

Etude électrophysiologique des laticifères d'*hévéa brasiliensis* : effet du glucose et du saccharose

M. Monestier⁽²⁾, D. Cornel⁽²⁾, R. Lacrotte⁽¹⁾, H. Chrestin⁽³⁾,
U. Bousquet⁽²⁾, J. d'Auzac⁽⁴⁾, J.P. Rhona⁽²⁾

De nombreuses preuves expérimentales indiquent que le saccharose apporté aux vaisseaux laticifères est rapidement utilisé pour synthétiser le polyisoprène, précurseur du caoutchouc (1-5). Dès le franchissement de la barrière plasmique des canaux laticifères, le saccharose est consommé, ce qui suggère le fonctionnement d'un mécanisme de régulation permettant l'alimentation des cellules en sucres exogènes, première étape dans la production du latex (3-6).

Dans la mesure où le transport des sucres au travers du plasmalemme s'effectue en sens contraire du gradient de concentration, leur absorption active implique une contribution énergétique provenant du métabolisme cellulaire (7).

Chez les cellules animales, la stratégie généralement suivie est l'absorption

active des sucres couplée à un influx passif net de Na⁺ (symport sucre/Na⁺). Ce processus est énergétiquement régulé par le fonctionnement de la Mg-K-ATPase pompe Na⁺K⁺, excréant le sodium à l'extérieur des cellules (8-11).

Dans le cas de la membrane plasmique des cellules végétales, c'est le transport couplé sucre/H⁺ qui est le plus souvent décrit pour expliquer le mécanisme de l'absorption active du glucose et du saccharose exogène (12-18).

Le couplage strict protons/sucres implique que l'intensité de l'influx cytoplasmique en sucres soit énergisé par le gradient de protons transplasmalemmes.

L'importance du gradient de H⁺ au travers de la membrane cytoplasmique est liée à la concentration locale en protons à la surface du plasmalemme.

La capacité énergétique de ce gradient résulte essentiellement de l'activité de la Mg-K-ATPase pompe à protons située sur le plasmalemme des cellules (19-20).

L'absorption des sucres se concrétise par un influx net de protons au travers du symport protons/sucres (Fig. 1) : son fonctionnement est révélé par une dépolarisation du plasmalemme pouvant atteindre plusieurs dizaines de millivolts (13, 21, 22).

Chez les cellules laticifères, une dépolarisation rapide consécutive à l'apport de sucre pourrait donc être un bon indice de la présence de symports protons/sucres (glucose et saccharose) entretenus par l'activité de la pompe H⁺. Si l'existence d'un tel mécanisme de régulation est présent chez l'hévéa (23), son étude approfondie permettra de mieux cerner les étapes physiologiques conduisant à la synthèse du polyisoprène et, ainsi, tenter d'en influencer la production.

MATERIELS & METHODES

Matériel biologique

Les échantillons sont prélevés sur des rameaux provenant de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* âgés d'environ 4 mois. La cuticule épidermique de la préparation (1 x 5 mm) est ôtée pour faciliter l'insertion de la microélectrode de mesure dans la première couche cellulaire.

La microscopie en contraste de phase interférentiel de Nomarsky, permet d'observer aisément les canaux laticifères, grâce à la forte réfringence des granulations de latex (Fig. 2) : la longueur des vaisseaux varie de 100 µ à 400 µ selon les coupes. Les cellules adjacentes sont de taille réduite et sont parfois pigmentées d'anthocyanes.

(1) Irca-MRS BP 1536 Abidjan 01 (Côte-d'Ivoire).

(2) Université Paris 7, Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes, 2, place Jussieu, 75231 Paris Cedex 05, France.

(3) Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales, Centre Orstom d'Adiopodoumé BP V-51, Abidjan 01, Côte-d'Ivoire.

(4) Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Laboratoire de Physiologie Végétale et Appliquée, Place Eugène Bataillon, 34060 Montpellier Cedex, France.

