

S. PUJARNISCLE

**ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES LUTOÏDES**  
**du latex d'*Hevea brasiliensis*, Mull. Arg.**  
*Différences et analogies avec les lysosomes*

**OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**ET TECHNIQUE OUTRE-MER**





# ÉDITIONS DE L'OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

## RENSEIGNEMENTS, CONDITIONS DE VENTE

Pour tout renseignement, abonnement aux revues périodiques, achat d'ouvrages et de cartes, ou demande de catalogue, s'adresser à :

SERVICE CENTRAL DE DOCUMENTATION DE L'ORSTOM  
70-74, route d'Aulnay, 93 - BONDY (France)

— Tout paiement sera effectué par virement postal ou chèque bancaire barré, au nom du Régisseur des Recettes et Dépenses des SSC de l'ORSTOM, 70-74, route d'Aulnay, 93 - BONDY ; compte courant postal n° 9.152-54 PARIS.

— Achat au comptant possible à la bibliothèque de l'ORSTOM, 24, rue Bayard, PARIS (8°).

## REVUES ET BULLETINS DE L'ORSTOM

### I. CAHIERS ORSTOM

#### a) *Séries trimestrielles* :

- Pédologie (1)
- Océanographie
- Hydrobiologie
- Sciences humaines
- Hydrologie
- Entomologie médicale et Parasitologie

Abonnement : France 90 F ; Etranger 110 F ;  
le numéro 25 F

#### b) *Série semestrielle* :

- Géologie.

Abonnement : France 70 F ; Etranger 75 F

#### c) *Séries non encore périodiques* :

- Biologie (3 ou 4 numéros par an)
- Géophysique. Prix selon les numéros

### II. BULLETINS ET INDEX BIBLIOGRAPHIQUES

- Bulletin analytique d'Entomologie médicale et vétérinaire Mensuel

Abonnement : France 70 F ; Etranger : 80 F ;  
le numéro 8 F

- Index bibliographique de Botanique tropicale Trimestriel

Abonnement : France 25 F ; Etranger 30 F

(1) Masson et C<sup>ie</sup>, 120, bd Saint-Germain, Paris-VI<sup>e</sup>, dépositaires de cette série à compter du vol. VIII, 1970. Abonnement étranger : 124 F.

## CAHIERS ORSTOM

### SÉRIE BIOLOGIE

La série *Biologie* des *Cahiers ORSTOM* publie des études consacrées à diverses branches de la biologie végétale et animale.

#### *Sommaire du dernier numéro paru :*

N° 13

COLONNA (J.-P.). — Quelques faits essentiels concernant les propriétés et la biosynthèse de l'acide chlorogénique.

RABECHAULT (H.), GUENIN (G.), AHEE (J.). — Absorption de l'eau par les noix de palme (*Elaeis guineensis* Jacq. Var. *dura* Becc.). IV. Migration de l'eau pendant le stockage.

GUILLAUMIN (J.-J.). — Etude du déterminisme de la différenciation des organes agrégés chez l'Ascomycète *Sphaerostilbe repens* B. et Br.

COLONNA (J.-P.). — L'alimentation minérale du caféier *Excelsa*. Variabilité naturelle de la composition minérale foliaire sur une plantation homogène.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES LUTOÏDES  
DU LATEX d'*Hevea brasiliensis*, Mull. Arg.  
Différences et analogies avec les lysosomes

Cet ouvrage a fait l'objet d'une thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles, soutenue le 2 juillet 1969, à la Faculté des Sciences d'Orsay (Université de Paris).

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les " copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non « destinées à une utilisation collective " et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations « dans un but d'exemple et d'illustration, " toute représentation ou reproduction intégrale, « ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants-droit ou ayants-cause « est illicite " (alinéa 1<sup>er</sup> de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait « donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal. »

Mémoire O.R.S.T.O.M. n° 48

Serge PUJARNISCLE

Docteur ès Sciences Naturelles  
Maître de recherches à l'O.R.S.T.O.M.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES LUTOÏDES  
DU LATEX d'*Hevea brasiliensis*, Mull. Arg.  
Différences et analogies avec les lysosomes

O.R.S.T.O.M.  
PARIS  
1971

## INTRODUCTION

Depuis que l'on sait que la cellule est l'élément constitutif de base de tout organisme vivant, un nombre considérable de travaux ont été consacrés à son étude afin de percer les mystères de son organisation et de ses fonctions.

Les premières recherches ont été consacrées à leur examen microscopique. Ils ont révélé l'existence de divers organites, et ont amené l'étude de ceux-ci. Cependant, l'examen visuel des composants de la cellule n'a permis d'explorer qu'un domaine assez limité de leurs fonctions, malgré les trésors d'imagination qui ont été employés par les chercheurs dans leurs travaux.

L'introduction de la centrifugeuse comme instrument de travail au cours de ces vingt dernières années a véritablement révolutionné le domaine d'investigation des biologistes. Elle a entraîné une multitude de découvertes sur la nature et les fonctions de ces organites cellulaires.

La *centrifugation différentielle* permet de séparer les divers constituants cellulaires en quantité assez grande, et dans un état de pureté et d'intégrité relativement suffisante pour pouvoir, par la suite, soumettre ces fractions à des analyses chimiques et enzymologiques.

De nombreux travaux d'approche ont été exécutés, mais ce n'est que vers 1946, à la suite des travaux de CLAUDE (37 et 38), donnant un schéma de fractionnement quantitatif, que la technique devint réellement utile. Depuis lors, de nombreuses améliorations ont été apportées à cette méthode. Nous citerons entre autres, l'introduction de solutions de saccharose et de solutions tamponnées comme milieux de dispersion.

A ses débuts, la centrifugation différentielle, qui met à profit les différences de vitesse de sédimentation des divers constituants cellulaires, a permis de séparer des fractions correspondant aux noyaux, aux mitochondries, aux microsomes, et enfin, au surnageant. Plus tard, la technique fut améliorée par De DUVE et al. (62) qui ont introduit une nouvelle fraction correspondant aux lysosomes.

Cependant, malgré les immenses services qui ont été rendus par la centrifugation différentielle, on s'aperçut très vite des limitations de la méthode. En effet, les fractions obtenues ne sont pas parfaitement pures. Ainsi un enzyme, surtout d'activité très faible, trouvé par exemple dans la fraction mitochondriale, n'appartient pas forcément aux mitochondries. Ce pourrait être soit un enzyme soluble entraîné par adsorption, soit un enzyme appartenant à des particules étrangères, sédimentant à une vitesse identique. En outre, le schéma de fractionnement classique est par trop rigide, et ne permet pas de mettre en évidence des particules inconnues pouvant exister dans la cellule. C'est pour ces différentes raisons que BRAKKE (33) a introduit la *centrifugation en gradient de densité*, appelée aussi centrifugation « isopycnique », par De DUVE (55).

Cette technique met à profit les différences de densité des constituants cellulaires pour leur séparation. Le principe de la méthode est de centrifuger à très haute vitesse, et pendant des temps assez longs, un homogénat étalé sur un gradient de densité. Ce gradient peut être discontinu ou continu, et est généralement préparé avec des solutions de saccharose. Au cours de la centrifugation, les granules viennent s'équilibrer dans la zone correspondant à leur propre densité. Cette technique est essentiellement analytique, car elle permet d'établir la courbe de distribution de densité des organites auxquels sont associés certains enzymes ou composés chimiques. Elle peut aussi servir à des fins préparatives pour séparer des particules dans un état

de très grande pureté ; c'est ainsi que SAWANT et al. (132), en associant la centrifugation différentielle et la centrifugation isopycnique réussirent à séparer des quantités pondérables de lysosomes de foie de rat, dans un état de très haute pureté. Néanmoins, il est difficile, par cette technique, d'obtenir des organites en très grandes quantités, et de nouvelles améliorations ont été introduites notamment par ANDERSON et BURGER (3) avec la *centrifugation zonale*.

Cette méthode est très proche de la précédente, mais plus sophistiquée. Elle nécessite des rotors creux de grande capacité, et le gradient de densité, puis l'homogénat sont introduits, alors que le rotor est en marche. La force centrifuge maintient le gradient en place. Après centrifugation à grande vitesse pendant des temps relativement longs, le gradient est fractionné, le rotor étant toujours en marche.

Cette technique, comme la précédente, peut être utilisée à des fins analytiques, mais elle est aussi d'un emploi très précieux lorsqu'il est nécessaire de préparer des particules de très grande pureté et en grande quantité.

Les organites cellulaires préparés par les diverses méthodes de centrifugation que nous venons de décrire seront, par la suite, soumis à des analyses chimiques et enzymatiques, qui permettront de préciser d'une part, la nature, et d'autre part, les fonctions de ces particules.

C'est presque essentiellement sur cette méthodologie que je me suis basé pour entreprendre l'étude des éléments figurés du latex, et plus particulièrement celle des lutoïdes.

Dans un premier temps, j'ai cherché à définir les enzymes concentrés dans la « fraction lutoïdes » séparée par centrifugation différentielle du latex. Les enzymes ainsi définis étant exclusivement des hydrolases, j'ai été amené à émettre l'hypothèse de la nature lysosomale de ces particules. Je me suis donc attaché à confirmer cette hypothèse en montrant d'une part, que ces hydrolases sont bien toutes de nature « lutoïdique » et d'autre part, que ces particules répondent bien aux caractéristiques qui définissent les lysosomes.

Ces travaux ont été effectués au Centre O.R.S.T.O.M. d'Adiopodoumé en Côte d'Ivoire, dans le cadre du programme du laboratoire de Physiologie végétale de ce Centre.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à M. le Professeur CAMUS, Directeur général de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (O.R.S.T.O.M.) qui m'a confié le sujet de cette étude, et qui a permis sa réalisation par les facilités qu'il m'a accordées, et par les conseils et encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer.

J'exprime également ma gratitude à M. le Professeur LIORET, pour les conseils qu'il m'a donnés et pour l'attention avec laquelle il a suivi les progrès de ce travail.

Que M. le Professeur BOURDU trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance pour avoir bien voulu accepter de faire partie de mon jury.

Mes remerciements s'adressent également à M. DE PADIRAC et à M. COMPAGNON qui m'ont permis d'utiliser les hévéas de la Station expérimentale de Bimbresso (Côte d'Ivoire).

Ma reconnaissance va aussi à M. RIBAILLIER, qui a sélectionné le matériel végétal ayant servi à mon expérimentation, ainsi qu'à M. d'AUZAC, pour les conseils et critiques qu'il m'a prodigués.

Je suis particulièrement heureux de rendre hommage au personnel technique du laboratoire de Physiologie végétale du Centre d'Adiopodoumé, qui m'a apporté son aide efficace et dévouée dans l'exécution de ce travail. Que soient aussi remerciés mes collègues et amis du laboratoire qui, par leurs discussions et échanges d'idées, ainsi que par l'ambiance sympathique qu'ils ont su créer, ont largement facilité ce travail.

## Chapitre I

# LA CELLULE LATICIFÈRE ET LE LATEX

## LATICIFÈRES ET PRODUCTION DU CAOUTCHOUC

*L'Hevea brasiliensis* Mull. Arg. euphorbiacée originaire du bassin de l'Amazonie est à l'heure actuelle, le principal producteur de caoutchouc naturel.

### Structure des vaisseaux laticifères

*L'Hevea brasiliensis* possède un système de vaisseaux laticifères situés presque exclusivement dans la région secondaire du phloème du tronc, des branches et des racines. Selon BOBILIOFF (29), ce système résulte de la réunion des cellules laticifères, dont les parois et les membranes se sont peu à peu résorbées. Ce point de vue a, par la suite, été confirmé par ANDREWS et DICKENSON (4) et par DICKENSON (47), à la suite d'examen effectués au microscope électronique sur des coupes de tissus.

