les complexes enzymatiques du métabolisme

glucidique (JACOB, 1970) et de la synthèse protéique (COUPE *et al.*, 1974).

- c) 1 fraction lourde, dite "fraction jaune" contenant essentiellement deux types de particules :

α) Les "particules de FREY-WYSSLING", de couleur jaune du fait de leur richesse en caroténoïdes ; leurs dimensions sont de l'ordre du μ , elles possèdent une structure bimembranaire avec des inclusions lipidiques (DICKENSON, 1969).

β) "Les lutoïdes", éléments figurés les plus abondants du latex après le caoutchouc ; de 2 à 10 μ de dimensions, ils ont une structure monomembranaire plus ou moins sphérique (HOMANS et VAN GILS, 1948 ; RUINEN et DE HAAN - HOMANS, 1950 ; SOUTHORN, 1960 ; DICKENSON, 1965 etc...).

La fraction lourde reprise dans un milieu isotonique (mannitol 0,3 M), soumise à une nouvelle centrifugation (notamment sur gradient de saccharose), permet de séparer ces deux types de particules, les lutoïdes ayant une densité plus élevée que les particules de FREY-WYSSLING.

Ces lutoïdes ont des propriétés qui les rapprochent à la fois des lysosomes d'une part et des vacuoles d'autre part.

Le caractère lysosomal se manifeste par la localisation extrêmement privilégiée de nombreuses activités hydrolase, la phosphatase acide étant l'enzyme marqueur type (PUJARNISCLE, 1968, 1969). Le caractère vacuolaire se manifeste par la fixation élective du rouge neutre (WIERSUM, 1957), le pH acide du contenu (nommé "sérum lutoïdique" dans ce qui suit) et l'accumulation sélective de certaines substances minérales et organiques, en particulier les ions Mg^{++} , Ca^{++} et citrate (RIBAILLIER *et al.*, 1971).

Le latex constitue ainsi un protoplasme aisément disponible et ce, sans qu'il soit nécessaire d'opérer des manipulations brutales (broyage, utilisation de "Waring blenders" etc...), lesquelles entraînent la rupture des membranes des différents compartiments avec mélange des phases originellement séparées *in situ*.

L'existence des propriétés vacuolaires des lutoïdes, le fait que l'on peut isoler intactes ces particules, enfin les grandes quantités disponibles, font que ce matériel présente un intérêt tout particulier pour l'étude des relations cytoplasme vacuole et notamment du transport entre ces 2 phases cellulaires.

La présente communication relate de l'accumulation du citrate et de la L-lysine dans le compartiment lutoïdique et de la pénétration de ces métabolites, contre le gradient de concentration, dans des lutoïdes isolés maintenus en suspension dans un milieu tamponné isotonique et dépourvu d'aliments énergétiques.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Les techniques de saignée, de récolte du latex dans des récipients refroidis par la glace, de conservation (avec addition de tampon et de mercapto-éthanol), d'isolement des lutoïdes, le principe et le détail technique des mesures de pénétration des substrats marqués par ^{14}C , les déterminations des protéines et du citrate, ont été déjà décrits (cf d'AUZAC *et al.*, 1974). Les déterminations d'acides aminés sont décrites dans l'article de BRZOWSKA *et al.* (1974).

Les lutoïdes, particules unimembranaires osmosensibles, présentent une certaine fragilité limitant l'expérimentation (PUJARNISCLE, 1969 ; RIBAILLIER, 1972). Cette fragilité est plus ou moins prononcée selon l'origine clonale des arbres (les faits relatés ci-dessous ont été réalisés à partir de latex provenant d'arbres appartenant aux clones PB 86 et PR 107). Elle interdit le plus souvent des temps d'incubation longs. Elle rend très difficile l'interprétation des mesures d'exsorption, du fait qu'il n'est pas aisé de faire la part entre molécules, contenues auparavant dans les particules, se trouvant dans le milieu extérieur soit du fait d'un efflux de particules demeurées intactes, soit

du fait de la destabilisation d'une partie d'entre elles.

Par ailleurs, leur petite taille (diamètre moyen entre 2 et 10 μ) n'a pas permis de mesurer le potentiel électrique transmembranaire et par là de calculer les différences de potentiel électrochimique.

