

# THESE

D'UNIVERSITE

Présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ D'ABIDJAN

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

ABSORPTION DES ACIDES AMINÉS BASIQUES PAR LES  
LUTOÏDES DU LATEX D'*HEVEA BRASILIENSIS*

CARACTÉRISTIQUES, EFFECTEURS, RECHERCHE DE RELATIONS  
AVEC LA PRODUCTIVITÉ DES ARBRES

par

**NIAMIEN N'GORAN**

Soutenue le 23 Janvier 1982 devant la Commission d'Examen

MM. LOROUGNON Guédè Professeur **President**

DIOPH Koré Professeur

FAVRE Jean Michel Professeur

} **Examineurs**

S O M M A I R E

	pages
AVANT-PROPOS .....	1
INTRODUCTION .....	6
MATÉRIEL ET TECHNIQUE .....	14
1. RECOLTE DU LATEX .....	14
2. ISOLEMENT ET PURIFICATION DU COMPARTIMENT LUTOÏDIQUE .....	15
3. MESURE DE L'ABSORPTION .....	15
4. CHOIX DU TAMPON .....	16
5. EXPRESSION DES RESULTATS .....	16
PREMIERE PARTIE	
I. MODALITÉ DE L'ABSORPTION .....	18
1. CINETIQUE .....	18
2. INFLUENCE DU pH EXTERIEUR .....	25
3. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE .....	32
4. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EXTERNE EN ACIDE AMINE.	35
5. SPECIFICITE DE L'ABSORPTION .....	39
a). Influence réciproque Lysine-Arginine .....	39
b). Influence de la D.Lysine sur l'absorption de la L.Lysine .....	43
II. ESSAI D'EXSORPTION .....	43

## DEUXIEME PARTIE

LES EFFECTEURS .....	46
I. ACTION D'UN EFFECTEUR AGISSANT AU NIVEAU DES RÉCEPTEURS NEM .....	48
II. ACTION D'EFFECTEURS AGISSANT AU NIVEAU DU GRADIENT DE PH .....	48
A. AMPLIFICATEUR DU GRADIENT DE pH .....	48
1). L'Ethrel .....	48
2). Effet de l'ATP-Mg .....	50
a). Apporté seul .....	50
b). En présence de N N'dicyclohexyl-carbodiimide (DCCD) .....	53
B. ANNULATEURS DU GRADIENT DE pH .....	55

## TROISIEME PARTIE

RELATION ENTRE L'ABSORPTION LUTOÏDIQUE DES ACIDES AMINÉS ET LA PRODUCTION .....	58
I. MESURES EFFECTUEES SUR DES LUTOIDES MIS A INCUBER DANS UN MILIEU TAMPONNE ARTIFICIEL .....	59
1). Vérification de l'existence d'une corrélation entre $\Delta$ pH et production .....	59
2). Recherche d'une corrélation entre l'absorption lutoïdique de l'Arginine et de la Lysine et le $\Delta$ pH. ....	61
3). Recherche d'une corrélation entre l'absorption lutoïdique de l'Arginine et la Lysine et la Production .....	65
II. MESURES REALISEES SUR DU LATEX BRUT .....	65
CONCLUSIONS GÉNÉRALES .....	75
BIBLIOGRAPHIE .....	80

## AVANT-PROPOS

Ce mémoire de contenu modeste doit être avant tout considéré comme une contribution active au vaste programme de recherche sur le latex, confié au laboratoire de Physiologie Végétale de l'ORSTOM Centre d'Adiopodoumè dans le cadre du contrat DGRST-ORSTOM sur la membrane lutoïdique.

Je dois la réalisation de ce travail à Monsieur le Ministre J. GUEDE LOROUGNON qui a permis mon intégration dans le cadre de l'ORSTOM. Ces conseils, ces encouragements m'ont été très précieux. Il me fait l'amitié de présider mon Jury. Tout en lui adressant mes très sincères remerciements, je voudrais lui dire toute ma gratitude et le prier de bien vouloir trouver ici l'expression de mes sentiments respectueux et de ma profonde admiration.

Je sais gré au Dr. BALLA Kéita Ministre de la Recherche Scientifique qui dans ses fonctions de Directeur des Affaires Scientifiques a retenu, en commission thématique en 1976, le projet de cette thèse.

Monsieur le Professeur Guy CAMUS Directeur Général de l'ORSTOM a manifesté beaucoup d'intérêt pour la réalisation de ce travail. Il a tenu à être informé de l'évolution de celui-ci et m'a encouragé chaque fois qu'il était de passage au Centre d'Adiopodoumè. Je saisi l'occasion pour lui exprimer toute ma gratitude.

A l'heure de ce bilan, ma pensée va vers M. J.P. TONNIER ancien Directeur de l'ORSTOM en Côte d'Ivoire à qui je dois une reconnaissance infinie.

Je suis redevable également à M. le Professeur J. D'AUZAC de LAMARTINIE qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et m'enseigner les techniques indispensables à

*l'étude des phénomènes de perméabilité des membranes lutoïdiques. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes très sincères remerciements.*

*Je tiens à exprimer toute ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance à M. J.M. FAVRE Maître de Conférences à l'Université Nationale d'Abidjan. Il a suivi ce travail et guidé sa bonne marche jusqu'à sa phase finale. Ses critiques et ses remarques judicieuses m'ont été très précieuses. Il m'a apporté une aide importante pour la rédaction de ce mémoire. M. FAVRE me fait l'honneur d'être le rapporteur de mon Jury. Je voudrais lui dire combien je suis touché de cette bienveillante collaboration et lui adresse mes très sincères remerciements, remerciements qui viennent du plus profond de mon coeur.*

*Je remercie M. le Professeur DIOPH qui a bien voulu accepter de faire partie de mon Jury.*

*J'ai passé avec P. HANOWER, J. BRZOZOWSKA, H. CRETIN des années de travail passionné, dans une parfaite harmonie de pensée, animés chacun du même désir d'apporter notre contribution au développement de la Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire. Les solides relations qui nous liaient, n'étaient pas celles de maître à élèves. Il n'y avait place que pour une heureuse et confiante collaboration, nourrie par l'estime et la sympathie réciproque que nous avons les uns pour les autres. J'ai été aidé par la confiance qu'ils me témoignaient et encouragé par la chaleur de leur amitié toujours renouvelée.*

*HANOWER et BRZOZOWSKA ont initié ce travail et ils ont activement contribués à son exécution. J'ai poursuivi celui-ci en pensant à eux stimulé par la fierté de combler leur souci de formateur. J'ai trouvé auprès d'eux une aide et de précieux conseils dans les moments de flottement. Je leur dois mes contacts avec le monde scientifique Ouest-Africain. Je leur suis redevable de m'avoir permis de réaliser mon ambition. Je voudrais leur adresser ici, l'expression de mon infinie reconnaissance, et mes humbles et très sincères remerciements pour l'heureuse et enthousiaste époque passée ensemble.*

H. CRETIN qui a assuré la relève d'HANOWER et BRZOZOWSKA m'a beaucoup, sinon tout apporté dans ce travail. Il m'a largement fait bénéficier de ses hautes connaissances. Ses conseils éclairés, sa compréhension, sa disponibilité de tous les instants, malgré ses nombreuses charges de Chef de laboratoire, ses encouragements dans les moments de désespoir, m'ont permis de mener à bonne fin ce mémoire.

Les discussions que nous avons eu à plusieurs reprises, traduisaient bien l'intérêt tout particulier qui portait à mon travail. Je ne lui en serais jamais assez reconnaissant. Je regrette seulement de ne pas trouver d'expression forte et particulière pour lui signifier ce que je ressens à son égard. Je voudrais le prier de bien vouloir accepter que je lui dise, simplement, très simplement, Merci.

Je voudrais exprimer au Professeur LIORET, Président du Comité Technique de Biologie la grande sensibilité que j'éprouve, au grand honneur qu'il m'a fait en acceptant que ce mémoire soit inclus dans le cadre du programme : "Membranes biologiques. Structures et fonctions" dont il est le coordinateur.

J'adresse mes remerciements à mes premiers Maîtres VIEIRA da SILVA, S. PUJARNISCLE, D. RIBAILLER qui au sortir du Lycée Technique m'ont accepté dans leur laboratoire et inculqué leur souci de rigueur scientifique.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la précieuse et désintéressée collaboration du personnel du laboratoire de Physiologie Végétale. Merci à mes collègues techniciens, R. CHEZEAU et P. TROUSLOT, F. DOUMBIA, K. KARA, O. OUATTARA, Djè KOUASSI qui ont été magnifiques dans leur rôle d'accompagnateur. Je suis particulièrement heureux de leur rendre hommage, pour l'aide efficace qu'ils m'ont apportée dans l'exécution de ce travail.

Je ne saurais oublier mon aîné Y. KONAN, très simplement je lui dis "N'Djamo et Nacé mon frère".

M. et Mme LAGOU M. trouveront ici l'expression de toute ma reconnaissance. Leur affection communicative m'a été source de stimulant.

Ils sont nombreux à m'avoir apporté de près ou de loin leur concours et leur aide morale que j'ai hautement appréciés. Les responsables du laboratoire de Radioisotopes, et leur personnel ont rempli pleinement leur rôle. Que M. J.F. BOIS et J.C. BURGAUD soit remerciés, ainsi que le C.E.A.

J'adresse mes humbles remerciements aux chercheurs et techniciens expatriés du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé pour l'amitié toujours renouvelée qu'ils m'ont témoignée tout au long de ce travail.

Je le dis de façon toute particulière à MM. J. CLAUDAUD, P. CAPGRAS, pour avoir partagé mes problèmes matériels et apporté des solutions dans la mesure de leurs possibilités.

MM. S. DIGBEU, J. OMPLEON, P. ZADI KOUBI, G. MAI LOUHO, G. KOFFI, M. KANGA, N'DOLI, F. DIEA, L. SAWADOGO m'ont apporté leur amitié et leur sympathie. Je leur adresse ma pensée scientifique la plus sincère.

Des mains de maître, K. BONFOU et P. DAVID ont dactylographié le texte de ce mémoire. Je voudrais leur dire mon infinie reconnaissance.

Enfin, j'ai trouvé dans la présentation attentive de mon épouse et de mes enfants, une aide constante, qu'ils en soient remerciés.

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE  
TEXTE ET DANS LES SCHÉMAS

---

ATP	:	Adénosine Triphosphate
2.4 DNP	:	2.4 Dinitro-phénol
DCCD	:	N' N'Dicyclohexyl carbodiimide
Cpm	:	Coup par minute
<sup>14</sup> C.M.A.	:	Methyl-Amine marqué au carbone quatorze
GT 1	:	Gondang Tappen 1 : clône d' <i>Hevea brasiliensis</i>
Km	:	Constante de <i>Michaelis</i>
mM	:	Millimolaire (unité de concentration)
ml	:	Millilitre (unité de volume)
MTPP	:	Methyl.triphényl-phosphonium
NAD	:	Nicotinamide adénine dinucléotide : forme oxydé
NADH	:	Nicotinamide Adénine dinucléotide : forme réduite
NADP	:	Nicotinamide Adénine dinucléotide phosphate : forme oxydée
NADPH	:	Nicotinamide Adénine dinucléotide phosphate : forme réduite
NEM	:	N. Ethyl maleimide
NH <sub>4</sub> Cl	:	Chlorure d'ammonium
PEP	:	Phosphoénol-pyruvate
POPOP	:	2'2.P.phényl-bis (5-phenyl oxazole)
PPO	:	2'5 Diphényl-Oxazole
Pr 107	:	Proefstation Woor Rubber : Clône d' <i>Hevea brasiliensis</i>
r	:	Coefficient de corrélation
S	:	Concentration en substrat
S. Cyt.	:	"Serum" cytoplasmique
S. Lut.	:	"Serum" lutoïdique
STi	:	Stimulé
μCi	:	Microcurie
μM	:	Micromole
v	:	Vitesse initiale d'absorption
Vm	:	Vitesse maximum d'absorption

## INTRODUCTION

Parmi les nombreux végétaux producteurs de latex *Hevea brasiliensis* Müll. Arg (Euphorbiacées-Crotonoïdées) est le seul qui fasse aujourd'hui l'objet d'une exploitation industrielle intensive (\*).

D'origine amazonienne, cet arbre a été d'abord cultivé en Extrême Orient (Malaisie, Thaïlande, Indonésie, Cambodge, Vietnam...) région qui fournit actuellement 92% de la production mondiale de caoutchouc naturel.

Introduit en Afrique depuis une trentaine d'années, sa culture s'est vulgarisée au Liberia, au Nigeria, au Cameroun, au Zaïre et en Côte d'Ivoire, qui en a fait un des objectifs de diversification de ses cultures traditionnelles.

D'ici 1990, les surfaces hévéicoles ivoiriennes doivent passer de 30.000 à 75.000 hectares et la production de 19.000 à 80.000 tonnes.

Aux plantations anciennes du Sud et du Sud-Est sont venus s'ajouter de vastes programmes dans le Sud-Ouest.

Autour de ces grands blocs de culture industrielle, une politique de promotion de plantations villageoises permet d'apporter aux populations de ces régions des revenus supplémentaires appréciables.

---

(\*) Le Guayule, *Parthenium argentatum* Gray (Composées) arbuste producteur de caoutchouc originaire du Nord Mexique commence à faire l'objet d'essais d'implantation dans les zones sahéliennes d'Afrique (essentiellement Sénégal). Il a fait l'objet de cultures industrielles au Mexique et a été introduit à titre expérimental aux USA, en Australie, en URSS ainsi que dans divers pays du bassin méditerranéen.

Cette volonté de développer ainsi l'hévéiculture ivoirienne se fonde sur une situation mondiale particulièrement favorable, puisque les experts prévoient pour l'horizon 1990 un déficit en caoutchouc naturel d'un million de tonnes, déficit qui devrait s'accroître jusqu'à 2 ou 3 millions de tonnes en l'an 2000.

Le latex de l'hévéa est produit par un tissu particulier, composé de cellules spécialisées dans la synthèse du caoutchouc. Ces cellules sont incluses dans le phloème des arbres. Elles communiquent entre elles par la réalisation d'anastomoses, formant ainsi un véritable réseau ("manteau") laticifère.

Le sectionnement de ce réseau par la "saignée", provoque l'écoulement du latex et permet sa récolte jusqu'à ce que des phénomènes de coagulation interviennent et colmatent les brèches ouvertes dans le réseau laticifère.

Le latex ainsi récolté, qui sera traité pour en extraire le caoutchouc naturel, correspond à la partie fluide du cytoplasme des cellules laticifères.

Après centrifugation (30 mn à 30.000-50.000 g), il est possible de le fractionner en 3 parties (COOK et SEKHAR, 1955) : fig. (1).

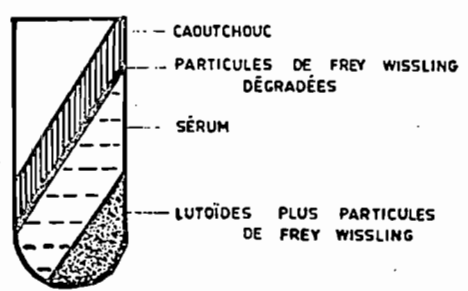


Figure 1

Centrifugation oblique du latex à 50 000 g,  
d'après COOK et SEKHAR (1955)

1. Une fraction légère, de couleur blanche ou crème, collante au toucher qui représente en volume 40 à 60% du latex frais. Elle est constituée de particules de caoutchouc dont la taille varie de 0,03 à 3  $\mu$  (RICHES et COODING, 1952). Ces particules de forme plus ou moins sphérique sont entourées d'un film phospholipidoprotéique chargé négativement.

2. Une fraction aqueuse, limpide, représentant 25 à 40% du latex, assimilable au serum cytoplasmique des cellules laticifères. Ce serum contient de nombreux complexes enzymatiques du métabolisme intermédiaire, notamment ceux qui intéressent la régénération du latex à l'intérieur des laticifères (D'AUZAC, 1965 ; JACOB, 1970), ainsi que des protéines chargées négativement et divers métabolites (citrate, malate, saccharose...). Son pH est voisin de la neutralité (6,8 à 7).

3. Une fraction lourde, sédiment jaunâtre ou grisâtre représentant 12 à 15% du latex frais.

Cette dernière fraction contient les organites du latex = particules de FREY-WYSSLING d'une part, lutoïdes, d'autre part.

- Les particules de FREY-WYSSLING qui portent le nom de celui qui les a découvertes et décrites pour la première fois (1929), représentent environ 10% de la fraction lourde du latex. Leur taille varie de 1 à 2  $\mu$ . Elles sont limitées par une double membrane, contiennent des inclusions lipidiques et des caroténoïdes qui leur donnent une coloration jaune.

D'après HSIA (1958) et COUPE et *al.* (1972), les particules de FREY-WYSSLING sont le siège d'une activité polyphénoloxydasique. Elles interviendraient dans la coagulation du latex (HANOWER et *al.* 1978).

- Les lutoïdes, isolés et décrits pour la première fois par HOMANS et VAN GILS en 1948 constituent 90% de la fraction sédimentable du latex. Ce sont des éléments figurés, plus ou moins sphériques, de dimensions comprises entre 2 et 10  $\mu$

(SOUTHORN, 1966) limités par une membrane lipoprotéique unique de 70 à 85 Å d'épaisseur (DICKENSON, 1964-1968) qui contient 85% d'acide phosphatidique (HANOWER, JACOB, 1978).

Ces particules jouent deux rôles essentiels dans les cellules laticifères :

1. Un rôle lysosomal (PUJARNISCLE, 1968-1969) caractérisé par la présence d'hydrolases (phosphatases acide, phosphodiesterases, RNases..) capables de dégrader les principales macromolécules cellulaires.
2. Un rôle vacuolaire entrevu par WIERSUM (1957-1958) et confirmé ensuite par ARCHER et *al.* (1969) et RIBAILLER et *al.* (1971).

Les microvacuoles que constituent les lutoïdes fixent sélectivement le rouge neutre. Leur pH interne est acide (5,5). Elles peuvent accumuler sélectivement certains composés du cytoplasme laticifère : des anions tels que le citrate, le malate, le phosphate (RIBAILLER et *al.*, 1971, D'AUZAC et LIORET, 1974, COUPE et LAMBERT, 1977) des cations minéraux ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ) des protéines, des acides aminés basiques (ARCHER et *al.* 1969, MOIR et TATA 1964, BRZOZOWSKA et *al.* 1974) et certains alcaloïdes (ARCHER et *al.* 1969).

Ces propriétés du milieu intralutoïdique sont en relation avec le rôle important que ces organites jouent dans la productivité des arbres.

Deux niveaux essentiels d'intervention peuvent être notés : la coagulation et la régénération du latex.

Les lutoïdes interviennent en effet très activement dans la coagulation du latex. Lorsqu'ils éclatent, les éléments chargés positivement qu'ils contiennent (cations, protéines) sont libérés et provoquent la neutralisation des charges négatives des particules de caoutchouc et des protéines cytoplasmiques.

Cette neutralisation entraîne la déstabilisation de l'état colloïdal du latex, et la formation de microcoagulum constitués d'un conglomérat de lutoïdes éclatés et de particules de caoutchouc coagulé qui arrêtent l'écoulement du latex. Le rendement de la saignée dépend donc pour une part importante de la stabilité des lutoïdes.

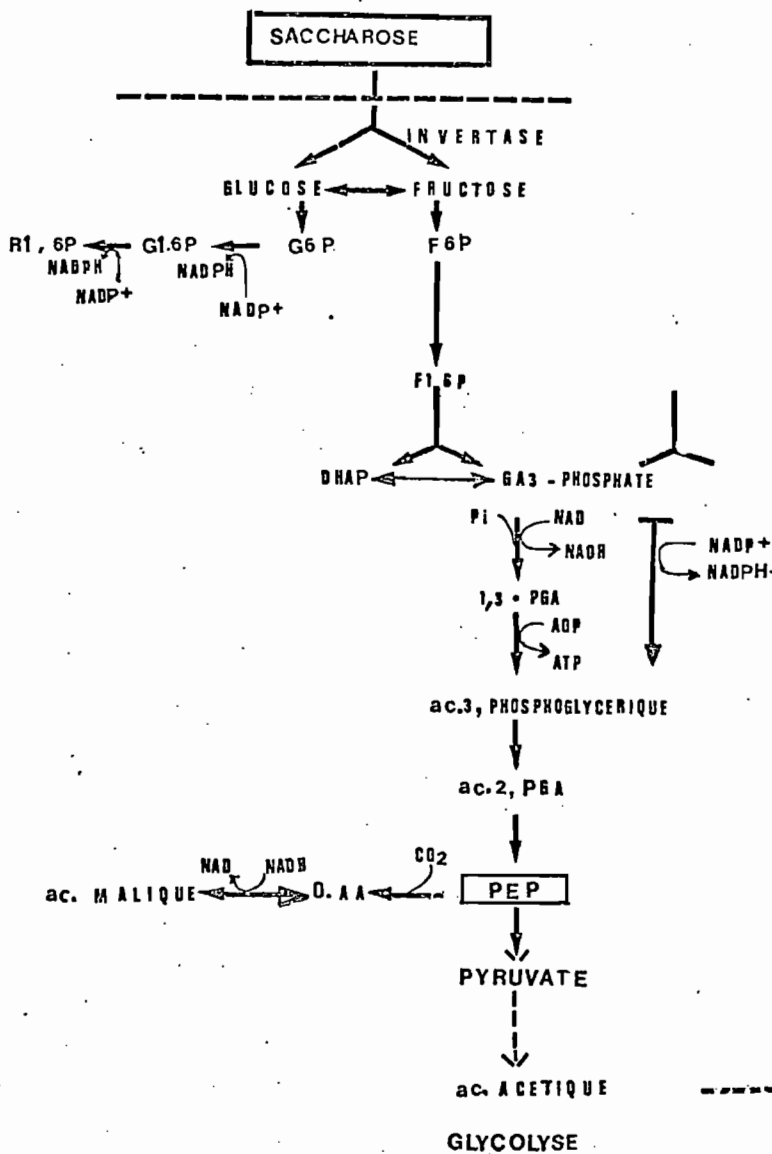
Le rôle des lutoïdes pressenti au niveau de la régénération du latex pourrait également être essentiel : la biosynthèse du caoutchouc s'effectue dans le cytoplasme des cellules laticifères. Les lutoïdes sont par eux-mêmes incapables de la réaliser. Mais du fait de leur aptitude à accumuler sélectivement certaines molécules, ils contribuent à assurer au sein du cytoplasme des conditions physiologiques favorables à la régénération du latex.

Ainsi, en accumulant certains acides aminés (Arginine et Lysine notamment), les particules lutoïdiques jouent au sein des cellules laticifères le rôle de réservoirs de composés azotés qui peuvent être utilisés au cours de la biosynthèse des protéines nécessaires à la régénération du latex.

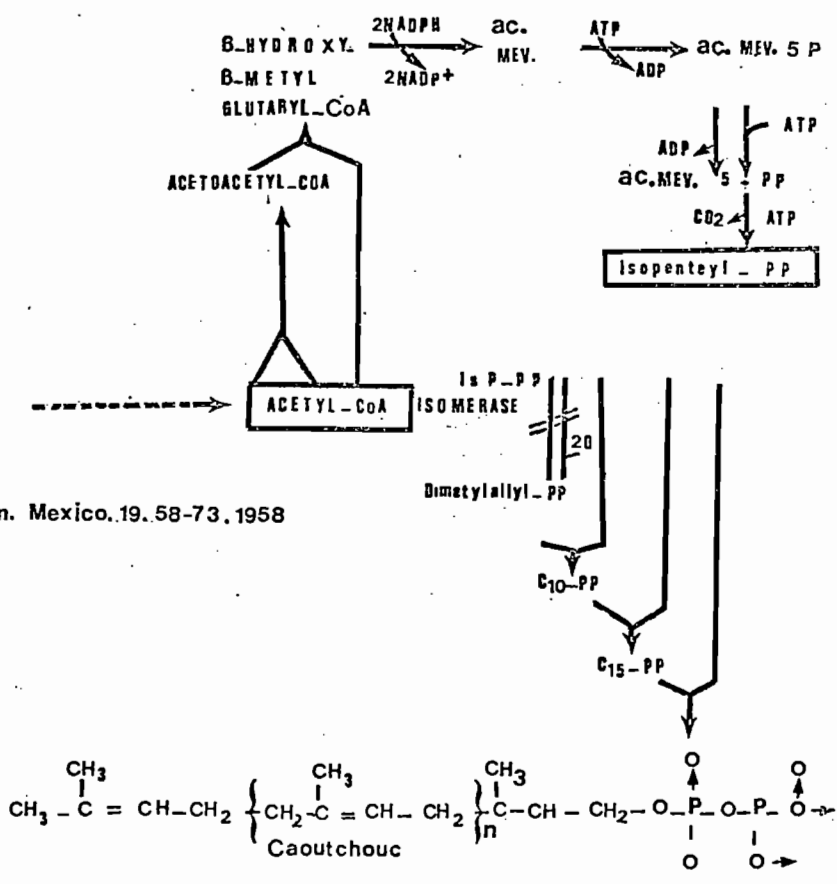
De même en exerçant un effet régulateur au niveau de la teneur en certains cofacteurs enzymatiques (cations par exemple), et en assurant, notamment par l'intermédiaire d'une pompe à protons membranaire (CRETIN, 1981, MARIN et *al.* 1981), le maintien du pH cytoplasmique au voisinage de la neutralité, les lutoïdes contrôlent certaines activités enzymatiques impliquées dans la régénération du latex. C'est le cas notamment de l'invertase (TUPÝ 1973, JACOB 1970) enzyme initiant la série des réactions qui conduisent du saccharose à l'acetyl CoA, puis à la synthèse du caoutchouc (Schéma 1).

Il est donc logique de constater qu'il existe une relation étroite entre le pH cytoplasmique des laticifères et la productivité des arbres. Celle-ci est d'autant meilleure qu'il est proche de la neutralité, ou légèrement supérieur (BRZOWSKA-HANOWER et *al.* 1979).

PHOTOSYNTHESE



d'après B.Arreguin et M.C. Rock Bot. Inst. Quim. Mexico.19.58-73.1958



BIOSYNTHESE du Caoutchouc

d'après F. Lynen Biochemical Problem of Rubber synthesis

Schema-1

Actuellement, le pH du latex et de son cytoplasme constitue l'un des indicateurs physiologiques des plus fiables, et le plus utilisé en tant que test de la productivité potentielle naturelle de certains clones d'hévéa.

D'autre part, il a été démontré que la différence de pH entre le serum cytoplasmique et le milieu intralutoïdique ( $\Delta$ pH) est fortement corrélée à la productivité des arbres. Le fait que les lutoïdes soient capable de piéger des protons, les soustrayant ainsi au métabolisme cytoplasmique constitue un argument supplémentaire en faveur de leur rôle positif au niveau de la régénération du latex.

En outre, on s'aperçoit fréquemment que l'apparition de perturbations au niveau de la productivité des arbres est associée à un mauvais état physiologique, ou une alteration des propriétés des lutoïdes.

C'est ce que l'on observe notamment à propos des "encoches sèches" maladie qui se manifeste par un tarissement progressif de l'arbre. L'étude du latex d'arbres atteints révèle en effet une nette diminution de la fraction sédimentable du latex, un indice d'éclatement des lutoïdes élevé et un abaissement du pH du sérum cytoplasmique accompagné d'une augmentation de celui du milieu intralutoïdique (diminution du  $\Delta$ pH) (CRETIN, 1978).

Un grand nombre de recherches ont donc été entreprises pour essayer de mieux connaître les lutoïdes, et en particulier la physiologie de leur membrane dont le rôle parait à plusieurs titres capital.

En Côte d'Ivoire, plusieurs chercheurs, tant à l'ORSTOM qu'à l'Université ou à l'IRCA y ont consacré ou y consacrent actuellement leurs efforts (D'AUZAC, 1968 ; RIBAILLER, 1972 ; LAMBERT, 1974 ; MARIN, 1968 ; CRETIN, 1976 ; HANOWER, 1977).