Ces vaisseaux sont du type anastomosés, et se présentent à partir du cambium en manteaux concentriques constitués de cellules longitudinales, dont la plupart des parois transversales ont complètement ou partiellement disparu durant la différenciation et la maturation. Les anastomoses sont fréquentes à l'intérieur du même manteau, mais beaucoup plus rares d'un manteau à l'autre.

De par la nature de cette organisation histologique, les vaisseaux les plus vieux se situent du côté des tissus les plus externes, alors que les vaisseaux les plus jeunes se trouvent dans les régions où la différenciation est la plus active, c'est-à-dire près du cambium.

### Écoulement du latex

La production du caoutchouc, matière première industrielle provenant de la culture de l'hévéa est obtenue par la coagulation du latex. Le latex lui-même est recueilli après « saignée » de l'arbre, c'est-à-dire l'incision des laticifères de l'écorce. Il s'en suit un écoulement du contenu des laticifères, sous l'effet de la pression interne qui peut être de l'ordre de 14 atmosphères (35).

Le fait remarquable dans le cas de *L'Hevea brasiliensis*, est que cet arbre répond à la saignée. En effet, lors de l'ouverture d'un panneau vierge, le latex qui s'écoule est très épais, presque pâteux, et coagule très rapidement. La production des premières saignées est quasi négligeable. A la longue, l'arbre semble s'habituer à ce traumatisme ; le latex devient plus fluide, et plus stable. Il s'ensuit alors une augmentation du volume de latex recueilli qui, au bout d'un certain temps, atteint un palier. L'hévéa est alors en production normale.



C'est cette caractéristique, ainsi que les forts rendements et la pureté du caoutchouc obtenu, qui ont fait que l'*Hevea brasiliensis* a presque partout été adopté en vue de la production industrielle de ce produit.

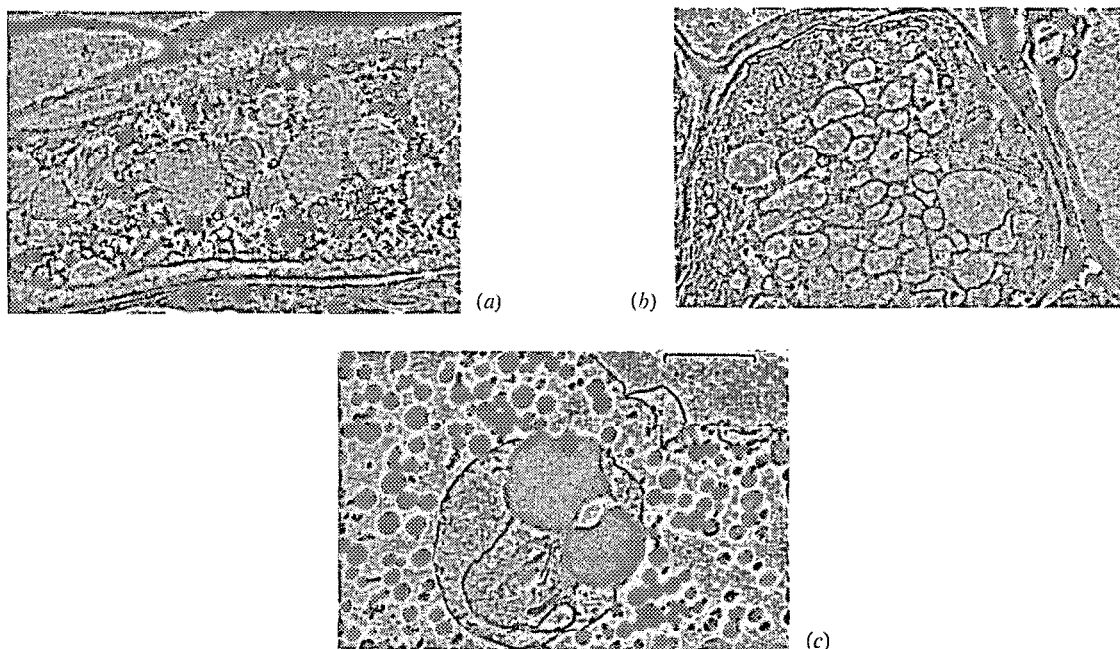


FIG. 1. — Vue au microscope électronique :  
 a) d'une coupe longitudinale d'un vaisseau laticifère,  
 b) d'une coupe transversale d'un vaisseau laticifère,  
 c) d'une particule de FREY-WYSSLING.  
 (clichés P. B. DIXENSON - 47)

## LE LATEX ET SES CONSTITUANTS

Durant de longues années, le latex a été considéré comme un fluide vacuolaire, constitué par une émulsion de diverses substances dont des hydrocarbures, des lipides et des protéines, mais ne possédant pas la structure et les fonctions complexes d'un cytoplasme. Ce n'est qu'en 1886, que BERTHOLD (28) reprit cette question et suggéra le premier, que le latex pouvait consister en un fluide d'origine cytoplasmique. Cette théorie fut reprise par la suite par MILANEZ (102) et finalement, s'imposa définitivement grâce à la mise en œuvre de techniques d'investigation de plus en plus raffinées. Ainsi divers chercheurs, notamment ceux de la Natural Rubber Producer's Research Association (N.R.P.R.A.) mirent en évidence dans le latex, des composés protéiques distincts, des ribonucléo-protéines, et différents coenzymes. Une vacuole ne pouvait présenter une telle complexité biochimique.

En outre, BANDURSKI et TEAS (20) montrèrent que le latex « in vitro » contient tous les enzymes susceptibles de transformer l'acétate en caoutchouc, et se comporte comme un homogénat cytoplasmique. Enfin, l'introduction du microscope électronique comme moyen d'investigation de la cellule laticifère (4 et 47) démontra définitivement la nature cytoplasmique du latex.

## Composition organo-minérale

Le latex contient des éléments minéraux susceptibles de variations importantes dues, soit au cycle végétatif, soit aux variations clonales, soit aux conditions d'exploitation de l'arbre (25).

On y trouve aussi des glucides comme le québrachitol, le m- et le l-inositol, le saccharose, le glucose et le fructose (30, 15 et 93), la plupart des acides aminés à l'état libre (50 et 17), des bases azotées (2) et des composés azotés soufrés (105) ainsi que des acides organiques (113 et 16). Bref, tous les composés classiques qui se rencontrent dans un liquide biologique.

## Composés protéiques

Comme dans tout fluide biologique, il existe aussi dans le latex des protéines en quantité relativement importante. Certaines sont adsorbées sur les particules de caoutchouc et semblent jouer un rôle dans la stabilité colloïdale du latex et dans la transformation de l'isopentényl-pyrophosphate en caoutchouc (8). D'autres sont sous forme soluble ou associées aux divers éléments figurés du latex.

L'étude de ces protéines a été entreprise par électrophorèse en Angleterre, à la Natural Rubber Producer's Research Association et en Malaisie, à la Rubber Research Institute of Malaya. Elle a montré l'extrême complexité de ces constituants. Il semble cependant, que c'est une  $\alpha$ -globuline (9) et l'hévéine (7) qui soient les deux protéines quantitativement les plus importantes. En outre, il a été observé dans les lutoïdes de latex provenant de jeunes laticifères, des microfibrilles creuses ayant une structure hélicoïdale (47). L'étude de ces microfibrilles a été entreprise par AUDLEY (11), mais leurs fonctions n'ont pas encore été élucidées.

Il existe aussi de nombreuses protéines du type enzymatique. On a déjà vu que le latex est capable de transformer l'acétate en caoutchouc, et certains enzymes de cette chaîne de réactions ont pu être partiellement purifiés (168 et 36). Il a aussi été mis en évidence des oxydases, comme la DOPA-oxydase, et des peroxydases, ainsi que des enzymes de décarboxylation.

Enfin, d'AUZAC (12) a montré que le latex est le siège de toute une série de séquences métaboliques, dont l'une des plus importantes pour la biogénèse du caoutchouc semble être la glycolyse. En outre, cet auteur, en collaboration avec JACOB (13), a montré l'existence de nombreuses déshydrogénases.

A côté des protéines proprement dites, on rencontre aussi des ribonucléoprotéines qui ont pu être purifiées par Mac MULLEN (106).

## Organites cellulaires

Le latex est un hydrosol constitué par une suspension de diverses particules dans un sérum aqueux. L'étude et l'examen microscopique de ces organites ont généralement été effectués après fractionnement du latex par centrifugation.

COOK et SEKHAR (42), en centrifugeant du latex à 59.000 g, obtinrent une séparation de ses constituants en quatre fractions distinctes :

*a* une couche légère, blanche, d'aspect crémeux, formée par des particules de caoutchouc ;

*b* juste en dessous de cette crème, une couche fine, jaune-orangée, formée par des particules de Frey-Wyssling ;

c. un sérum aqueux, clair ;

d. un culot d'aspect gélatineux et de coloration gris-jaunâtre, formé par l'agrégation des lutoïdes.

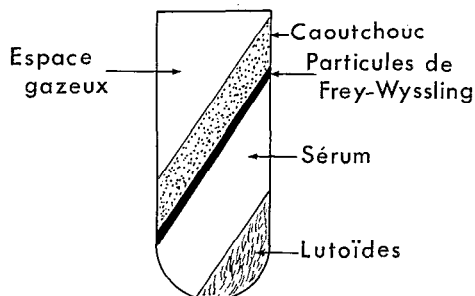


FIG. 2. — Centrifugation du latex à 59.000 g d'après COOK et SEKHAR (42)

De son côté, MOIR (103) en prenant plus de précautions, obtint une séparation nettement plus complexe. Le latex recueilli dans un mélange réfrigéré et centrifugé ensuite à 54.000 g à 0°C, en présence ou non, de divers colorants vitaux (rouge neutre, vert Janus...) donne onze zones visibles à l'œil nu.

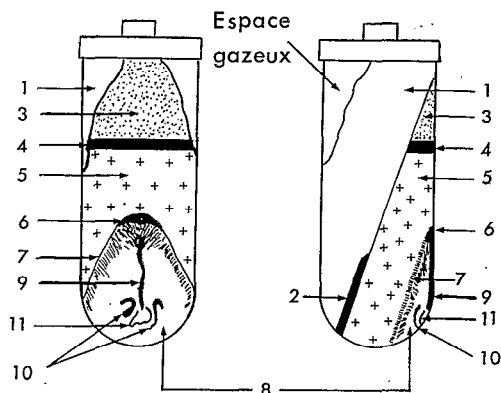


FIG. 3. — Les zones de centrifugation telles que les a obtenues MOIR (103)

— La zone 1, blanche et opaque, est formée par l'agglomération des particules de caoutchouc.

— La zone 2, très petite, se distingue par une certaine translucidité et se colore en bleu par le vert Janus.

— La zone 3, formée d'une émulsion blanche, semble analogue à la zone 2, et se colore aussi en bleu par le vert Janus.

— La zone 4, de coloration orange, correspond à la couche jaune-orangée décrite par COOK et SEKHAR. Elle est constituée par les particules de Frey-Wyssling.

— La zone 5 est formée par le sérum, mais contrairement aux résultats de COOK et SEKHAR, celui-ci est légèrement trouble.

— Les zones 6 à 11 correspondent au culot obtenu par COOK et SEKHAR, mais elles sont très hétérogènes.

— La zone 6, est formée de particules difficilement sédimentables et une légère agitation les redispense dans le sérum. Ces particules contiennent des pentoses (réaction positive à l'orcinol) et pourraient être constituées par des ribosomes.

— Les zones 7 et 9, sont formées par des particules jaunes et blanchâtres qui, avec le vert Janus, donnent une coloration mal définie, allant du jaune au vert sale. A 20-25°C, cette coloration vire au rouge brillant. Ces zones sont ainsi formées de particules réduisant le vert Janus et pourraient être constituées par des mitochondries.

— La zone 8, qui forme la presque totalité du culot a une coloration gris-crème. Elle se colore en rouge intense avec le rouge neutre et serait constituée par les lutoïdes.

