

2 - 4 - 3
**Transfert d'électrons dans la membrane des lutoïdes
 du latex d'*Hevea brasiliensis***
 F. Moreau

Electron transfer in the lutoïd membrane

*An NADH-cytochrome c oxydoreductase (E.C. 1.6.99.3.) has been shown to exist inside the lutoïd membranes of the latex of *Hevea brasiliensis*. It is not sensitive to antimyicine and cannot function with NADPH. Potassium ferricyanide can replace cytochrome c as an acceptor of electrons.*

It has been possible, by means of differential absorption spectrophotometry, to characterise at least two type b cytochrome in the same membranes. One, known as cytochrome b 563 is partially reduced by NADH but not by NADPH. The other, known as cytochrome b 561 is only reduced by hydrosulphite. No traces of cytochrome P 450 were detected.

The part played by these molecules in their biological context is discussed.

★

Le latex d'*Hevea brasiliensis* peut être considéré comme un véritable cytoplasme (1). Il contient notamment, outre des particules de caoutchouc, différents organites cellulaires parmi lesquels les lutoïdes sont les éléments les plus importants. Ces lutoïdes montrent de grandes analogies de propriétés enzymatiques avec les lysosomes animaux, de sorte qu'actuellement ils sont généralement considérés comme de véritables phytolyosomes (2). Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur la membrane propre de ces organites dont le rôle dans la biochimie des cellules laticifères ou la biosynthèse des constituants isopréniques n'a pas encore été clairement établi.

Dans ce bref rapport, nous résumons un certain nombre de résultats concernant la mise en évidence dans la membrane des lutoïdes d'une NADH deshydrogénase (NADH-cytochrome c oxydoréductase) (E.C. 1.6.99.3.) associée à un système de transport d'électron comprenant des cytochromes de type b (3).

Les lutoïdes ont été préparés à partir du latex par centrifugation sur gradient discontinu de densité de saccharose. Le profil obtenu est illustré dans la figure 1.

(1) A. I. Mc MULLEN - *Biochem. J.*, 85, 491-495, (1962).

(2) S. PUJARNISCLE - *C. R. Acad. Sci. Paris* série D, 261, 2127-2130, (1966).

(3) F. MOREAU, J.L. JACOB, J. DUPONT et C. LANCE - *Biochim., Biophys. Acta*, 396, 116-124, (1975).

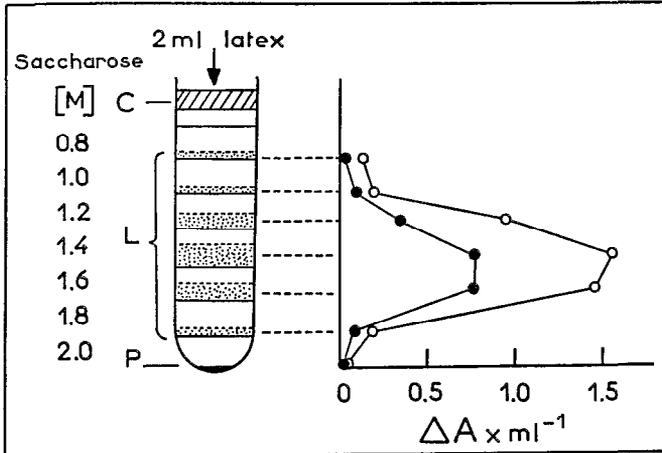


Figure 1

Distribution des lutoïdes et de différentes activités enzymatiques après centrifugation du latex d'*Hevea brasiliensis* (clone PR 107) sur gradient de densité de saccharose (80 000 g x 120 minutes)

○—○ : phosphatase acide - ●—● : NADH-cytochrome c oxydoréductase - C : couche de caoutchouc au sommet du gradient de densité après centrifugation - L : lutoïdes ; les diverses fractions sont récupérées et diluées dans un volume identique - P : précipité de débris cellulaires - ΔA : accroissement d'absorption, mesuré pour chaque activité enzymatique et rapporté à 1 ml de suspension diluée de lutoïdes. La phosphatase acide est mesurée par l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate à 400 nm (4). La NADH-cytochrome c réductase est mesurée par la réduction du cytochrome c à 550 nm (3).

Cette distribution, fortement dépendante de l'origine clonale du latex, indique ainsi une très grande variation dans la densité de ces organites. Cependant, les fractions les plus importantes se trouvent au sommet des couches de saccharose ; 1,4 ; 1,6 ; 1,8 M, comme le montre la distribution de l'activité phosphatase acide, utilisée comme marqueur enzymatique de ces organites.

La distribution de l'activité NADH-cytochrome c réductase est rigoureusement parallèle à celle de la phosphatase acide, ce qui implique que cette activité d'oxydoréduction se trouve étroitement associée avec les particules de lutoïdes. En outre, la séparation de la membrane des lutoïdes et du sérum lutoïdique, obtenue en soumettant des organites intacts à un choc osmotique hypotonique qui les fait éclater, a permis de préciser que l'activité NADH-cytochrome c réductase est exclusivement membranaire. D'autre part, cette activité est insensible à l'antimycine. Elle est spécifique pour le NADH, le NADPH n'étant rigoureusement pas oxydé. Par contre, le ferricyanure de potassium peut être substitué au cytochrome c comme accepteur d'électrons.

(4) J.L. JACOB - *Physiol. vég.*, 8, 395-411, (1970).

La spectrophotométrie d'absorption différentielle à température ambiante (25°C) ou à celle de l'azote liquide (-196°C), a permis de préciser la nature des transporteurs d'électrons qui se trouvent impliqués dans l'activité NADH-cytochrome c réductase de la membrane des lutoïdes.