Notre travail se place directement dans ce cadre. En étudiant la perméabilité des lutoïdes à divers acides aminés, nous avons voulu apporter notre contribution à cet ensemble de travaux.

La membrane lutoïdique est en effet douée d'une forte sélectivité vis-à-vis des acides aminés (BRZOZOWSKA, HANOWER, CHEZEAU, 1974). Alors que les acides aminés acides ou neutres dominent dans le serum cytoplasmique (acide glutamique, alanine...), à l'intérieur des lutoïdes ce sont les acides aminés basiques qui sont les plus abondants (plus de 50% de la teneur totale). Les quantités intralutoïdiques d'acides aminés basiques sont de 6 fois environ (Lysine et Arginine) à 20 fois (Acide  $\alpha$ - $\gamma$  diaminobutyrique) supérieures à celles trouvées dans le sérum cytoplasmique.

C'est à cet aspect du problème que nous nous sommes intéressé en étudiant l'absorption de quelques acides aminés, en insistant principalement sur le cas de l'Arginine et de la Lysine.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

### 1) Récolte du latex

L'étude des caractéristiques générales de l'absorption des acides aminés étudiés (première et deuxième parties du mémoire) a été réalisée sur du latex prélevé dans un lot de 30 arbres du clone PR 107.

La recherche des relations entre absorption et productivité (troisième partie du mémoire) a été menée à partir de latex récolté dans un lot de 72 arbres du clone GT 1, parmi lesquels ont été distingués 20 arbres hauts-producteurs (H.P.) et 34 arbres bas-producteurs (B.P.).

Tous ces arbres dont l'âge varie entre 8 et 12 ans sont sains et présentent un état végétatif satisfaisant.

Ils sont saignés deux fois par semaine en spirale entière (S j/3 j/4).

Le latex qui s'écoule pendant la première minute contient des organites lésés par le traumatisme inhérent à la saignée. Il est donc écarté.

Passé ce délai, on recueille, dans des tubes à essais plongés dans de la glace, 40 à 50 ml de latex de chaque arbre. Puis, par simple mélange, du contenu de ces tubes, on constitue un échantillon moyen de latex.

Pour les expériences portant sur la recherche de relations entre productivité et absorption des acides aminés, aucun mélange n'est effectué. Les mesures sont réalisées directement sur le latex provenant d'un seul arbre, haut ou bas producteur. Pour les bas-producteurs, la quantité recueillie ne dépasse pas 10 à 20 ml.

## 2) Isolement et purification du compartiment lutoïdique

L'isolement du compartiment lutoïdique est réalisé par centrifugation selon la procédure suivante :

Les pots à centrifugation sont remplis de 40 ml du latex à étudier et placés dans un rotor réfrigéré SS 34. Ils sont centrifugés pendant 15 minutes à 15.000 tours/mn (27.000 g) dans un appareil de type SORVALL à une température voisine de 5°C.

Le caoutchouc concentré à la partie supérieure du tube est écarté. Après décantation du surnageant aqueux, le culot lutoïdique tassé au fond du tube est resuspendu dans un tampon Phosphate-Mannitol de pH 7,0 puis recentrifugé pendant 15 mn. L'opération est renouvelée 2 fois. Après ces trois lavages successifs, les culots sont isolés, dilués de moitié dans le même tampon (1 volume de tampon pour 1 volume de lutoïdes) puis soigneusement homogénéisés par plusieurs pipettages.

## 3) Mesure de l'absorption

Les quantités d'acides aminés absorbées sont mesurées par utilisation de molécules radioactives marquées au  $^{14}\text{C}$  (Activité spécifique donnée en annexe).

L'opération se déroule de la façon suivante :

Les lutoïdes sont placés dans un milieu d'incubation dépourvu de tout matériel énergétique, composé pour 1 ml total, de 0,5 ml de la suspension de lutoïdes diluée au demi, de 0,1 ml de molécules radioactives à 5  $\mu\text{Ci}$  par échantillon et de 0,4 ml de solution tampon contenant l'acide aminé étudié non radioactif.

Trois ou quatre répétitions sont réalisées.

L'incubation est arrêtée après un temps variant selon les cas de 10 à 60 mn, par addition dans les tubes utilisés de 9 ml de la solution tampon ne contenant pas de molécules radioactives, mais renferment l'acide aminé non radioactif à la même concentration que celle utilisée pour l'incubation (dilution isotopique).

On centrifuge immédiatement pendant 10 mn à 16.000 tours/mn (31.000 g). Deux autres lavages du culot sont effectués de la même manière, afin d'éliminer les molécules radioactives non incorporées dans les lutoïdes (milieu interstitiel contaminant).

Le sédiment est alors repris dans 1 ml d'une solution de Triton X 100 à 1% afin de provoquer la rupture des membranes lutoïdiques.

On ajoute ensuite 0,2 ml de l'homogenat ainsi obtenu à 5 ml de liquide scintillant (composition en annexe) et la radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation Inter-technique S.L.30.

Dans la plupart des cas, les comptages sont effectués sur 10 minutes.

#### 4) Choix du tampon

Des expériences réalisées par D'AUZAC (1972) ont montré que l'absorption du Citrate par les lutoïdes est plus importante dans les tampons Phosphate que dans les tampons TRIS-Maleate.

L'expérience a été reprise pour la Lysine, et nous avons constaté qu'en présence du tampon Phosphate la pénétration de la molécule marquée est environ 2 fois plus importante qu'en milieu tamponné par le TRIS-Maleate.

C'est la raison pour laquelle ce sont des tampons Phosphate qui ont été utilisés dans ce travail (voir composition en annexe).

#### 5) Expression des résultats

Les résultats sont généralement rapportés à 1 mg de protéine de la suspension lutoïdique. Dans chaque prise soumise

à incubation, on dose donc systématiquement les protéines selon la méthode de LOWRY et *al.* (1951).

Ce mode d'expression des résultats permet de comparer valablement les résultats de différentes expériences et de contrôler l'état des lutoïdes à la suite de l'incubation et des trois lavages au tampon qui suivent.

Le matériel végétal étudié présente une grande variabilité qui se traduit par des valeurs qui varient parfois de façon très sensible d'une expérience à l'autre. Toutefois, les tendances observées ne sont pas affectées.

Les résultats qui figurent dans ce mémoire représentent, les moyennes de 3 expériences et parfois plus. Les concentrations citées dans le texte sont les concentrations réelles finales dans le milieu d'incubation.

## RÉSULTATS

### Première partie

#### CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA PERMEABILITE

##### I) Modalités de l'absorption

###### 1. Cinétique

Quatre acides aminés ont été retenus pour cette étude :

2 acides aminés basiques : l'Arginine et la Lysine  
 1 acide aminé neutre : l'Alanine  
 1 acide aminé acide : l'Acide glutamique.

Dans les cellules laticifères, ces acides aminés se trouvent à des concentrations différentes dans le cytoplasme et dans les lutoïdes (tableau 1).

	Serum cytoplasmique μM/ml (C)	Serum lutoïdique μM/ml (L)	Rapport d'accumulation L/C
Arginine	0,22	1,42	6,5
Lysine	0,61	3,40	5,6
Alanine	7,77	2,88	0,4
Acide glutamique	5,72	1,80	0,3

Tableau 1 - Concentration de l'Arginine, Lysine, Alanine et acide glutamique dans les compartiments cytoplasmique et lutoïdique du latex.

(D'après BRZOZOWSKA et al., 1974).

*In vivo*, la pénétration des acides aminés basiques dans les lutoïdes se fait donc contre le gradient de concentration, alors que celle des deux autres se fait dans le sens de ce gradient.

Pour étudier la cinétique de pénétration, nous avons donc choisi trois situations expérimentales :

a). Dans la première, les lutoïdes sont incubés dans des milieux contenant 10 mM des acides aminés considérés, c'est-à-dire une concentration largement supérieure aux concentrations physiologiques normales des milieux cytoplasmiques et intralutoïdiques.

Dans ces conditions, la pénétration pour les 4 acides aminés étudiés se fait dans le sens du gradient de concentration.

Les résultats sont représentés sur la Figure 2.

Deux faits apparaissent :

- Les acides aminés considérés sont inégalement absorbés par les lutoïdes. Ils se classent dans l'ordre d'absorption décroissante suivant : Arginine, Lysine, Alanine, Acide glutamique. Ce sont les acides aminés basiques qui sont les plus intensément absorbés.
- Pour chaque acide aminé, l'absorption se fait selon une cinétique non linéaire, caractérisée par une phase rapide, puis un ralentissement qui précède une stabilisation.

Ces observations recourent celles réalisées par HANOWER et *al.* (1977) sur la Lysine, l'Alanine et l'Acide glutamique quant à l'inégalité d'absorption. L'ordre relevé est en effet le suivant : Lysine, Alanine, Acide glutamique.

Par contre, elles en diffèrent sur le plan de la non linéarité. Ces auteurs concluent en effet au caractère linéaire de la cinétique d'absorption de ces trois acides aminés. Leurs mesures cependant, sont limitées à 30 minutes, et dans ce laps de temps l'absorption peut, en première approximation apparaître comme linéaire. La poursuite des mesures jusqu'à 1 heure montre bien qu'en fait il n'en est rien, et que l'absorption des acides aminés étudiés n'est pas linéaire, mais curvilinéaire, ce qui pourrait indiquer l'intervention de phénomènes de saturation.

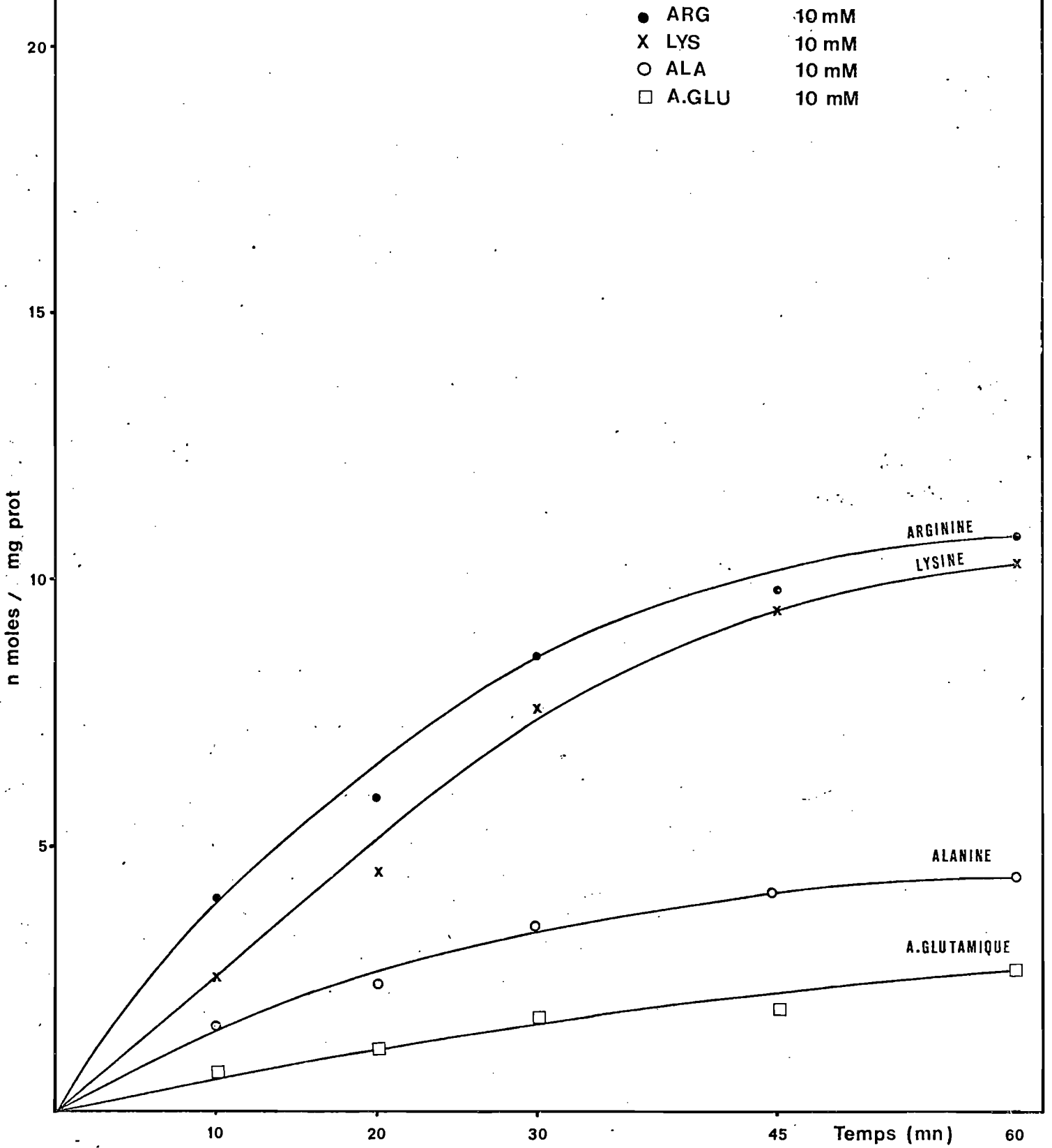


Figure : 2

Cinetique de pénétration de L.Arginine (●) de la L.Lysine (x) de L. Alanine (o) et de l'A. glutamique (□) à concentrations exterieures in vitro supérieures à la concentration exterieure (cytoplasme) in vivo

b). Dans une deuxième expérience, nous avons choisi de supprimer le gradient de concentration, en plaçant les lutoïdes dans des milieux d'incubation dont la concentration en acide aminé est égale à celle du milieu intralutoïdique telle qu'elle est donnée par BRZOZOWSKA et *al.* (1974).

Sur la figure 3 qui regroupe les résultats, on retrouve comme précédemment une cinétique d'absorption d'allure curvilinéaire, ce qui confirme les remarques faites à ce propos.

Mais, des phénomènes nouveaux apparaissent : on observe tout d'abord une diminution globale de l'absorption qui, pour chacun des acides aminés est environ 10 fois plus faible que précédemment. (L'échelle de la figure 3 est en ordonnée 2 fois plus grande que celle de la figure 2).

Cette diminution est liée à la réduction des concentrations en acides aminés du milieu d'incubation, mais elle n'affecte pas ceux-ci, de façon égale.

Le tableau 2 permet de comparer pour chaque acide aminé, les variations de concentration et les variations de vitesse d'absorption observées entre ces deux premières conditions expérimentales.

	$\frac{(C) \text{ expérience 1}}{(C) \text{ expérience 2}}$	$\frac{(V) \text{ expérience 1}}{(V) \text{ expérience 2}}$	
		20 mn	60 mn
	Arginine	7	5,68
Lysine	2,95	3,2	6
Alanine	3,7	3,1	3,25
Acide glutamique	5,5	1,34	1,9

Tableau 2 - Rapport des vitesses de pénétration des acides aminés dans les lutoïdes comparé au rapport de concentration en acides aminés externes dans les expériences 1 et 2.

On peut alors constater que pour l'Arginine et l'Alanine, la diminution de vitesse d'absorption est du même ordre que la diminution de concentration. Pour la Lysine, la vitesse

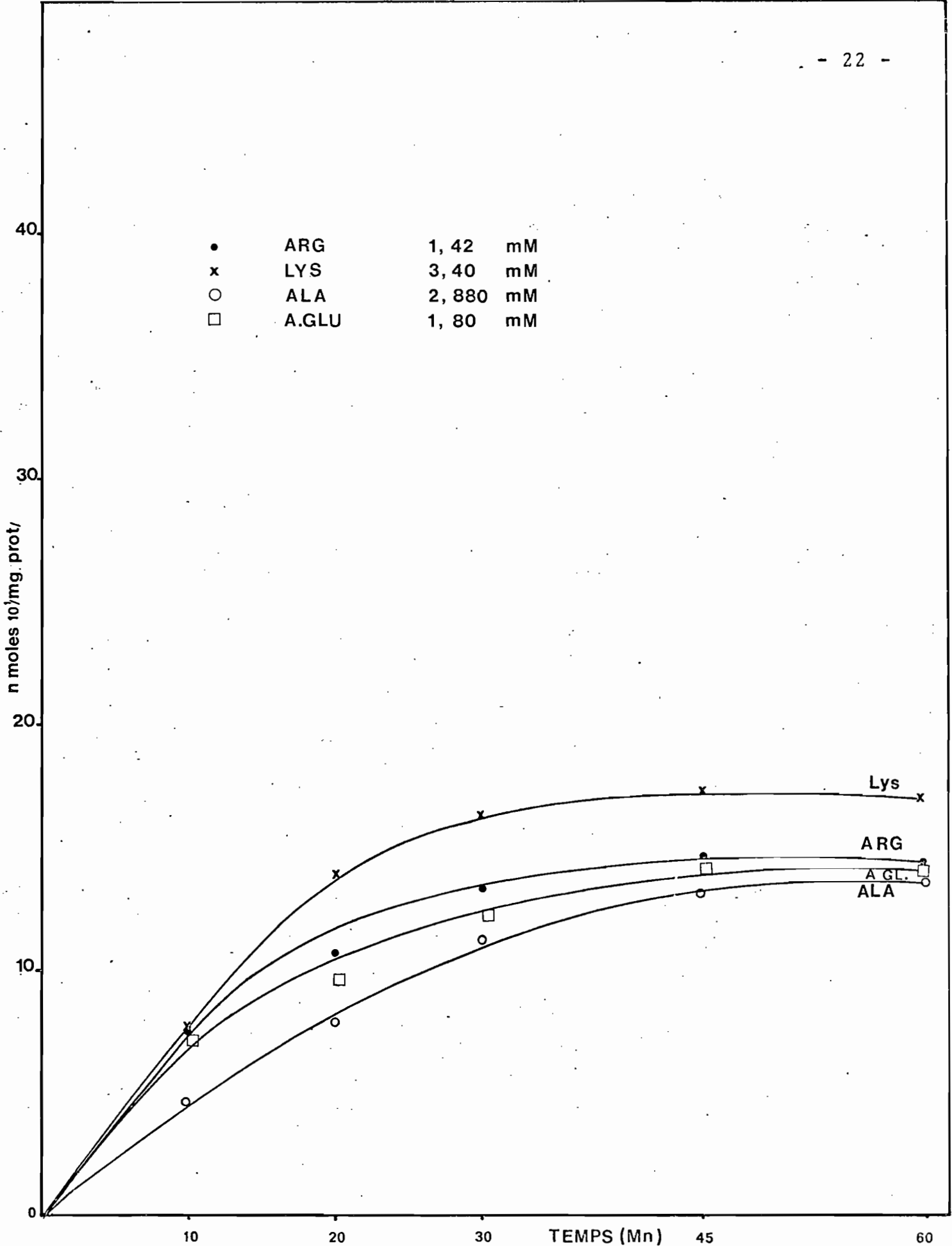


Figure :3 .. Cinétique de pénétration de L. Arginine (●) de la lysine (x) de la L. Alanine (o) et de la l'Acide L. glutamique (□)(à concentrations extérieures égales à la concentration intralutoïdique) in vivo

d'absorption décroît plus que la concentration, tandis que pour l'Acide glutamique la vitesse diminue moins que la concentration.

Cela se traduit par un resserrement des courbes, les acides aminés basiques restant cependant toujours un peu plus absorbés que les autres, mais cette fois c'est la Lysine qui dépasse l'Arginine.

c). Les deux expériences précédentes ont un point en commun.

Dans l'une comme dans l'autre en effet, les concentrations en acide aminé des milieux d'incubation sont très éloignées des concentrations existant dans le milieu cytoplasmique dans lequel les lutoïdes se trouvent normalement en suspension.

Nous avons donc réalisé une troisième expérience dans laquelle les lutoïdes sont placés dans des milieux d'incubation dont les teneurs en acide aminé sont comparables à celles du sérum cytoplasmique, c'est-à-dire, pour l'Arginine 0,22 mM, pour la Lysine 0,61 mM, pour l'Alanine 7,77 mM et pour l'Acide glutamique 5,72 mM.

Dans ce cas, comme nous l'avons déjà indiqué, la pénétration des acides aminés basiques se fait donc contre le gradient de concentration, et celle des autres dans le sens de ce gradient.

De l'examen des courbes de la figure 4 qui représente les résultats obtenus, il ressort immédiatement que dans ces nouvelles conditions, il réapparaît une inégalité d'absorption entre les acides aminés. Mais cette fois l'ordre est inversé par rapport à celui observé dans la première expérience où la concentration extérieure était, pour tous les acides aminés considérés, supérieures à celles utilisées ici. L'Alanine et l'Acide glutamique sont en effet plus absorbés que la Lysine et l'Arginine.

Cette inversion est due à une diminution de l'absorption des acides aminés basique, diminution qui semble répondre aux variations de concentration (tableau 3), alors que la pénétration de l'Alanine et de l'Acide glutamique ne varie pas

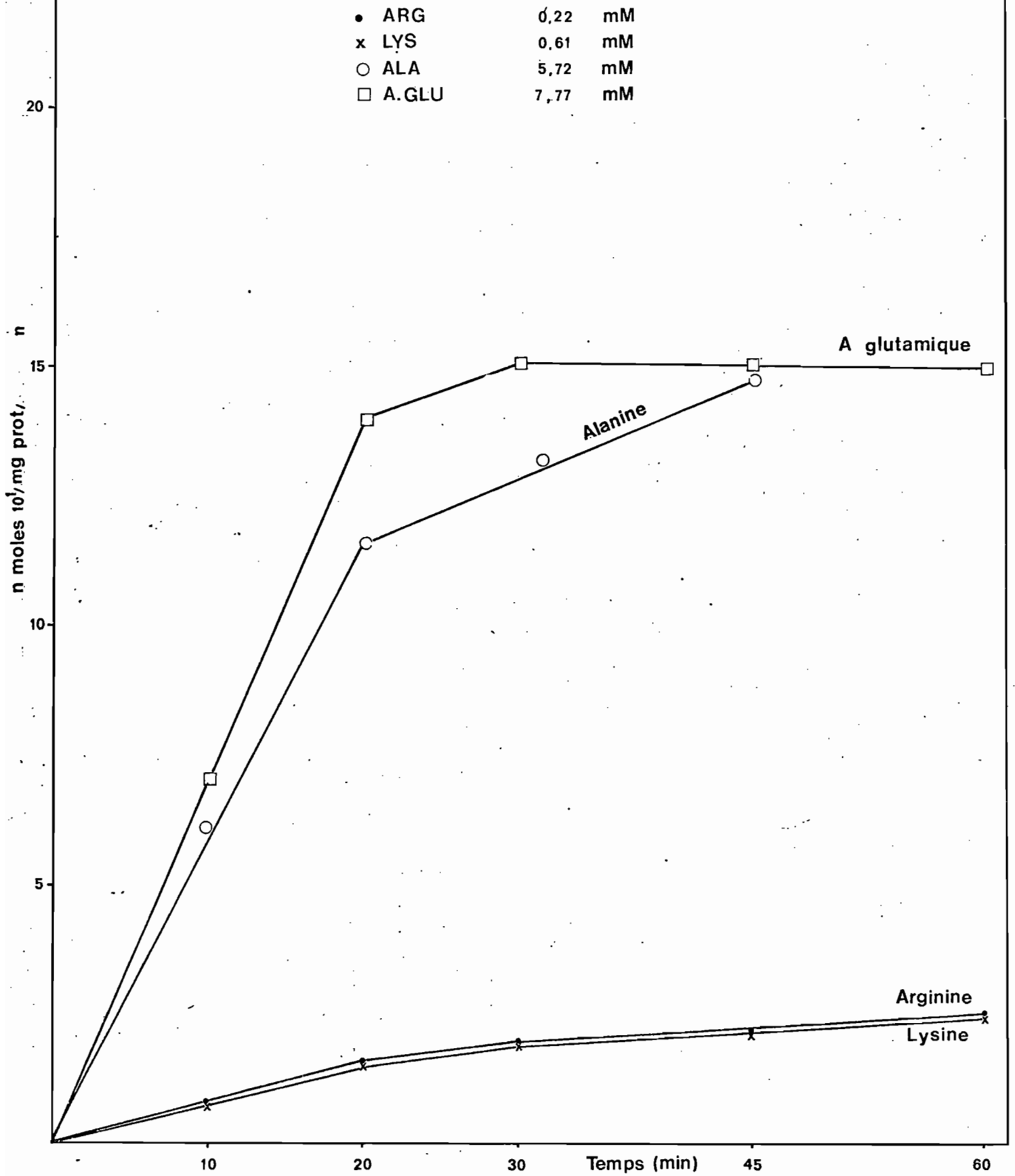


Figure : 4. Cinétique de penetration de L. Arginine (●) de la L. lysine (x) de L. Alanine (○) et de l'Acide L. glutamique (□) (à concentrations extérieures in vitro égale à la concentration (cytoplasmique) in vivo

beaucoup comme le montre la comparaison des figures 3 et 4.

	(C) expérience 2	(V) expérience 2	
	(C) expérience 3	(V) expérience 3	
		20 mn	60 mn.
Arginine	0,15	0,15	0,17
Lysine	0,18	0,11	0,15
Alanine	1,98	1,47	(1,1)*
Acide glutamique	4,3	1,45	1,05

Tableau 3 - Rapport de vitesse de pénétration des acides aminés dans les lutoïdes comparé au rapport de concentration en acides aminés externes dans les expériences 2 et 3.

Cependant, si l'on apprécie l'absorption non pas en quantité réelle (valeur absolue) mais en valeur relative exprimée par rapport à la quantité d'acide aminé présente dans le milieu d'incubation, on retrouve l'ordre initial, Arginine, Lysine, Alanine, Acide glutamique (figure 5).

On peut en conclure qu'en dépit du fait que pour des concentrations paraphysiologiques, les quantités de Lysine et d'Arginine entrant effectivement dans les lutoïdes soient inférieures à celles des autres acides aminés, les systèmes assurant la pénétration des acides aminés basiques sont relativement plus efficaces que ceux permettant l'absorption de l'Alanine et de l'Acide glutamique.

Le fait que ces acides aminés basiques s'avèrent entrer dans les lutoïdes moins vite que les autres pourrait alors être expliqué en admettant que les concentrations utilisées dans cette troisième expérience sont plus loin du Km que celles des autres acides aminés.

## 2. Influence du pH extérieur

Les expériences précédentes ont toutes été réalisées à pH = 7, dans un tampon phosphate, conformément à ce que nous avons indiqué dans la description générale des conditions de manipulation.