— Enfin, la zone 10 est représentée par un anneau de matière orange foncé, et la zone 11, par une petite tache de gelée grise translucide. Ces deux dernières zones sont en très petites quantités, mais leur présence est incontestable.

SOUTHORN (144) a examiné systématiquement ces diverses zones au microscope à contraste de phase, et il a pu constater qu'elles n'étaient pas homogènes. Une zone donnée pouvait contenir des organites différents. Il put, de cette façon, caractériser huit types de particules. Cependant, il semble que la classification de SOUTHORN, basée parfois sur des différences morphologiques minimales, ne l'ait amené à augmenter ainsi le nombre des classes des constituants particuliers du latex.

Ces examens ont ensuite été repris au moyen du microscope électronique (4, 47 et 48). Actuellement, on admet qu'il existe dans le latex les particules classiques qui se trouvent normalement dans toute cellule vivante, comme les noyaux, les mitochondries et les ribosomes, ainsi que des particules qui semblent être propres à la cellule laticifère, comme le caoutchouc, les particules de Frey-Wyssling et les lutoïdes.

#### — Noyaux

Dans la cellule laticifère, ils sont normalement accolés à la membrane cellulaire, et de ce fait, ne sont pas ou peu entraînés lors de la saignée. On en rencontre que très rarement dans le latex.

#### — Mitochondries

Elles sont comme dans les autres cellules, caractérisées par leurs crêtes. Leur localisation dans les laticifères est la même que celle des noyaux. On n'en retrouve aussi qu'un nombre infime dans le latex.

#### — Ribosomes

Ils sont accolés comme toujours, au réticulum endoplasmique, dont la localisation est de même, proche de la membrane cellulaire. Cependant, on en trouve aussi à l'état libre, dans le cytoplasme des laticifères. Ils peuvent donc être entraînés par la saignée, et on en retrouve un certain nombre dans le latex ; c'est ainsi que Mac MULLEN (106) a pu les séparer et les purifier à partir d'un culot obtenu par ultra-centrifugation du latex.

### — Particules de caoutchouc

Elles forment la majeure partie de la phase dispersée du latex. Elles sont généralement sphériques dans les laticifères jeunes, mais dans les cellules plus vieilles, elles peuvent être piriformes. SOUTHORN a constaté qu'elles sont difficiles à colorer, surtout lorsque les préparations sont fraîches, ce qui laisserait supposer la présence d'une membrane protectrice. C'est en effet ce qu'on observe au microscope électronique. Cette paroi, bien définie, est extrêmement fine (100 Å d'épaisseur environ). Elle est très vraisemblablement formée par une ou deux membranes de nature lipo-protéique. La taille des particules de caoutchouc est excessivement variable, elle peut aller de 500 Å à quelques microns.

### — Particules de Frey-Wyssling

En 1929, FREY-WYSSLING (69) observa dans le latex, des particules non caoutchouc, sphériques, colorées en jaune vif, et ayant un diamètre supérieur aux particules de caoutchouc. On les trouve fréquemment sous forme d'amas dans le latex, après saignée. Elles ont une densité légèrement supérieure à celle du caoutchouc, et leur coloration est due à la présence de caroténoïdes et de lipides. Pendant très longtemps, elles furent considérées comme de petits sacs contenant lipides et caroténoïdes. Mais, avec le microscope électronique, DICKENSON (47 et 48) constata qu'elles présentent une structure beaucoup plus complexe et élaborée qu'on ne le pensait, et proposa alors de les appeler « complexes de Frey-Wyssling ». Ces complexes se présentent comme des vésicules sphériques de 5 à 6  $\mu$  de diamètre, limitées par une double membrane. A l'intérieur, on y trouve un système ramifié de tubules formés d'une membrane simple et ayant un diamètre approximatif de 750 Å, ainsi que des globules de caroténoïdes et de lipides.

La structure extrêmement élaborée de cet organite amène à penser qu'il doit être fonctionnel et impliqué dans des mécanismes de biosynthèse, et en particulier dans celle des lipides et des caroténoïdes, éléments qui les accompagnent toujours. En effet, il a pu être montré que des fractions enrichies de ces particules par centrifugation, sont capables de transformer le mévalonate 14-C en  $\beta$ -carotène radioactif (47). Il a aussi été avancé que ces particules pouvaient être impliquées dans la biosynthèse du caoutchouc, mais aucune preuve expérimentale n'est venue appuyer cette hypothèse.

### — Lutoïdes

Ce sont, après le caoutchouc, les particules les plus abondantes du latex. Ils ont été décrits en premier par HOMANS et Van GILS (81) qui les obtenaient par centrifugation à basse vitesse, sous forme d'agrégats colorés en jaune, d'où leur nom. On s'aperçut, par la suite, que cette coloration était due à la présence de particules de Frey-Wyssling entraînées et, en fait, ils ont une coloration grisâtre, mais le nom de lutoïdes leur est resté.

Ce sont des particules sphériques de 2 à 10  $\mu$  de diamètre, donc de taille bien supérieure aux particules de caoutchouc. RUINEN (128) les a décrits comme des corps fluides, limités par une membrane. En collaboration avec De HANN-HOMANS (130), elle montra que ces particules proviennent bien des laticifères, et ne sont en aucune façon, un produit des tubes criblés qui serait venu se mélanger au latex lors de la saignée. Plus tard, SCHOON et PHOA (136) observèrent à l'intérieur des lutoïdes, des inclusions particulières animées d'un mouvement brownien.

Les études effectuées au microscope électronique (47, 48 et 146) montrent que ces organites sont limités par une membrane simple de 80 à 100 Å d'épaisseur, semi-perméable, donc

osmotiquement sensible. Ils contiennent un liquide aqueux de pH fortement acide, environ 5,5, en comparaison de celui du latex qui se situe aux alentours de 6,9. Dans les tissus jeunes, les lutoïdes contiennent des inclusions fibrillaires de nature protéique, qui disparaissent avec le vieillissement. De par sa nature exclusivement protéique, et de son caractère transitoire, il a été suggéré que ces microfibrilles constituent une matière de réserve utilisable pour le métabolisme des vaisseaux en voie de développement (48). Cela suppose aussi l'existence au sein de ces particules, d'une protéase, ce qui a effectivement été montré (118).

La présence des lutoïdes semble être générale dans toutes les plantes à caoutchouc. Déjà, en 1901, MOLISCH (104) avait observé dans le latex de *Carica papaya*, des particules complexes dont la description rappelle celle des lutoïdes. De son côté RUINEN (129) en passant en revue diverses plantes à latex autres que l'hévéa, observa des particules semblables aux lutoïdes dans certaines de celles-ci. Par la suite, SOUTHORN (145) examina systématiquement le latex d'une vingtaine de plantes appartenant à huit genres différents. Dans tous, il nota la présence de particules semblables aux lutoïdes. Il semble qu'ils existent aussi dans les laticifères d'*Euphorbia characias* (95).

La présence des lutoïdes n'est donc pas une caractéristique de l'*Hevea brasiliensis*, mais paraît plutôt être celle de la cellule laticifère. C'est pour cette raison, qu'il a été suggéré que ces particules pourraient être le site probable de la biogénèse du caoutchouc (144), mais aucune preuve expérimentale n'est venue confirmer cette hypothèse. En revanche, divers résultats paraissent plutôt l'infirmer.

En fait, on sait peu de choses sur les fonctions des lutoïdes au sein des laticifères, ni par quel mécanisme la population des lutoïdes se maintient à une forte concentration pendant l'écoulement du latex lors de la saignée. On ne sait pas non plus comment s'effectue leur régénération dans les laticifères. Parce que ces organites se colorent facilement avec des colorants vacuolaires tels que le rouge neutre, WIERSUM (167) pensa qu'il s'agissait de vacuoles polydispersées, mais cela n'apportait pas de grands renseignements quant à leurs fonctions. Par contre, BANDURSKI et TEAS (20) ont montré que les lutoïdes ne jouent aucun rôle dans la biosynthèse du caoutchouc. Ces auteurs ont observé, qu'en incubant de l'acétate-2-14 C dans du latex débarrassé des lutoïdes par centrifugation, le caoutchouc obtenu avait une radioactivité spécifique plus forte que celle résultant d'incubations sur du latex entier. De même, ARCHER et Mac SWEENEY (10) montrèrent que la polycondensation de l'isopentényl-pyrophosphate avait lieu dans le latex, même si celui-ci avait été débarrassé au préalable des lutoïdes par centrifugation.

D'autre part, KARUNAKARAN et al. (86) trouvèrent dans la fraction lourde obtenue par centrifugation du latex et constituée principalement par des lutoïdes, un grand nombre de protéines. En outre, dans cette fraction, il a pu être caractérisé des activités phospholipase (142), polyphénol-oxydase (82) et phosphatase (8). De par ces activités enzymatiques, il semble donc que les lutoïdes puissent jouer un rôle négatif, mais important sur la biosynthèse du caoutchouc et la stabilité du latex (112 et 120) et par là, sur la productivité de l'hévéa.

## CONCLUSIONS

Cet exposé, bien que sommaire, nous montre à quel point, le « milieu » latex est complexe. Devant une telle complexité, il est difficile d'admettre la nature vacuolaire du latex. Celui-ci est bien un cytoplasme, mais d'un type particulier, spécialisé dans la fabrication du caoutchouc, dans lequel se retrouvent tous les métabolismes fondamentaux caractéristiques d'une cellule vivante.

J'avais à étudier les éléments figurés du latex, en dehors des particules de caoutchouc. Mon choix s'est porté sur les lutoïdes, car d'une part, ils existent en grande quantité dans le latex, et d'autre part, ils sont relativement faciles à séparer par centrifugation.

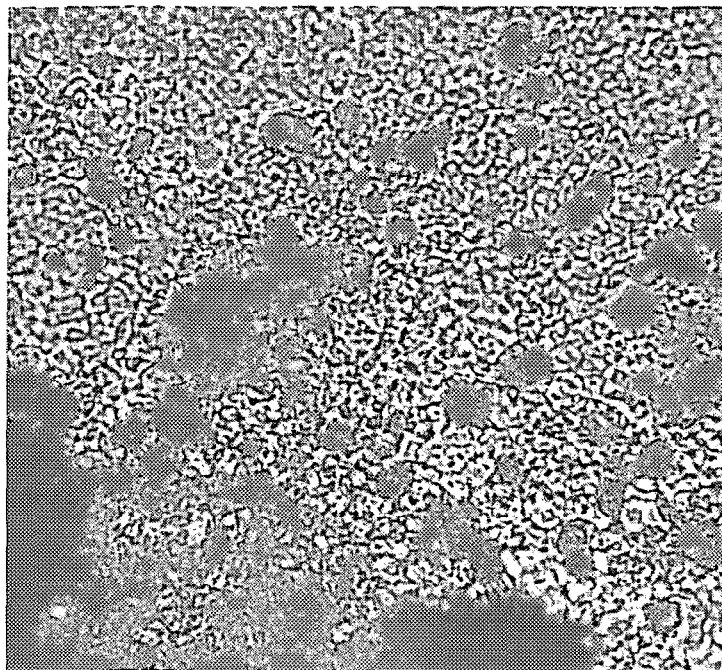


FIG. 4. — Révélation de la phosphatase acide dans le latex à l'aide du réactif de Gomori ( $\times 1\ 600$  environ)

Pour entreprendre cette étude, je suis parti des résultats d'ARCHER et al. (8) qui ont montré la présence d'une phosphatase dans les lutoïdes.

Une étude plus approfondie de cet enzyme a été entreprise, et j'ai alors constaté que cette phosphatase est du type acide (117), et qu'elle est effectivement localisée dans les lutoïdes (fig. 4). Ce dernier résultat a été obtenu en révélant le latex à l'aide du réactif de Gomori (120).

Par la suite, d'autres hydrolases ont pu être localisées dans ces particules (118), ce qui m'a amené à émettre l'hypothèse de la nature lysosomale des lutoïdes.