RESULTATS

I - LA COMPARTIMENTATION DE L'ACIDE CITRIQUE ET DE LA L-LYSINE

RIBAILLIER *et al.* (1971) ont montré que les concentrations en citrate du sérum cytoplasmique sont comprises entre 2,19 mM et 7,14 mM pour 4 latex différents alors que celles du sérum lutoïdique se situent entre 34,0 mM et 62,4 mM. BRZOWSKA *et al.* (1974) ont montré que la concentration en L-lysine du sérum cytoplasmique se situait aux environs de 0,5 mM, alors que celle du sérum lutoïdique se situe aux environs de 2,5 mM.

D'autre part le pH du sérum lutoïdique est compris entre 5,5 et 6,2, alors que le pH du sérum cytoplasmique se situe entre 7,2 et 6,8 (cf. RIBAILLIER, *et al.*, 1971 ; Tableau III de cette communication). Ceci fait que, compte tenu des différentes constantes de dissociation, le citrate se trouve sous forme complètement dissociée dans le sérum cytoplasmique ; les formes moins dissociées ne sont pas du tout négligeables dans le sérum lutoïdique et présentent donc un rapport d'accumulation beaucoup plus élevé (Cf. d'AUZAC *et al.*, 1974). La L-lysine est représentée, dans les deux compartiments, principalement par la forme à 3 groupes ionisés.

Il existe donc, *in situ*, un gradient de concentration pour ces deux métabolites. Les expériences décrites par la suite et rendant compte d'une pénétration *in vitro* dans le compartiment lutoïdique ont, dans la quasi totalité des cas, respecté ce gradient. Les concentrations des milieux d'incubation étaient respectivement de $7,5 \cdot 10^{-3}$ M pour le citrate et de $0,5 \cdot 10^{-3}$ M pour la L-lysine.

II - CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'ABSORPTION DE L'ACIDE CITRIQUE OU DE LA L-LYSINE

Les figures 1 et 2 montrent qu'à 25°C, les absorptions de l'acide citrique d'une part, de la L-lysine d'autre part, par des lutoïdes en suspension dans un milieu artificiel isotonique et dépourvu d'aliments énergétiques, sont dans la plupart des cas linéaires sur une période de 30 min.

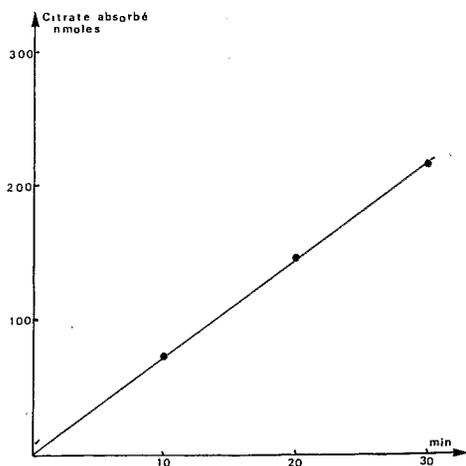


Fig. 1 Pénétration de citrate 1-5 ^{14}C dans des lutoïdes en suspension

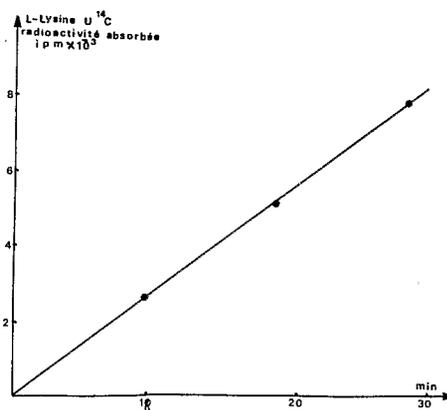


Fig. 2 Pénétration de L-lysine UC 14 dans des lutoïdes en suspension

Ces absorptions se font contre le gradient de concentration.

Le tableau I présente un résumé comparatif des caractéristiques de ces absorptions. Les figures 3, 4, 5 et 6 illustrent les traits les plus marquants de celles-ci.