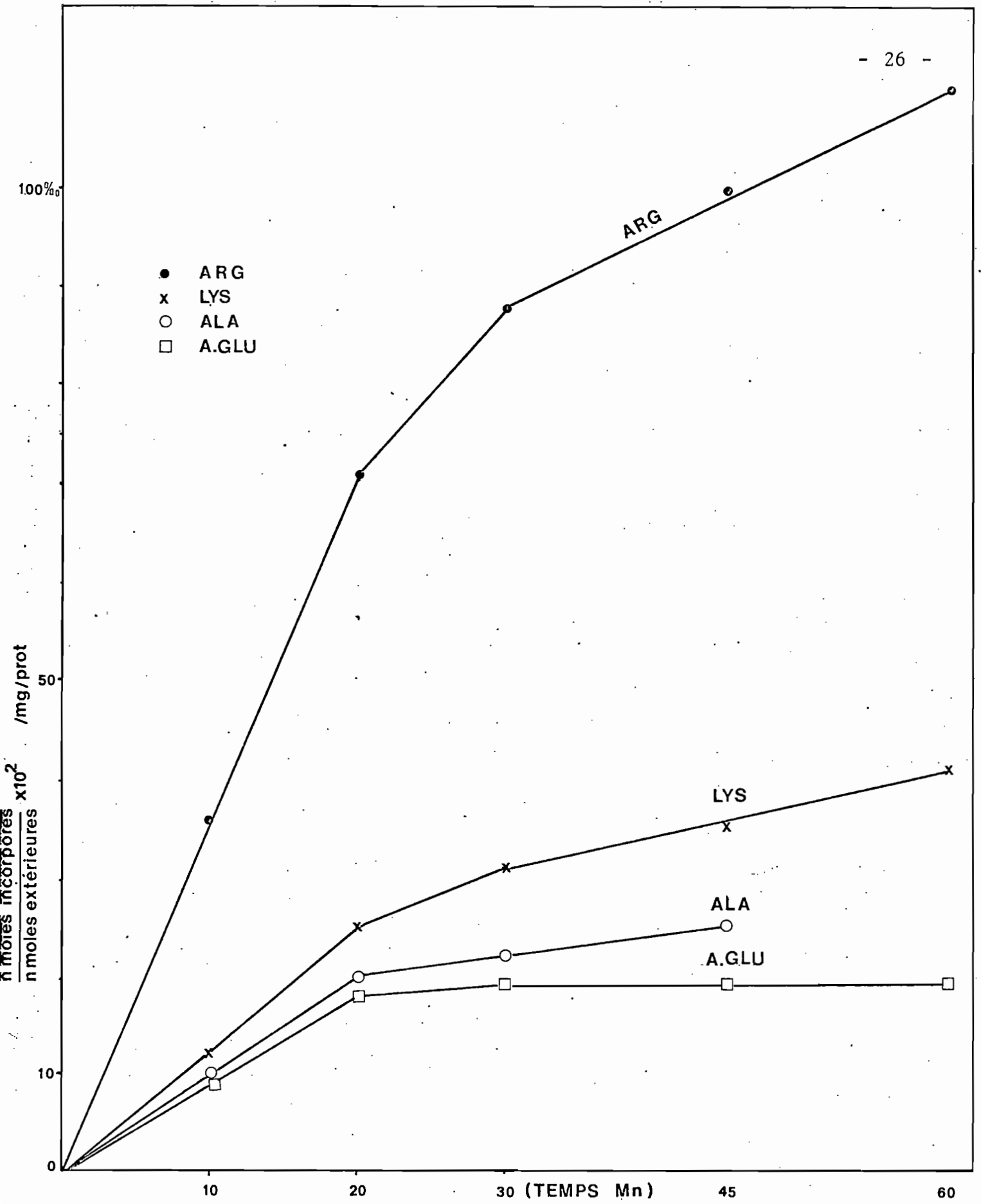


Figure 5 Absorption relative des différents A. Aminés exprimée en % de la concentration en A. Aminés présents dans le milieu d'incubation

Ce pH correspond à celui du milieu cytoplasmique des laticifères, qui comme on le sait se situe au voisinage de la neutralité.

Que se passe-t-il, lorsqu'on s'écarte de ces conditions standard ?

L'absorption a donc été étudiée dans une gamme de pH comprise entre 5 et 9. Au-delà de ces valeurs, les lutoïdes tendent à éclater.

Pour chacun des acides aminés considérés, la concentration du milieu d'incubation est la concentration "physiologique" du serum cytoplasmique : Arginine 0,22 mM, Lysine 0,61 mM, Alanine 7,77 mM, Acide glutamique 5,72. Dans l'expression des résultats cependant, l'absorption a été ramenée pour plus de clarté à une concentration unique de 1 mM (figure 6).

On peut alors faire les constatations suivantes :

A pH 7, l'absorption se fait dans l'ordre décroissant Arginine, Lysine, Alanine, Acide glutamique, qui est celui observé précédemment. (fig. 2).

Lorsque l'on s'écarte de la neutralité vers les pH basiques, on enregistre une augmentation de l'absorption des acides aminés basiques. Le maximum d'absorption de ces acides se situe entre 7,5 et 8 pour l'Arginine, et entre 8 et 8,5 pour la Lysine. On remarque en outre, que quel que soit le pH l'Arginine est toujours plus absorbée que la Lysine.

Lorsqu'au contraire, on va vers des pH plus acides, l'absorption de l'Arginine et de la Lysine décroît nettement, alors que celle de l'Alanine et de l'Acide glutamique augmente, atteignant un maximum entre 5,5 et 6.

Le pH du milieu d'incubation influe donc sensiblement sur la vitesse de pénétration des acides aminés dans les lutoïdes. Deux explications peuvent être apportées à ce fait.

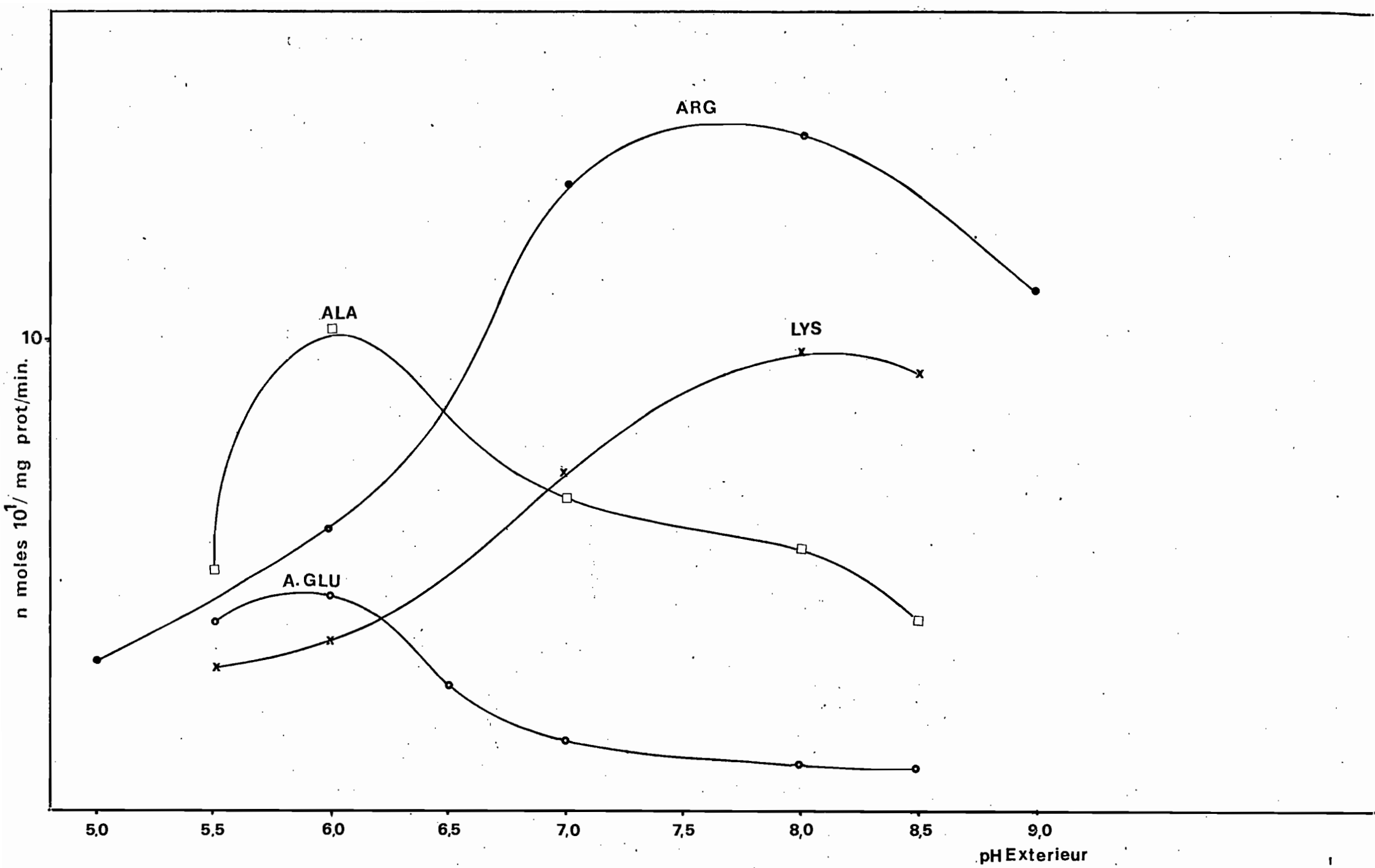


Fig. 6 : Influence du pH extérieur sur la pénétration de la L. Arginine (●) de la L. Lysine (x), de L. Alanine □ ou de l'acide A. glutamique (○) dans les lutoïdes

On peut tout d'abord penser à la modification des formes de dissociation des molécules d'acides aminés qui peuvent porter des charges différentes selon le pH du milieu dans lequel elles se trouvent. Certaines de ces formes peuvent être préférentiellement absorbées. (Tableau en annexe III).

Pour le citrate par exemple D'AUZAC et *al.* (1974) ont montré que ce sont les formes les moins dissociées qui présentent le rapport d'accumulation le plus élevé, alors qu'elles se trouvent en plus faible concentration dans le cytoplasme. Pour chacun des acides aminés étudiés, nous avons donc relevé les différentes formes de dissociation (voir en annexe). Nous avons ensuite calculé les pourcentages des différentes formes de dissociation dans le cas des trois pH 6, 7 et 8 correspondant soit à la neutralité, soit aux optima d'absorption des quatre acides aminés étudiés. Les résultats sont résumés dans les tableaux (4, 5, 6 et 7).

En ce qui concerne l'Arginine et la Lysine, on constate que lorsque le pH augmente, la teneur de la forme A+1 baisse alors que l'absorption augmente. Ce n'est donc probablement pas sous la forme (A+1) que ces deux acides aminés sont absorbés. Par contre, la concentration de la forme neutre (A°) et dans une moindre mesure, la concentration de la forme (A-1) augmentent avec le pH et l'absorption. C'est vraisemblablement sous l'une ou l'autre de ces deux formes que l'absorption a lieu (tableaux 4 et 5).

En ce qui concerne l'Alanine on remarque que lorsque le pH augmente (6 à 8) la teneur de la forme (A°) non chargée diminue, ainsi que son absorption.

Il est important de noter qu'à pH 6,0 qui correspond à l'optimum de l'absorption de l'Alanine, la quasi totalité des molécules (99, 95%) se trouve sous la forme non chargée (A°). Il s'agit probablement de la forme absorbée par les lutoïdes.

De même, la forme monocationique (A+1) de l'Alanine devient présente d'une manière significative, en même temps que l'absorption de cet acide aminé augmente, c'est-à-dire lorsque

Calcul en Pourcentage des Concentrations des différentes formes ioniques à 3 pH para-physiologiques ( pH 6-7-8 )

PH	A <sup>+2</sup>	A <sup>+1</sup>	A <sup>0</sup>	A <sup>-1</sup>	Absorption n Moles/30'
6,0	1,4 x 10 <sup>-2</sup>	99,89	8,4 x 10 <sup>-2</sup>	∞ 10 <sup>-6</sup>	0,605
7,0	1,4 x 10 <sup>-2</sup>	99,09	0,84	∞ 10 <sup>-5</sup>	1,342
8,0	1,4 x 10 <sup>-2</sup>	91,59	8,4	2,8 x 10 <sup>-4</sup>	1,440

ARG Tableau 4

PH	A <sup>+2</sup>	A <sup>+1</sup>	A <sup>0</sup>	A <sup>-1</sup>	Absorption n Moles/30'
6,0	1,5 x 10 <sup>-2</sup>	99,87	0,11	3,3 x 10 <sup>-4</sup>	0,361
7,0	1,4 x 10 <sup>-3</sup>	98,88	1,11	3,3 x 10 <sup>-3</sup>	0,723
8,0		89,8	10,09	3 x 10 <sup>-2</sup>	0,982

LYS Tableau 5

PH	A <sup>+1</sup>	A <sup>0</sup>	A <sup>-1</sup>	Absorption n Moles/30'
6,0	2,2 x 10 <sup>-2</sup>	99,95	2 x 10 <sup>-2</sup>	1,035
7,0	2,2 x 10 <sup>-3</sup>	99,79	2 x 10 <sup>-1</sup>	0,666
8,0	2,2 x 10 <sup>-4</sup>	97,99	2	0,536

ALA Tableau 6

PH	A <sup>+1</sup>	A <sup>0</sup>	A <sup>-1</sup>	A <sup>-2</sup>	Absorption n Moles/30'
6,0		1,7	98,2	2,1 x 10 <sup>-2</sup>	0,460
7,0		0,17	99,61	0,21	0,153
8,0	∞	1,7 x 10 <sup>-2</sup>	97,88	2,1	0,1020

A.GLU Tableau 7

le pH diminue de 8 à 6. On ne peut donc exclure complètement que cette forme soit aussi une des formes absorbées (tableau 6).

Pour l'Acide glutamique (tableau 7) ce n'est probablement pas la forme anionique (A-1) qui est absorbée, car l'optimum de concentration de cette forme se situe autour de pH 7,0 alors que l'optimum d'absorption de cet acide aminé se trouve à pH acide (5,5). Dans le cas de cet acide aminé, il semble encore que ce soit la forme non chargée (A°) ou à la limite la forme chargée (A+1) qui soit la mieux absorbée.

Notons enfin que nous n'avons tenu compte dans cette discussion que des formes de dissociation des acides aminés eux-mêmes. L'ionisation d'éventuels récepteurs membranaires susceptibles de catalyser le transport doit également intervenir, et c'est probablement l'interaction entre la forme ionique (ou non) absorbée et son récepteur qui rendent compte des optima d'absorption en fonction du pH.

Mais l'effet du pH peut également se faire sentir au niveau du  $\Delta$  pH qui existe entre le milieu externe et le compartiment intralutoïdique.

Ce dernier, nous l'avons vu, est acide et *in vivo*, il existe normalement une différence de l'ordre d'une unité de pH de part et d'autre de la membrane des lutoïdes.

L'acidification du milieu d'incubation diminue ce gradient, l'alcalinisation au contraire l'augmente. Or il a été démontré que l'absorption de certains composés comme le citrate par les lutoïdes dépend directement de ce  $\Delta$  pH. Plus il est important, plus l'entrée du Citrate est intense (ou augmente) (COUPE et LAMBERT, 1977).

On peut donc supposer que les mécanismes contrôlant l'absorption des acides aminés, du moins celle de l'Arginine et de la Lysine, font également intervenir ce gradient.

Nous reviendrons plus longuement par la suite sur cette hypothèse.

### 3. Influence de la température

La Lysine et l'Arginine, étant les plus absorbés par les lutoïdes, ce sont eux qui ont été retenus pour la suite de ce travail.

Pour l'étude de l'influence de la température, comme pour celle du pH, les concentrations du milieu d'incubation sont celles du serum cytoplasmique, et dans l'expression des résultats, l'absorption est ramenée à une concentration égale de 1 mM (figure 7).

L'absorption de la Lysine et de l'Arginine est thermo-dépendante. Elle est faible, mais non nulle; à 0°C, comparativement à celle enregistrée à 30°C.

Pour chaque température, on constate que l'absorption de l'Arginine est toujours plus importante que celle de la Lysine.

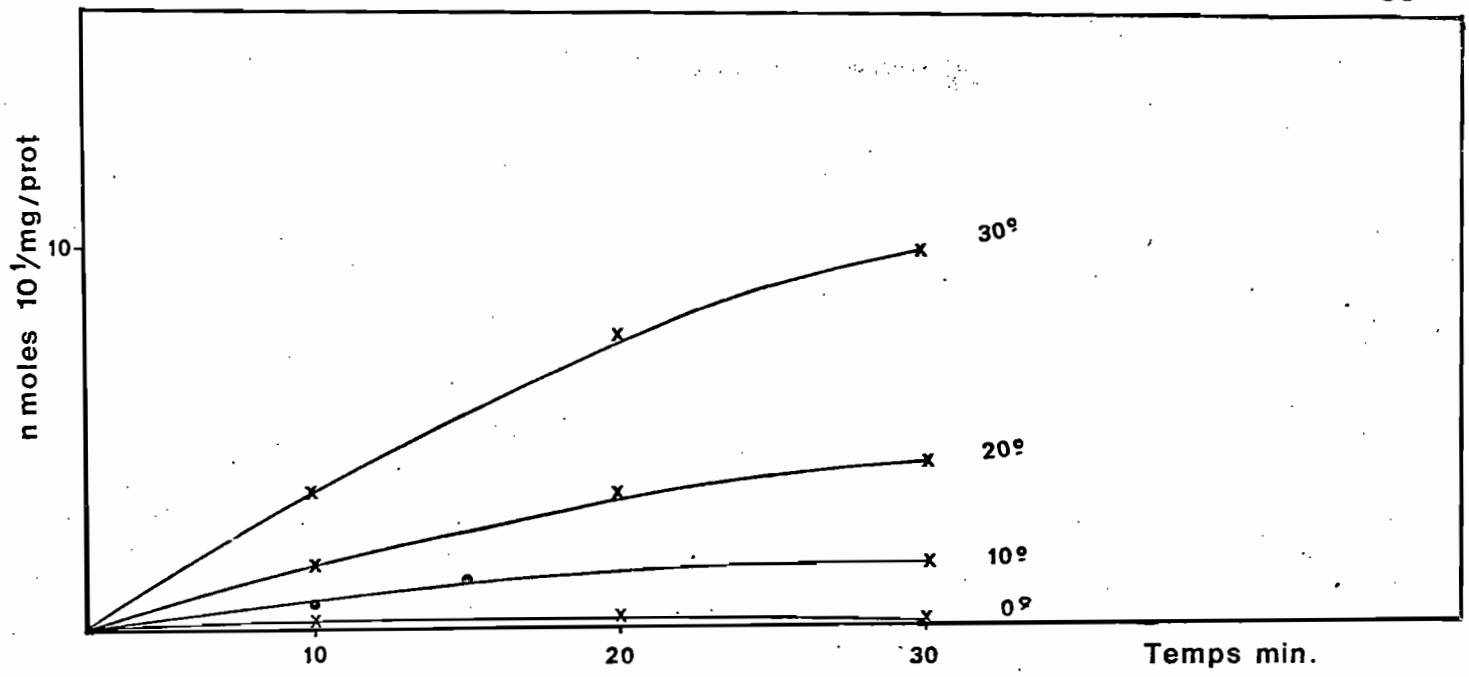
Les valeurs des Q10 sont élevées (tableau 8) et sans rapport avec l'influence de la température sur des phénomènes de nature purement diffusionnelle qui sont simplement proportionnels à la température absolue.

	Arginine	Lysine
Q10 de 10 à 20°	2,51	2,84
Q10 de 20 à 30°	2,09	2,28

Tableau 8 - Valeur des Q10 de l'absorption des Acides basiques.

L'entrée de la Lysine et de l'Arginine dans les lutoïdes doit donc faire intervenir des processus métaboliques de transport actif.

La représentation d'*Arrhenius*  $\text{Log } V = f\left(\frac{1}{T}\right)$  montre (Figure 8) une cassure à 12°3 pour l'Arginine et à 12°7 pour la Lysine. Cette cassure traduit sans doute un changement



Influence de la Température sur la Cinétique de pénétration de la L. lysine dans les lutoïdes (x)

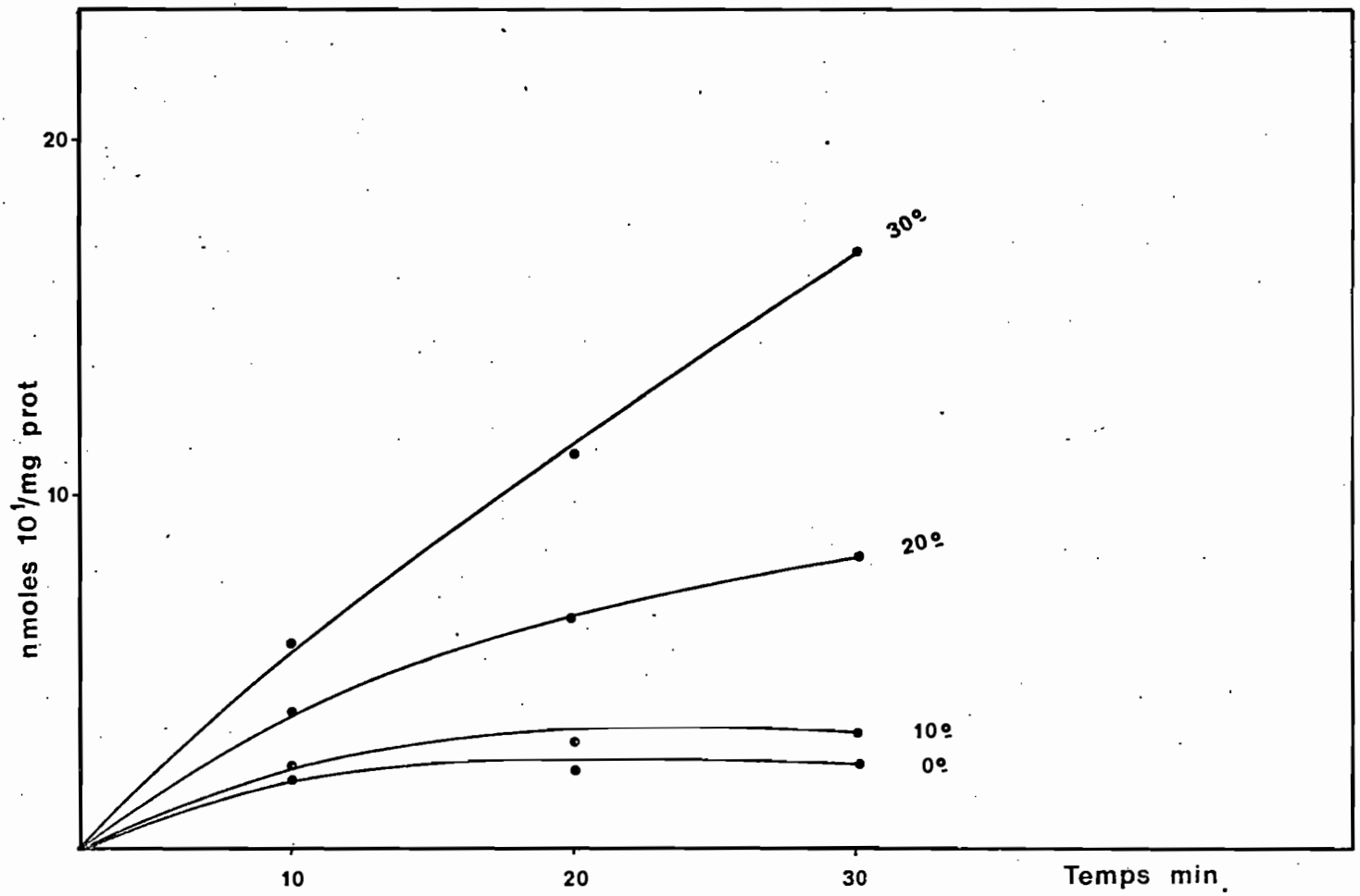
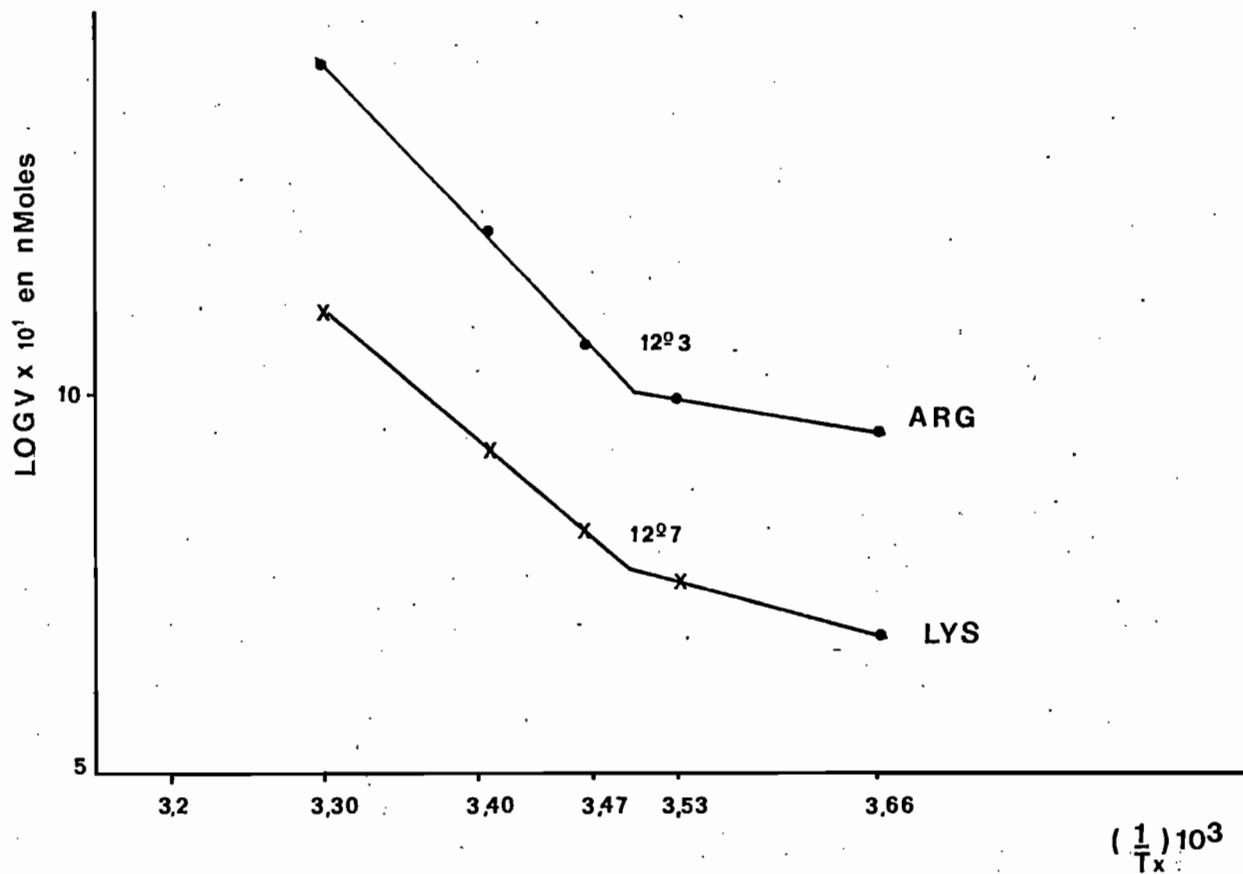


Figure: 7 Influence de la Température sur la Cinétique de pénétration de la L. Arginine dans les lutoïdes (o)



**Figure : 8** Influence de la température sur la vitesse de pénétration de L. Arginine (●) et de la L. Lysine (x) dans les lutoïdes : représentation d'ARRHENIUS ( $\log v = f(\frac{1}{T})$ )

d'état de la membrane lutoïdique dû à la fusion des lipides membranaires aux températures supérieures à 12°C.

Cette indication plaide en faveur de l'existence de médiateurs plus ou moins liés à la membrane.

#### 4. Influence de la concentration externe en acide aminé

L'étude de l'influence de la concentration externe en acide aminé, a été réalisée dans les conditions standard (pH = 7, tampon phosphate, température = 25°C) pour une gamme comprise entre 0,04 mM et 40 mM.

La représentation directe des résultats ( $V = f(c)$ ) conduit à une constatation surprenante : l'absence de plateau de saturation (Figure 9 a). La figure 9 b montre les détails de la fig. 9 a à une échelle plus grande en ordonnée, mais cette fois avec des concentrations allant de 0,04 à 4 mM.

Ce phénomène peut être expliqué par l'insuffisante précision de la méthode aux faibles concentrations (0,04 à 0,1 mM), ainsi que par la perturbation du fonctionnement des lutoïdes aux fortes concentrations (4 à 40 mM).

Dans cette zone en effet, le gradient naturel d'Arginine et de Lysine est complètement inversé et il peut y avoir une altération des propriétés membranaires elles mêmes.

Des phénomènes purement diffusionnels peuvent alors devenir prépondérants et masquer les mécanismes de transport normaux.

Si on laisse de côté ces zones de faibles ou de fortes concentrations pour lesquelles les mesures sont sujettes à caution, on peut tenter, en utilisant la représentation de LINEWEAVER et BURK ( $\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{C}\right)$ ) dans les zones de concentrations moyennes (paraphysiologiques) (0,4 à 10 mM), d'établir un  $K_m$  apparent pour chacun des deux acides aminés étudiés.

On obtient alors effectivement deux droites (Figure 10) qui indiquent des  $K_m$  apparents de 6,6 mM pour l'Arginine et de 10 mM pour la Lysine.