Cependant, avant d'aller plus en avant, et d'aborder les résultats expérimentaux, je pense qu'il serait utile de rappeler brièvement les notions acquises jusqu'à ce jour sur les lysosomes.

## Chapitre II

# LES LYSOSOMES

Le concept de lysosome illustre, de manière éclatante, tous les renseignements qu'il est possible de tirer sur la structure cellulaire à l'aide des techniques de centrifugation complétées par des analyses biochimiques.

En 1955, l'école de De DUVE (6) à Louvain, en étudiant par centrifugation différentielle les divers constituants du tissu hépatique du rat, isola une fraction nouvelle. Celle-ci est caractérisée par la présence d'une phosphatase acide et sédimente dans la fraction comprise entre celle des mitochondries (caractérisées par la cytochrome oxydase) et celles des microsomes (caractérisés par la glucose-6-phosphatase). De DUVE proposa le nom de *Lysosomes* à ces particules, désignation correcte, devenue classique depuis.

## Propriétés des lysosomes

La définition des lysosomes est avant tout physico-chimique et repose sur les études biochimiques de ces particules. Les propriétés les caractérisant, sont les suivantes :

1. Ils contiennent un grand nombre d'hydrolases du *type acide* : phosphatase ; ribonucléase et désoxyribonucléase ; cathepsine ; phosphoprotéine-phosphatase ; collagénase ;  $\alpha$ -glucosidase ;  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase ;  $\beta$ -glucuronidase ;  $\beta$ -galactosidase ;  $\alpha$ -mannosidase ; arylsulfatase ; phospholipase, estérase, etc.

Ces hydrolases sont susceptibles d'attaquer tous les composés biologiques à haut poids moléculaire. Par contre, les lysosomes ne contiennent aucun enzyme d'oxydo-réduction. Cependant, RAGAB et al. (121) ont identifié une déshydrogénase à NADH liée à la fraction membranaire d'une préparation de lysosomes de foie de rat. Cette découverte n'a pas été confirmée, et il est fort possible que cet enzyme soit une impureté d'origine mitochondriale ou microsomale.

2. Ces hydrolases sont sédimentables, puisqu'elles accompagnent un système particulaire.

3. Les hydrolases lysosomales sont sous forme latente, c'est-à-dire qu'elles sont inactives lorsque la membrane lysosomale est intacte. Elles deviennent actives et passent en solution lorsque cette membrane est détruite. Cette destruction peut être obtenue par divers traitements :

### TRAITEMENTS PHYSIQUES.

Force de cisaillement (action d'un broyeur à couteaux par exemple) ; congélations et décongélations répétées ; lyse osmotique ; action des pH extrêmes et de la température.



## TRAITEMENTS CHIMIQUES.

Certaines substances sont capables de libérer le contenu des lysosomes : le tétrachlorure de carbone, la digitonine, les détergents (Triton X-100 par exemple), ainsi que certains enzymes comme la lécithinase et les enzymes protéolytiques.

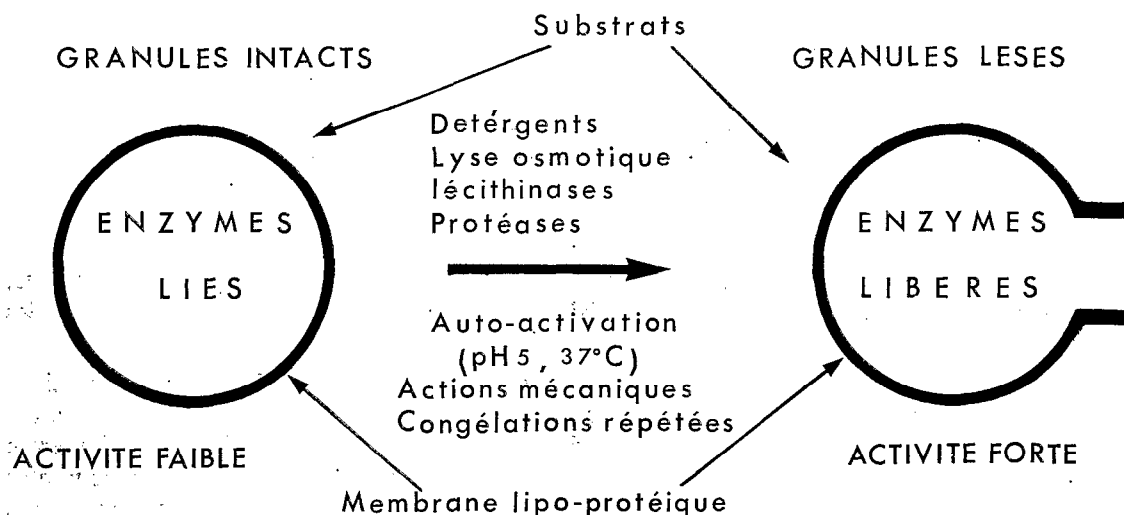


FIG. 5. — Schéma résumant les propriétés des lysosomes d'après DE DUVE (53)

Toutes ces propriétés font admettre que la membrane lysosomale est de nature lipo-protéique (23).

## Morphologie des lysosomes

Par la suite, NOVIKOFF et al. (107) ont isolé une fraction très pure de lysosomes, et l'ont étudiée au microscope électronique.

Ce sont de petits corps ovoïdes de 0,2 à 0,4  $\mu$ , limités par une membrane simple. Leur structure est polymorphe : leur matière granuleuse peut être homogène, ou contenir des cavités. Leur densité électronique très forte, est liée à la présence de granules de 56 à 76 Å, qui ressembleraient à des micelles de ferritine. En fin de compte, ce seraient les corps denses, polymorphes observés par ROUILLET et BERNHARD (127) le long de canalicules biliaires sur des coupes de foie de rat.

L'une des principales caractéristiques de ces particules est leur hétérogénéité morphologique, non seulement d'une cellule à l'autre, mais encore à l'intérieur de la même cellule. Cela a amené une assez grande confusion dans la désignation de ces corps. De DUVE et WATTIAUX (63) ont essayé de mettre un peu d'ordre dans cette nomenclature, et on trouvera ci-après, le tableau proposé par ces auteurs résumant les différents termes désignant ces particules (tableau I).

## Fonction des lysosomes

Le polymorphisme des lysosomes est parfaitement explicable de par les fonctions de ces particules. En effet, la présence de ce large spectre d'hydrolases implique nécessairement

TABLEAU I  
Liste des termes utilisés pour désigner les lysosomes selon  
DE DUVE et WATTIAUX (63)

SYNONYMES ET DESCRIPTIONS	
<i>Vacuole autophagique</i> .....	Cytolysosome, cytoségrésome, vacuole autolytique, site de dégradation cytoplasmique focale ou d'autolyse focale. Ce sont des vacuoles limitées par une membrane contenant des composés cytoplasmiques morphologiquement reconnaissables. Elles comprennent les autolysosomes et les autophagosomes hypothétiques.
<i>Cytolysosome</i> .....	Vacuole autophagique.
<i>Cytoségrésome</i> .....	Vacuole autophagique.
<i>Cytosome</i> .....	Terme mal défini s'appliquant à presque toutes les structures cytoplasmiques limitées par une membrane simple et dont l'identité est douteuse. Les particules appelées cytosomes sont généralement des lysosomes. Certains auteurs comprennent les « microbodies » dans ce terme.
« <i>Microbody</i> » .....	Particule trouvée dans le foie et le rein, entourée d'une membrane simple et contenant un intérieur finement granulé et dans certains cas, mais pas dans tous, un noyau dense de structure régulière. Les « microbodies » ne sont pas des lysosomes ; ils contiennent des peroxydases et ont été dénommés par la suite « peroxyosomes ».
<i>Corps multivésiculaire</i> .....	C'est une structure délimitée par une membrane simple et contenant des vésicules ressemblant aux vésicules de Golgi. D'après leurs réactions aux colorants, les corps multivésiculaires sont des formes de lysosomes.
<i>Corps résiduels</i> .....	Ce sont des inclusions limitées par une membrane simple, caractérisées par des résidus non digérés (fragments de membrane, myéline, ferritine, etc...). Ils comprennent les télo-lysosomes et les post-lysosomes hypothétiques.

une activité digestive. TAPPEL et al. (151) ont effectivement montré qu'une préparation de lysosomes est capable d'hydrolyser les homogénats de foie de rat, ainsi que les organites qui les constituent.

Par la suite, STRAUSS (148 et 149) montra qu'après injection intraveineuse de blanc d'œuf ou de peroxydase de raifort à des rats, ces protéines se retrouvent au bout de quelques heures, concentrées dans la fraction lysosomale du tissu rénal. Ces résultats amènent à penser que les lysosomes peuvent jouer un rôle dans les processus de désintoxication et de digestion vis-à-vis des substances ingérées par pinocytose ou phagocytose dans la cellule.

L'hétérogénéité des lysosomes est donc liée aux changements dynamiques qu'ils subissent au cours de leur cycle vital. Leur activité digestive a pour conséquence l'existence, à l'intérieur de ces particules, d'une variété de substances dans un état plus ou moins avancé de destruction, qui déterminent la forme, la dimension et la densité des lysosomes. Cependant, en dépit de ces variations, il existe beaucoup plus de points communs, surtout si l'on tient compte des critères enzymatiques et fonctionnels, qu'il n'y a de différences dans la morphologie de ces particules. Il semble donc justifié de les considérer comme un groupe distinct de particules cytoplasmiques étiquetées sous le terme général de lysosomes.

Durant la première phase, les recherches se sont basées essentiellement sur des analyses biochimiques. Plus tard, les méthodes cytochimiques et l'utilisation du microscope électronique ont énormément contribué à l'avancement de nos connaissances dans ce domaine. En particulier, la réaction de GOMORI pour révéler la phosphatase acide, a grandement facilité l'étude des lysosomes et de leurs fonctions dans de nombreux tissus normaux ou pathologiques.

On a alors constaté que ces organites sont impliqués dans un grand nombre de phénomènes biologiques.

Grâce à leurs enzymes hydrolytiques, les lysosomes sont capables de digérer les corps étrangers ayant pénétré dans la cellule, ou bien certains matériaux cellulaires sénescents. Ils agissent ainsi comme élément de défense et de désintoxication. Le phénomène ne se limite d'ail-

leurs pas à une simple absorption. Les corps étrangers ou le matériel cellulaire sont englobés dans une vacuole qui a été dénommée « phagosome » ou « vacuole autophagique » suivant les cas. Les « lysosomes primaires », appelés aussi « granules de stockage », contenant les enzymes hydrolytiques viennent fusionner avec la vacuole, et c'est alors qu'a lieu la digestion. Les produits de dégradations (acides aminés, etc.) sont récupérés par le cytoplasme et serviront au métabolisme de la cellule.

Ils sont donc impliqués dans tous les phénomènes de phagocytose, pinocytose, endocytose (39)..., etc.

Ils interviennent aussi dans les involutions spontanées de certains organes, comme dans le cas de la régression de la queue de têtard (162) ou du canal de MULLER dans l'embryon de poulet (133 et 134).

Pendant, un des rôles les plus intéressants attribués aux lysosomes est certainement leur intervention dans les états pathologiques (1). Dans ce cas, la membrane lysosomale devient très fragile, et on observe une rapide solubilisation des hydrolases qui attaquent alors la cellule et peuvent provoquer la nécrose ou la mort des tissus. Ces résultats ont été constatés dans une très grande variété de cas pathologiques, normaux ou expérimentaux, comme par exemple, dans la dystrophie musculaire du lapin (152), dans le cas de fonte tissulaire provoquée par un excès de vitamine A (49), dans les intoxications au tétrachlorure de carbone (45), dans le cas d'une ligature du pédoncule vasculaire du lobe hépatique, provoquant ainsi l'anoxie des tissus (60), dans le cas d'un jeûne prolongé..., etc. Il a même été avancé que les lysosomes pouvaient être impliqués dans le cancer par l'intermédiaire de son activité d'oxyribonucléase qui provoquerait des aberrations dans les chromosomes (1).