La figure 2 illustre les types de spectres obtenus qui permettent de caractériser au moins deux cytochromes de type b. Ces cytochromes ont été définis d'après leurs maximums d'absorption dans la région *a*, sur les spectres réalisés à la température ordinaire. Le cytochrome b_{563} est partiellement réduit par le NADH, mais non par le NADPH, et présente une bande *a* dédoublée (555 + 561 nm) à basse température (Figure 2b). Ce cytochrome participe au transfert d'électrons du NADH au cytochrome c exogène. Un second cytochrome

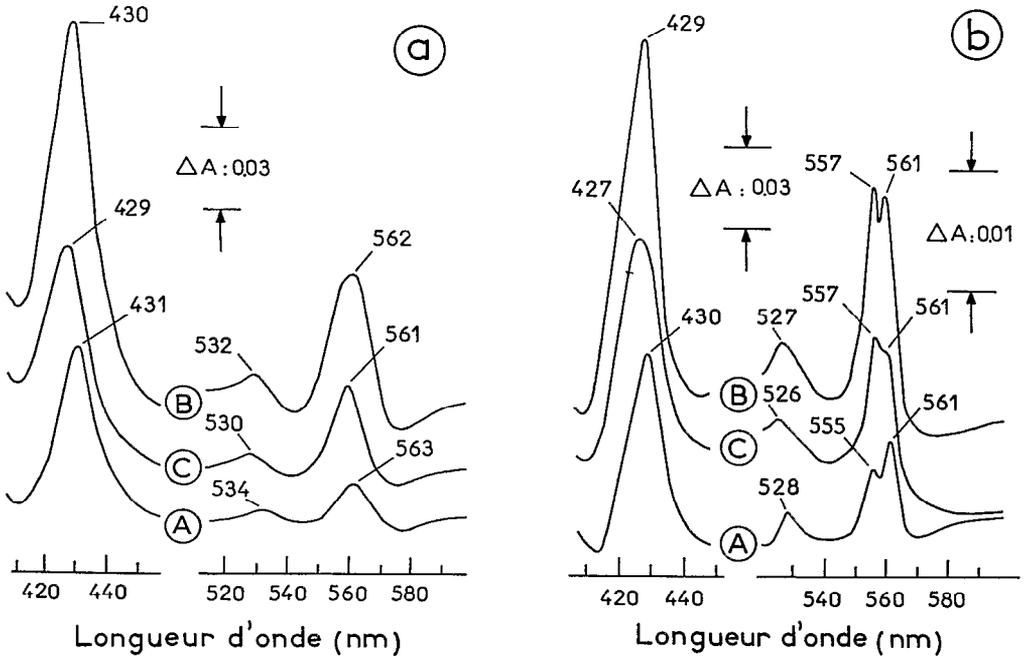


Figure 2

Spectres d'absorption différentielle (réduit moins oxydé) à température ambiante (25°C) et à basse température (-196°C) de membranes lutoïdiques du latex d'*H. brasiliensis*

Les membranes des lutoïdes sont préparées par addition aux organites intacts de 10 fois leur volume de tampon phosphate 3 mM (pH 7,2), agitation à 4°C durant 30 minutes et centrifugation à 90000 g pendant 30 minutes. Les culots de membranes sont lavés et centrifugés de la même façon.

a - Spectres à température ordinaire : 3 mg/ml de membranes dans un tampon phosphate

10 mM (pH 7,2) sont placés dans des cuves de 3 ml et de 10 mm de trajet optique. L'état oxydé est obtenu par barbotage de O_2 durant 1 minute. L'état réduit est obtenu par addition d'un excès de NADH ou de quelques cristaux d'hydrosulfite. A : NADH moins O_2 ; B : hydrosulfite moins O_2 ; C : Hydrosulfite moins NADH.

b - Spectres à basse température : mêmes conditions que précédemment sauf que des cellules en plexiglas de 1 ml et de 2mm de trajet optique sont utilisées.

appelé b_{561} (bande a à 557 nm avec un épaulement à 561 nm à basse température) est réduit seulement par l'hydrosulfite. De ce fait, son rôle reste quelque peu mystérieux. Enfin, à l'état réduit, ces cytochromes ne se combinent pas avec le CO. En conséquence, l'existence de cytochrome P_{450} ne peut être démontrée.

En conclusion, un système de transports d'électrons : NADH + cytochrome b_{563} réductase, est présent dans les membranes des lutoïdes, ainsi qu'un autre cytochrome b, réductible seulement par l'hydrosulfite. Un tel système peut être rapproché du complexe NADH + cytochrome b_5 réductase des microsomes animaux et végétaux (5) (6). De plus, chez ces derniers, des cytochromes b, réductibles par l'hydrosulfite seulement, ont été décrits. En revanche, les membranes lutoïdiques semblent se distinguer radicalement des membranes microsomales par l'absence de système NADPH + cytochrome P_{450} réductase qui, très généralement, est associé au complexe NADH + cytochrome b_5 .

Enfin, la grande spécificité vis-à-vis du NADH du système de transport d'électrons de la membrane des lutoïdes suggère que ce système puisse jouer un rôle dans l'équilibre des pyridines nucléotides à l'intérieur des laticifères, notamment en éliminant l'excès de NADH, condition indispensable à la synthèse des constituants polyisopréniques.

★

(5) STRITTMATTER, P. et VELICK, S.F. - *J. Biol. Chem.*, 228, 785-799, (1957).

(6) RICH, R.P. et BENDALL, D.S. - *Eur. J. Biochem.*, 55, 333-341, (1975).