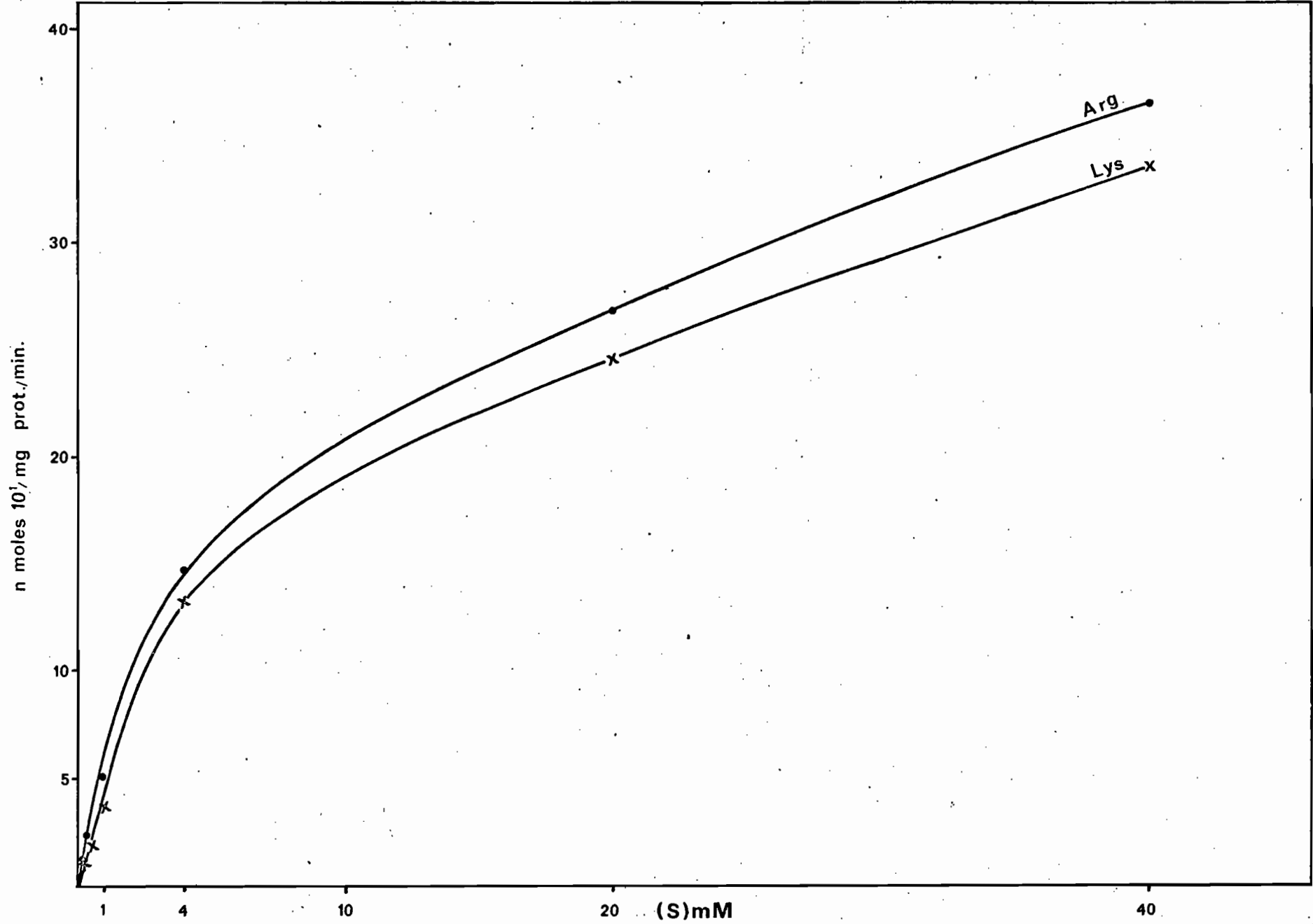


Fig. 9a : Représentation directe de la vitesse de pénétration de l'Arginine (●) et de la L-Lysine (x) dans les lutoïdes en fonction de la concentration du milieu d'incubation en A. Aminés correspondants.

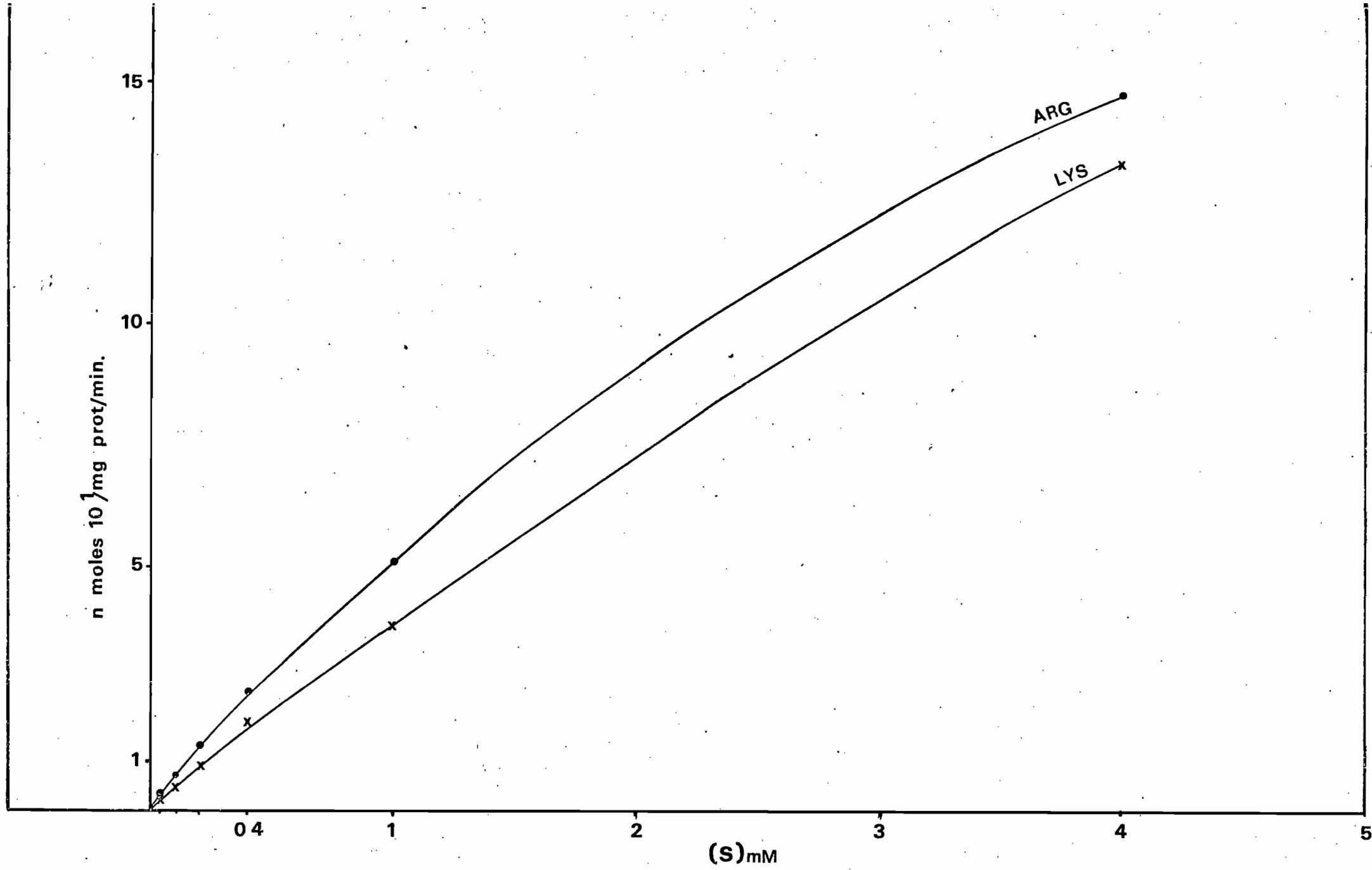
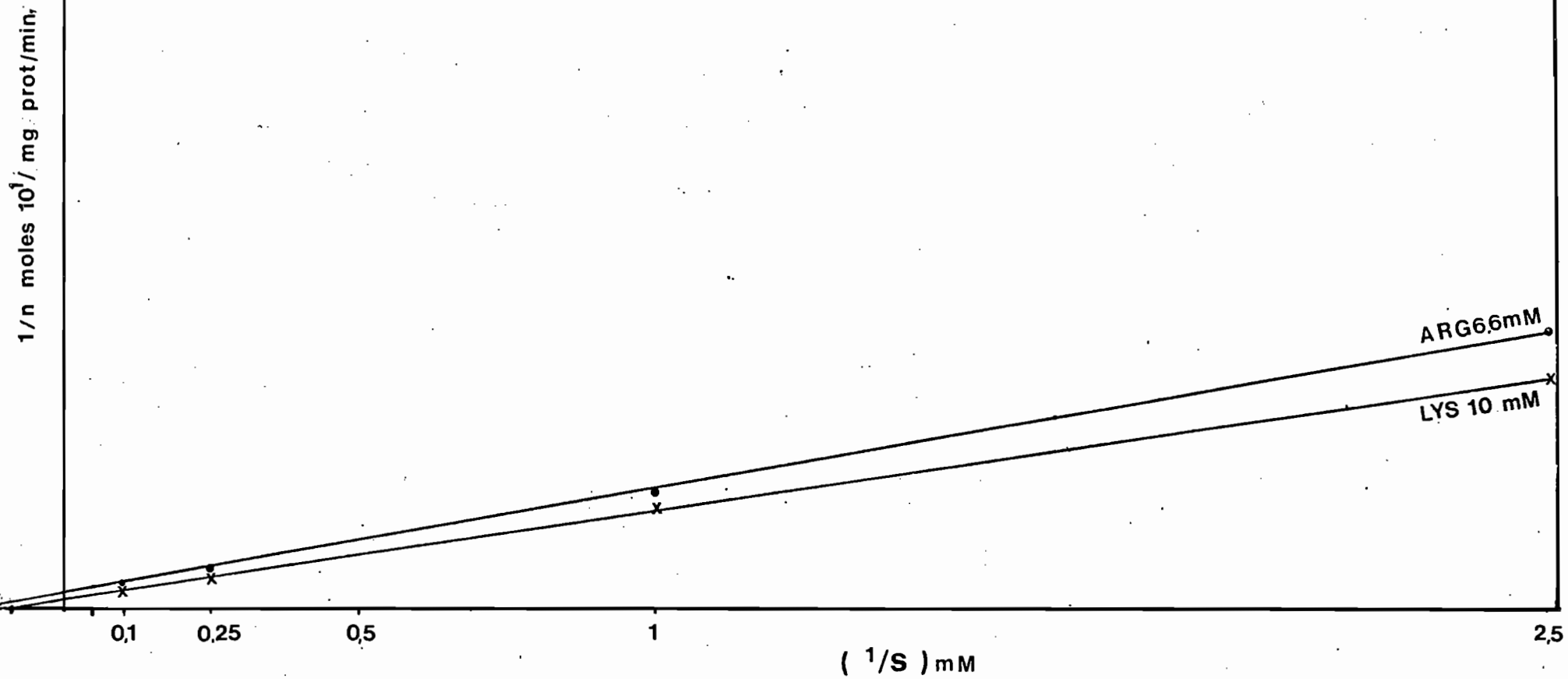


Figure : 9b. Représentation directe de la vitesse de pénétration de l'Arginine (•) et de la L.Lysine (x) dans les lutoïdes en fonction de la concentration du milieu d'incubation en. A. Aminés correspondants



**Figure :10**

Influence de la concentration externe en A. Aminés non radioactifs (ARG . LYS) :  
 représentation par les inverses de la vitesse de pénétration de L. Arginine (●) et de  
 L. Lysine dans les lutoïdes, en fonction de la concentration du milieu d'incubation  
 en A. Aminé correspondant : représentation de LINEWEAVER et BURK

Ces résultats laissent donc supposer que l'absorption de la Lysine et de l'Arginine met en jeu des sites de fixation, membranaires (récepteurs).

Ceci indique que l'Arginine dont le Km est plus faible, présente plus d'affinité vis-à-vis de son éventuel récepteur que la Lysine.

Ceci est conforme aux résultats obtenus dans l'étude des cinétiques d'absorption de ces acides aminés et explique que l'Arginine soit plus absorbée par les lutoïdes que la Lysine.

## 5. Spécificité de l'absorption

### a) Influences réciproques Lysine-Arginine

L'inhibition réciproque de l'absorption des différents acides aminés a été testée en comparant l'absorption dans un milieu d'incubation habituel contenant une gamme de 0,04 à 10 mM de l'un, à celle obtenue dans le même milieu auquel 2 mM de l'autre (non radioactif) ont été ajoutés.

Les courbes obtenues (Figure 11) montrent que la présence de Lysine dans le milieu d'incubation n'a pas d'effet sur l'absorption de l'Arginine.

Par contre, en présence d'Arginine, l'absorption de la Lysine est très nettement réduite. Le taux d'inhibition atteint 65%.

La représentation des inverses (LINEWEAVER et BURK) (Figure 12) montre que cette inhibition n'est pas de type compétitif. Le Km ne change pas. Il reste égal à 10 mM. Cette constatation vérifiée à plusieurs reprises est en contradiction avec les résultats publiés par HANOWER et *al.*

De ceci, on peut conclure que l'absorption des deux acides aminés considérés dans ce travail met en jeu :

- d'une part un récepteur plus spécifique de l'Arginine, qui ne permet que le transport de cet acide aminé et est insensible à la Lysine ;

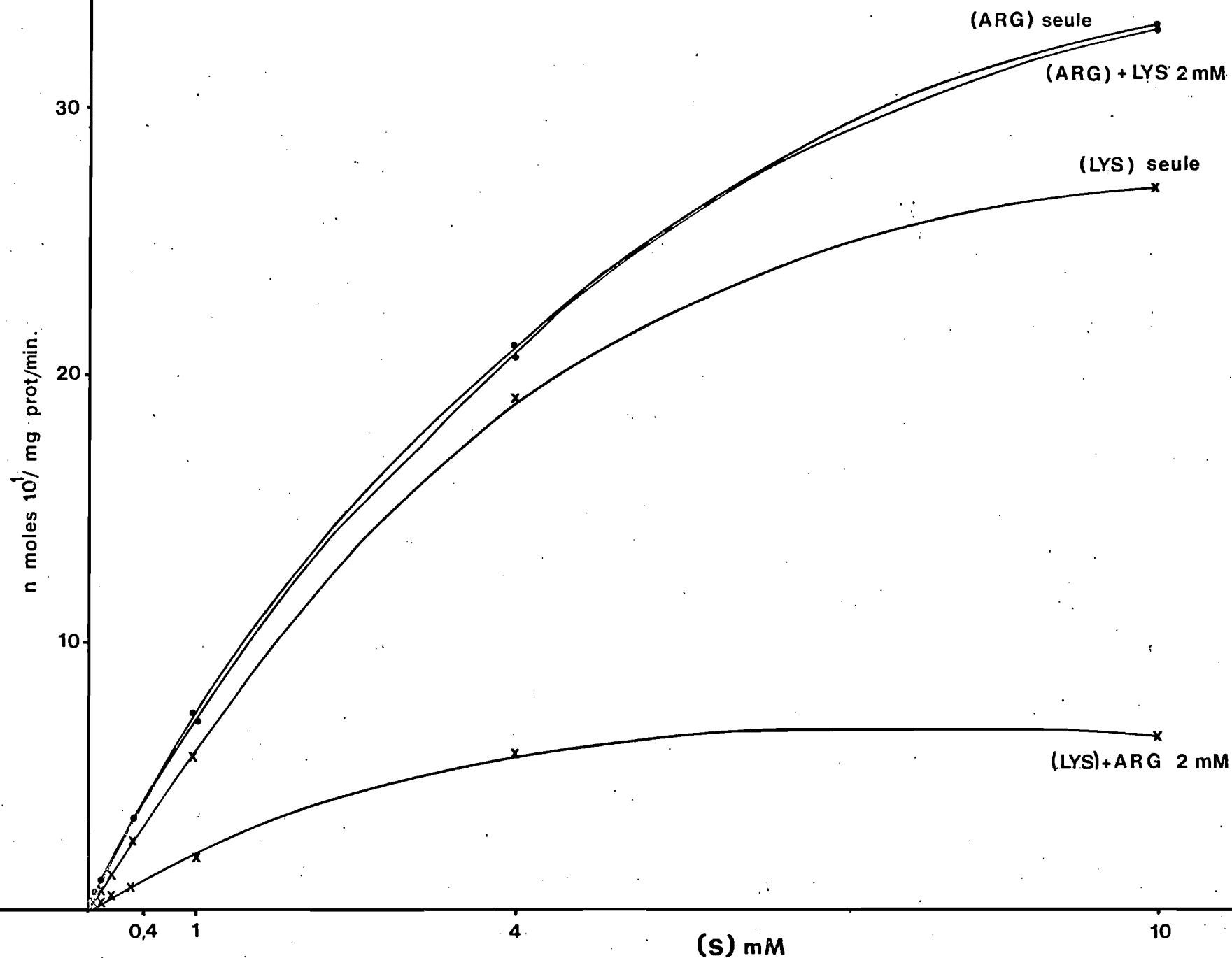


Figure :11

Interaction de la L. Arginine (•) sur l'absorption de la L.Lysine (x) (inhibition) et de la L. Lysine sur l'absorption de la L. Arginine par les lutoïdes

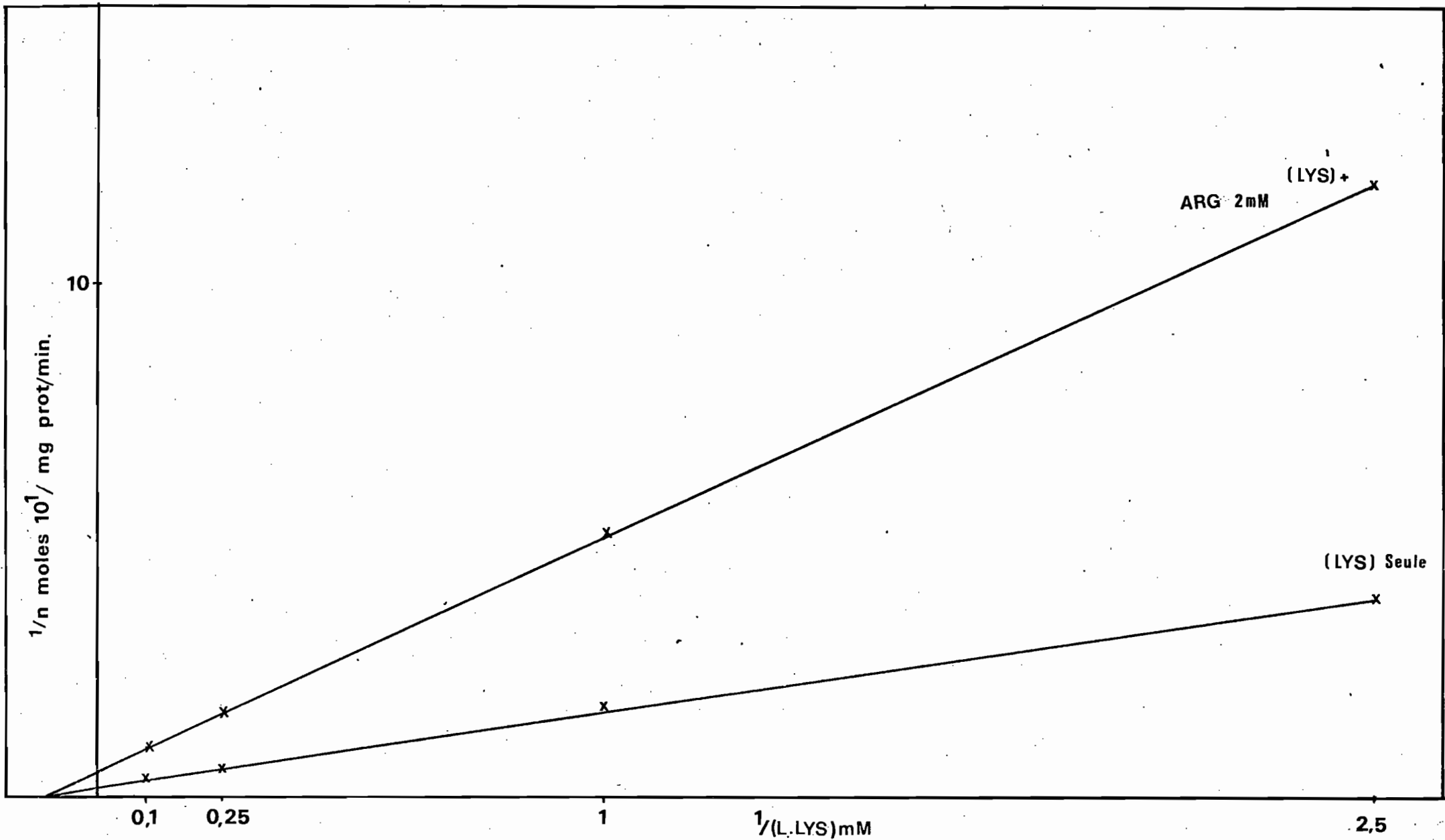


Figure : 12

Inhibition non compétitive de la pénétration de L. Lysine par la L. Arginine dans les lutoïdes: représentation par les inverses de la vitesse de pénétration de L. Lysine, en fonction de la concentration dans le milieu d'incubation en L. Lysine non radioactive représentation de LINEWEAVER et BURK

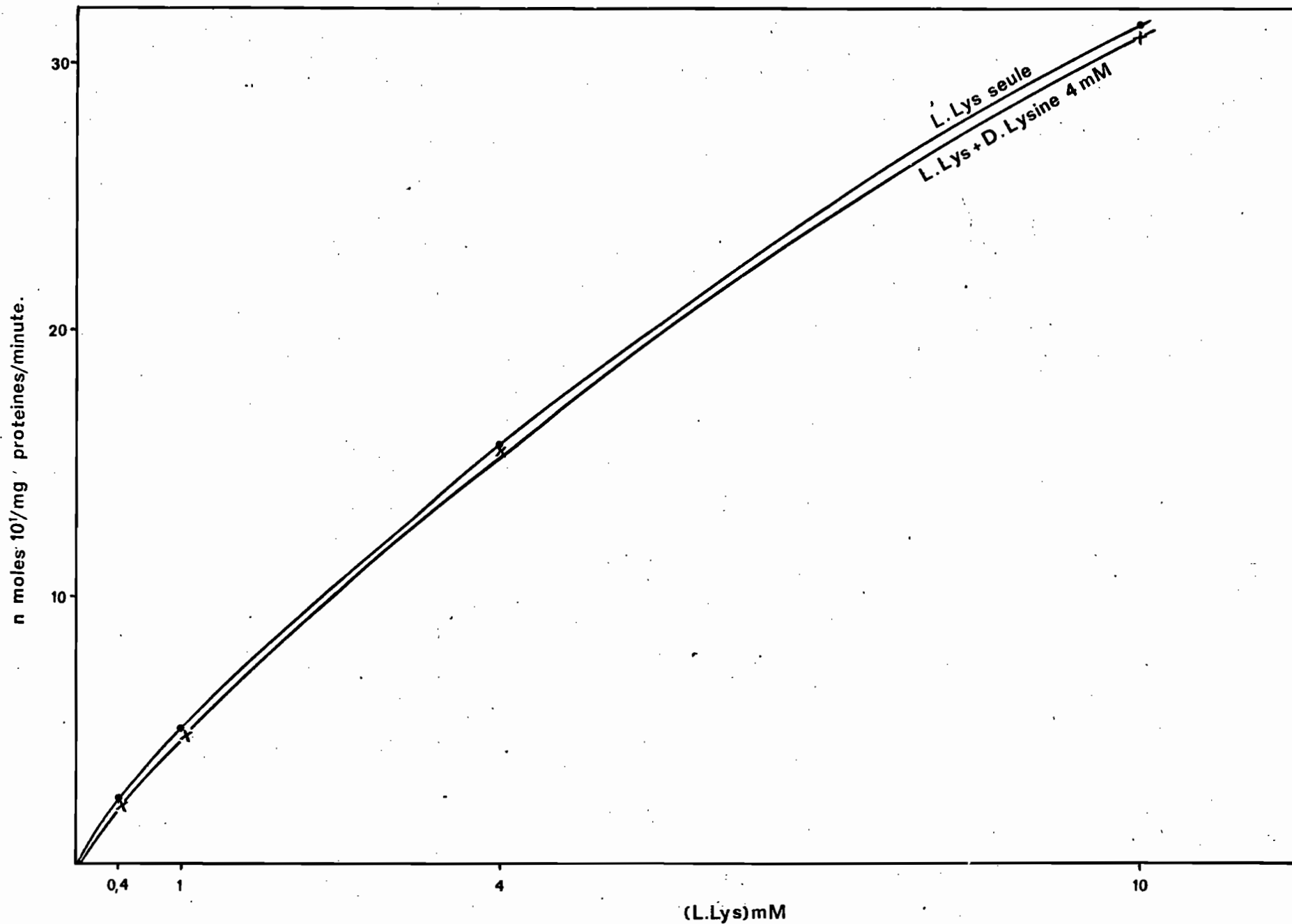


Fig. 13 : Action de la D.Lysine (x) sur la pénétration de la L.Lysine dans les lutoïdes

- d'autre part un second récepteur comportant au moins deux sites distincts, l'un fixant exclusivement la Lysine et catalysant son transport, l'autre fixant d'autres acides aminés, dont l'Arginine, sans les transporter.

La fixation sur ce deuxième site que l'on peut qualifier de "régulateur", entraîne une diminution de la vitesse de pénétration de la Lysine dans les lutoïdes (non compétitivité).

#### b) Influence de la D-Lysine sur l'absorption de la L-Lysine

Les énantiomères utilisés dans toutes les expériences précédentes sont les énantiomères L (naturels). Pour apprécier le degré de spécificité de l'absorption de la Lysine, nous avons testé l'influence de la D-Lysine sur l'absorption de la L-Lysine. La D-Lysine est ajoutée dans le milieu d'incubation à la concentration de 4 mM.

Les résultats consignés dans la Figure 13 montrent que l'énantiomère D de la Lysine est sans influence sur l'absorption de la forme L. Le récepteur de la L-Lysine ne fixe donc pas la D-Lysine. Compte tenu du peu de différence structurale entre les deux isomères, cette absence d'effet de la D-Lysine témoigne d'une haute stéréospécificité du transport de la L-Lysine.

#### II) Essai d'exsorption

Nous avons montré que l'Arginine et la Lysine, pénètrent dans les lutoïdes. Nous avons recherché si après avoir pénétré dans les lutoïdes, ces Acides aminés pouvaient en ressortir.

Pour ces essais d'exsorption, le temps de contact des lutoïdes avec l'Acide aminé radioactif (Arginine ou Lysine) est de une heure. Après lavage, les lutoïdes sont resuspendus pendant une heure dans un milieu tamponné à pH 7,0, en présence de concentrations variables (0 à 5 mM) d'Acide aminé non radioactif.

Dans un milieu d'exsorption ne contenant pas d'Acide aminé (Arginine, ou Lysine) 99,7% de l'Arginine et 98,5% de la Lysine radioactive sont retenus dans les lutoïdes (tableau 9).

En présence de concentrations variables de ces Acides aminés dans le milieu extérieur, on observe que 95 à 97% de l'Arginine et 74 à 79% de la Lysine restent dans les lutoïdes, quelle que soit la concentration externe en Acide aminé. Le faible efflux de la Lysine obtenu dans ce dernier cas, qui n'est pas toujours reproductible, peut-être considéré comme résultant de l'éclatement d'un certain nombre de lutoïdes au cours de la manipulation. On peut supposer, comme pour l'Arginine que la quasi totalité de la Lysine est retenue dans les lutoïdes.

Remarquons d'autre part, que cette impossibilité d'obtenir une exsorption significative, indique que l'absorption de la Lysine et de l'Arginine ne se fait pas par simple échange isotopique.