Dans ce bref résumé de l'activité des lysosomes, on notera que ceux-ci peuvent agir de deux manières :

— D'une part, en vase clos, à l'intérieur d'une vacuole, et à l'abri d'une membrane qui sépare les enzymes hydrolytiques du reste de la cellule. C'est le cas de la phagocytose ou endocytose.

— D'autre part, en libérant leurs enzymes dans le cytoplasme par rupture de la membrane lysosomale, dans tous les autres cas. Il y a alors activation des hydrolases. Le déterminisme de cette activation reste encore inconnu et pose un problème passionnant aux biologistes.

## Lysosomes des tissus animaux

Il est apparu que les lysosomes existent dans tous les tissus animaux. Ils sont particulièrement nombreux dans les cellules épithéliales des organes d'adsorption, de sécrétion et d'excrétion (foie, rein, prostate, etc.). On en trouve aussi dans la muqueuse intestinale (83), les cellules musculaires (125 et 151), celles de la peau (46), ainsi que dans les cellules des tissus lymphatiques (31) et des tissus osseux (157 et 158).

## Lysosomes des cellules végétales

La très grande majorité des recherches effectuées sur les lysosomes se sont cantonnées essentiellement au domaine animal. Peu de travaux approfondis ont été entrepris dans le domaine végétal. Cependant, des granules ayant le caractère lysosomal semblent aussi exister dans les cellules végétales.

En 1956, JENSEN (85) observa dans des cellules de racines, la présence de particules à phosphatase acide, mais cet auteur pensa qu'il s'agissait de mitochondries. Un peu plus tard,

GENÈVES, LANCE et BUVAT (73) ont décrit dans diverses catégories de cellules végétales des corpuscules à contenu dense et finement granuleux, analogues aux lysosomes. Par la suite, AVERS et KING (18) sont arrivés à la conclusion que la phosphatase acide appartient, dans la cellule végétale, aux mitochondries et à des particules du type lysosomal. WALEK-CZERNECKA (159) de son côté, montra que cet enzyme se situe au niveau des sphérosomes dans l'épiderme des écailles bulbaires d'*Allium cepa*, et émit l'hypothèse de l'équivalence entre ces particules et les lysosomes. Quant à POUX (115 et 116), travaillant sur des embryons de Blé, elle constata que les vacuoles et les grains d'aleurone contiennent de la phosphatase acide. En outre, ayant observé des enclaves cytoplasmiques en voie de digestion à l'intérieur de certaines vacuoles (114), cet auteur pensa que l'appareil vacuolaire est susceptible de présenter des fonctions semblables à celles des lysosomes. En 1964, CRONSHAW (44) décrivit, dans divers tissus végétaux, des particules limitées par une membrane simple et contenant un noyau cristallin. Il pensa qu'il pouvait s'agir de lysosomes par analogie avec des particules précédemment décrites par De DUVE (56) et qui contiennent aussi un noyau cristallin. En fait, cet auteur a confondu ces organites avec ceux contenant l'uricase, la catalase et la D-amino-acide-oxydase (24) et qui ont été dénommés *peroxysomes* par De DUVE et son école (59). Enfin, GAHAN (71) puis GAHAN et Mac LEAN (72) ont décrit dans les cellules méristématiques des racines de *Vicia fabia*, des particules à phosphatase acide, entourées d'une membrane lipo-protéique. L'enzyme peut être libéré à la suite de divers traitements tels que des congélations et décongélations répétées, ou par action du Triton X-100, du formol ou de la chaleur. Ces auteurs pensaient qu'ils étaient en présence de lysosomes végétaux.

Ces travaux, bien que présentant des faits certains, ne sont guère convaincants quant à leurs conclusions. On a pu constater à quel point les lysosomes sont hétérogènes. Il semble donc illusoire de vouloir les caractériser uniquement par leur aspect morphologique.

En outre, il ne faut pas perdre de vue, que si la révélation de la phosphatase acide par des méthodes cytochimiques a rendu d'immenses services dans l'étude des lysosomes, il serait dangereux de donner indistinctement ce nom à toute structure intracellulaire qui réagirait positivement à cette réaction. La présence de cet enzyme est nécessaire, mais nullement suffisante. Dans ce genre d'étude, il faut toujours garder présent à l'esprit que la phosphatase acide peut se trouver dans certains sites, sans pour cela être accompagnée par d'autres hydrolases, et sans qu'il y ait des fonctions caractéristiques des lysosomes (57). Cela est d'autant plus vrai dans le cas de la cellule végétale où l'on sait qu'il existe une grande diversité et une grande richesse en phosphatase acide. Ainsi RAGLETI et al. (122) ont montré que cet enzyme existe sous forme latente dans les chloroplastes de *Nicotiana-glutinosa*, et qu'il est activé par un traitement au Triton X-100, ou au bromure d'hexadécyl-triméthyl-ammonium. Au microscope électronique, ces auteurs ont observé que cette phosphatase est normalement associée aux structures lamellaires des chloroplastes.

Beaucoup plus convaincante, est l'observation de POUX (114) citée plus haut, qui nota la présence d'enclaves cytoplasmiques en voie de digestion dans certaines vacuoles. Ce fait impliquerait la présence de plusieurs hydrolases, ainsi que la fonction digestive de ces structures. De même, les observations de OLSZEWSKA et GABARA (109) qui ont caractérisé par des méthodes cytochimiques, dans les sphérosomes de diverses cellules végétales, les enzymes suivants : estérase non spécifique, lipase, phosphatase acide et alcaline, aryl-sulfatase, désoxyribonucléase acide et probablement  $\beta$ -glucuronidase. WALEK-CZERNECKA (160) de son côté, par des méthodes semblables, montra la présence de la phosphatase acide, l'estérase, la  $\beta$ -glucuronidase, la  $\beta$ -galactosidase, l'aryl-sulfatase, la lipase et la désoxyribonucléase dans les sphérosomes de différentes cellules végétales.

Il semble donc hautement probable que les sphérosomes de la cellule végétale correspondent aux lysosomes de la cellule animale. Cependant, les travaux que nous avons cités jusqu'ici sont d'ordre purement cytologique. Jusque-là, aucune tentative n'a été faite pour séparer ces

« lysosomes végétaux » et les étudier par des méthodes biochimiques. CORBETT et PRICE (43) tentèrent bien de détecter une activité p-nitro-phényl-phosphatase acide particulière dans des fractions obtenues par centrifugation différentielle et centrifugation zonale d'homogénats de divers tissus végétaux (cotylédons de Pois, feuilles de Soja..., etc.). Mais ces auteurs n'obtiennent au maximum que 10 % de l'activité de cet enzyme sous forme sédimentable, le reste étant sous forme soluble. En outre, cette fraction ne présente aucun phénomène de latence. Par contre, MATILE et son équipe à Zurich (99), purent isoler par centrifugation en gradient de densité d'homogénats de plants de Maïs et de Tabac, deux fractions contenant des hydrolases acides (phosphatase, protéase, estérase et ribonucléase). L'une de ces fractions contient principalement des prosphérosomes, l'autre des sphérosomes.

Ces résultats ont été approfondis par la suite, d'une part par BALZ (19), et d'autre part, par SÉMADINI (138) qui ont montré que les hydrolases des sphérosomes sont activables par le Triton X-100. En outre, ce dernier a pu mettre en évidence la capacité de ces particules à transformer l'acétate- $H_3$  en lipide radioactif.

L'équipe de MATILE établit encore, que certaines vacuoles des cellules végétales possèdent les caractéristiques des lysosomes (97, 100 et 101). Il en est de même pour les grains d'aleurone (98), ce qui avait été pressenti par BUTTROSE (34). En outre, il apparaît que les vacuoles contiennent deux transaminases (l'aspartate et l'alanine amino-transférase), ainsi que deux oxydo-réductases (la cytochrome-réductase et la diaphorase), enzymes qui ne semblent pas exister dans les lysosomes du règne animal.

Enfin ORY et al. (119) par des études biochimiques et de microscopie électronique confirment le caractère lysosomal des sphérosomes et YATSU et JACK (169) celui des grains d'aleurone.

Il semble ainsi bien établi que des particules ayant des caractéristiques lysosomales existent dans la cellule végétale, sous des formes qui, par leur aspect morphologique, étaient dénommées sphérosomes, vacuoles ou grains d'aleurone.

Cependant, à la différence des lysosomes du règne animal, ces organites posséderaient, à côté de tout un spectre d'hydrolases, des activités oxydo-réductrices et seraient capables d'effectuer certaines synthèses. Ces derniers points mériteraient néanmoins d'être vérifiés par d'autres techniques, comme le démantèlement contrôlé de ces particules par exemple. Toutefois, si nous acceptons ces résultats, il faudrait admettre que leurs fonctions sont plus complexes que celles des lysosomes de la cellule animale. Malgré ce, par analogie avec ces derniers, on pense qu'ils sont impliqués dans la dégradation du matériel cellulaire, spécialement lors de la germination et de la sénescence.

## CONCLUSIONS

La découverte des lysosomes par De DUVE a suscité une floraison de travaux, et il reste, certes, encore beaucoup à dire sur un sujet aussi vaste. Il est cependant difficile de faire le tour de cette question dans le cadre limité de ce mémoire. D'excellentes revues analytiques ont d'ailleurs été écrites ces dernières années faisant le point sur cette question (voir par exemple 63, 165, 150 et 164).

Le concept de lysosomes a apporté une solution élégante au problème de la lyse cellulaire. Jusqu'alors, la mort d'un organe ou sa disparition posait un problème biologique ardu : comment expliquer en effet, qu'un tissu sain, ou en voie de prolifération, puisse dans certaines conditions, être l'auteur de sa propre destruction ? L'existence des lysosomes a permis d'expliquer ce phénomène.

Les lysosomes, ou du moins les particules à caractère lysosomal, paraissent être des constituants normaux de toutes les cellules, aussi bien animales que végétales. Cependant, si les

fonctions de ces particules dans la cellule animale commencent à être bien connues, par contre, peu de choses ont été établies quant à leur rôle dans la cellule végétale. Néanmoins, en raisonnant par analogie, il est admis que ces organites sont impliqués dans les mêmes phénomènes. Il est donc vraisemblable que dans les études consacrées à la physiologie de la cellule végétale, ces particules en pleine activité se rencontreront dans les cas de traumatisme, et dans ceux où se trouveront impliqués des phénomènes de digestion ou de dégradation du matériel cellulaire.

De mon côté, comme je l'ai souligné précédemment, en étudiant les lutoïdes du latex, j'ai été amené à penser que là aussi, il pouvait s'agir de particules possédant les caractères des lysosomes. Les principaux résultats obtenus sur ce sujet ont déjà fait l'objet de plusieurs publications (117, 118 et 119). Je vais essayer de montrer dans ce mémoire, le bien fondé de cette hypothèse, en me basant sur les principales caractéristiques des lysosomes, à savoir :

- La présence d'un large spectre d'hydrolases du type acide, susceptibles de dégrader divers composés biologiques, particulièrement ceux à haut poids moléculaire ;
- L'existence de ces hydrolases sous forme latente ;
- Les fonctions digestives de ces particules.

### Chapitre III

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

D'une manière générale, le biochimiste ayant à étudier un tissu quelconque, commence par le broyer dans un milieu approprié afin d'obtenir un homogénat. De très grandes précautions doivent être prises dans cette opération, car l'homogénat doit contenir en solution et en suspension, tous les constituants cellulaires dans un état parfait d'intégrité morphologique et chimique. En outre, il doit être parfaitement représentatif des cellules qui composent le tissu.