Tableau I

Pénétration du citrate et la L-lysine
dans des lutoïdes en suspension dans un milieu isotonique

	citrate *	L-lysine **
Vitesse de pénétration en nmoles/min, mg de protéines à 25°C à 0°C	linéaire pdt. 30 min 10 à 20 ≈ 0,5	linéaire pdt. 30 min ≈ 0,1 ≈ 0,005
Cinétique de pénétration en fonction de la concentration extérieure en substrat	Michaelienne Km ≈ 7.10 ⁻³ M (fig. 3)	Michaelienne Km ≈ 1.2 10 ⁻² M
Spécificité	Aucune inhibition par d'autres acides organiques, dont des analogues structuraux (isocitrate, tricarballoylate), n'a pu être détectée	Inhibition compétitive par l'arginine (fig. 4) avec Ki ≈ 5,6 10 ⁻³ M. Aucune inhibition en présence de D-lysine ou de L-α alanine
Stimulation par l'ATP	Stimulation de 100% avec ATP 5.10 ⁻³ M. Action positive si ATP fourni en préincubation (fig. 5). Joue sur V max et non sur Km (fig. 6)	Stimulation de 40% avec ATP 2,5 10 ⁻³ M
Inhibition par 2-4 DNP	Inhibition de 50% avec 2 - 4 DNP 2.10 ⁻³ M.	Inhibition de 35% avec 2-4 DNP 10 ⁻² M.
Inhibition par NH ₄ ⁺ Cl ⁻	Aucune inhibition constatée	Inhibition de 50% avec NH ₄ ⁺ Cl ⁻ 7.10 ⁻³ M.
Inhibition par NEM	Inhibition de 50% avec NEM 5.10 ⁻³ M.	Inhibition de 40% avec NEM 10 ⁻² M.

* pour le citrate, le milieu d'incubation comprenait : mannitol 0,3 M ; TEA HCl pH 7,5, 0,1 M ; PO₄H₂K₂ 10⁻²M ; CaCl₂, 0,25 10⁻³ M ; Mg Cl₂, 2.10⁻³M ; citrate tri Na, 7,5 10⁻³M (sauf détermination de Km) ; MSH, 10⁻³ M.

** pour la L-lysine : mannitol, 0,337 M ; PO₄H₂K pH 7,0, 0,125 M ; L-lysine, 5.10⁻⁴ M.

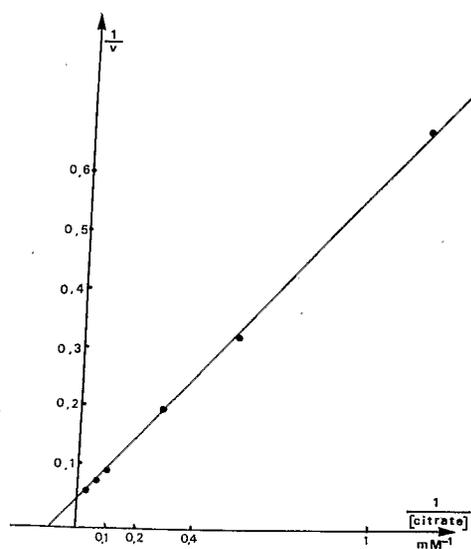


Fig. 3 Représentation de LINEWEAVER et BURK mettant en évidence la cinétique Michaelienne de la pénétration du citrate.

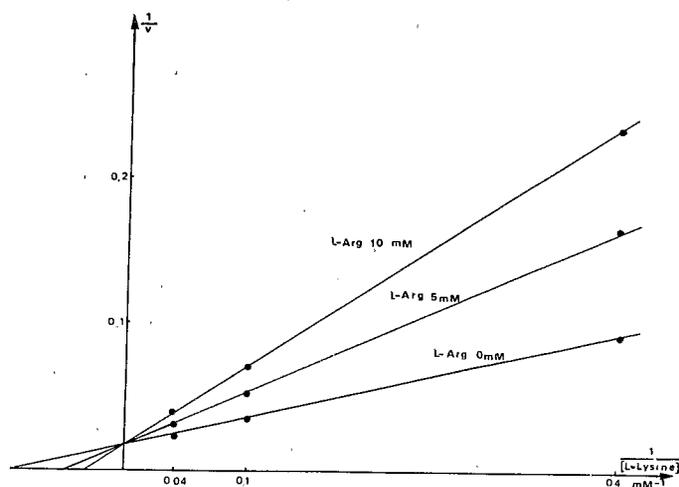


Fig. 4 Représentation de LINEWEAVER et BURK mettant en évidence l'inhibition de type "compétitif" de la L-arginine sur la pénétration de la L-lysine.