Nous avons réalisé des tentatives d'exsorption dans des milieux de pH variable. Les résultats peu reproductibles, semblent indiquer qu'il n'y a pas d'exsorption pH dépendante. Il apparaît donc qu'il y a immobilisation dans les lutoïdes des Acides aminés absorbés, et que les facteurs agissant sur leur pénétration (concentration, pH externe et  $\Delta$  pH) ne sont pas responsable de cette rétention.

RÉTENTION PAR LES LUTOÏDES DE L'ARGININE ET DE  
LA LYSINE RADIOACTIVE ABSORBÉE

L Y S I N E				
Milieu d'incubation pH 7	Absorption n moles incorporé	Milieu d'exorption pH 7	Exorption n moles restante	% Rétention
Lys 0,5 mM	0,29469	Tampon	0,29025	98,5
Lys 0,5 mM	0,29469	Lys 0,5 mM	0,22194	75,4
Lys 0,5 mM	0,29469	Lys 2,5 mM	0,23295	79,1
Lys 0,5 mM	0,29469	Lys 5 mM	0,21954	74,6

A R G I N I N E				
Milieu d'incubation pH 7	Absorption n moles incorporé	Milieu d'exorption pH 7	Exorption n moles restante	% Rétention
Arg 0,25 mM	0,28883	Tampon	0,28789	99,7
Arg 0,25 mM	0,28883	Arg 0,25 mM	0,28057	97,2
Arg 0,25 mM	0,28883	Arg 2,5 mM	0,27661	95,8

Tableau 9 - Influence de la concentration du milieu extérieur en acide aminés à pH 7 sur l'exorption de la Lysine ou de l'Arginine absorbée par les lutoïdes.

## Deuxième partie

### LES EFFECTEURS DE L'ABSORPTION

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons envisagé divers aspects des modalités de l'absorption par les lutoïdes, de quelques acides aminés, en particulier de 2 acides aminés basiques, l'Arginine et la Lysine.

Nous avons constaté :

- d'une part que dans les conditions physiologiques, la pénétration de ces acides aminés se fait contre le gradient de concentration, ce qui suppose une consommation d'énergie,
- et d'autre part qu'elle met en jeu deux récepteurs différents, l'un très spécifique de l'Arginine, l'autre moins spécifique, capable de fixer Lysine et Arginine.

Pour mieux comprendre le mécanisme de cette absorption, nous nous sommes dans cette deuxième partie intéressé à l'influence d'un certain nombre d'effecteurs.

Le premier, le N ethyl-maleimide (NEM) est connu pour se fixer sélectivement sur les groupements SH des composés protéiniques et il est donc susceptible d'interagir avec les récepteurs membranaires lutoïdiques de l'Arginine et de la Lysine.

Les autres agissent, plus ou moins spécifiquement (nous y reviendrons dans la 3e partie) au niveau des gradients de protons transmembranaires, donc par conséquent sur le  $\Delta pH$  existant entre le compartiment intra-lutoïdiques et le milieu cytoplasmique, soit en l'amplifiant (ATP, Ethrel) soit en le déchargeant ( $NH_4 Cl$ , 2-4 DNP) (\*).

Nous envisagerons d'abord l'effet du NEM.

---

(\*) Initialement choisis en fonction d'informations bibliographiques recueillies sur des matériels variés, ces différents effecteurs ont été testés sur des lutoïdes et nous avons ainsi vérifié qu'ils avaient bien l'effet attendu sur le  $\Delta pH$  - (voir annexe n° 4),  
Tableau 13.

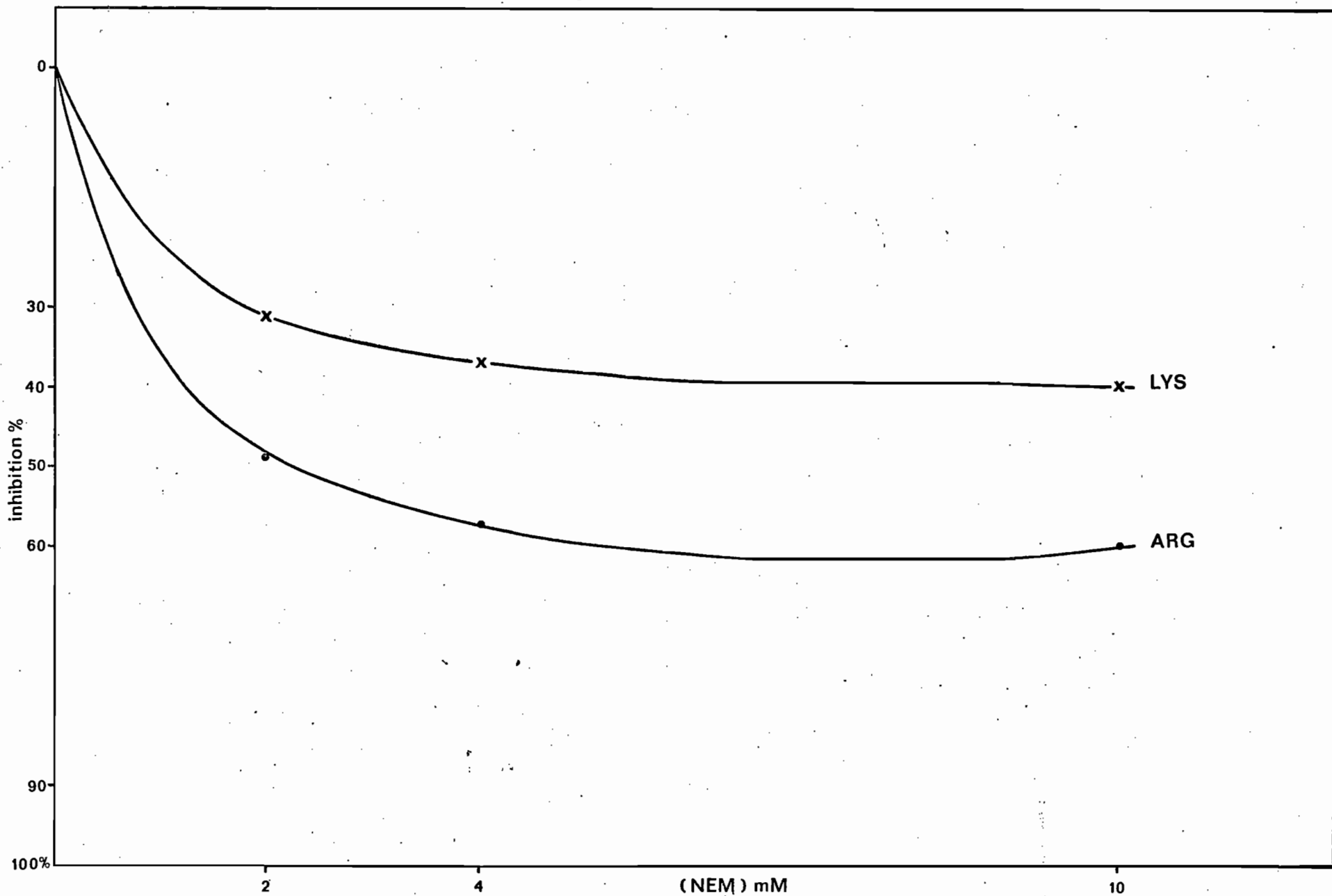


Fig. 14 : Action du NEM à concentration croissante sur la pénétration de la L. Lysine (x) et de L. Arginine (•) dans les lutoïdes. Résultats exprimés en % d'inhibition par rapport au témoin incubé sans NEM

I) Action d'un effecteur agissant au niveau des récepteurs : NEM

Les lutoïdes sont préparés et mis à incuber dans les conditions habituelles. On ajoute seulement au milieu d'incubation des quantités variables de NEM, comprises entre 0 et 10 mM.

Les résultats portés sur la Figure 14 expriment en pourcentage l'inhibition de l'absorption des acides aminés par le NEM à concentration croissante.

On constate que cet effecteur exerce un effet inhibiteur sur l'absorption des deux acides aminés. Son action commence à 2 mM et atteint son degré maximum des 4 mM jusqu'à 10 mM. Elle varie d'intensité selon l'acide aminé considéré : pour la Lysine elle est de l'ordre de 40% et pour l'Arginine de 60%. A concentration égale, le NEM agit donc plus fortement sur le récepteur de l'Arginine que sur celui de la Lysine.

Le fait que le NEM inhibe ainsi de façon différente l'absorption des deux acides aminés, peut s'expliquer en admettant que les récepteurs membranaires de chacun d'eux sont distincts, ce qui corrobore les observations faites précédemment sur la spécificité de l'absorption.

Le NEM étant un réactif des groupements - SH, on peut en conclure que, des thiols doivent intervenir dans l'établissement des interactions substrat récepteurs.

II) Action d'effecteurs agissant au niveau du gradient de pH

A) Amplificateurs du gradient de pH

1. L'Ethrel

L'ethrel, est un générateur d'Ethylène bien connu en agronomie utilisé notamment pour induire la floraison de l'ananas.

En hévéiculture, il est utilisé pour stimuler les arbres dans le but d'obtenir une surproduction de latex, (D'AUZAC et RIBAILLER 1969 ; RIBAILLER 1972 ; JACOB 1975). L'opération

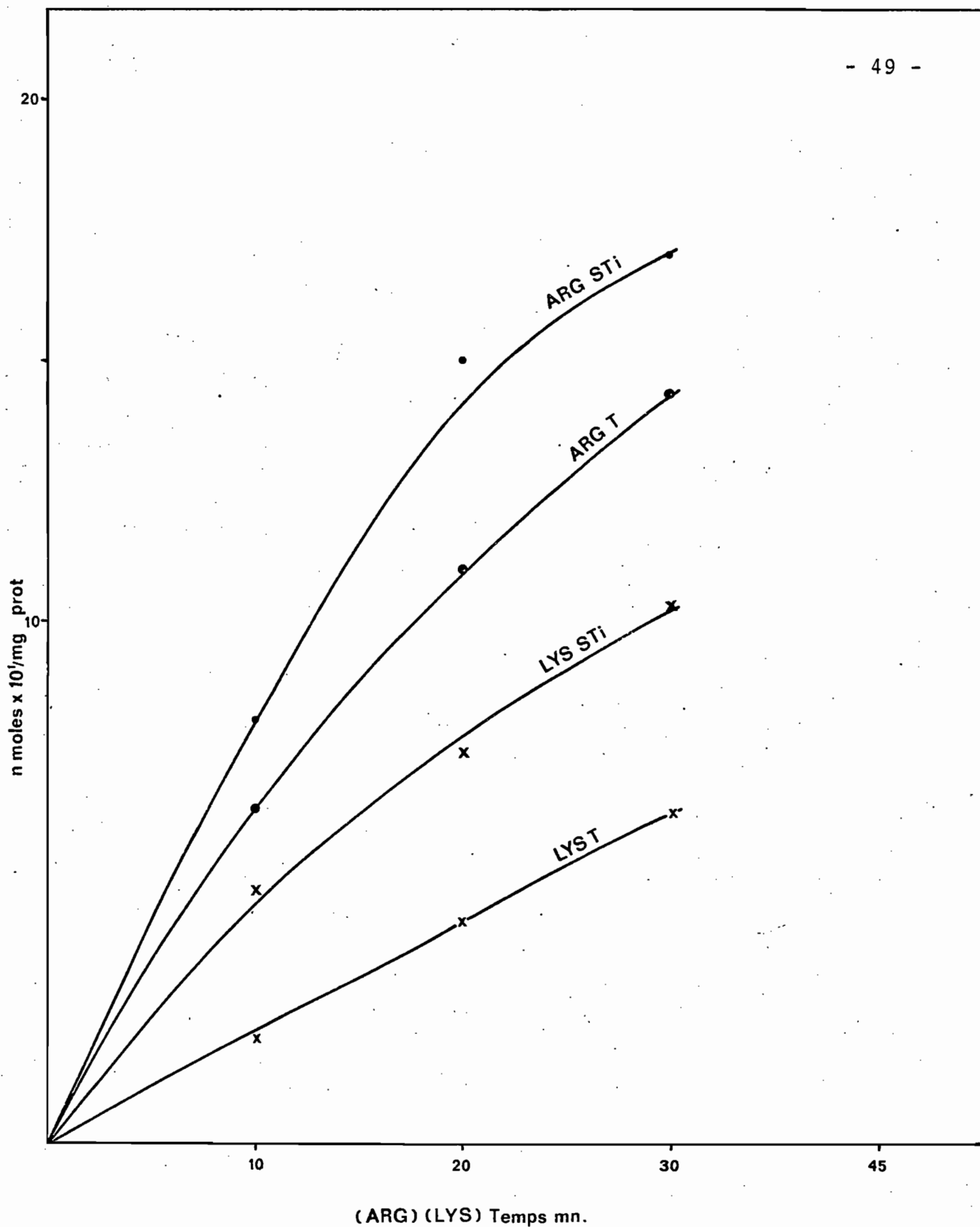


Fig. 15 : Influence de la stimulation par L'Ethrel sur la cinétique de pénétration de l'Arginine (•) et de la Lysine (x) dans les lutoïdes  
Sti: arbres stimulés T: arbres témoins

pratiquée au niveau du panneau de saignée consiste à gratter l'écorce sur une bande de 2 cm de large qui est ensuite badi-geonnée avec de l'ethrel dilué à 5% dans de l'huile de palme.

Le résultat du traitement est une modification des propriétés coagulantes du latex qui provoque un allongement de la durée d'écoulement, donc une production plus importante.

Plusieurs auteurs (RIBAILLER, 1970 a, PUJARNISCLE 1969 a, JACOB 1975) ont montré que le traitement par l'Ethrel stabilise la membrane lutoïdique. COUPE (1977), HANOWER et *al.* (1979) ont en outre mis en évidence que la stimulation des arbres se traduit par une acidification du milieu intralutoïdique ce qui provoque une augmentation du  $\Delta$ pH.

Il nous a donc paru intéressant de voir si la stimulation avait aussi un effet sur l'absorption des acides aminés. Pour ce faire, nous avons comparé sur une durée de 30 minutes la cinétique de l'absorption de l'Arginine et de la Lysine par des lutoïdes provenant de latex d'arbres stimulés ou non.

Le milieu d'incubation contient au départ 0,5 mM de L.Lysine et 0,25 mM de L.Arginine.

Les résultats sont représentés sur la figure 15. Ils montrent que les lutoïdes provenant du latex des arbres stimulés absorbent plus fortement la Lysine et l'Arginine que ceux du latex "témoin" des arbres non stimulés.

Exprimée en valeur absolue, cette augmentation de l'absorption est, pour chacun des deux acides aminés étudiés, du même ordre de grandeur = 3,5 à 4 nanomoles/mg de protéine après 20 minutes d'incubation, mais en valeur relative, elle est plus faible pour l'Arginine (+ 37%) naturellement plus absorbée par les lutoïdes, que pour la Lysine (+ 71%).

## 2. Effet de l'ATP-Mg

### a). Apporté seul

Depuis les travaux de D'AUZAC et LIORET (1974) on sait que la pénétration d'un anion comme le Citrate est exaltée par

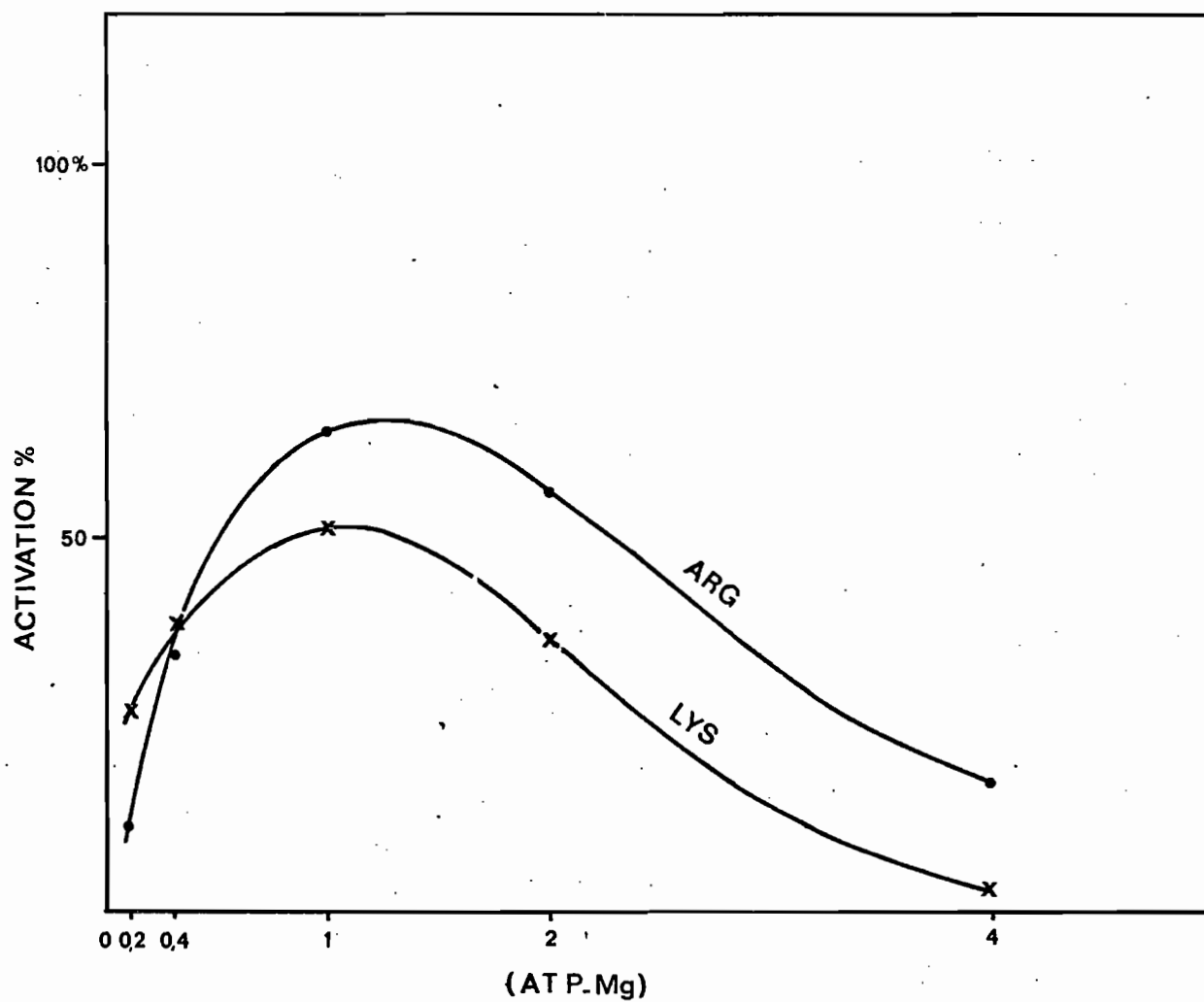


Fig.16 : Action de l'ATP. Mg à concentration croissante sur la pénétration de la L. Arginine (●) et de la L. Lysine (x) dans les lutoides - Résultats exprimés en % d'Activation par rapport au témoin sans ATP

la présence d'ATP. LAMBERT (1975) a pu montrer *in vitro*, que l'addition d'ATP dans le milieu d'incubation entraîne une acidification du serum intralutoïdique et une augmentation corrélatrice du gradient de pH. Il était donc logique de penser que le gradient de pH pouvait être le moteur de l'absorption du Citrate par les lutoïdes.

Cette hypothèse a été effectivement confirmée par D'AUZAC (1977) qui a pu mettre en évidence l'existence d'une ATPase - Mg dépendante, localisée sur la membrane lutoïdique, qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP exogène.

L'énergie ainsi libérée permet le fonctionnement d'une pompe à proton couplée à l'absorption du Citrate, MARIN (1981), CRETIN (1982). C'est à la lumière de ces résultats que nous avons entrepris l'étude de l'effet de l'ATP (1 mM) sur l'absorption de l'Arginine et de la Lysine (tableau 11).

L'ATP-Mg est apporté seul dans le milieu d'incubation à des concentrations variant entre 0 et 4 mM. Les résultats portés sur la Figure 16 sont exprimés en % d'activation. On constate que l'apport d'ATP au milieu d'incubation a un effet activateur qui commence à 0,2 mM et atteint son optimum à 1 mM.

A cette dernière concentration, l'augmentation de l'absorption est de 50% pour la Lysine et de 60% pour l'Arginine. A 2 mM l'effet positif s'atténue pour devenir très réduit à 4 mM.

Ainsi l'addition exogène d'un effecteur tel que l'ATP, et la stimulation des arbres par l'Ethrel qui ont le même effet amplificateur du gradient de pH existant entre le milieu extérieur et le compartiment intralutoïdique, se traduisent au niveau de l'absorption de l'Arginine et de la Lysine par la même action stimulatrice.

Autrement dit, il semble que ce qui augmente le  $\Delta pH$  favorise l'absorption de ces deux acides aminés.

En ce qui concerne l'ATP cependant, on peut se demander si l'effet positif enregistré est un effet direct de la molécule, ou, au contraire, le résultat d'une action indirecte se situant au niveau d'une ATPase membranaire susceptible d'énergiser le compartiment lutoïdique.

C'est cette question qui nous a conduit à mesurer l'effet de l'ATP sur l'absorption de la Lysine et de l'Arginine en présence d'un inhibiteur spécifique des ATPases.

	Nanomoles incorporées		Activation
	Témoins	1 mM ATP-Mg	%
ARG. 0,25 mM	1,80268	2,75001	52,5
LYS. 0,5 mM	2,94807	4,15642	40,9

Tableau 10 - Influence de l'ATP-Mg sur l'absorption de la L.Arginine et de la L.Lysine par les lutoïdes. Temps d'incubation = 1 heure. pH du milieu = 7,0. Concentration en ATP = 1 mM en Mg = 2,5 mM.

b). En présence de N-N' dicyclohexyl carbodiimide (DCCD)

L'inhibiteur choisi pour réaliser cette expérience est le DCCD, molécule qui agit au niveau des groupements carboxyle du site actif des ATPases (GLASER E., NORLING B., ERNSTER L. 1980).

Il a été apporté au milieu d'incubation à la concentration de 0,5 mM tout d'abord en présence des acides aminés seuls (absence d'ATP). Les résultats sont notés après 30 minutes.

Le tableau n° 11 montre que la présence du DCCD ne modifie pas l'absorption de façon significative.

	n moles incorporées	% Activation
Lysine seule	1,63781	
Lysine + DCCD	1,8869	15 %
Arginine seule	2,2927	
Arginine + DCCD	2,4099	5 %

Tableau 11 - Influence du DCCD sur l'absorption de la L.Lysine et de la L.Arginine par les lutoïdes. Temps d'incubation : 1 heure, pH du milieu : 7,0, concentration en DCCD 0,5 mM

Cet effecteur n'a donc pas d'effet direct apparent sur les récepteurs membranaires de l'Arginine et de la Lysine des lutoïdes.

Par contre, en présence d'ATP (1 mM), l'action est importante (tableau 12). On observe en effet que l'activation de l'absorption de la Lysine, obtenue en présence d'ATP seule et qui atteint cette fois 53% est annulée par le DCCD.

L'apport du DCCD en présence d'ATP semble même diminuer l'absorption comparativement au témoin. Cette constatation rejoint les observations rapportées par D'AUZAC (1977) qui montrent que le DCCD inhibe ou moins partiellement l'activité de l'ATPase membranaire lutoïdique.

	n Moles incorporées	Activité % du témoin	Effets %
Lysine seule	1,63781	100 %	0
Lysine + DCCD	1,8869	115 %	+ 15
Lysine + ATP	2,5181	153 %	+ 53
Lysine + ATP + DCCD	1,4706	90 %	- 10

Tableau 12 - Influence du DCCD sur l'absorption de la L.Lysine en présence de l'ATP-Mg.  
Temps d'incubation : une heure. pH du milieu : 7,0  
Concentration en DCCD 0,5 mM, en ATP 1 mM Mg 2,5 mM

On peut conclure de ces expériences que l'énergie nécessaire à l'absorption de la Lysine par les lutoïdes est apportée, au moins en partie, par l'activité d'une ATPase membranaire sensible au DCCD.

#### B) Annulateurs du gradient de pH

Deux agents connus comme déchargeant les gradients de protons transmembranaires ont été utilisés. Il s'agit du 2-4 Dinitrophenol (2-4 DNP) et du Chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4 \text{Cl}$ ).

Le premier est un découplant bien connu des phosphorylations oxydatives, et le second décharge les gradients de protons intrachloroplastiques.

Ajoutés au milieu d'incubation des lutoïdes à des concentrations variant entre 0 et 10 mM ils ont tous les deux un effet inhibiteur marqué sur l'absorption (fig. 17 et 18).

L'effet du 2-4 DNP débute à 2 mM et atteint son maximum entre 5 et 6 mM. A cette concentration et jusqu'à 10 mM, l'inhibition, qui est de même intensité pour l'Arginine et la Lysine, atteint 31%.

En ce qui concerne le  $\text{NH}_4 \text{Cl}$  l'inhibition commence à se faire sentir dès 0,4 mM pour approcher de son maximum aux environs de 8 à 9 mM. Pour ces valeurs, le pourcentage d'inhibition obtenu varie selon l'acide aminé considéré. Il est plus faible pour l'Arginine (48%) que pour la Lysine (60%).

Ainsi, après avoir constaté en étudiant l'influence de l'ATP et de l'Ethrel, que ces effecteurs en provoquant une augmentation du gradient de pH entre les milieux intra et extralutoïdique (annexe 3) activent l'absorption, nous observons que les agents qui déchargent ce gradient réduisent l'absorption.

Ce parallélisme entre l'évolution du  $\Delta\text{pH}$  et celle de l'absorption tend à accréditer l'idée que, comme dans le cas du Citrate (D'AUZAC et LIORET 1974) le  $\Delta\text{pH}$  pourrait être l'un des moteurs de l'absorption de l'Arginine et de la Lysine.

C'est cette hypothèse que nous allons mettre à l'épreuve dans la 3e partie de ce mémoire.