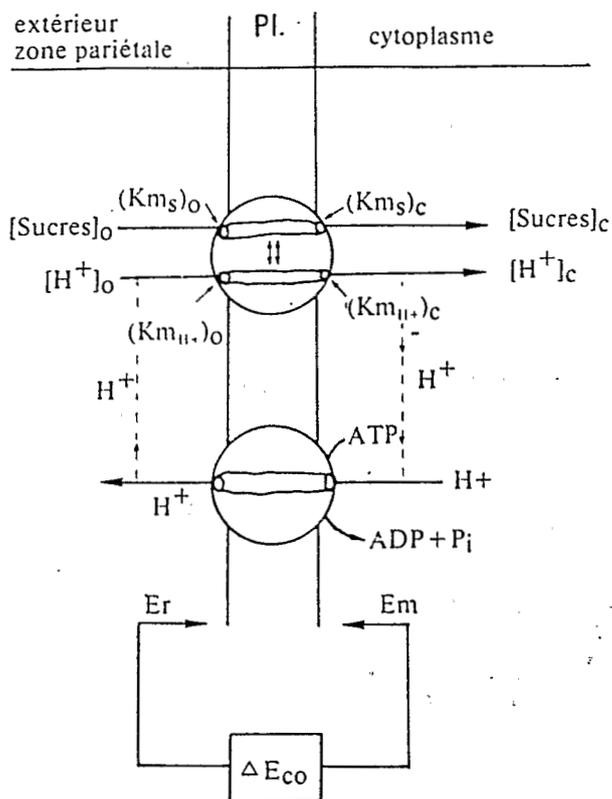


Figure 1: Modèle proposé pour un symport protons / sucres situé sur le plasmalemme, et son couplage énergétique avec la Mg-ATPase pompe à protons (---); Km constante de Michaelis: $(Kms)_o < (Kms)_c$ avec $[sucres]_o < [sucres]_c$ et $(KmH^+)_o = (KmH^+)_c$ avec $[H^+]_o > [H^+]_c$; Em et Er: électrodes de mesure et de référence; Eco: variation de ddp transplasmalemme lors du fonctionnement du symport (ici dépolarisation); ---: indique le couplage entre les deux influx cytoplasmiques.

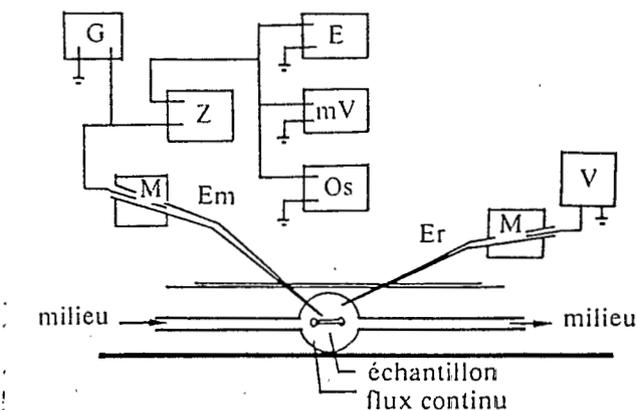
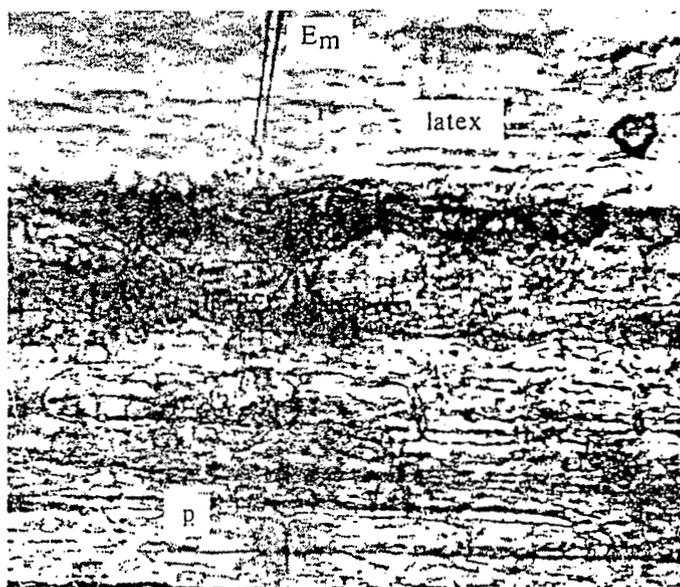