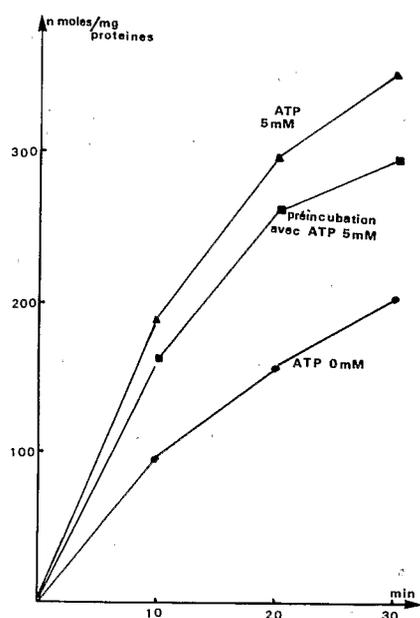


Fig. 5 Action de l'ATP sur la pénétration du citrate dans les lutoïdes en suspension. Pour le lot "préincubation", l'expérience s'est déroulée en 2 temps : incubation 30 min 25°C en présence d'ATP sans citrate ; puis, après élimination du milieu par centrifugation, 2ème incubation en absence d'ATP et en présence de citrate ^{14}C .

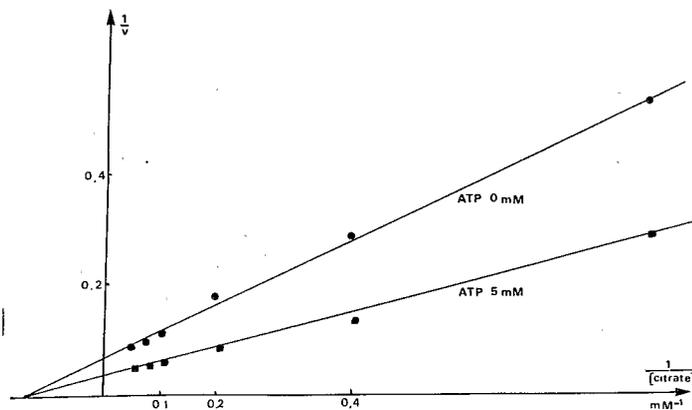


Fig. 6 Représentation de LINEWEAVER et BURK montrant que l'ATP agit sur la V_{max} et non sur le K_m .

DISCUSSION

Les faits exposés ci-dessus indiquent que deux métabolites importants, de charges électriques opposées, sont accumulés conjointement, apparemment dans un même compartiment cellulaire, et que cette accumulation paraît avoir lieu *in vitro*, à partir d'un milieu non énergétique.

I - POSSIBILITE D'UN ECHANGE ISOTOPIQUE

Il ne nous échappe pas que les données obtenues correspondent à des mesures de radioactivité et ne permettent pas de conclure s'il s'agit d'un flux net ou d'un simple échange isotopique. Des expériences de mesure d'efflux, consistant en une première incubation d'une 1/2 heure en présence de substrat radioactif, suivie d'un transfert et d'une deuxième incubation dans un milieu non radioactif, ont donné des valeurs indiquant que 85 à 95% de la radioactivité incorporée (exprimée par mg de protéines de lutoïdes intacts en fin d'expérimentation) demeuraient dans les particules. Compte tenu des erreurs intervenant dans les différentes mesures (en particulier pour le calcul de l'abaissement d'activité spécifique du métabolite dû aux quantités déjà présentes dans le compartiment lutoïdique), les 5 à 15% rendant compte des quantités apparemment perdues ne sont pas significatifs. Il ne nous a donc pas été possible de conclure valablement sur les mesures d'efflux.

Plusieurs arguments s'opposent à ce que les mesures de la radioactivité incorporée rendent compte d'un simple échange isotopique, résultant d'une diffusion, pouvant avoir lieu, par exemple, à travers des pores transitoires formés lors de l'agitation thermique.

- a) Un tel mécanisme entraînerait l'affaîssement des gradients de concentration.
- b) Les connaissances que l'on possède concernant la structure physico-chimique des membranes biologiques semblent exclure la constitution de pores dont le diamètre permettrait le passage diffusif de molécules aussi volumineuses que le citrate ou la lysine (SCHECHTER, communication personnelle).
- c) Un tel mécanisme ne pourrait expliquer la spécificité des phénomènes observés.

II - ROLE DU GRADIENT DE PH

L'interprétation par un simple échange isotopique nous paraissant peu probable, il est nécessaire de rendre compte de l'influx de métabolites de charges électriques opposées, se faisant dans un milieu dépourvu d'aliment énergétique, contre le gradient de concentration.