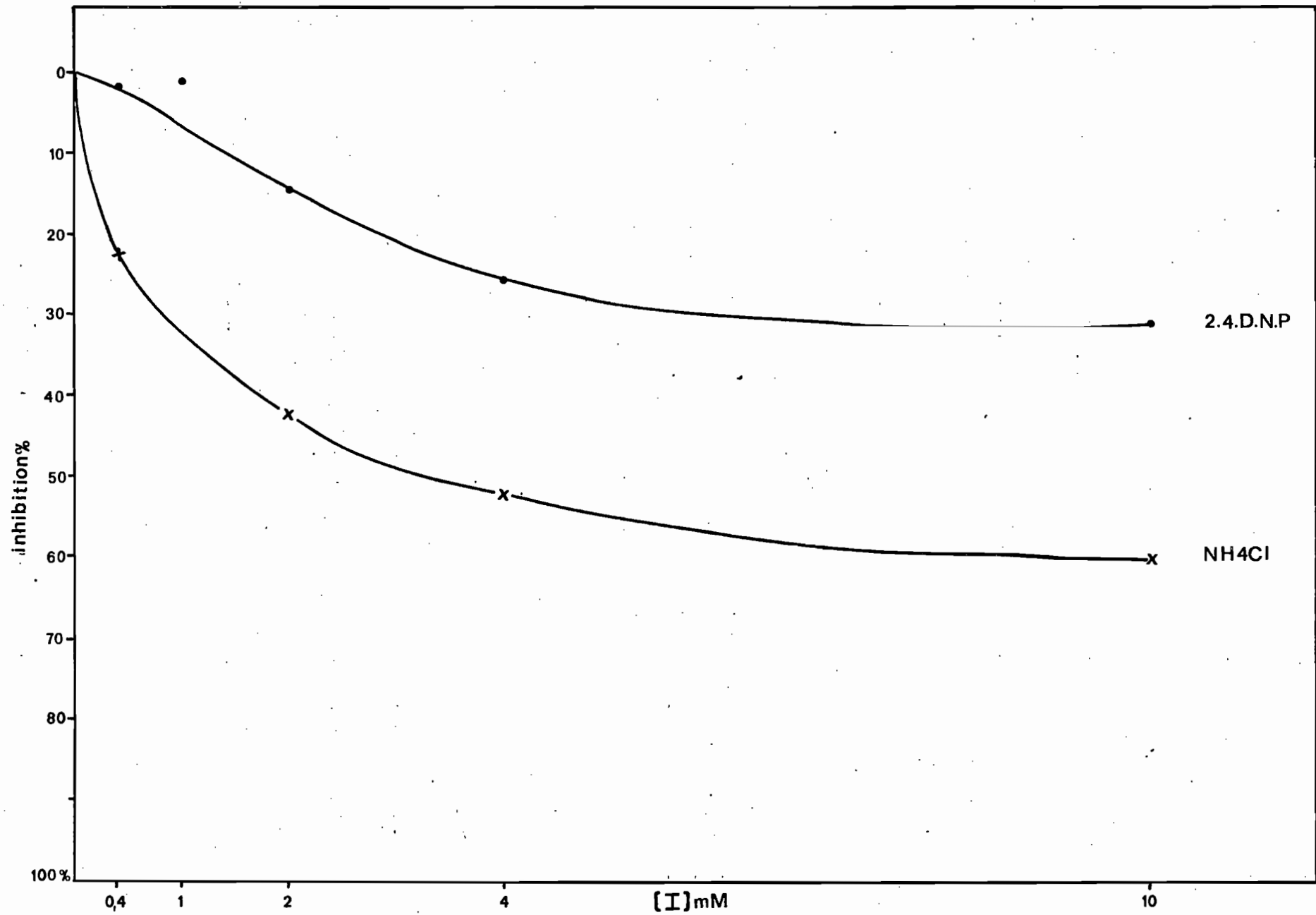


Fig. 17 : Action du 2.4 DNP (•) et de NH<sub>4</sub>Cl (x) à concentration croissante sur la pénétration de la L.Lysine dans les lutoïdes - Résultats exprimés en % d'inhibition par rapport au témoin incubé sans effecteurs

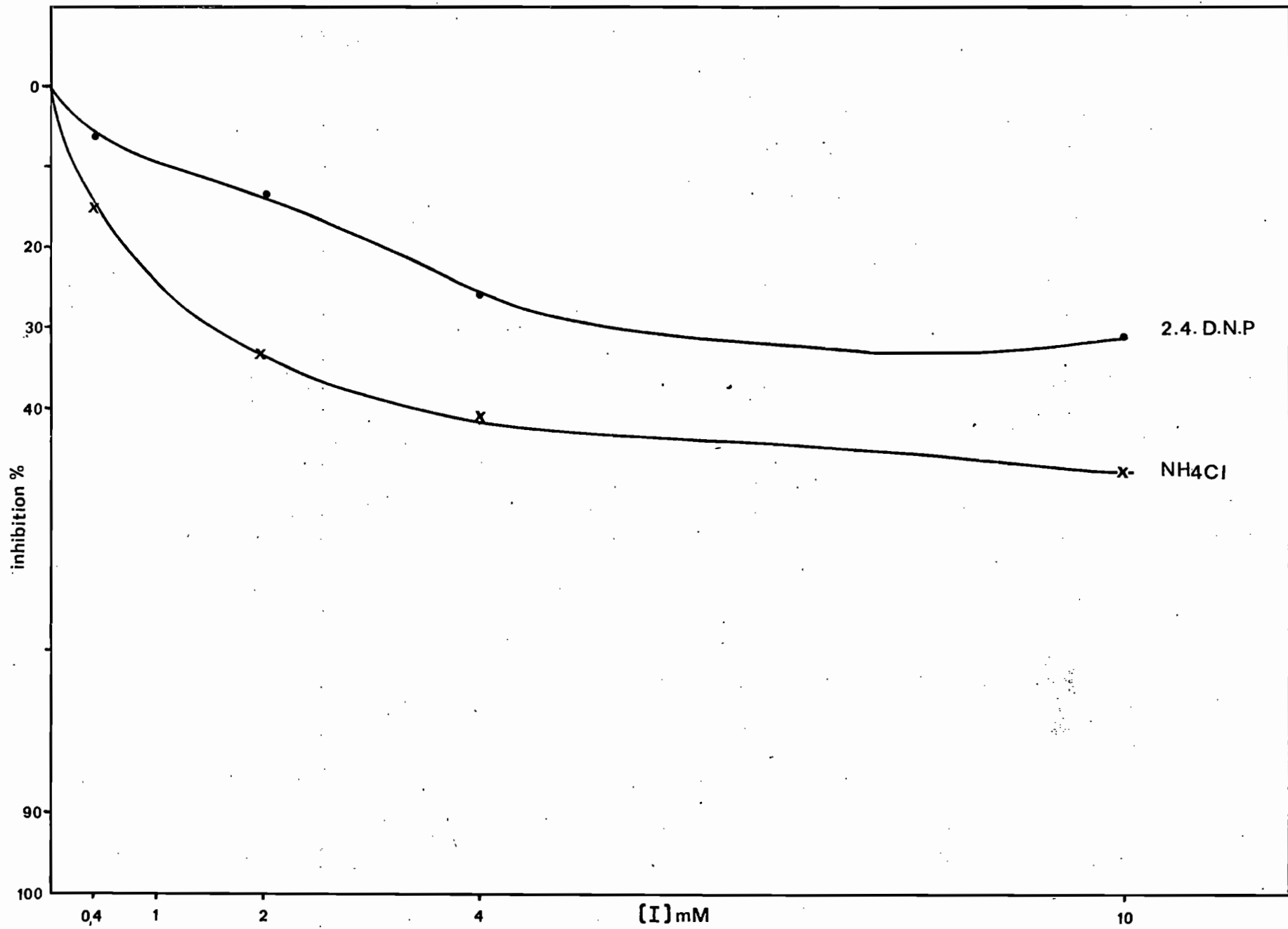


Fig. 18 : Action du 2.4 DNP (●) et de NH<sub>4</sub>Cl (x) à concentration croissante sur la pénétration de L. Arginine dans les lutoïdes . Résultats exprimés en % d'inhibition par rapport au témoin incubé sans inhibiteurs

Troisième partie

RELATIONS ENTRE L'ABSORPTION LUTOÏDIQUE DES ACIDES AMINES  
ET LA PRODUCTION

Comme nous l'avons déjà mentionné à plusieurs reprises, il existe une relation entre la différence des pH du sérum cytoplasmique et du milieu intralutoïdique et la production des arbres.

Cette constatation repose sur de multiples observations, par exemple celles qui dérivent de l'examen des variations individuelles ou saisonnières de la production.

Ainsi, COUPE (1977) a pu montrer dans une étude réalisée arbre par arbre que plus la production est faible, plus le pH cytoplasmique est acide, et par conséquent plus le  $\Delta$ pH est réduit. CRETIN (1978), BRZOZOWSKA-HANOWER et al. (1979), travaillant également arbre par arbre, ont mis en évidence que les variations saisonnières de production sont liées à des variations parallèles du pH cytoplasmique et du  $\Delta$  pH.

L'étude des effets de la stimulation par l'Ethrel apporte aussi des indications confirmant l'existence de cette relation entre  $\Delta$ pH et production. Nous avons déjà mentionné les résultats de COUPE (1977) et d'HANOWER et al. (1979) qui ont montré que la stimulation acidifie le milieu intralutoïdique. De façon complémentaire, TUPY (1973) a montré que le traitement à l'éthylène augmente le pH cytoplasmique. Ces deux effets conjugués jouent dans le sens d'un accroissement du  $\Delta$ pH, qui accompagne donc l'augmentation de production due à la stimulation.

Si comme les observations réalisées précédemment à l'occasion de l'étude d'un certain nombre d'effecteurs (ATP, Ethrel, 2-4 DNP,  $\text{NH}_4$  Cl) tendent à le montrer, il existe une relation entre l'intensité de l'absorption des acides aminés basiques et le  $\Delta$ pH, on devrait également trouver, comme pour

le Citrate (LAMBERT et COUPE, 1977) une relation avec la production.

C'est sur ce point que nous nous sommes arrêté dans cette 3ème partie en effectuant des mesures d'absorption d'une part sur des lutoïdes isolés, préparés selon la procédure habituelle, et d'autre part, nous en verrons les raisons par la suite, dans du latex brut.

I) Mesures effectuées sur des lutoïdes mis à incuber dans un milieu tamponné artificiel

Pour réaliser cette étude, 268 arbres du clone GT<sub>1</sub> sélectionnés pour leur croissance homogène ont été répartis en 15 classes selon leur production de caoutchouc sec par arbre, par saignée (moyenne de 3 relevés sur 4 saignées cumulées) (Figure 19).

Vingt arbres les plus homogènes ont été sélectionnés dans les classes 9 à 15 (90 à 150 grammes/arbre/saignée) qui regroupent les hauts producteurs (HP) et 32 dans les classes 1 à 5 (10 à 50 grammes/arbre/saignée) qui constituent les bas producteurs (BP).

L'expérience consistait pour chaque arbre HP ou BP à mesurer la production en grammes de caoutchouc sec par saignée et à préparer deux parties aliquotes de la fraction lutoïdique : la première traitée aux ultra-sons pour provoquer l'éclatement des lutoïdes permettait la mesure du pH de leur milieu interne. La seconde était utilisée pour effectuer les mesures d'absorption. Enfin le pH du sérum cytoplasmique après centrifugation du latex était mesuré. Ces opérations ont été réalisées sur une période d'un mois (2 saignées hebdomadaires) afin d'éviter l'artefact des variations saisonnières. A chaque fois 12 HP et 12 BP sont traités.

Les résultats suivants ont ainsi été obtenus :

1. Vérification de l'existence d'une corrélation entre  $\Delta$ pH et production

L'établissement par la méthode des moindres carrés des droites de régression, et le calcul des coefficients de

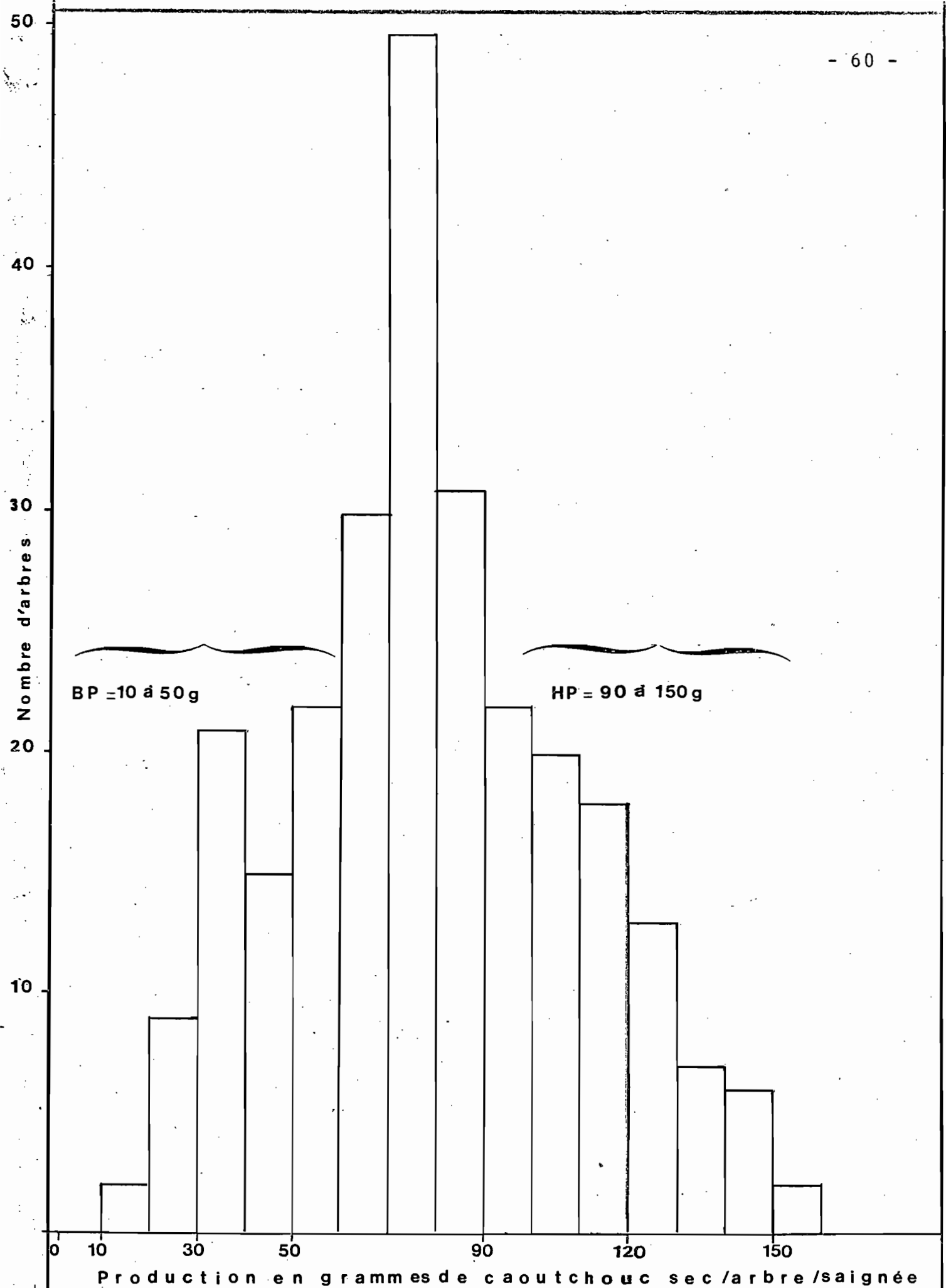


Fig.19-Histogramme des classes de production de caoutchouc (Hévéas du clône GT1)

corrélation entre :

- Production et pH cytoplasmique (figure 20),
- Production et pH intralutoïdique (figure 21),
- Production et  $\Delta$ pH (figure 22)

montrent comme on pouvait s'y attendre qu'il existe bien une corrélation très hautement significative entre la production des arbres et le  $\Delta$ pH. Si l'on réalise le calcul avec le Logarithme de la production au lieu de la production, on n'obtient qu'une faible amélioration de la corrélation (tableau 14).

	pH Cyt.	pH Lut.	$\Delta$ pH
Production	+ 0,7827	+ 0,7972	- 0,6964
Log de production	+ 0,8022	+ 0,8094	- 0,8963

Tableau 14 - Comparaison des coefficients de corrélation entre la production ou le logarithme de la production et les caractéristiques de pH du latex.

La relation entre la production et les diverses caractéristiques de pH du latex peut donc être assimilée à une relation de type linéaire.

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par LAMBERT et COUPE (1977) et CRETIN (1978).

Ces arbres sélectionnés pour ces expériences ont donc un comportement normal.

## 2. Recherche d'une corrélation entre l'absorption lutoïdique de l'Arginine et de la Lysine et le $\Delta$ pH

Après s'être assuré de l'existence d'une corrélation positive entre production et  $\Delta$ pH chez les arbres utilisés, nous avons cherché à vérifier, si comme les résultats de la 2ème partie de ce mémoire le laissent supposer, il est effectivement possible de mettre en évidence une corrélation entre absorption et  $\Delta$ pH.

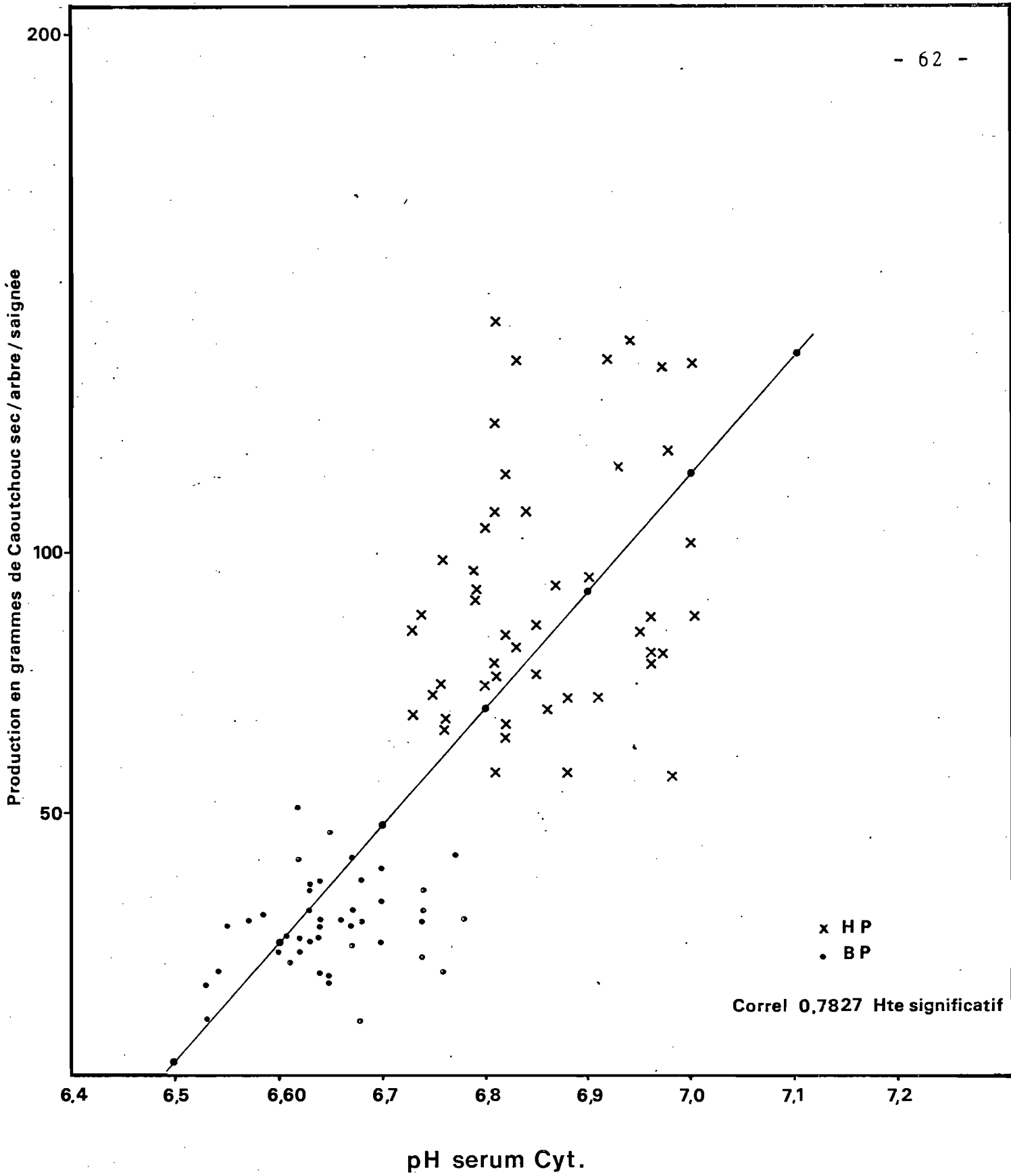


Fig. 20

Corrélation entre la production de caoutchouc sec de l'hévéa et le pH cytoplasmique du latex

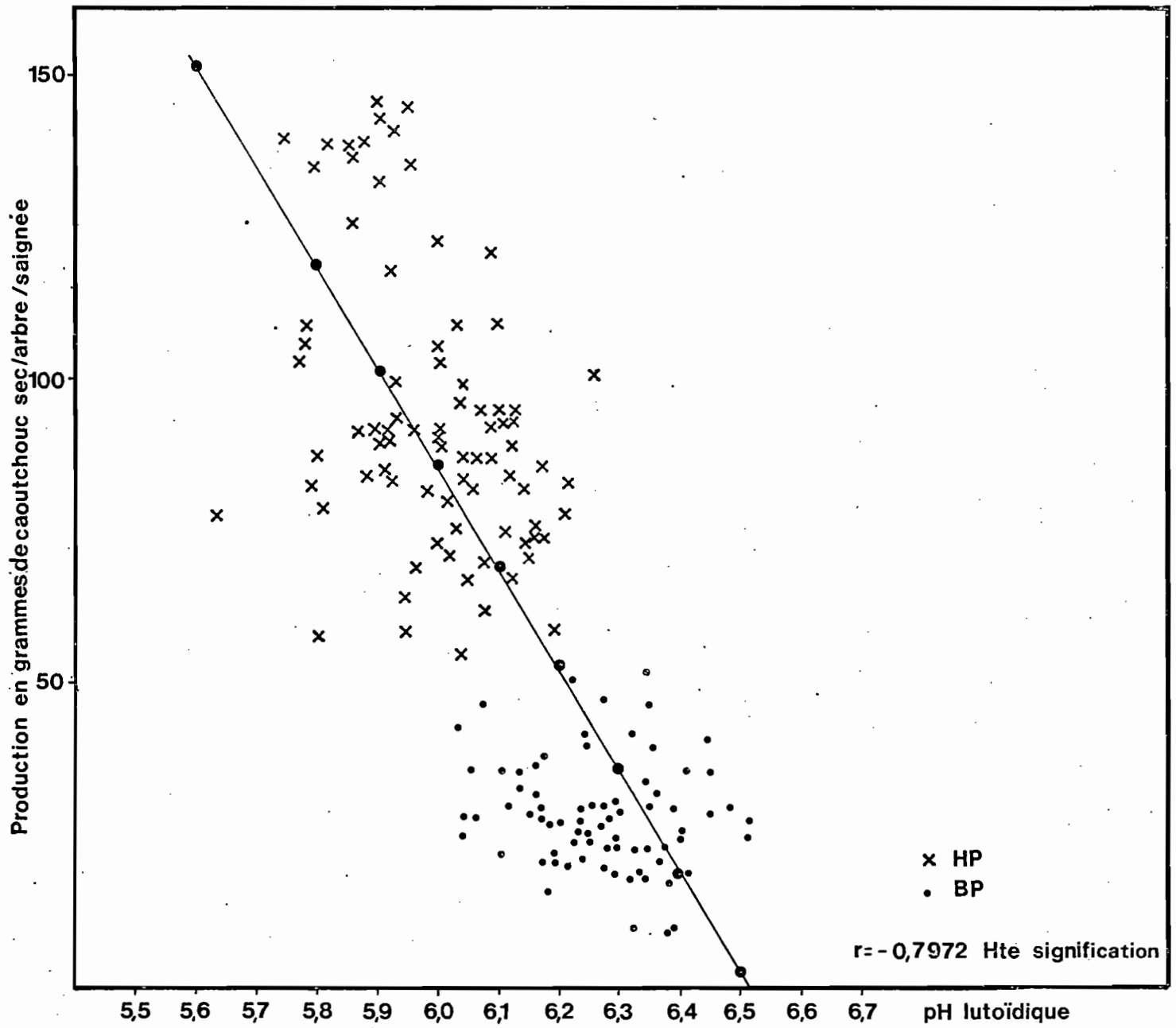


FIG. 21 Corrélation entre la production de caoutchouc sec et le pH lutoïdique

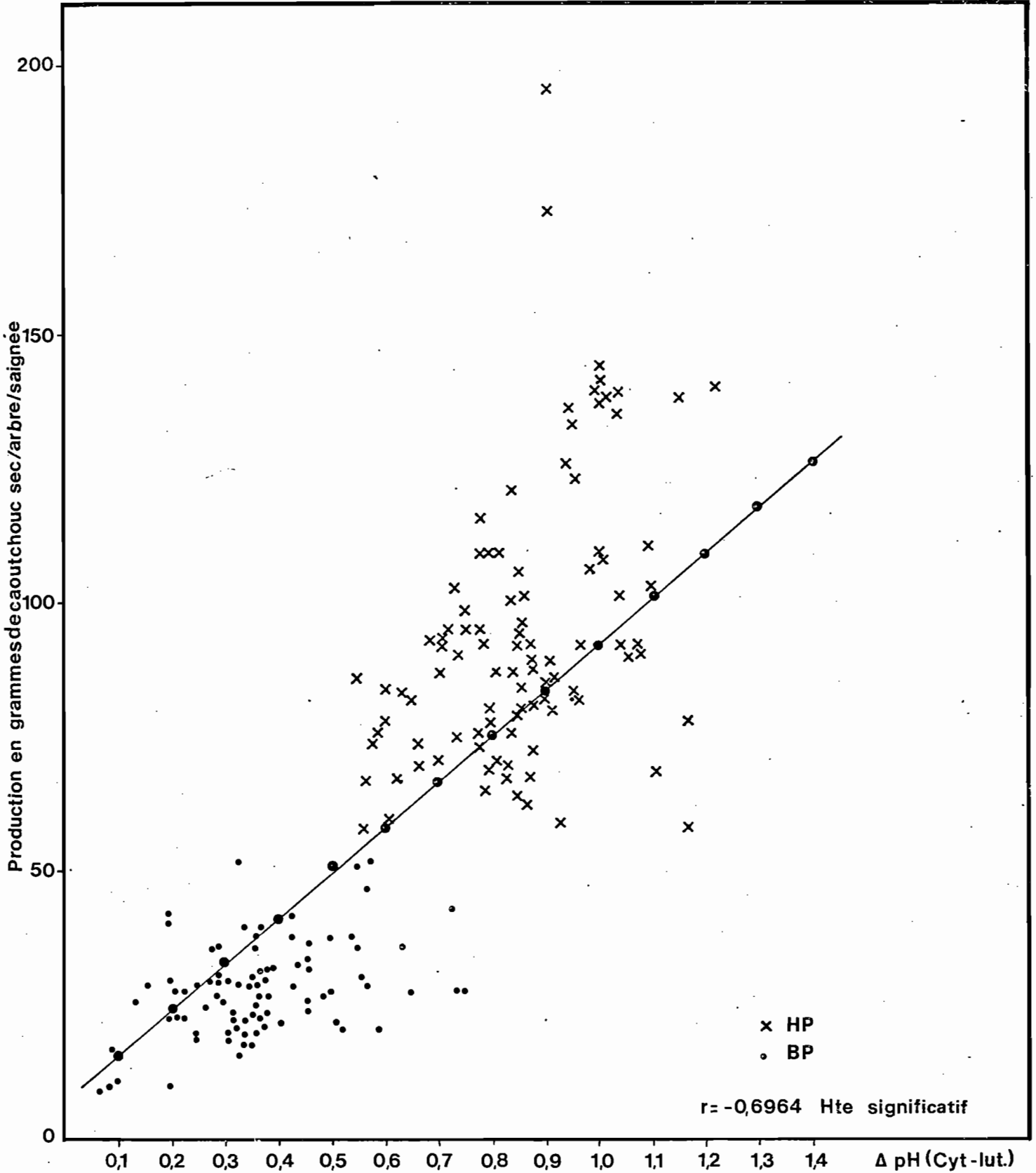


FIG.22 Corrélation entre la production de caoutchouc sec et le  $\Delta$  pH (Cyt-lut.)

Les résultats obtenus sont négatifs. Aussi bien pour l'Arginine que pour la Lysine, il n'est pas possible de mettre en évidence de corrélation significative ni entre le pH intralutoïdique et l'absorption, ni entre le  $\Delta$ pH et l'absorption (Figures 23, 24, 25, 26).

3. Recherche d'une corrélation entre l'absorption lutoïdique de l'Arginine et de la Lysine, et la production

Compte tenu des résultats négatifs concernant les relations entre  $\Delta$ pH et intensité d'absorption lutoïdique de l'Arginine et de la Lysine, il est logique d'aboutir également à un échec lorsque l'on essaye de mettre en évidence une corrélation entre absorption et production. (figures 27 et 28).

Ainsi, contrairement à ce que laissaient supposer les résultats de la 2ème partie de ce mémoire, il n'est pas possible, à partir de lutoïdes préparés selon la méthode habituelle d'observer l'existence d'une corrélation entre absorption,  $\Delta$ pH et production.

C'est pour essayer d'expliquer ces résultats inattendus que nous avons réalisé des essais d'absorption sur latex brut.

II) Mesures réalisées sur du latex brut

Dans les expériences précédentes, les lutoïdes sont séparés des autres constituants du latex, et subissent plusieurs lavages successifs avant d'être mis en contact avec les radioéléments à absorber.

Cette préparation est susceptible de modifier les propriétés de leur membrane et (ou) de leur milieu intérieur et d'altérer ainsi leur capacité d'absorption de certaines molécules. Dans ce cas, les résultats négatifs obtenus précédemment pourraient résulter de cette procédure expérimentale et ne constituer donc que de simples artefacts.