Figure 3: Schéma du circuit utilisé pour les mesures électriques en flux continu (0,75 ml / min.); Em et Er microélectrodes de mesure et de référence; M: micro-manipulateurs; Os: oscilloscope; E: enregistreur; mV: millivoltmètre; V: unité de calibration; Z: électromètre (Axoclamp 2A); G: générateur d'impulsions.

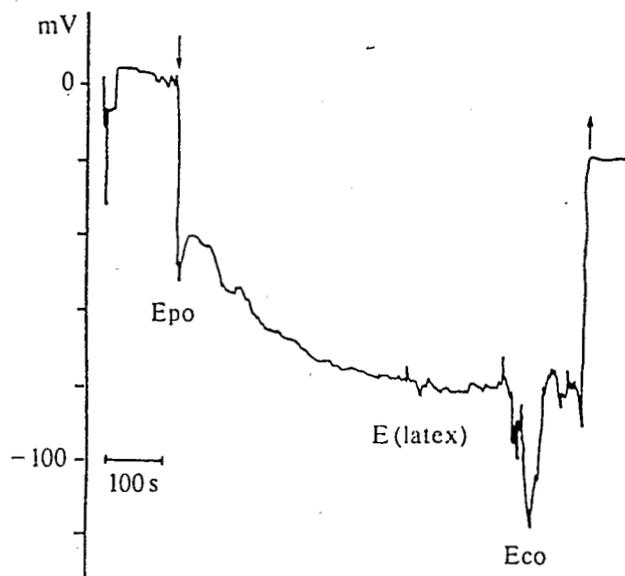


Figure 4: Profil électrique obtenu sur une cellule de latex anastomosée par percement de part en part (E: différence de potentiel électrique; o: milieu extérieur, p: paroi, c: cytoplasme, v: vacuole).

Figure 2: Photo montrant l'implantation d'une micro-électrode de mesure (Em) dans une cellule laticifère: P: cellule parenchymateuse.

Les fragments sont immergés dans un milieu de base simplifié. 2 heures avant les mesures électrophysiologiques (MES-Tris 5 mM, Mannitol 300 mM, CaCl_2 0.25 mM, MgCl_2 0.25 mM, pH 5.5 ou 6.5 selon les expériences). Les effecteurs sont dilués dans le milieu de base aux concentrations suivantes : orthovanadate de sodium à 400 μM , glucose à 50 mM, saccharose à 50 mM, la concentration en mannitol est de 250 mM, pour maintenir le potentiel hydrique constant. Un léger bullage assure l'aération des cellules.

Electrophysiologie

Un profil électrique témoin est d'abord réalisé à partir des cellules laticifères, à l'état stationnaire, dans le milieu de base à 20 °C (Fig. 2). L'échantillon est placé dans un volume de 100 μl de milieu et maintenu par une pâte adhésive sur une lame en verre spécialement conçue à cet effet (24-26). Les mesures sont effectuées en moins de 20 minutes, pour minimiser les phénomènes de surconcentration ionique et réduire le colmatage de la pointe de l'électrode par du latex coagulé (le colmatage augmente aux pH acides).

Par la suite, la technique du flux continu (27-28) a été adaptée aux tissus laticifères. Cette méthode autorise le renouvellement du milieu de travail par percolation et permet de tester la réversibilité d'action de certains effecteurs en maintenant l'aération du matériel (Fig. 3).