L'énergie nécessaire à ce transport pourrait avoir été stockée lors de la vie antérieure des lutoïdes *in situ*. L'apport d'ATP, qui paraît avoir un rôle indirect (expériences de préincubation fig. 5), assurerait un complément d'énergie. Des faits précis semblent indiquer que le gradient de protons existant entre les 2 compartiments puisse correspondre à cette énergie stockée.

Tableau II

Cinétique de variation du pH intralutoïdique, lors d'une incubation en présence d'un milieu à $5 \cdot 10^{-3}$ M d'ATP.

Durée d'incubation	0	5 mn	20 mn	30 mn
pH intralutoïdique	6,18	6,08	5,81	5,81

L'un de nous (LAMBERT, 1975) a montré qu'une incubation de 30 mn à 30°C dans un milieu isotonique, TEA 0,1 M pH 7, sans citrate et en présence d'ATP $5 \cdot 10^{-3}$ M, abaisse le pH du sérum lutoïdique de plusieurs dixièmes d'unité (tableau II). Les lutoïdes placés dans des conditions identiques sans ATP conservent un pH voisin de 6,2.

Le tableau III, établi lors des mesures de pénétration de la L-lysine, met en évidence une corrélation positive nette entre la différence de pH entre les 2 compartiments et la vitesse de pénétration de la lysine (cf tableau I).

Tableau III

Différence de pH après 30 minutes d'incubation à 25°C entre milieu extra lutoïdique, naturel ou artificiel, et sérum intralutoïdique, en présence de différents effecteurs dans le milieu extralutoïdique.

Milieu extralutoïdique	pH	pH Sérum intra lutoïdique	Δ pH
Sérum cytoplasmique	6,80	5,58	1,22
" "	6,87	5,62	1,25
Milieu de base seul	7,00	6,03	0,97
" "	7,00	5,99	1,01
" " + ATP 5 10 ⁻³ M	7,00	5,92	1,08
" " + ATP 5 10 ⁻³ M	7,00	5,95	1,05
" " + NH ₄ Cl 2,5 10 ⁻² M	7,00	6,38	0,62
" " + NH ₄ Cl 2,5 10 ⁻² M	7,00	6,58	0,42
" " + 2-4 DNP 2 10 ⁻² M	7,00	6,28	0,72
" " + 2-4 DNP 2 10 ⁻² M	7,00	6,30	0,70

L'ATP paraît à lui seul capable de faire fonctionner le mécanisme provoquant ce gradient de pH. D'autre part, l'existence de systèmes transporteurs d'électrons liés à la membrane lutoïdique (cf. d'AUZAC *et al.*, 1976, 2ème communication présentée à ce colloque) peut également rendre compte, selon un processus correspondant à la théorie de MITCHELL, de la création de ce gradient de pH.

Il ne nous échappe pas que des difficultés subsistent à cette interprétation. NH₄⁺ Cl⁻, connu comme détruisant les gradients de pH, est sans action sur l'influx de citrate alors qu'il inhibe celui de L-lysine. Le 2 - 4 DNP, connu également comme destructeur de ces gradients, n'est que très modérément actif et ce à des concentrations élevées.

Des expériences en cours tentent d'approfondir cette relation entre influx et gradient de pH.

III - SPECIFICITE DES SYSTEMES DE TRANSPORT

Si le tableau I souligne que les pénétrations respectives du citrate et de la L-lysine présentent de nombreuses caractéristiques communes, il existe cependant des différences notables.

- a) La vitesse de pénétration est beaucoup plus élevée pour l'anion que pour le cation.
- b) NH₄⁺ Cl⁻ inhibe la pénétration du cation et non celle de l'anion.
- c) La spécificité est apparemment très étroite pour la pénétration du citrate ; elle paraît liée aux L-amino-acides basiques pour celle de la lysine.

Ces différences amènent à la conclusion de l'existence de systèmes de transport, de spécificité élevée, localisées sur les membranes des lutoïdes. Elles constituent un argument supplémentaire pour exclure le simple échange isotopique de l'interprétation des données présentées.

Temporairement, nous proposons l'interprétation suivante. Sur la membrane lutoïdique, se trouveraient localisés :

- a) une pompe à protons assurant le gradient de pH ;
- b) un système spécifique de transport des acides aminés basiques, pouvant fonctionner par échange entre 1 proton et une mole d'acide aminé ;
- c) un système spécifique de transport du citrate, dont le fonctionnement nécessiterait une "énergisation" pouvant être effectuée par l'ATP. L'acidité du compartiment lutoïdique pourrait piéger le citrate intérieur sous forme de molécules moins ionisées.