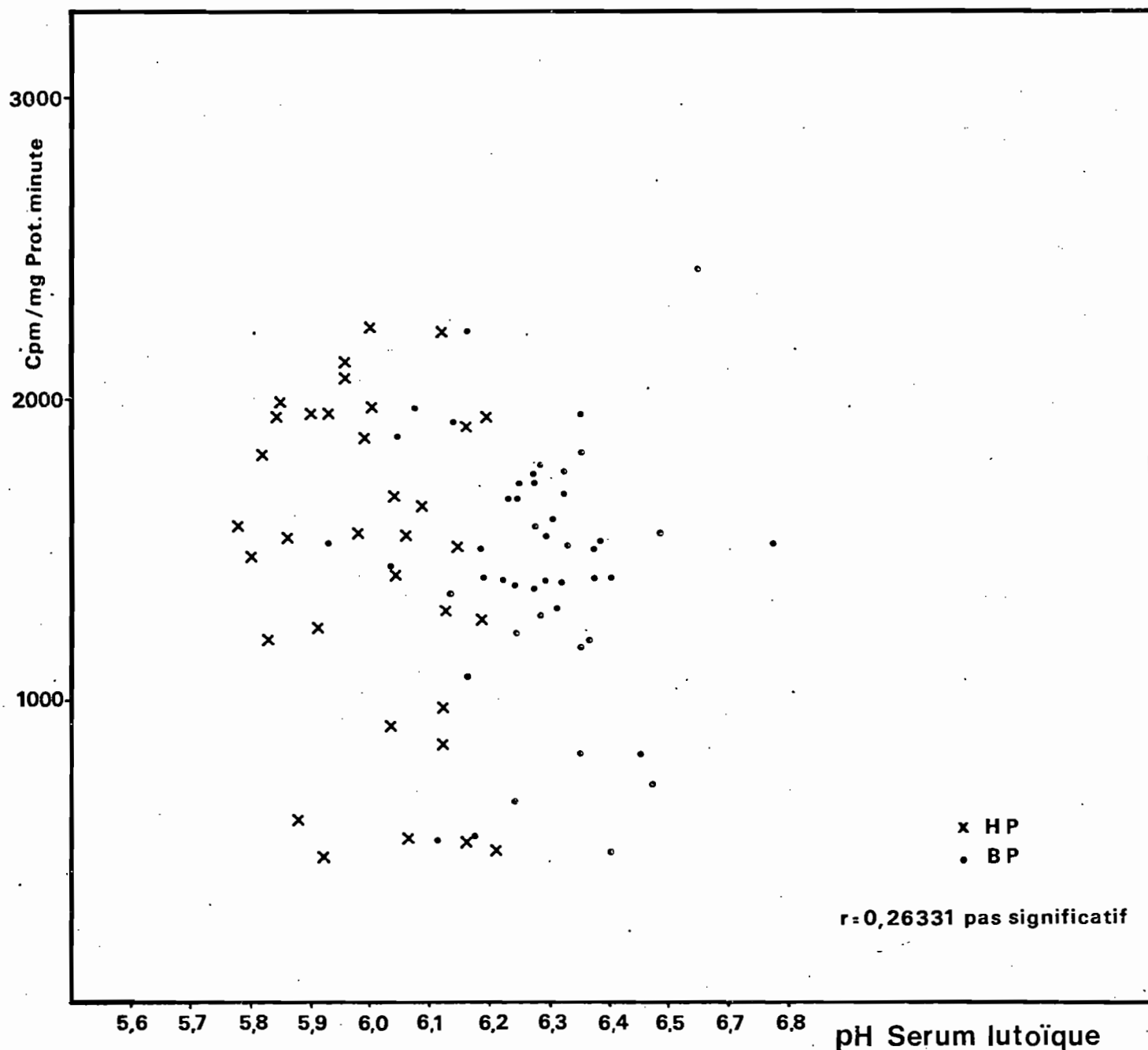


Fig. 23

Corrélation entre l'absorption "in vitro" de la lysine par les lutoïdes et le pH lutoïdique

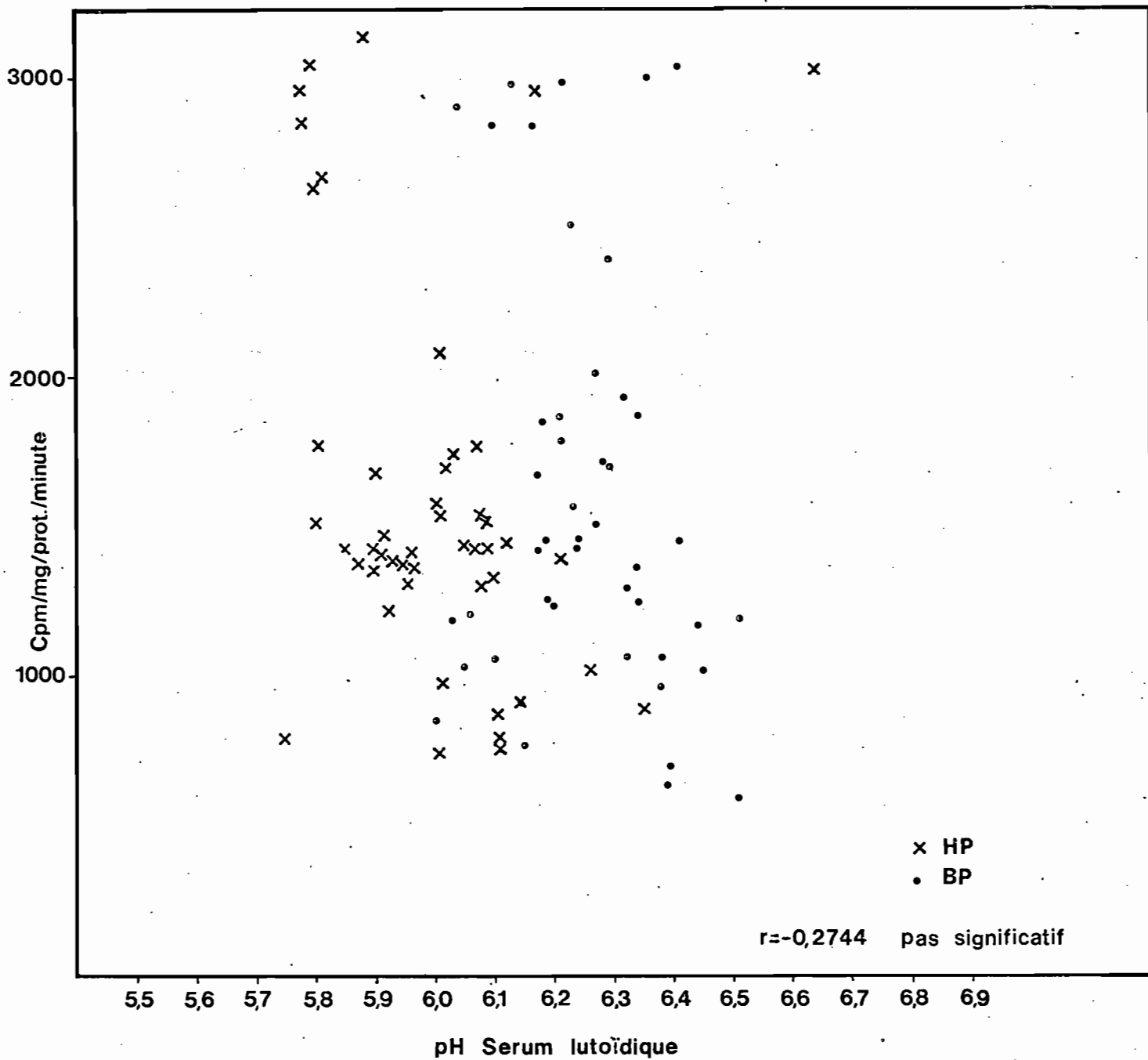


FIG. 24 Corrélation entre l'absorption "in vitro" de l'arginine par les lutoïdes et le pH lutoïdique

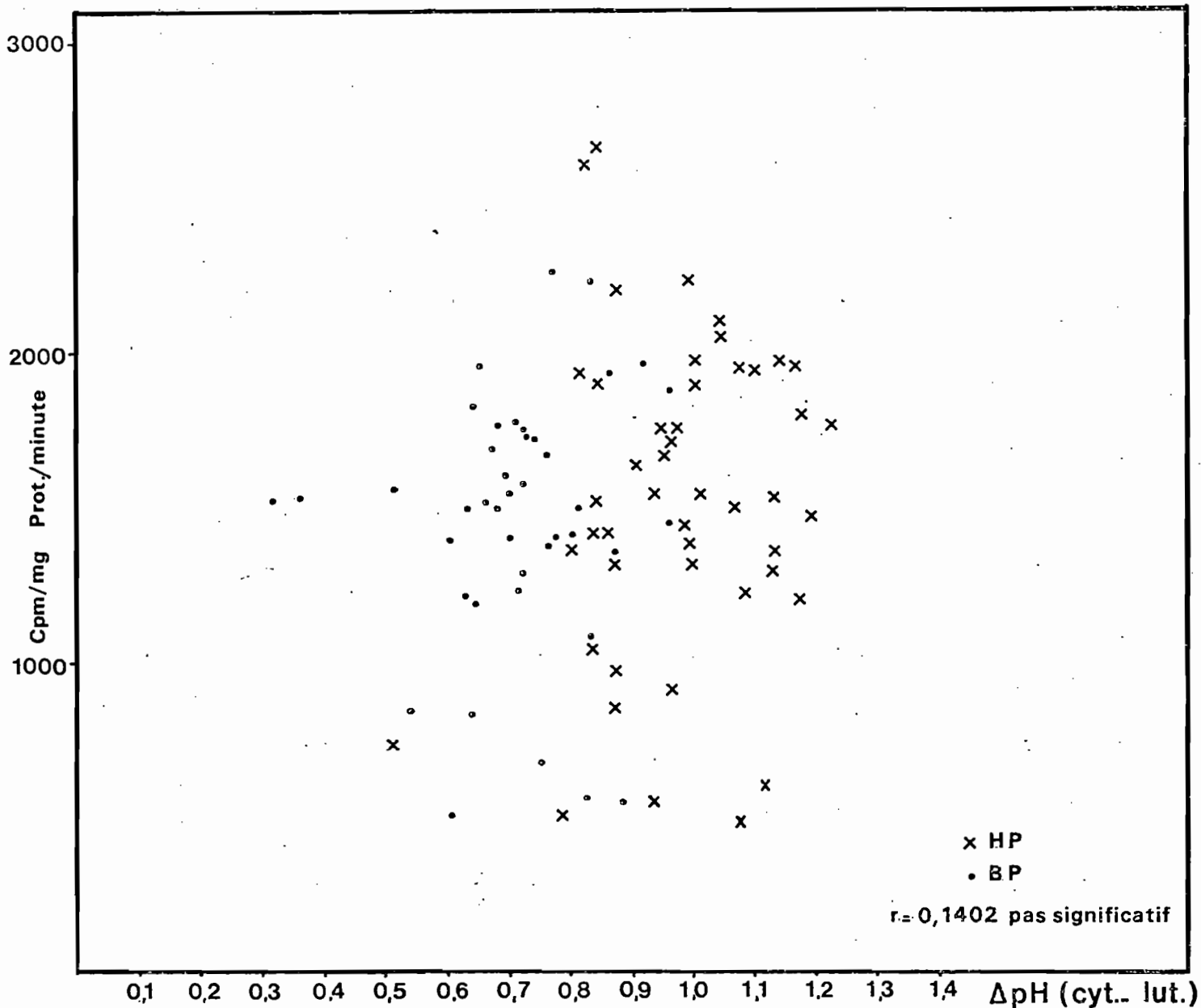


Fig. 25

Corrélation entre l'absorption "in vitro" de la lysine par les lutoïdes et le ΔpH (cyt.- lut.)

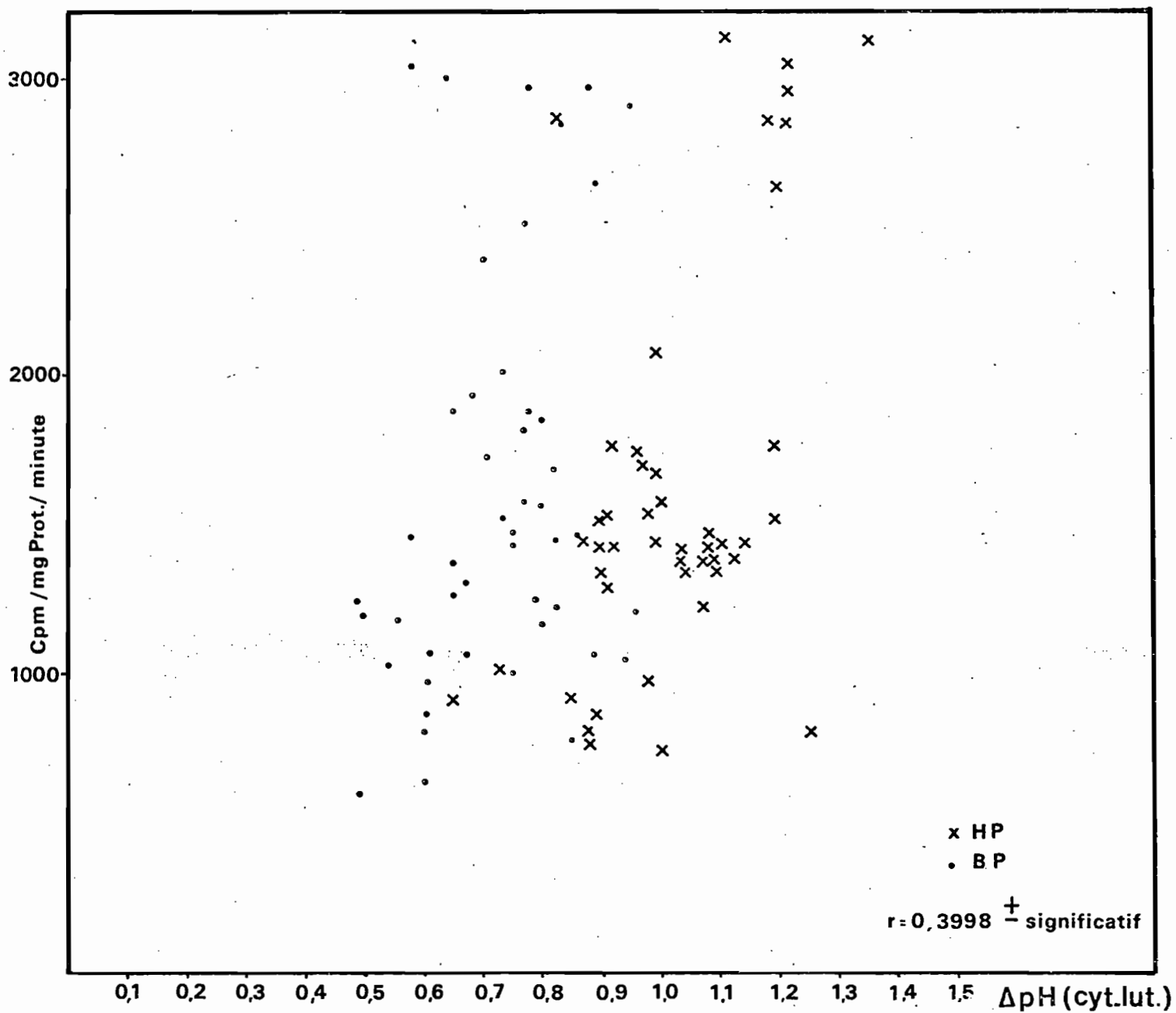


Fig.26

Corrélation entre l'absorption "in vitro" de l'arginine par les lutoïdes et le  $\Delta pH$  (cyt.lut.)

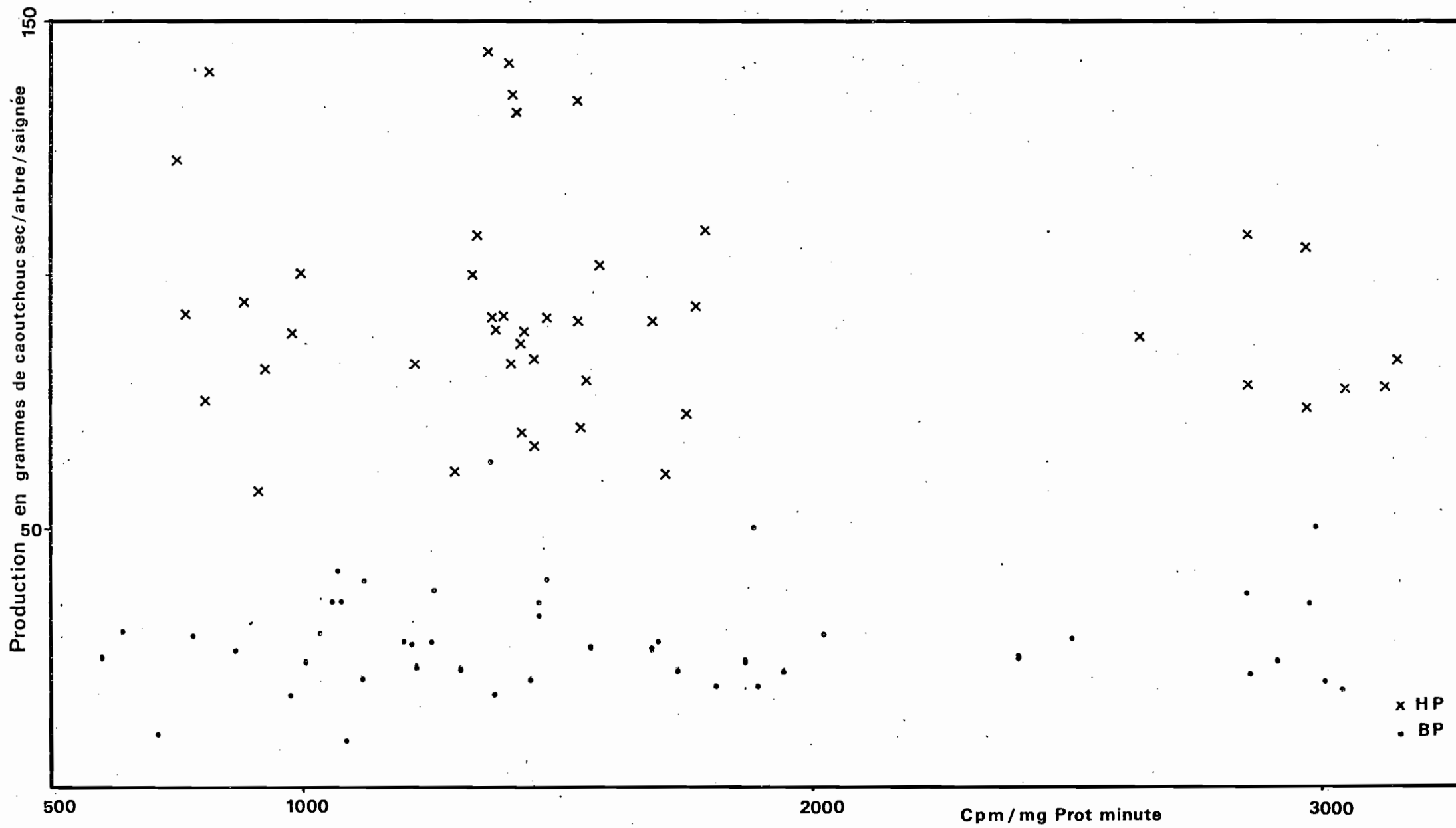
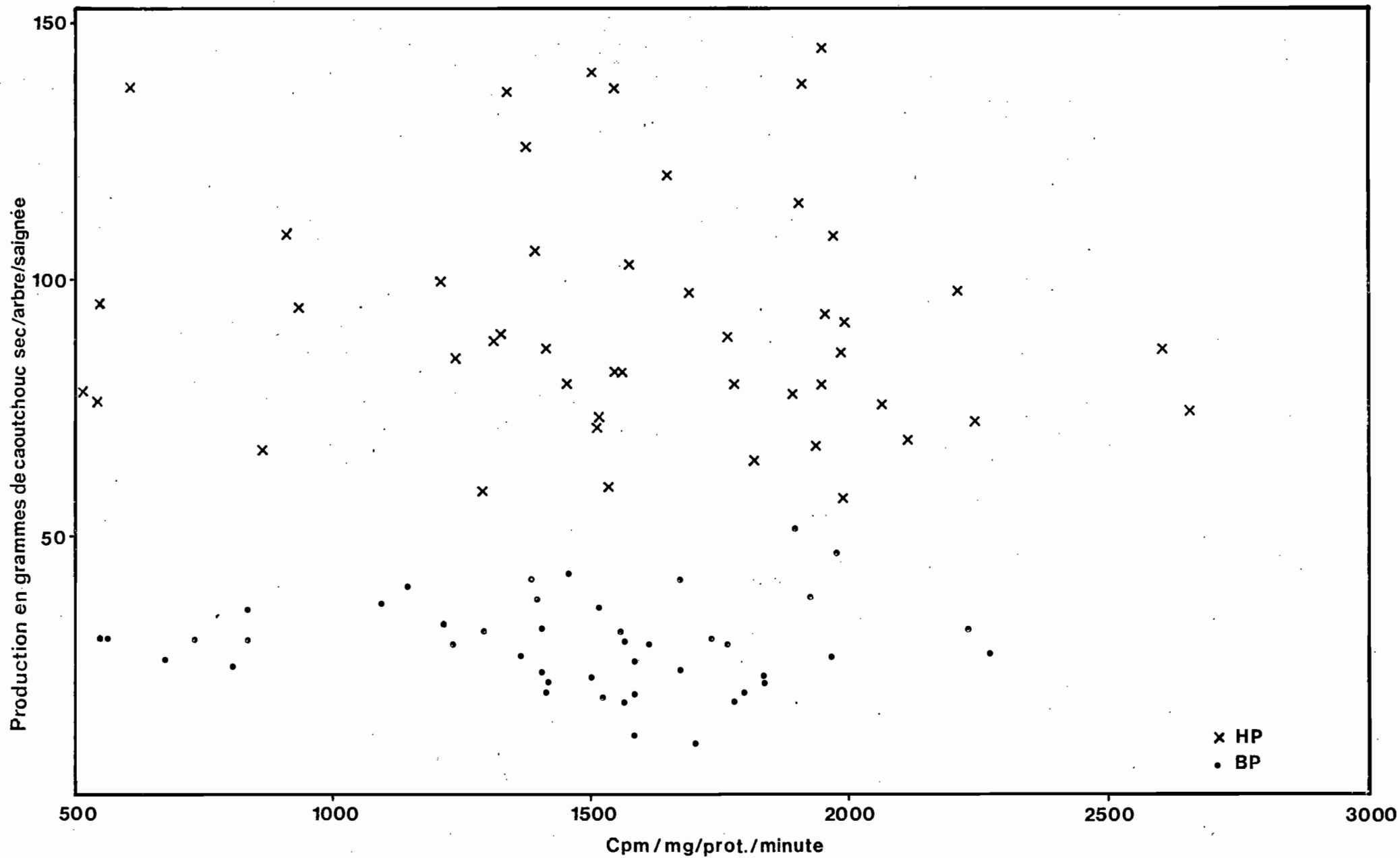


Fig. 27

Corrélation entre l'absorption "in vitro" de l'arginine par les lutoïdes et la production du caoutchouc



**FIG. 28** Corrélation entre l'absorption "in vitro" de la lysine par les lutoïdes et la production du caoutchouc

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc réalisé des expériences d'absorption directement dans le latex, c'est à dire dans des conditions qui peuvent être considérées comme assurant une meilleure préservation des propriétés naturelles des lutoïdes.

Cinq molécules marquées ont été utilisées. Outre l'Arginine et la Lysine, il s'agit :

- du  $^{14}\text{C}$  Citrate dont l'intensité d'absorption est corrélée au  $\Delta\text{pH}$  et à la production (COUPE et LAMBERT, 1977),
- de la  $^{14}\text{C}$  Methylamine ( $^{14}\text{CMA}$ ) qui s'accumule dans les compartiments les plus acides et peut donc servir d'indicateur de  $\Delta\text{pH}$  (CRETIN, 1982),
- et du  $^{14}\text{C}$  Methyltriphenylphosphonium positif (MTPP<sup>+</sup>) qui est un marqueur de charges négatives susceptible de traverser les couches lipidiques membranaires et donc de révéler l'existence d'éventuels gradients de potentiel électrique transmembranaire ( $\Delta\Psi$ ).

Pour ces divers radio-éléments, l'incubation est effectuée à 25°C dans du latex fraîchement récolté. Elle dure 30 minutes. Les lutoïdes sont ensuite séparés du latex par centrifugation et traités selon la procédure habituelle pour les mesures d'absorption et de pH.

Compte tenu du nombre des mesures à effectuer, l'analyse n'a pu être faite arbre par arbre comme précédemment, mais sur un échantillon moyen de latex provenant de 6 arbres HP et de 6 arbres BP.

Des résultats qui sont rassemblés dans le tableau 15, on peut tirer les conclusions suivantes :

	pH Lut.	$\Delta\text{pH}$	Absorption/cpm/mg Prot./30 minutes				
			$^{14}\text{CMA}$	$^{14}\text{CMTPP}^+$	Lys.	Arg.	Citrate
Arbres H.P.	5,900	0,925	37.654	4.268	836	1.031	1.546
Arbres B.P.	6,178	0,504	14.652	5.049	996	1.200	1.060

Tableau 15 - Mesure de la différence de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) existant entre le pH cytoplasmique et le pH lutoïdique. Absorption "in vivo" de la Methyl-amine  $^{14}\text{C}$  du methyl. Triphényl-phosphonium bromide, de la L.Lysine, de la L.Arginine et du Citrate par les lutoïdes.

1. Il n'y a pas, dans ces nouvelles conditions expérimentales de différence très significative d'absorption de la Lysine et de l'Arginine entre les arbres H.P et B.P alors qu'on observe chez les H.P un  $\Delta\text{pH}$  et une absorption de  $^{14}\text{CMA}$  nettement plus élevés que chez les B.P.

L'absence de corrélation entre l'absorption des acides aminés, le  $\Delta\text{pH}$  et la production observée sur des lutoïdes préalablement séparés des autres fractions du latex, se retrouve avec des lutoïdes conservés au sein de celui-ci dans un milieu parapsiologique.

Les résultats négatifs enregistrés précédemment ne sont donc pas dûs à l'utilisation d'une certaine procédure expérimentale. On peut affirmer qu'il n'y a effectivement pas de relation simple entre l'absorption des acides aminés, le  $\Delta\text{pH}$  et la production.

2. En ce qui concerne le Citrate par contre, on retrouve dans le latex frais la relation entre l'absorption, le  $\Delta\text{pH}$  et la production mise en évidence en utilisant des fractions lutoïdiques purifiées. Ce caractère essentiellement  $\text{pH}$  dépendant du transport de cette molécule se trouve ainsi confirmé.

3. Il existe un certain parallélisme entre l'absorption du  $^{14}\text{C}$ .  $\text{MTPP}^+$  et celle de l'Arginine et de la Lysine. Dans les deux cas les écarts sont proches, avec un léger avantage pour les B.P dont le compartiment interne est plus négatif.

Cela pourrait signifier que le transport des acides aminés à l'intérieur des lutoïdes ne serait donc pas, comme celui du Citrate essentiellement dépendant du  $\Delta\text{pH}$ , mais ferait intervenir également (voir essentiellement) le  $\Delta\Psi$ .

Cette hypothèse peut être appuyée par un certain nombre de résultats récents obtenus par CRETIN (1982) et MARIN (1981).

Ces auteurs ont en effet montré que l'apport d'ATP dans le milieu d'incubation des lutoïdes n'a pas seulement pour conséquence l'acidification du sérum intralutoïdique et donc l'aug-

mentation du  $\Delta pH$  que nous avons signalée précédemment (cf. 2ème partie) mais qu'il modifie également le potentiel électrique transmembranaire. C'est cette action au niveau du  $\Delta\Psi$  qui expliquerait l'augmentation de l'absorption des acides aminés enregistrée après addition d'ATP au milieu d'incubation.