Les techniques de mesures et l'analyse des profils électriques ont été décrits par ailleurs (29-31).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Profils électriques des cellules laticifères

La figure 4 montre le tracé électrique enregistré dans un canal laticifère, à l'état stationnaire, transpercé de part en part. Dans le réseau pariétal, la conductance électrique est très élevée (> 1 milliSiemens), il se comporte comme un système de Donnan et la ddp mesurée dans cet espace, par rapport au milieu de référence, est très électro-négative (-80 mV à -90 mV).

Après le pic d'entrée lié aux contraintes pariétales, la polarisation du compartiment endocellulaire se stabilise d'abord vers -80 mV, puis évolue vers des valeurs plus négatives, au fur et à mesure de l'insertion de l'électrode dans la zone laticifère. La conductance est très faible (environ 10 nanoSiemens), ce phénomène est dû au latex coagulé colmatant la pointe et la différence de potentiel (ddp) ainsi obtenue ne peut pas être considérée comme représentative du gradient électrique transplasmalemmé. Un colmatage trop important de la pointe conduit généralement à des valeurs proches de -200 mV à -300 mV, la conductance étant proche de zéro, il n'est pas impossible que cet artefact soit dû à un effet électrostatique du caoutchouc polymérisé, qui est naturellement chargé négativement en surface (Jacob, com. personnelle).

Avant le franchissement des parois, côté opposé à la pénétration de la microélectrode, l'enregistrement pré-

sente un pic d'environ -120 mV, cette valeur semble pouvoir être attribuée à l'amplitude du gradient électrique au travers du plasmalemmé seul (Eco : cytoplasme par rapport au milieu extracellulaire).

La figure 5 illustre une succession de trois profils, enregistrés sur le même canal laticifère piqué à des endroits différents. La vitesse d'insertion de l'électrode est ici très lente, pour accéder au cytoplasme en premier. Chaque fois, la pointe de la microélectrode est maintenue immobile dans la couche cytoplasmique, on observe alors une forte polarisation du compartiment étudié (-120 mV à -150 mV). Dans le premier profil, on observe une forte instabilité du potentiel endocytosplasmique, ce phénomène artefactuel résulte d'un shunt électrique transmembranaire provoqué par la pointe de l'électrode. Les deux empacements suivants montrent que le canal laticifère se polarise normalement à une valeur stable.

En comparaison avec les cellules précédentes, des mesures de potentiels transmembranaires effectuées sur les cellules du parenchyme (Fig. 6) donnent des valeurs variant entre -49 mV et -80 mV (électrode insérée dans la vacuole centrale). Enfin, la figure 7 donne l'exemple type d'un profil de cellule laticifère, suffisamment stable dans le temps pour tenter d'étudier les épiphénomènes électriques liés au fonctionnement du symport sucres/protons.

Etude en milieu renouvelé

L'amplitude du gradient électrique transplasmalemmé des vaisseaux laticifères

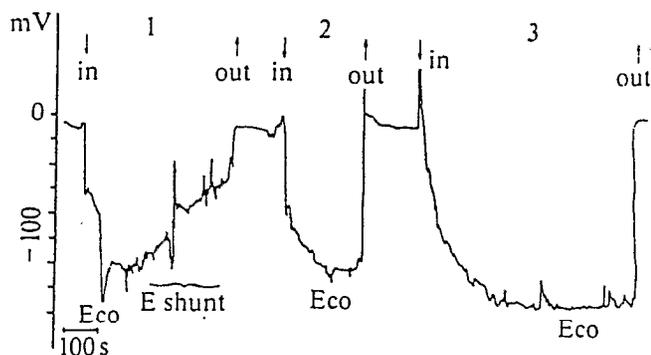


Figure 5: Potentiels transmembranaires successifs (Eco) enregistrés sur une même cellule laticifère en suspension dans le milieu de base (pH : 6,5). E shunt : court circuit électrique à travers le plasmalemmé dans la première mesure.