Dans le cas du latex, cette première opération est inutile, puisque nous sommes en présence d'un homogénat naturel. Cependant, il n'est pas parfaitement représentatif du contenu de la cellule laticifère. En effet, certains constituants comme le noyau ou les mitochondries, ne sont pas ou à peine entraînés par le flot du latex qui s'écoule lors de la saignée. L'idéal serait de pouvoir séparer les cellules laticifères, puis de désintégrer leur enveloppe afin de récupérer la *totalité* du cytoplasme. Malheureusement, cela n'est techniquement pas possible.

Il se trouve fort heureusement, que si le latex ne représente pas *quantitativement* le contenu des laticifères, il contient *qualitativement* tous ses constituants. En outre, dans le cas des lutoïdes qui nous intéressent plus particulièrement, le latex en contient dans des proportions suffisantes pour pouvoir les séparer et en effectuer l'étude. Il est donc justifié d'utiliser du latex frais, comme cela a été fait, pour étudier les lutoïdes.

Néanmoins, les précautions nécessaires lors de la préparation d'un homogénat et de son fractionnement par centrifugation, sont également valables dans le cas du latex. Celui-ci doit être recueilli dans des récipients propres et refroidis par de la glace fondante. Les manipulations ultérieures doivent aussi être effectuées à une température proche de 0°C, afin de conserver, autant que faire se peut, l'intégrité structurale du latex ainsi que toute son activité enzymatique.

En outre, le latex, milieu biologique complet, est de ce fait, parfaitement propice au développement microbien. TAYSUM (154 et 155) a montré que cette infection peut également atteindre l'intérieur des vaisseaux laticifères sur quelques centimètres de profondeur. D'AUZAC (12) dans son étude sur le métabolisme du latex a pris des précautions justifiées, comme : désinfection du panneau, ouverture d'une nouvelle encoche... etc., pour éviter cette infection. Dans cette étude, il m'a paru inutile de prendre de telles précautions. En effet, le latex étant recueilli dans un récipient refroidi par de la glace fondante, le temps total d'écoulement à température ambiante n'est que de quelques minutes. Toutes les manipulations ultérieures se faisant à une température proche de 0°C, et dans l'heure qui suit la récolte du latex, ne permettent pas une forte prolifération microbienne. En outre, comme les 20 à 30 premiers ml de latex qui s'écoulent de l'arbre après la saignée et qui contiennent la plus forte concentration microbienne, ne sont pas recueillis, on peut raisonnablement admettre que l'interférence des micro-organismes est sinon nulle, du moins négligeable.

## Matériel végétal et prélèvement du latex

Les latex utilisés dans cette étude proviennent de quelques hévéas issus de graines clonales ou de clones greffés de la station expérimentale de l'Institut des Recherches sur le Caoutchouc en Afrique.

Au cours de cette étude, le même groupe d'arbres a constamment été utilisé. Ceux-ci ont été choisis au hasard, mais possèdent les caractéristiques suivantes : 8 à 10 ans d'âge, ils sont apparemment sains, en bon état physiologique et en saignée normale depuis au moins un an.

L'arbre étant saigné, on laisse s'écouler les 20 à 30 premiers ml de latex et les 30 ml suivants sont recueillis dans un erlenmeyer refroidi par de la glace fondante. Ce latex est ensuite traité le plus rapidement possible pour l'obtention des lutoïdes.

A partir de l'instant où le latex s'écoule de l'arbre jusqu'au moment où les dosages sont mis en route, toutes les manipulations se font en chambre froide et les centrifugations dans une ultra-centrifugeuse réfrigérée (Spinco modèle L-2-50).

## Centrifugation différentielle

Vingt ml de latex, mesurés exactement, sont dilués quatre fois avec une solution tampon isotonique (mannitol 0,3 M contenant du tampon imidazole 0,05 M de pH 7,0). Le mélange est centrifugé à 10.000 tr/mn (g moyen = 6.600) pendant 10 minutes dans le rotor 50 de l'ultra-centrifugeuse préparative Spinco.

Le surnageant constitué principalement de caoutchouc et de sérum est mis de côté. Le culot composé par des lutoïdes est remis en suspension dans la solution tampon isotonique à l'aide de l'appareil de Potter-Elvehjem manié à la main. La suspension obtenue est soumise à une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 5.000 tr/mn (g moyen = 1.650).

Le sédiment est remis en suspension dans le tampon isotonique et complété à 20 ml dans une fiole jaugée. Cette suspension représente la « fraction lutoïdes ». Elle est constituée presque exclusivement de lutoïdes dont l'intégrité est suffisante pour permettre d'entreprendre l'étude de leurs propriétés.

Les surnageants obtenus au cours de ces deux centrifugations sont mélangés et complétés à 150 ml. Cette « fraction surnageante » ne correspond en rien à celle obtenue dans le cas du fractionnement classique d'un homogénat de foie de rat par exemple. En plus de la fraction soluble (sérum), elle contient des organites comme le caoutchouc et la majorité des particules de Frey-Wyssling. En fait, c'est du latex dilué et débarrassé des lutoïdes.

Dans le cas où les deux fractions obtenues par centrifugation du latex ne sont utilisées que pour des dosages d'activité enzymatique totale, la lyse totale des lutoïdes est effectuée par addition de Triton X-114 à 1 % (v/v), se manière qu'après complément à volume, la concentration finale en détergent soit de 0,1 % (v/v).

## Centrifugation en gradient de densité ou " isopycnique "

Le gradient linéaire de densité allant de 1,02 à 1,19 est obtenu à l'aide d'un petit appareil \*, dont le schéma est donné ci-après.

---

(\*) Je remercie vivement M. le Professeur LIORÉ et M. GUILLE qui m'ont aimablement fourni ces appareils.



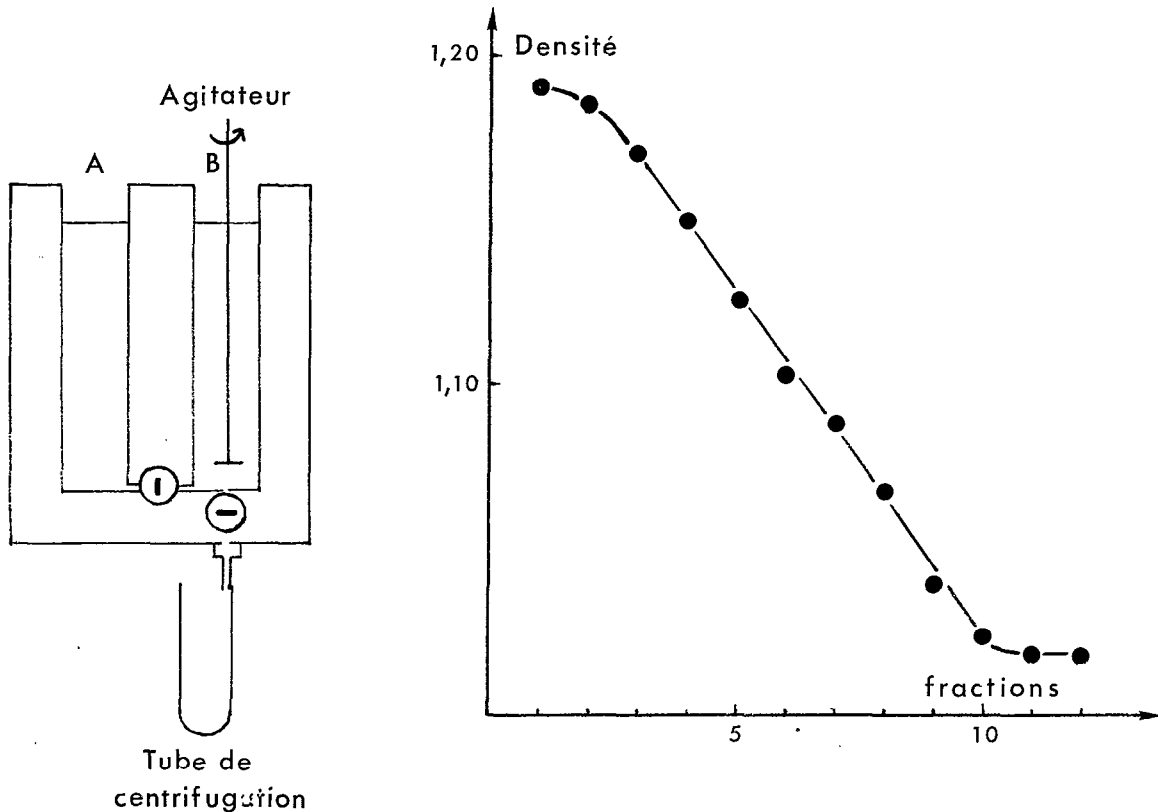


Fig. 6. — Schéma de préparation d'un gradient et densité des fractions obtenues.

2,1 ml de mannitol 0,3 M tamponné à pH 7,0 par du tampon imidazole-C1H 0,05 M sont placés dans le compartiment A, et 2,0 ml d'une solution contenant du saccharose à 50 %, du mannitol 0,3 M et du tampon imidazole-C1H 0,05 M, dans le compartiment B.

Le gradient est obtenu par le mélange progressif de la solution A dans la solution B. Ce mélange s'écoule le long de la paroi d'un tube de centrifugation de 5 ml en nitrate de cellulose.

1 ml de suspension de lutoïdes, ou bien 1 ml de latex dilué au préalable avec du mannitol 0,3 M de pH 7,0 (tampon imidazole-C1H 0,05 M) est étalé sur ce gradient. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant deux heures à 39.000 tr/mn ( $g$  moyen = 124.000) dans le rotor SW 39 de l'ultra-centrifugeuse Spinco.

Après centrifugation, les tubes sont récupérés avec précaution, et leur fond est percé à l'aide d'une aiguille hypodermique. Des fractions de quelques gouttes sont recueillies et amenées à un volume donné avec du tampon imidazole de pH 7,0 à 5 mM, et contenant 0,2 % de Triton X-114.

La linéarité du gradient a été vérifiée en mesurant l'indice de réfraction des fractions, à l'aide d'un réfractomètre de précision. Le réfractomètre a été préalablement étalonné avec des solutions de mannitol 0,3 M tamponnées à pH 7,0 avec du tampon imidazole-C1H 0,05 M et contenant du saccharose à des concentrations allant de 0 à 50 %. La densité de ces solutions a été mesurée à température ambiante, à l'aide d'un pycnomètre.

## Dosage des enzymes hydrolytiques

La mise au point de ces dosages a été effectuée essentiellement avec des suspensions de lutoïdes lysés par du Triton X-114, comme source d'enzyme.

Sauf en ce qui concerne l'estérase, la phospholipase D et la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, dans tous les autres dosages, la concentration en substrat utilisée correspond à la saturation de l'enzyme, déterminée expérimentalement.

En général, les activités de ces hydrolases ont été mesurées au pH qui correspond à l'optimum de leur activité. Dans le cas où des dosages ont été effectués à un autre pH, cela sera précisé dans le protocole expérimental.

Les méthodes ont été vérifiées et, dans nos conditions opératoires, il y a proportionnalité entre l'activité et la durée des incubations ou la concentration en lutoïdes.

Dans le cas où la durée des incubations excède une heure, les milieux ont été additionnés de thiomersalate (Hopkin and William, Grande-Bretagne) à la concentration de 0,01 % (24) afin d'éviter les contaminations bactériennes. Il a été vérifié qu'à cette concentration, le thiomersalate n'inhibe pas l'activité des hydrolases et est suffisante pour éviter toute infection. Divers mélanges servant aux dosages ont été étalés sur des milieux nutritifs solides. Après sept jours d'incubation à 37°C, il n'est apparu aucune colonie bactérienne.

En ce qui concerne les mesures effectuées sur les fractions obtenues par centrifugation isopycnique, et qui sont très peu concentrées en enzymes, il a fallu augmenter les durées d'incubation. Elles vont de 30 minutes à 72 heures selon l'activité de l'enzyme étudié.