De même, l'action du  $NH_4 Cl$  à la concentration utilisée ne se limite pas à la décharge du gradient de protons ( $\Delta pH$ ). Ce composé agit aussi sur le gradient de potentiel, contrairement au 2-4 DNP qui est plus spécifique du  $\Delta pH$ .

Or l'inhibition de l'absorption obtenue par  $NH_4 Cl$  est environ 20% plus élevée que celle induite par le 2-4 DNP, ce qui tendrait également à indiquer une intervention du  $\Delta\Psi$  sur le transport intra-lutoïdique des acides aminés.

L'absorption de ces composés, obéit donc vraisemblablement à un mécanisme différent de celui qui gouverne l'entrée du Citrate dans les lutoïdes qui est essentiellement dépendante du  $\Delta pH$ , alors que l'énergisation de l'absorption des acides aminés se ferait en partie grâce au  $\Delta\Psi$ .

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* sont de petits organites monomembranaires qui constituent le système vacuolaire (à caractère lysosomal) des cellules laticifères au sein desquelles ils jouent un rôle important d'homéostasie.

De pH interne acide, ils accumulent en effet sélectivement toute une série de composés divers, organiques ou minéraux (acide citrique, phosphore minéral, ions,  $Mg^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Ca^{++}$  etc...) susceptibles d'intervenir dans l'activité métabolique cytoplasmique contribuant ainsi au maintien dans la cellule de conditions favorables aux réactions qui permettent la régénération du latex (régulation du pool de certaines molécules, ions, contrôle du pH...).

Par ce biais, et également par le rôle qu'ils jouent en outre au niveau de la coagulation du latex, les lutoïdes interviennent donc de façon importante sur la production des arbres.

Parmi les composés sélectivement absorbés, on note la présence d'acides aminés, en particulier d'acides aminés basiques tels que l'Arginine et la Lysine qui se trouvent *in vivo* dans les lutoïdes à des concentrations environ 6 fois supérieures à celles trouvées dans le cytoplasme.

C'est à l'absorption de ces éléments, dont l'accumulation peut conférer aux particules lutoïdiques un rôle de réservoir de composés azotés susceptibles d'être utilisés au cours de la biosynthèse des protéines nécessaires à la régénération du latex, que ce travail a été consacré.

De l'ensemble des résultats obtenus, deux conclusions essentielles peuvent être retenues :

1) L'absorption de l'Arginine et de la Lysine par les lutoïdes résulte d'un transport actif mettant en jeu des transports médiats membranaires. En effet :

a. Pour chacun des acides aminés étudiés au départ (Arginine, Lysine, Alanine, Acide glutamique), la cinétique d'absorption n'est pas linéaire, mais curvilinéaire avec plateau de saturation.

b. L'absorption de la Lysine et de l'Arginine est thermodynamiquement dépendante. La valeur des  $Q_{10}$  obtenus (supérieure à 2) exclut l'intervention exclusive ou dominante de phénomènes de nature purement diffusionnelle.

La représentation d'*Arrhenius* permet en outre de mettre en évidence une cassure dans l'absorption aux environs de  $12^{\circ}\text{C}$ , température de fusion des lipides membranaires, ce qui accrédite l'idée de l'intervention dans le transport de ces acides aminés de médiateurs liés à la membrane.

c. Lorsque l'on reste dans des limites compatibles avec la précision de la méthode expérimentale et la préservation des propriétés naturelles des lutoïdes, la relation existant entre la vitesse d'absorption de l'acide aminé et sa concentration dans le milieu est de type Michaelien. Pour chacun des deux acides aminés étudiés, on peut ainsi établir un  $k_m$  apparent. La valeur plus faible obtenue pour l'Arginine indique une plus grande affinité de cette molécule pour son récepteur.

d. Il n'y a pas d'inhibition de l'absorption de l'Arginine par la Lysine, mais que l'Arginine inhibe de façon non compétitive l'absorption de la Lysine. On peut en conclure à l'existence de deux types de récepteurs :

- l'un spécifique de l'Arginine ne permet que le transport de cet acide aminé et est insensible à la Lysine.
- l'autre comporte au moins deux sites distincts : le premier fixe exclusivement la Lysine et catalyse son transport ; le second que l'on peut qualifier de site régulateur est apte à fixer les autres acides aminés, l'Arginine en particulier, mais ne permet pas leur transport.

A tous ces éléments, on peut ajouter que les connaissances que l'on possède actuellement sur la structure physico-chimique des membranes biologiques tendent à exclure la possibilité de formation par agitation thermique, de pores transitoires d'ouverture suffisante pour laisser passer des molécules aussi volumineuses que l'Arginine et la Lysine (SCHECHTER c.p.).

On peut donc conclure que l'absorption de la Lysine et de l'Arginine implique l'intervention d'un mécanisme de transport actif mettant en jeu des transport-médiats récepteurs membranaires.

2) L'absorption fait intervenir le gradient de potentiel électrique transmembranaire des lutoïdes ( $\Delta\Psi$ )

Les éléments qui permettent d'avancer cette deuxième conclusion sont les suivants :

a. quelles que soient les conditions expérimentales utilisées (incubation des lutoïdes dans un milieu tamponné, ou directement au sein du latex frais) il n'est pas possible d'établir de corrélation entre l'intensité de l'absorption et le pH lutoïdique ou le  $\Delta\text{pH}$  serum cytoplasmique-lutoïdes.

b. de même, on ne peut établir de relation simple entre l'absorption et la production des arbres qui est corrélée au  $\Delta\text{pH}$  (COUPE et LAMBERT, 1977). (Etude réalisée arbre par arbre).

c. la comparaison des effets sur l'absorption d'un certain nombre d'effecteurs agissant soit spécifiquement sur le  $\Delta\text{pH}$ , soit à la fois sur le  $\Delta\text{pH}$  et le  $\Delta\Psi$  fait apparaître des différences significatives.

le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  par exemple qui agit à la fois en déchargeant le gradient de protons et le gradient de potentiel exerce pour chacun des deux acides aminés étudiés une inhibition d'absorption environ 20% supérieure à celle provoquée par le 2-4 D.N.P dont l'effet est plus spécifique du  $\Delta\text{pH}$ .

Inversement, l'addition d'ATP au milieu d'incubation qui modifie à la fois le  $\Delta\text{pH}$  et le  $\Delta\Psi$  (CRETIN, 1982, MARIN, 1981) amène une augmentation de l'absorption des acides aminés.

d. Enfin, on observe un certain parallélisme entre les variations de l'absorption des lutoïdes provenant du latex d'arbres hauts ou bas producteurs et celle de l'accumulation du Methyltriphenylphosphonium positif (MTPP<sup>+</sup>) qui est un marqueur de charges négatives donc du gradient de potentiel électrique transmembranaire.

On peut donc considérer, comme très probable que le  $\Delta\Psi$  intervient de façon prépondérante dans l'absorption de l'Arginine et de la Lysine.

Les mécanismes qui président à l'accumulation de ces molécules dans les lutoïdes sont donc différents, et probablement plus complexes que ceux mis en évidence pour le Citrate dont l'absorption est strictement dépendante du  $\Delta pH$  (COUPE, LAMBERT, 1977). Contrairement au Citrate, l'intensité de pénétration des acides aminés ne peut être considérée comme un bon marqueur physiologique de la production.

Il reste maintenant à conforter et à étayer encore cette conclusion, et surtout à essayer de comprendre comment s'établit cette différence de potentiel électrique.

C'est vraisemblablement au niveau de l'energisation de l'absorption par l'ATP que se trouve la réponse à la question.

CRETIN et MARIN (1980) ont en effet démontré l'existence au niveau de la membrane lutoïdique d'une ATPase fonctionnant comme une pompe à protons. L'influx de protons ainsi créé n'est pas immédiatement accompagné d'une sortie compensatoire de charges. C'est dans ce déséquilibre que réside très vraisemblablement l'origine du gradient de potentiel transmembranaire.

*In vivo*, dans les cellules laticifères l'ATPase qui est alimentée régulièrement en ATP fonctionne en permanence. La différence de potentiel est entretenue ce qui permet l'absorption active et l'accumulation des acides aminés.

Dans le latex après récolte, il y a arrêt des phosphorylations et épuisement progressif des réserves d'ATP. Le fonctionnement de la pompe à proton se ralentit et progressivement il se produit un rééquilibrage électrique transmembranaire. Le  $\Delta\Psi$  di-

minue et l'absorption atteint un plateau (cf. cinétique de l'absorption) lorsque celui-ci est nul.

Ce schéma ne peut sans doute être considéré comme complètement établi. Il n'en reste pas moins que, compte tenu des données en notre possession, c'est actuellement le plus probable.

BIBLIOGRAPHIE

- AUZAC (d') J., BRZOZOWSKA J., HANOWER P., LAMBERT C., LIORET C. et NIAMIEN N'GORAN (1977).-  
Un modèle de structure vacuolaire isolée intacte : les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. I. Accumulation et pénétration du Citrate et de la Lysine dans les lutoïdes.  
M. Thellier, A. Monnier, M. Demarty et J. Dainty eds. 5-7/76.
- AUZAC (d') J., RIBAILLER D. (1970).-  
Nouvelles perspectives de stimulation hormonale de la production chez l'*Hevea brasiliensis*.  
Rev. Gén. Caoutchouc Plast. 47, 433-439.
- AUZAC (d') J. (1975).-  
Caractérisation d'une ATPase membranaire en présence d'une phosphatase acide dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
Phytochemistry 14, (4), 671-675.
- AUZAC (d') J., LIORET C. (1974).-  
Mise en évidence d'un mécanisme d'accumulation du Citrate dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Kunth.  
Mull. Arg.  
Physiol. Veg. 12, (4), 617-635.
- AUZAC (d') J., DUPONT J., JACOB J.L., LANCE C., MARIN B., MOREAU F. (1976).-  
I. Un modèle de structure vacuolaire isolée intacte : les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
II. Caractéristique de la membrane lutoïdique.  
Dans : Echanges ioniques transmembranaires chez les végétaux.  
M. Thellier, Monnier, M. Demarty, J. Dainty eds. 5-11/76, paru 1977.

- AUZAC (d') J. (1977).-  
ATPase membranaire de vacuoles lysosomales. Les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
Phytochemistry.vol. 16, p. 1881-1885.
  
- BOLLER T., DURR M. et WIERSUM (1975).-  
Characterisation of specific transport system of Arginine in isolated yeast vacuoles.  
J. Biochem. 54, 81-91.
  
- BRZOZOWSKA J., HANOWER P., CHEZEAU R. (1974).-  
Free amino-acid of *Hevea brasiliensis* latex.  
Separatum Experientia 30, 894.
  
- BRZOZOWSKA J., CRETIN H., HANOWER P. et PIERRE MICHEL (1979).-  
Variation de pH entre compartiments vacuolaire et cytoplasmique au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
Influence saisonnière et action du traitement par l'ethrel générateur d'éthylène. Repercussion sur la production et l'apparition d'encoches sèches.  
Physiol. Veg. 17 (4), 889-905.
  
- BRZOZOWSKA J., HANOWER P., LIORET C., (1977).-  
Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* Kunth. Mull. Arg.  
II. Systèmes enzymatiques impliqués dans le processus.  
I. Phénoloxydase.  
Physiol. Plant 39, 299-304.
  
- BURCKHARDT G., PIETRZYK C. (1980).-  
The influence of an uncoupler on amino acid accumulation in Ehrlich Mouse Ascites Tumor Cells.  
Biochimica et Biophysica Acta n° 2, p. 403-414.
  
- CASEY R.P., THELEN M., AZZI A. (1980).-  
Dicyclohexyl carbodiimide binds specifically and covalently to cytochrome C Oxidase while inhibiting its H<sup>+</sup> translocating activity.  
The Journal of Biological Chemistry, Vol. 255, n° 9, p. 3994-4000.

- COOK A.S. et SEKAR B.C. (1955).-  
Fraction from *Hevea brasiliensis* latex centrifuged at 59000 g.  
J. Rubb. Res. Inst. Malaya 14, 163-167.
  
- COUPE M. et LAMBERT C. (1977).-  
Absorption of citrate by the lutoïds of latex and Rubber production by hevea.  
Phytochemistry Vol. 16, pp. 445-458 Pergamon Press.
  
- COUPE M. (1977).-  
Etude physiologique sur le renouvellement du latex d'*Hevea brasiliensis*. Action de l'Ethylène importance des ribosomes.  
Thèse d'Etat (Science Nat.) Université des Sciences et Technique du Languedoc - Montpellier.
  
- COUPE M., PUJARNISCLE S., AUZAC (d') J. (1972).-  
Compartimentation de divers oxydoréductases (peroxydase 0. diphénoloxydase et malate déshydrogénase dans le latex d'*Hevea brasiliensis* Kunth. Mull. Arg.  
Physiol. Plant 10, 459-480.
  
- COUPE M. et AUZAC (d') J. (1979).-  
Phosphatases et ATPases liées aux parois squeletiques.  
Physiol. Vég. 17 (4), 801-815.
  
- COUPE M. et AUZAC (d') J. (1980).-  
"ATPase" des parois squeletiques de racine et d'épicotyle chez *Vicia faba*.  
Physiol. Veg. 18 (2) : 223-240.
  
- CRETIN H. (1978).-  
Contribution à l'étude des facteurs limitant la production du latex d'*Hevea brasiliensis* Kunth. Mull. Arg.  
Rapport d'élève-ORSTOM, Laboratoire de Physiologie Végétale - Adiopodoumé.

- CRETIN H., JACOB J.L., PREVOT J.C., AUZAC (d') J. (1980).-  
pH du latex : son influence sur la production et les  
éléments de sa régulation.  
Caoutchouc et Plastiques n° 603.
  
- CRETIN H. (1982).-  
The proton gradient across the vacuo-lysosomal membrane  
of lutoïds from the latex of *Hevea brasiliensis*.  
I. Further evidence for a proton translocative ATPase  
on the vacuo-lysosomal membrane of intact lutoïds.  
J. Membr. Biol. (1982 - sous presse).
  
- DICKENSON P.B. (1964).-  
The ultra structure of latex vessel of *Hevea brasiliensis*.  
Proceed nat. Rubb. Prod. Res. ass. Jubiles. Conf.  
Cambridge 52-56 L. Mulling editeur.
  
- DUPONT J. (1975).-  
Phospholipides et acides gras de la membrane des lutoïdes  
du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
1-2-5- Doc. ORSTOM Colloque sur la Physiologie du latex  
d'*Hevea brasiliensis* - Journées latex Montpellier 9-10  
sept.
  
- GLASER E., NORLING B., ERNSTER L. (1980).-  
Reconstitution of Mitochondrial oligomycin and  
dicyclohexycarbodiimide sensitive ATPASE.  
Eur. J. Biochem. (110), 1, p. 225-235.
  
- HANOWER P., BRZOZOWSKA J. et NIAMIEN N'GORAN (1977).-  
Absorption des acides aminés par les lutoïdes du latex  
d'*Hevea brasiliensis*.  
Physiol. Plant 39, 299-304.
  
- HANOWER P. et BRZOZOWSKA J. (1977).-  
Composition lipidique du culot membranaire des lutoïdes.  
Commission Progr. Hévéa Latex et Caoutchouc MRS 22.03.1977.

- JACOB J.L. (1970).-

Particularité de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*.

Thèse Doc. Etat (Sci. Nat.) Faculté des Sciences d'ORSAY, n° d'ordre AO. 4129.

- JACOB J.L. (1975).-

Schéma général des problèmes de la régulation de la synthèse isoprénique.

2.2.7. Travaux et Doc. de l'ORSTOM Colloque sur la Physiologie du latex d'*Hevea brasiliensis* - Journées Latex, Montpellier 9-10 sept.

- KRISTENSEN L.O. (1980).-

Energization of Alanine Transport in Isolated RAT Hepatocytes.

Electrogenic Na<sup>+</sup>-Alanine Co-Transport Leading to increased K<sup>+</sup> permeability.

The Journal of Biological Chemistry Vol. 255 n° 12, p. 5236-5243.

- LAMBERT C. (1975).-

L'absorption des acides organiques par les lutoïdes.

2-4-5-2. Travaux et Doc. de l'ORSTOM, Colloque sur la Physiologie du latex d'*Hevea brasiliensis*.

Journées Latex Montpellier 9-10 sept.

- LAMBERT C. (1975).-

Influence de l'ATP sur pH intralutoïdique, et sur la pénétration du Citrate dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*.

C.R. Acad. Sci. Paris, 281.

- LORENZINI M. (1970).-

L'exsorption de K<sup>+</sup> par des disques frais de pommes de terre : compartimentation, action du Ca<sup>2+</sup> et du Mg<sup>2+</sup>.

Physiol. Veg. 8 (2) : 159-172.

- LOWRY O.H., BROUGH ROSE N.J., FARR, *al.* et RANDALL, R.J. (1951).-

Protein measurements with the folin phénol reagent.

J. Biol. Chem., 193 : 265-275.

- MARIN B., LANZA M. and KOMOR E. (1981).-  
The proton motive potentiel difference across the vacuolysosomal membrane of *Hevea brasiliensis* and its change by a membrane bound Adenosine-triphosphatase.  
J. Biochem. 1981: 365-372.
  
- MESSENGUY F., COLIN D., TENHAVE J.P. (1980).-  
Regulation of compartimentation of amino acid pools in *saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control.  
Eur. J. Biochem. Vol. 108 n° 2 : 439-447.
  
- OHSAWA M., KILBERG M.S., KIMMEL G., CHRISTENSEN H.N. (1980).-  
Energization of amino acid transport in Energy depleted Ehrlich cells and Plasma membrane vesicles.  
Biochimica et Biophysica Acta Vol. 599 n° 1, p: 175-190.
  
- PRIMOT L. (1975).-  
L'invertase.  
2.2.1. Travaux et Doc. ORSTOM, page 79 Colloque sur la Physiologie du latex d'*Hevea brasiliensis*.  
Journées Latex Montpellier 9-10 sept.
  
- PRIMOT L. (1975).-  
Importance du pH dans la productivité du latex.  
2.2.6. Travaux et Doc. de l'ORSTOM, p. 100. Colloque sur le latex d'*Hevea brasiliensis*.  
Journées Latex Montpellier 9-10 sept.
  
- PUJARNISCLE S. (1968).-  
Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Kunth Müll Arg.  
Physiol. Veg. 6 (1) : 27-46.
  
- PUJARNISCLE S. (1969).-  
Etude de quelques facteurs intervenant sur la perméabilité de la membrane des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll Arg.  
Physiol. Veg. Vol. 7 n° , p. 391-403.

- PUJARNISCLE S. (1969).-

Etude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll Arg. Différence et analogie avec les lysosomes. Propriétés et activités des lutoïdes dans quelques cas particuliers d'exploitation d'hévéa.

Thèse Doc. Etat (Sci. Nat.) Faculté des Sciences d'ORSAY  
Université de Paris n° d'ordre AO 3379.

- PUJARNISCLE S. et RIBAILLER D. (1966).-

Etude préliminaire sur les lutoïdes du latex et leur possibilité d'intervention dans la biosynthèse du caoutchouc.

Rev. Gén. Caoutchouc Plast. 43 (2) : 226-228.

- RAMOS E.H., DEBONGIOANNI L.C., STOPPANI A.O.M. (1980).-

Kinetics of L. (<sup>14</sup>C) Leucine transport in *saccharomyces cerevisiae*.

Effect of Energy coupling inhibitors.

Biochimica et Biophysica Acta Vol. 599 (n° 1), p. 214-231.

- RIBAILLER D. (1967).-

Etude de quelques propriétés du latex en fonction de sa stabilité et de sa composition minérale.

Etude de différents paramètres influant sur la stabilité et la productivité.

I.R.C.A. - rapport de recherches Biochimie 4/67.

- RIBAILLER D. (1972).-

Quelques aspects des lutoïdes dans la Physiologie et l'écoulement du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth.) Müll Arg. action des produits libérant de l'Ethylène.

Thèse Doc. (Sci.Nat.) Université d'Abidjan CNRS n° AO 7716.

- SIPS H.J., VAN A. MELSVOORT J.M.M., VANDAM K. (1980).-

Amino acid transport in plasma-membrane vesicles from rat liver.

Characterization of L. alanine transport.

Eur. J. Biochem. Vol. 105 n° 1, p. 217-224.

- TUPY J. (1973).-

The regulation of in invertase activity in the latex of *Hevea brasiliensis* Müll Arg. The effects of growth regulators and bark Wounding on latex tapping.

J. Exp. Bot. 24 : 516-524.

## ANNEXE II

### COMPOSITION DES TAMPONS PHOSPHATES UTILISÉS DANS L'ÉTUDE DE L'ABSORPTION DES A. AMINÉS

(selon HANOWER)

#### I - Tampon phosphate dipotassique pH 7,0

K<sub>2</sub> HP04            0,125 M

MANNITOL            0,33 M

On ramène à pH 7,0 avec du KOH 2N

#### II - Tampon phosphate disodique et phosphate monopotassique

Na<sub>2</sub> HP04, 2H<sub>2</sub>O            0,066 mM

KHP04                0,066 mM

MANNITOL            0,33 M

On mélange 600 ml de Na<sub>2</sub> HP04 à 400 ml de KHP04- le pH se situe à 6,97. On ramène à pH 7,0 par addition de quelques gouttes de KOH 2N.

#### III - Milieu d'incubation

Le milieu d'incubation type est composé du tampon ci-dessus auquel on adjoint l'acide aminé non radioactif étudié; à ce milieu, on ajoute le volume (0,1 ml/tube) de molécule radioactive.

#### IV - Milieu de lavage

Le milieu de lavage utilisé à la même composition que celle du milieu d'incubation sauf qu'il ne contient pas de molécule radioactive.

#### V - Liquide scintillant

Préparation pour 1 litre (Simmonet: Scintillation en milieu liquide. Manuel de Travaux Pratique (C.E.A.))

Toluène            2/3                    660 ml

POPOP            0,01 %                0,1 g

PPO                0,5 %                 5 g

Triton             1/3                    330 g

# ANNEXE III

TABLEAU DE DISSOCIATION DE LA LYSINE, DE L'ARGININE, DE L'ALANINE  
ET DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

LYS.	≅ CHARGE A	pK
$  \begin{array}{ccc}  A^{++} & & A^{++} \\  NH_3^+-R-COOH & \xrightleftharpoons{k_1} & NH_3^+-R-COO^- H^+ \\    & &   \\  NH_3^+ & & NH_3^+  \end{array}  $	+1	2,18
$  \begin{array}{ccc}  A^{\pm} & & A^{\pm} \\  NH_3^+-R-COO^- & \xrightleftharpoons{k_2} & NH_3^+-R-COOH \\    & &   \\  NH_3^+ & & NH_2  \end{array}  $	0	8,95
$  \begin{array}{ccc}  A^{\pm} & & A^- \\  NH_3^+-R-COO^- & \xrightleftharpoons{k_3} & NH_2-R-COO^- H^+ \\    & &   \\  NH_2 & & NH_2  \end{array}  $	-1	10,53

ARG.	≅ CHARGE A	pK
$  \begin{array}{ccc}  A^{++} & & A^{\pm} \\  NH_2^+-C(=NH) & \xrightleftharpoons{K_1} & NH_3^+-C(=NH) \\    & &   \\  (R)_3 & & (R)_3 \\  NH_2^+-CH_2-COOH & & NH_3^+-CH_2-COO^- H^+  \end{array}  $	+1	2,17
$  \begin{array}{ccc}  A^{\pm} & & A^{\pm} \\  NH_3^+-C(=NH) & \xrightleftharpoons{K_2} & NH_3^+-CH=NH \\    & &   \\  (R)_3 & & (R)_3 \\  NH_3^+-CH_2-COO^- & & NH_2-CH_2-COO^- H^+  \end{array}  $	0	9,04
$  \begin{array}{ccc}  A^{\pm} & & A^- \\  NH_3^+-CH=NH & \xrightleftharpoons{K_3} & NH_2-CH=NH \\    & &   \\  (R)_3 & & (R)_3 \\  NH_2-CH_2-COO^- & & NH_2-CH_2-COO^- H^+  \end{array}  $	-1	12,48

ALA.	≅ CHARGE A	pK
$  \begin{array}{ccc}  A^{\pm} & & A^{\pm} \\  CH_3-CH-COOH & \xrightleftharpoons{K_1} & CH_3-CH-COO^- H^+ \\    & &   \\  NH_3^+ & & NH_3^+  \end{array}  $	0	2,34
$  \begin{array}{ccc}  & & \\  CH_3-CH-COO^- & \xrightleftharpoons{K_2} & CH_3-CH-COO^- H^+ \\    & &   \\  NH_3^+ & & NH_2  \end{array}  $	-1	9,69

A.GLU.	≅ CHARGE A	pK
$  \begin{array}{ccc}  A^{\pm} & & A^{\pm} \\  COOH & & COOH \\  (CH_2)_2 & \xrightleftharpoons{K_1} & (CH_2)_2 \\    & &   \\  CH-NH_3^+ & & CH-NH_3^+ \\    & &   \\  COOH & & COO^- H^+  \end{array}  $	0	2,19
$  \begin{array}{ccc}  A^{\pm} & & A^{\pm-} \\  COOH & & COO^- \\  (CH_2)_2 & \xrightleftharpoons{K_2} & (CH_2)_2 \\    & &   \\  CH-NH_3^+ & & CH-NH_3^+ \\    & &   \\  COO^- & & COO^- H^+  \end{array}  $	-1	4,25
$  \begin{array}{ccc}  A^{\pm-} & & A^{\pm-} \\  COO^- & & COO^- \\  (CH_2)_2 & \xrightleftharpoons{K_3} & (CH_2)_2 \\    & &   \\  CH-NH_3^+ & & CH-NH_2 \\    & &   \\  COO^- & & COO^-  \end{array}  $	-2	9,67

## ANNEXE I

### ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES MOLÉCULES RADIOACTIVES UTILISÉES POUR L'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

---

- 1°) L.ARGININE  $^{14}\text{C}$  (U). Réf. CB9. Activité spécifique 300 mci/mM
- 2°) L. LYSINE  $^{14}\text{C}$  (U). Réf. CB16. Activité spécifique 255 mci/mM
- 3°) L. ALANINE  $^{14}\text{C}$  (U). Réf. CB8(F). Activité spécifique 112 mci/mM
- 4°) L.ACIDE GLUTAMIQUE  $^{14}\text{C}$ (U). Réf. CB11(F). Activité spécifique 156 mci/mM

## ANNEXE IV

CORRELATION ENTRE LE GRADIENT DE pH EXTRA-/INTRALUTOÏDIQUE ET LA VITESSE DE PENETRATION DE L'ARGININE 0,25mM ET DE LA LYSINE 0,5mM (INFLUENCE DE L'ATP - Mg - NH<sub>4</sub>Cl. 2.4 DNP) 'IN VITRO'

Milieu d'incubation	LYSINE					Milieu d'incubation	ARGININE				
Composition	pH	pH du S. lut.	Δ pH	n moles incorp.	% du témoin	Composition	pH	pH du S.	Δ pH	n moles incorp.	% du témoin
Serum cyt.	6,83	5,60	1,23	-	-	Serum cyt.	6,81	5,58	1,22	-	-
: Témoins	7,00	6,11	0,89	2,94807	100 %	: Témoins	7,001	6,002	0,999	1,80268	100 %
+1mM ATP - Mg	7,00	5,93	1,07	4,15642	140,9 % (+40,9%)	+1mM ATP.Mg	7,006	5,879	1,127	2,75001	152,5 % (+52,5)
10mM NH <sub>4</sub> Cl	7,00	6,45	0,55	1,15307	40 % (-60%)	+10mM NH <sub>4</sub> Cl	7,002	6,305	0,697	0,77750	43 % (-57%)
+8mM.2.4.DNP	7,00	6,29	0,71	1,92525	65 % (-35%)	8mM.2.4.DNP	7,004	6,203	0,801	1,00338	55,6 % (-44,4%)

Tableau 13 : Temps d'incubation 30 minutes

S. lut. = Serum intralutoïdique ; S. cyt. = Serum cytoplasmique