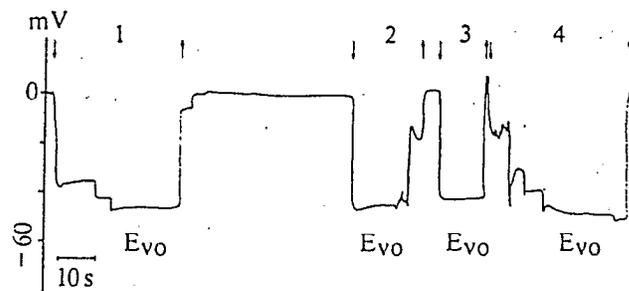


Figure 6: Profils électriques de cellules de parenchyme; la microélectrode de mesure a franchi successivement quatre couches cellulaires; Evo : différences de potentiel entre l'intérieur de la vacuole et le milieu extérieur.

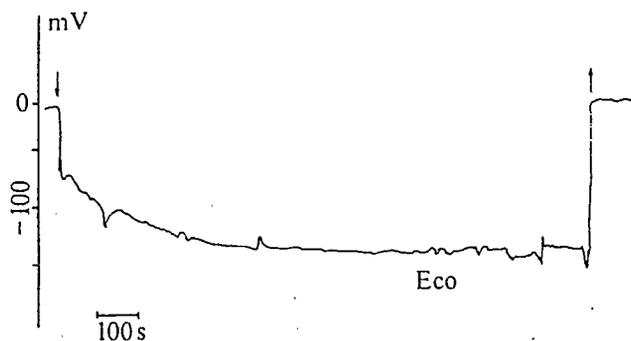


Figure 7: Stabilité du profil électrique transplasmalemme d'une cellule laticifère.

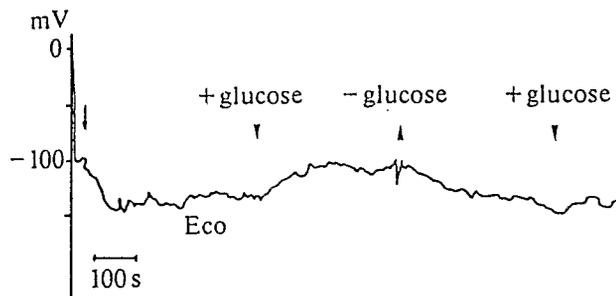


Figure 9: Dépolarisation réversible induite par le glucose (50 mM); Eco: gradient électrique à travers le plasmalemme d'une cellule laticifère.

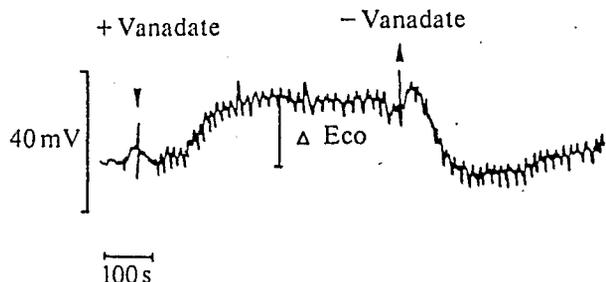


Figure 8: Dépolarisation réversible induite par le Na-orthovanadate (400 μ m), Δ Eco: variation de l'amplitude du gradient électrique à travers le plasmalemme lors de l'action du vanadate.

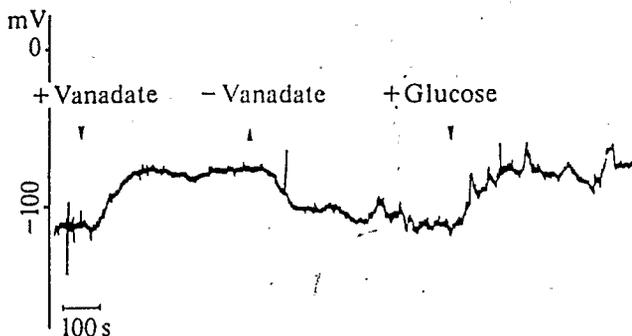


Figure 10: Effets successifs du vanadate (400 μ m) et du glucose (50 mM) sur le plasmalemme d'une cellule laticifère.

cifères varie peu par rapport aux résultats précédents, une fois la percolation mise en place (Eco est compris entre -110 mV et -140 mV).