### a ACTIVITÉS MESURÉES A L'AIDE DE SUBSTRATS SYNTHÉTIQUES AU P-NITRO-PHÉNOL.

— *Phosphatase acide* (E.C.3.1.3.2.) : elle est dosée en milieu acétate 0,1 M à pH 5,0 avec 10 mM/l de p-nitrophénylphosphate (Koch-Light, Grande-Bretagne), comme substrat (92).

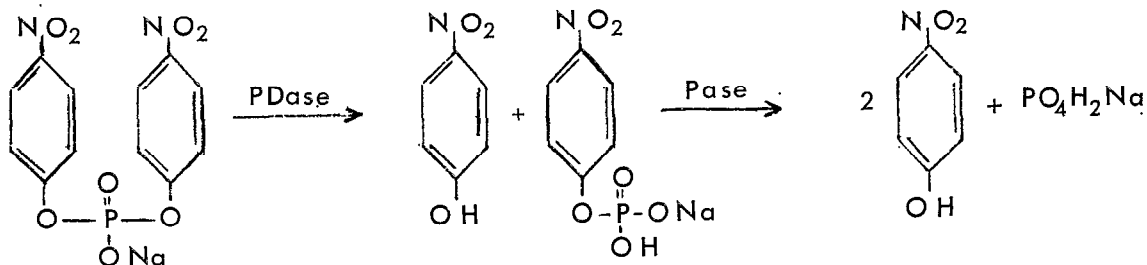
—  $\beta$ -*Glucosidase* (E.C.3.2.1.21) : elle est dosée à pH 5,0 en milieu tampon acétate 0,1 M avec 15 mM/l de p-nitro-phényl- $\beta$ -D-glucopyranoside (Koch-Light, Grande-Bretagne) comme substrat (41).

—  $\beta$ -*Galactosidase* (E.C.3.2.1.23) : elle est dosée à pH 5,5 en milieu phosphate-citrate 0,1 M avec 10 mM/l de p-nitrophényl- $\beta$ -galactopyranoside (Koch-Light, Grande-Bretagne) comme substrat (41).

—  $\beta$ -*N-Acétyl-glucosaminidase* (E.C.3.2.1.30) ; elle est dosée à pH 5,0 en milieu tampon citrate 0,1 M avec 2 mM/l de p-nitrophényl-2-acétamino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (Koch-Light, Grande-Bretagne) comme substrat (41).

— *Phosphodiesterase* (E.C.3.1.4.1.) : cet enzyme présente deux activités maximales, l'une à pH 6,0, l'autre à pH 8,0 (cf. fig. 13). Les dosages ont été effectués à pH 6,0 en milieu tampon cacodylate 0,1 M avec 10 mM/l de bis (p-nitrophényl) phosphate de sodium (Koch-Light, Grande-Bretagne) comme substrat (141).

A ce pH, l'activité phosphatase acide est encore très élevée, de deux à cinq fois plus active que la phosphodiesterase. On peut donc penser *a priori*, que tout le p-nitro-phényl-phosphate libéré par la phosphodiesterase est hydrolysé à son tour par la phosphatase, suivant la série de réactions :



Dans ces conditions, il y a deux fois plus de p-nitro-phénol libéré que dans le cas où la phosphodiesterase agirait seule. Pour obtenir l'activité phosphodiesterase réelle, il faut donc diviser par deux la quantité de p-nitro-phénol mesurée dans les conditions opératoires.

— *Estérase non spécifique* (E.C.3.1.1.2.) : c'est un dosage assez délicat étant donné l'insolubilité du p-nitro-phényl-laurate (Koch-Light, Grande-Bretagne), substrat de la réaction. Il a été fait appel à une technique dérivée de celle de KRISCH (88) en préparant une solution acétonique à 1,6 mg de p-nitro-phényl-laurate. 1 ml de cette solution est mise en suspension dans 9 ml de tampon, le mélange étant fortement agité. C'est cette suspension qui sera utilisée dans les dosages.

La mesure de l'estérase se fait en milieu phosphate-citrate 0,1 M à pH 5,5 avec 0,12 mg de p-nitro-phényl-laurate comme substrat.

Dans tous ces dosages, le volume réactionnel est de 2 ml. Les incubations se font généralement à 30°C, pendant 10 minutes pour la phosphatase et la  $\beta$ -glucosidase, 30 minutes pour la  $\beta$ -galactosidase, la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, et la phosphodiesterase, et 180 minutes pour l'estérase. La réaction est ensuite bloquée par addition de 2 ml d'acide trichloracétique N et le mélange est filtré sur filtre lent.

A 2 ml de filtrat, on additionne 1 ml de soude N et 2 ml de tampon glycine-carbonate de sodium 0,15 M de pH 10,0. La coloration développée par le p-nitro-phénol libéré est mesurée au colorimètre Klett-Summerson muni du filtre violet 42, ou au spectrophotomètre Beckman modèle D.B. à 400 m $\mu$ .

#### b ACTIVITÉS MESURÉES A L'AIDE DE SUBSTRATS NATURELS.

— *Cathepsine* : elle est dosée selon le principe de De DUVE et al. (62) à pH 3,7 en milieu tampon acétate 0,2 M avec 16,5 mg/ml d'hémoglobine de bœuf (Koch-Light, Grande-Bretagne) comme substrat. Le volume réactionnel est de 4 ml, et les incubations se font à 30°C pendant 1 à 3 heures. La réaction est bloquée par addition de 5 ml d'acide trichloracétique à 10 %. Le mélange est abandonné pendant 30 minutes environ à température ambiante, puis filtré sur filtre lent. 5 ml de filtrat sont mélangés à 5 ml de carbonate de sodium à 14 %, et on additionne ensuite 3 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au tiers. La lecture se fait au bout de 20 minutes environ au colorimètre Klett-Summerson muni d'un filtre rouge 69.

Pour obtenir de l'hémoglobine dénaturée, on prépare une solution stock à 66 g/l dans de l'acide chlorhydrique 0,05 N. 25 mg de thiomersalate sont ajoutés à cette solution, pour éviter toute prolifération bactérienne, et le stockage se fait entre 0 et 4°C.

— *Ribonucléase acide* (E.C.2.7.7.17) : elle est dosée selon le principe de De DUVE et al. (62) dans un volume total de 2 ml en milieu tampon citrate 0,1 M de pH 5,5 et 1,25 mg/ml d'acide ribonucléique de levure hautement polymérisé (Calbiochem, U.S.A.). Après 5 heures d'incubation à 30°C, la réaction est bloquée par addition de 2 ml d'acide trichloracétique à 5 % contenant 1,5 % de sulfate d'aluminium. Le mélange est abandonné 30 minutes à 30°C, puis filtré sur filtre lent. Une aliquote du filtrat est diluée avec de l'eau et la densité optique de cette solution est mesurée à 260 m $\mu$  au spectrophotomètre Beckman modèle D.B.

— *Désoxyribonucléase* (E.C.3.1.4.6.) : elle est dosée selon le principe de De DUVE et al. (62) dans un volume total de 2 ml en milieu tampon cacodylate 0,1 M de pH 6,0, et contenant 1 mg/ml d'acide désoxyribonucléique de thymus hautement polymérisé (Koch-Light, Grande-Bretagne). Après 5 heures d'incubation à 30°C, la réaction est bloquée par addition de 2 ml d'acide perchlorique à 10 % (p/v) et le mélange est abandonné 30 minutes à 0°C, puis filtré sur filtre lent. Une aliquote du filtrat est diluée avec de l'eau, et la densité optique de cette solution est mesurée à 260 m $\mu$  au spectrophotomètre Beckman modèle D.B.

— *Phospholipase D* (E.C.3.1.4.4.): suivant la nomenclature actuellement adoptée, cet enzyme attaque la lécithine entre la choline et le groupement phosphate, et provoque la libération de la choline. C'est donc une phosphodiesterase spécifique.

Le dosage se fait selon le principe de SHAPIRO (139). Dans un volume total de 2,10 ml en milieu tampon acétate 0,1 M de pH 5,5, contenant 0,1 mM/l de chlorure de calcium, et 15 mg de lécithine d'œuf (Koch-Light, Grande-Bretagne) en suspension. Le dosage démarre par addition de 5 ml d'éther éthylique; la réaction se poursuit pendant 3 heures sous agitation et à température ambiante, elle est ensuite bloquée par addition de 1 ml d'acide trichloracétique 2 N. Le mélange est filtré, et l'éther décanté. Le filtrat aqueux est encore extrait trois fois par 5 ml d'éther. On chasse ensuite l'éther résiduel de la phase aqueuse par chauffage au bain-marie, à 60°C.

1,5 ml de la solution aqueuse sont neutralisés par 0,10 ml de soude 2 N et amenés à pH 5,0 par addition de 0,90 ml de tampon acétate 0,8 M. On ajoute alors 0,5 ml d'acétate mercurique à 2 % en solution dans du tampon acétate 0,8 M de pH 5,0, afin d'éliminer les substances pouvant interférer dans le dosage de la choline (135).

Après avoir laissé reposer quelques heures à 0°C, le mélange est filtré, et 2 ml de ce filtrat sont prélevés pour le dosage de la choline selon la technique de DUCET (51). Celle-ci est précipitée par addition de 0,45 ml d'une solution de triiodure (16 g I<sub>2</sub> + 24 g IK en solution dans 100 ml d'eau).

Le mélange ayant été abandonné toute une nuit en chambre froide, est ensuite centrifugé. Le surnageant est décanté, et le précipité lavé à l'eau glacée, puis dissous dans du chloroforme. Enfin, l'iode est dosé à l'aide d'hyposulfite de sodium à 0,005 N jusqu'à décoloration totale de la solution chloroformique.

Dans toutes les mesures d'activités hydrolytique, il a été fait des témoins appropriés contenant tous les réactifs, sauf l'homogénat qui a été ajouté après coagulation. Les valeurs obtenues ainsi, ont été soustraites de celles mesurées dans les conditions normales.

Les activités mesurées à l'aide de substrats synthétiques ont été effectuées en double, avec un témoin; celles mesurées à l'aide de substrats naturels, en triple et deux témoins.

## Dosage d'enzymes d'oxydo-réduction

— *Polyphénol-oxydase* (E.C.1.10.3.2.): elle est dosée d'après la technique de LANCE (89) à pH 6,5 en milieu tampon phosphate 0,1 M et en présence de 0,2 % de dihydroxyphénylalanine (DOPA), le volume total étant de 5 ml. Au bout d'une durée variant entre 5 et 30 minutes, suivant l'activité du milieu, et à température ambiante, on mesure au colorimètre Klett-Summerson muni du filtre violet n° 42, la coloration du produit d'oxydation qui s'est formé au cours de la réaction.

Pour chaque dosage, on a soin de faire d'une part, un témoin contenant tous les réactifs sauf la DOPA, remplacée par de l'eau, d'autre part, un témoin contenant tous les réactifs sauf l'enzyme. Les densités optiques de ces deux témoins sont soustraites de celles obtenues dans le dosage normal. Les mesures se font en double pour une suspension donnée.

— *Malate déshydrogénase* (E.C.1.1.1.37.): elle est dosée d'après la méthode d'OCHOA (108) à pH 7,5 en milieu tampon phosphate 0,1 M et en présence de NADH et d'oxalacétate de sodium, respectivement à la concentration de 0,1 mM et de 0,25 mM.

Le volume total est de 3 ml. La réaction a lieu à température ambiante dans des cuves du spectrophotomètre Beckman modèle D.B., et elle démarre lors de l'addition de l'oxalacétate. La diminution de densité optique à 340 m $\mu$  est alors enregistrée pendant quelques minutes. L'activité est calculée à partir de la pente à l'origine de la courbe obtenue, et la mesure est faite par rapport à un témoin contenant tous les réactifs sauf le NADH.

## Dosage des protéines

Dans la plupart des cas, les protéines ont été mesurées sous forme d'azote insoluble dans l'acide trichloracétique N. L'insoluble est filtré sur filtre lent de 30 mm de diamètre, et lavé trois fois avec de l'acide trichloracétique N. Le papier filtre et son contenu sont minéralisés avec de l'acide sulfurique concentré. L'azote est ensuite dosé colorimétriquement par la méthode de NESSLER (156). En outre, l'interférence apportée par le papier est mesurée en minéralisant des filtres de même type. Cette interférence est très faible, de l'ordre de 5 % de l'azote mesuré.