IV - POSSIBILITE DE GENERALISATION AUX AUTRES SYSTEMES VACUOLAIRES

L'accumulation, et même le piégeage, de l'ion citrate dans les vacuoles des cellules est un phénomène assez répandu. Ainsi les fruits accumulant l'acide citrique (agrumes, groseilles etc...)

conservent ce métabolite au cours de leur maturation et ne manifestent pas de "crise climactérique" de respiration (PEYNAUD, 1946 ; KROTKOV *et al.*, 1951) contrairement aux fruits accumulant de l'acide malique (pommes, poires, raisins, etc..) (KIDD, 1935 ; HULME *et al.*, 1958 ; HULME *et al.*, 1957). Ce fait s'interprète par le piégeage du citrate dans les vacuoles alors que le malate peut franchir la membrane vacuolaire (fait vérifié à propos des lutoïdes du latex), son métabolisme dans le cytoplasme rendant compte de la phase climactérique.

L'assimilation, au compartiment vacuolaire des cellules végétales, du compartiment lutoïdique, de contenu acide, accumulant le citrate et d'autres éléments, fixant le rouge neutre, nous paraît donc posséder des bases sérieuses.

Ces travaux ont bénéficié d'une aide de la DGRST (N° 72-7-0229 et 74-7-0396). Nous remercions l'Institut de Recherche sur le caoutchouc en Afrique (IRCA) pour l'obtention du latex.

REFERENCES

1. - ARCHER B.L. et Mc. MULLEN A.J., (1960) *Proc. Nat. Rubb. Res. Conf.* Kuala Lumpur, 787-795.
2. - d'AUZAC J. et LIORET C., (1974) *Physiol. Végét.*, 12, 617-695.
3. - d'AUZAC J., DUPONT J., JACOB J.L., LANCE C., MARIN B. et MOREAU F., (1976) dans ce volume p.
4. - BRZOZOWSKA J., HANOWER P. et CHEZEAU R., (1974) *Experientia*, 30, 894-896.
5. - COUPE M. et d'AUZAC J., (1974) *Physiol. Végét.*, 12, 1-11.
6. - DICKENSON P.B., (1965) *Proc. Nat. Rubb. Prod. Res. Ass. Jubilee Conf.*, Cambridge (Mac. LAREN and sons Ltd, London), 52-56.
7. - DICKENSON P.B., (1969) *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, 534-539.
8. - HOMANS L.N.S. et VAN GILS G.E., (1948) *Proceed. Sec. Rubb. Technol. Conf.*, Londres, 292-302.
9. - HULME A.C. et NEAL G.E., (1957) *Nature*, 179, 1193.
10. - HULME A.C. et WOOLTORTON L.S.C., (1958) *J. Sci. Food. Agr.*, 9, 150-158.
11. - JACOB J.L., (1970) *Physiol. Végét.*, 8, 395-411.
12. - KIDD F., (1935) *Nature*, 135, 326.
13. - KROTKOV G., WILSON D.G. et STREET R.W., (1951) *Can. J. Botany*, 29, 79-90.
14. - LAMBERT C., (1975) *C.R. Acad. Sci.*, Série D, 281, 1705-1708.
15. - PEYNAUD E., (1946) "*Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins*" Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux.
16. - PUJARNISCLE S., (1968) *Physiol. Végét.*, 6, 27-46.
17. - PUJARNISCLE S., (1969) *Physiol. Végét.*, 7, 391-403.
18. - RIBAILLIER D., (1972) "*Quelques aspects du rôle des lutoïdes dans la physiologie de l'écoulement du latex d'Hevea brasiliensis (Kunth) Mill Arg. Action de produits libérant l'éthylène.*" Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Abidjan (Côte d'Ivoire).
19. - RIBAILLIER D., JACOB J.L. et d'AUZAC J., (1971) *Physiol. Végét.*, 9, 423-437.
20. - RUINEN J. et DE HAAN-HOMANS L.N.S., (1950) *Arch. Rubbercult.*, 27, 243-253.
21. - SOUTHERN W.A., (1960) *Proc. Nat. Rubb. Res. Conf.*, Kuala Lumpur, 766-776.
22. - WIERSUM L.K., (1957) *Vakbl. Biol.*, 37, 17-37.