Effet du vanadate

Le vanadate bloque le fonctionnement de la pompe à protons située sur les membranes plasmiques (32-34). Dans la mesure où un couplage énergétique relie le comportement électrique de la pompe aux forces activant le transport couplé sucre/protons, l'évaluation de l'amplitude de la composante électrogène créée par l'excrétion des H^+ , peut être un bon indice de sa capacité à fournir des protons au symport.

Ainsi, la figure 8 montre un exemple de l'effet dépolarisant du vanadate sur une cellule laticifère à l'état stationnaire, dans le milieu de base. L'amplitude de la dépolarisation est d'environ 20 mV à 30 mV. La variation de potentiel apparaît en moins de 2 min

en présence de l'effecteur. l'effet du vanadate est très reproductible d'une cellule à l'autre. La disparition du vanadate du milieu entraîne la restitution du potentiel de membrane à sa valeur de départ.

Effet du glucose

La présence de glucose (50 mM) dans le milieu de base à pH 6.5 dépolarise rapidement les cellules laticifères d'environ 20 mV à 30 mV, les cellules se repolarisent en moins d'une minute avec la suppression du glucose du milieu extérieur (fig. 9). La figure 10 montre l'effet réversible du vanadate déjà décrit ci-dessus, suivi d'un effet glucose. On constate que le test préalable avec le vanadate n'affecte pas l'effet dépolarisant du glucose. L'amplitude de cette dépolarisation est du même ordre de grandeur que celle mesurée sans effet vanadate. On peut admettre que le gradient de protons

créé par la pompe en fonctionnement a été rapidement réalimenté après son blocage par le vanadate.

Effet du saccharose

La figure 11 montre que l'effet dépolarisant du saccharose (50 mM) est réversible, comme pour le glucose et le vanadate. La dépolarisation n'est pas décelée au niveau du plasmalemme si les cellules sont à leur potentiel de diffusion (composante électrogène très faible ou masquée). Cette figure montre aussi que les trois effets dépolarisants décrits peuvent être observés consécutivement sur la même cellule. Dans ces conditions, la vitesse de dépolarisation et l'amplitude de la variation de potentiel sont très voisines, ceci suggère que le mécanisme impliqué est commun (par la modification en amont et en aval de l'amplitude du gradient transplasmalemme de protons).

CONCLUSION

Ce travail préliminaire, mené sur les canaux laticifères de l'*Hevea brasiliensis* montre que les vaisseaux laticifères sont accessibles à l'investigation électrophysiologique.

La robustesse des cellules laticifères permet des enregistrements électrophysiologiques de longue durée en flux continu.

L'absence de vacuoles centrales des cellules laticifères élimine de la mesure électrophysiologique la composante électropositive du tonoplaste habituellement présente dans les cellules végétales (25). Toutefois, le latex tend à se coaguler au contact de la pointe de la microélectrode et peut entraîner des artefacts de mesure dont il convient de tenir compte (surtout aux pH acides).

La polarisation du plasmalemme (en moyenne de -140 mV) est de l'ordre de grandeur des potentiels mesurés chez d'autres cellules végétales (35). Une composante électrogène est mise en évidence: elle est de l'ordre de -20 mV à -30 mV, selon le canal laticifère étudié et de l'amplitude initiale de son potentiel de membrane.

Le glucose, comme le saccharose, provoque un effet dépolarisant (entre 10 et 30 mV) qui varie selon l'état physiologique des cellules. La variation de la polarisation semble corrélée à la variation de l'électrogénicité de la pompe d'excrétion de protons. Ces premiers résultats sont en faveur de l'hypothèse de l'existence d'un ou plusieurs symports de type sucre/ H^+ , alimentant les vaisseaux en glucose et saccharose. Ce transport secondaire serait lié au fonctionnement de la Mg-ATPase pompe à protons (mécanisme énergétique primaire). Toutefois, dans l'état actuel du travail, nous n'avons pas d'indications précises sur la sélectivité du (ou des) symport(s) vis-à-vis des différents sucres et de la stoechiométrie du (ou des) mécanisme(s) en jeu.

Bibliographie

(1) F. Lynen (1969) J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 21, 389-406.

(2) J. Tupy (1969) - Stimulatory effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic and 1-naphthylacetic acids on sucrose level, invertase activity, and sucrose utilization in the latex of *Hevea brasiliensis*. Planta, 88, 144-153.

(3) J. Tupy. (1973) - The sucrose mobilizing effect of auxins in *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. dependence on the metabolic activity of the treated tissue. Physiol. Veg. 11, 13-23.

(4) J.M. Eschbach, D. Roussel, H. Van De Sype, J.L. Jacob & D'Auzac, (1984) - Relationships between yield and clonal physiological characteristics of latex from *Hevea brasiliensis*. Physiol. Vég. 22, 295-304.

(5) R. Lacrotte, H. Van de Sype & H. Chrestin, (1984) - In C.R. Coll.

cating proteins in model membrane systems. Ann. Rev. Physiol. 39, 19-49.

(11) J.B. Finean, R. Coleman, R.H. Michell. (1978) - Membranes and their cellular functions. 2d Ed. London: Blackwell. pp. 42-67.

(12) E. Komor (1973) - Proton coupled hexose transport in *Chlorella vulgaris*. FEBS Lett. 38, 16-18.

(13) C.L. Slayman & C.W. Slayman. (1974) - Depolarization of the plasma membrane of *Neurospora* during active transport of glucose: evidence for proton-dependent co-transport system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1935-1939.

(14) M.G.K. Jones, A. Novacky & V.H. Dropkin (1975) - Transmembrane potentials of parenchyma cells and nematode induced transfer cells. Protoplasma, 85, 15-37.

(15) E. Komor, M. Rotter & W. Tanner, (1977) - A protoncotransport system in a higher plant: sucrose transport in *Ricinus communis*. Plant Sci. Lett. 9, 153-162.

(16) C.I. Ullrich-Eberius, A. Novacky & U. Lüttge. (1978) - Active hexose uptake in *Lemna gibba* Gl. Planta, 139, 149-153.

(17) S. Delrot et J.P. Bonnemain (1981) - Involvement of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. Plant Physiol. 67, 560-564.

(18) T. Humphreys. (1983) - Proton electrochemical gradients and sucrose accumulation in the maize scutellum. Phytochemistry, Vol. 22, 12, 2669-2674.

(19) C.W. Slayman & C.L. Slayman. (1975) - Energy coupling in the plasma membrane of *Neurospora*: ATP-dependent proton transport and proton-dependent sugar cotransport. In Molecular aspects of membrane phenomena. Kaback, H.R. et al. Springer Verlag, Berlin pp. 233-248.

(20) F. Malek & D.A. Baker (1977) - Proton co-transport of sugars in phloem loading. Planta, 135, 297-299.

(21) E. Komor & W. Tanner. (1976) - The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*. Evidence for electrogenic sugar transport. Eur. J. Biochem. 70, 197-204.

(22) R.H. Racusen & A.W. Galston. (1977) - Electrical evidence for rhythmic changes in the co-transport of sucrose and hydrogen ions in *Samanea pulvini*. Planta, 135, 57-62.

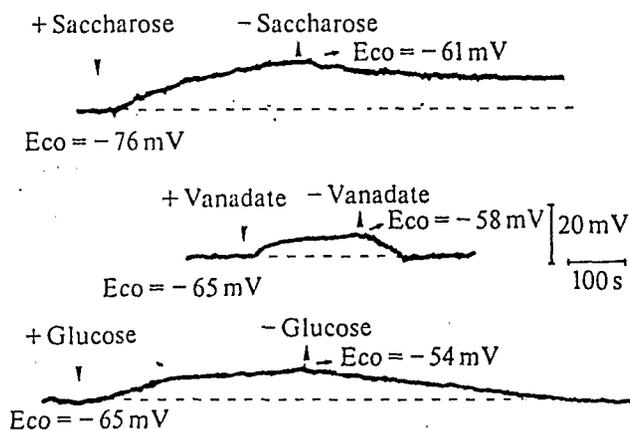


Figure 11: Effets dépolarisants successifs du saccharose (50 mM) du vanadate (400 μ M) et du glucose (50 mM) sur la même cellule. Eco: gradient électrique à travers le plasmalemme.

Exploit. Physiol. Amel. Hevea Irca Ed. 155-167.

(6) F.C. Low & J.B. Gomez. (1982) - J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 30, 1-18.

(7) J. D'Auzac (1988) - Transmembrane transports mechanisms. Application to the laticiferous system. Colloque de l'IRRD, Hevea 88, Ed. J.L. Jacob et J.C. Prévot, Irca-Cirad, 73-89.

(8) A.L. Finn. (1976) - Changing concepts of trans epithelial sodium transport. Physiol. Rev. 56, 453-464.

(9) R.D. Keynes (1969) - From frog skin to sheep rumen: a survey of transport of salts and water across multicellular structure. Q. Rev. Biophys. 2, 177-281.

(10) J.I. Korenbrot (1977) - Ion transport in membrane transport incorporation of biological ion-translo-

- (23) R. Lacrotte, (1987) - IRCA rapport interne.
- (24) J.P. Rona, G. Van De Sype, D. Cornel, C. Grignon & R. Heller, (1980a) - Plasmolysis effect on electrical characteristics of free cells and protoplasts of *Acer pseudoplatanus* L. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 7, 377-391.
- (25) J.P. Rona & D. Cornel, (1985) - An electrogenic proton pump on the tonoplast of *Acer pseudoplatanus*, L. free cells and isolated vacuoles. - In : B. Marin Ed. : *Biochemistry and Function of Vacuolar Adenosine Triphosphatase in Fungi and Plants*. Springer Verlag, Berlin.
- (26) C. Tamponnet, J.P. Rona, J.N. Barbotin & R. Calvayrac (1988) - Effects of high external calcium concentrations on etiolated *Euglene gracilis* Z. cells and evidence of an internal membrane potential. *Biochem. Biophys. Acta.* 943, 87-94.
- (27) J. Takeda, S. Abe, H. Morikawa & M. Senda, (1983) - Membrane potentials of heterotrophically cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.*, 24, 667-676.
- (28) M. Hofer & A. Novacky (1986) - Measurement of plasma membrane potentials of yeast cells with glass microelectrodes. *Biochem. Biophys. Acta.* 862, 372-378.
- (29) J.P. Rona, G.M. Pitman, U. Luttge & E. Ball, (1980b) - Electrochemical data on compartmentation into wall, cytoplasm and vacuole of leaf cells in the CAM genus *Kalanchoe*. *J. Membr. Biol.*, 57, 25-35.
- (30) D. Cornel, (1985) - Etude des propriétés électrophysiologiques des protoplastes et des vacuoles libres L. d'*Acer pseudoplatanus*. Thèse de Doctorat. Université Paris 7.
- (31) F. Chedhomme & J.P. Rona, (1988) - Electrical properties of tonoplast from cells and vesicles of storage Kiwi fruits. *J. Plant Physiol.* 133, 89-95.
- (32) B.J. Bowman and C.W. Slayman (1978) - The effect of vanadate on plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *Journ. of Biol. Chem.* 254, 8, 2928-2934.
- (33) I.G. Macara (1980) - Vanadium - an element in search of a role. *Trends in biochem. Sci.* 5, 92-94.
- (34) M. Cocucci, A. Ballarin-Denti & M.T. Marre, (1980) - Effects of orthovanadate on H⁺ secretion, K⁺ uptake, electric potential difference and membrane ATPase activities of higher plant tissues. *Plant Sci. Lett.* 17, 391-400.
- (35) R. Serrano (1985) - *Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.