Lorsqu'on a affaire à des solutions de protéines ne contenant pas de caoutchouc (fractions obtenues par centrifugation isopycnique par exemple), le dosage se fait selon la méthode de LOWRY et al. (94) avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Enfin, au cours de cette étude, il a fallu faire appel à divers dosages qui, à la différence de ceux qui viennent d'être décrits, n'ont été utilisés que dans des cas bien particuliers. Il en sera donc fait état, lorsque ces cas seront exposés.

## Présentation des résultats

### a EXPRESSION DES RÉSULTATS :

Il a été fait appel aux unités internationales pour exprimer la quasi-totalité des activités enzymatiques qui ont été mesurées au cours de ce travail.

En ce qui concerne les dosages faisant appel aux substrats synthétiques à base de p-nitro-phénol, les activités ont été exprimées en  $\mu$ M de p-nitro-phénol libérées en une minute.

Dans le cas de la cathepsine, l'activité a été exprimée conventionnellement en  $\mu$ M de tyrosine libérées en une minute.

Pour la ribonucléase et la désoxyribonucléase, les activités ont été exprimées conventionnellement en  $\mu$ M d'oligonucléotides libérées en une minute, en supposant que leur coefficient d'extinction moyen est de  $8,5 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$  à 260 m $\mu$ .

Dans le cas de la phospholipase D, l'activité a été exprimée en  $\mu$ M de choline libérées en une minute.

En ce qui concerne la malate déshydrogénase, l'activité a été exprimée en  $\mu$ M de NADH consommées en adoptant comme coefficient d'extinction du NADH  $6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$  à 340 m $\mu$  ; chiffre donné dans la littérature.

Dans le cas de la polyphénol-oxydase, son activité a été exprimée en unités arbitraires.

Les protéines mesurées par la méthode de NESSLER ont été exprimées en mg d'azote. Dans le cas où la mesure a été faite par colorimétrie directe, elles sont exprimées en  $\mu$ g de protéines, l'étalonnage ayant été effectué avec de la sérum-albumine (Calbiochem, U.S.A.).

Enfin, les activités spécifiques des enzymes ont été exprimées en unités par mg d'azote protéique ou par mg de protéines.

*b* ACTIVITÉS LIBRES, SOLUBLES ET TOTALES :

Du fait des propriétés spéciales des lutoïdes, on a distingué trois types de mesures :

*Activité totale* (161) : elle représente le potentiel actif global de l'enzyme contenu dans la particule. Cette activité a été mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114, détergent non-ionique qui provoque à cette concentration, la lyse totale des lutoïdes, et la libération des enzymes sous forme soluble.

*Activité libre* (62) : elle rend compte des enzymes qui, lorsque les lutoïdes sont dans un état parfait d'intégrité, sont accessibles au substrat. Pour être valables, les mesures doivent être faites en milieu isotonique (0,3 M de mannitol), pendant des temps très courts (généralement 10 minutes) afin d'éviter autant que faire se peut, une destabilisation de ces particules. Cependant, cette mesure présente certaines limitations. D'une part, le temps très court d'incubation restreint son application aux enzymes très actifs. D'autre part, l'enzyme enfermé dans les lutoïdes peut être plus ou moins accessible aux substrats, soit à cause d'une lésion partielle de la particule, soit parce que la membrane est relativement perméable à ce substrat. C'est pour ces raisons qu'on a été amené à introduire la notion d'activité soluble (151).

*Activité soluble* : elle se mesure sur le surnageant obtenu après centrifugation de la fraction lutoïdes. Elle représente donc la part des enzymes entièrement libérés, et qui sont sous forme soluble. De ce fait, il n'existe aucune limitation de temps pour la durée des incubations. Cette mesure peut donc être étendue aux enzymes présentant une activité très faible. Cependant, elle n'est pas à l'abri de toutes critiques.

En effet, les enzymes libérés par les lutoïdes peuvent être adsorbés ou entraînés partiellement par le sédiment. Cependant, cet entraînement semble relativement faible, car lorsque la lyse complète des particules est obtenue après addition de Triton X-114, les valeurs de l'activité totale mesurée directement sur la suspension de lutoïdes, sont équivalentes à celles obtenues sur le surnageant après centrifugation de la suspension.

Ce surnageant, contenant les enzymes lutoïdiques en solution, est obtenu après centrifugation de la suspension à 2.000 tr/mn (g moyen = 24.000) pendant 20 minutes dans le rotor 50 de l'ultra-centrifugeuse Spinco.

D'une façon générale, l'activité totale varie assez peu pour un latex donné, et les valeurs de l'activité soluble sont plus faibles que celles de l'activité libre. Ces deux dernières mesures représentent assez bien le degré d'altération des particules.

On trouvera ci-contre, un tableau dans lequel sont résumées les caractéristiques (substrat, tampon, pH, etc.) des différentes mesures des activités enzymatiques qui ont été utilisées dans cette étude (tableau II).

TABLEAU II  
Récapitulatif concernant le dosage des activités  
enzymatiques du latex

Enzymes	Concentration en substrat	tampons et pH	Volume réactionnel	Durée et température d'incubation		Analyse
				Centrifugation différentielle	Centrifugation isopycnique	
$\beta$ -N-ac.-glucosaminidase .....	2 mM de p-nitrophényl-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside .....	Citrate 0,1 M. pH 5,0.	2 ml	30 mn (30° C)	30-60 mn (30° C)	Colorimètre, 420 m $\mu$ .
Cathepsine .....	16,5 g d'hémoglobine de bœuf ..	Acétate 0,2 M. pH 3,7.	4 ml	1-3 h (30° C)	72 h (30° C)	Colorimètre, 690 m $\mu$ .
Désoxyribonucléase ..	1 g d'ADN hautement polymérisé .....	Cacodylate 0,1 M. pH 6,0.	2 ml	5 h (30° C)	72 h (30° C)	Spectrophotomètre 260 m $\mu$ .
Estérase .....	0,187 mM de laurate de p-nitrophényle .....	Phosphate-citrate 0,1 M. pH 5,5.	2 ml	3 h (30° C)	— —	Colorimètre, 420 m $\mu$ .
$\beta$ -galactosidase ...	10 mM de p-nitro-phényl- $\beta$ -D-galactopyranoside .....	Phosphate-citrate 0,1 M. pH 5,5.	2 ml	30 mn (30° C)	3h (30° C)	Colorimètre, 420 m $\mu$ .
$\beta$ -glucosidase .....	15 mM de p-nitro-phényl- $\beta$ -D-glucopyranoside .....	Acétate 0,1 M. pH 5,0.	2 ml	10 mn (30° C)	30 mn (30° C)	Colorimètre, 420 m $\mu$ .
Malate déshydrogénase .....	0,25 mM d'oxalacétate de sodium + 0,1 mM de NADH .....	Phosphate 0,1 M. pH 7,5.	3 ml	qq. mn (temp. amb.)	qq. mn (temp. amb.)	Spectrophotomètre 340 m $\mu$ .
Phosphatase .....	10 mM de phosphate de p-nitrophényle .....	Acétate 0,1 M. pH 5,0.	2 ml	10 mn (30° C)	30 mn (30° C)	Colorimètre, 420 m $\mu$ .
Phosphodiesterase ..	10 mM de phosphate de bis (p-nitro-phényle) .....	Cacodylate 0,1 M. pH 6,0.	2 ml	30 mn (30° C)	3 h (30° C)	Colorimètre, 420 m $\mu$ .
Phospholipase D ..	7,14 g de lécithine d'œuf + 0,1 mM Cl <sub>2</sub> Ca .....	Acétate 0,1 M. pH 5,5.	2,1 ml	3 h (temp. amb.)	—	Hyposulfite, 0,005 N
Polyphénol-oxydase ..	2 g de dihydroxy-phénylalanine ..	Phosphate 0,1 M. pH 6,5.	5 ml	5-10 mn (temp. amb.)	10-30 mn (temp. amb.)	Colorimètre, 420 m $\mu$ .
Ribonucléase .....	1,25 g d'ARN hautement polymérisé .....	Citrate 0,1 M. pH 5,5.	2 ml	5 h (30° C)	72 h (30° C)	Spectrophotomètre 260 m $\mu$ .

## Chapitre IV

# COMPOSITION DES LUTOIDES

Dans le but de parfaire nos connaissances sur les lutoïdes et de mieux comprendre leurs fonctions, j'ai tenté de définir leur composition en mesurant les principaux constituants de ces particules. Pour ce faire, j'ai mis à profit la propriété des lutoïdes de pouvoir libérer leurs hydrolases après un traitement provoquant leur lyse. Deux fractions ont ainsi été obtenues : l'une, insoluble, constituée principalement par des membranes et des protéines liées à ces membranes, l'autre comprenant des composés solubles. Ces deux fractions ont ensuite été analysées.

## Mode opératoire

Des lutoïdes ont été séparés par centrifugation d'une quantité connue de latex. Cependant, afin d'obtenir une préparation aussi pure que possible, deux lavages supplémentaires du culot ont été effectués. En outre, pour ne pas introduire de composés azotés dans la suspension de lutoïdes, le milieu de suspension utilisé a été du mannitol 0,3 M tamponné à pH 6,5 par du tampon acide maléique-soude 0,05 M.

La lyse des lutoïdes est obtenue en reprenant le culot de centrifugation par du tampon maléate 0,05 M de pH 6,5, sans mannitol. Le mélange est abandonné une trentaine de minutes à 30°C, puis centrifugé à 35.000 tr/mn (g moyen = 74.000) pendant 20 minutes. Le surnageant est mis de côté. Le culot est repris par le tampon maléate, et cette suspension subit le même traitement que précédemment.

Enfin, les surnageants sont mélangés et complétés à un volume donné et forment la *fraction soluble* ; le culot de son côté, est remis en suspension, complété à un volume donné, et constitue la *fraction membranaire*.

Sur les lutoïdes entiers, la fraction membranaire et la fraction soluble, on a mesuré :

- la quantité de lipides ;
- l'azote total, protéique et lipidique ;
- le phosphore total, minéral, protéique et lipidique.

## Méthodes de dosages

**AZOTE** : l'azote total et lipidique ont été mesurés sur la solution obtenue après minéralisation directe des suspensions ou de la solution étherée de lipides, par la méthode de NESSLER. L'azote protéique est dosé suivant la technique décrite dans le chapitre III.



PHOSPHORE : Le phosphore est mesuré par colorimétrie du complexe phosphomolybdique après réduction au sulfate d'hydrazine (14). Ces dosages s'effectuent sur le reste des minéralisats ayant servi pour les mesures d'azote.

Le phosphore minéral est dosé sur le filtrat obtenu après précipitation des protéines par l'acide trichloracétique.

LIPIDES : Une aliquote de chacune des fractions est placée dans une capsule et évaporée à sec sous vide. Le résidu est ensuite extrait par de l'éther de pétrole à chaud. La solution étherée est filtrée. Le filtrat est placé dans une capsule, préalablement tarée, puis évaporé à sec sous vide. Après dessiccation, on déduit le poids de lipide à la suite de la pesée de la capsule.

## Résultats

Le résidu lipidique est enfin minéralisé, et sur le minéralisat obtenu, on effectue les dosages d'azote et de phosphore lipidique.

Les mesures ont été effectuées sur une quinzaine de latex. Les résultats obtenus, ainsi que leurs intervalles de confiance sont donnés dans les tableaux III et IV.

Il est à noter que les lutoïdes sont relativement riches en phosphore qui se présente principalement sous forme minérale (85 % du total). Comme on pouvait s'y attendre, ce dernier se retrouve presque exclusivement dans la fraction soluble (88 %) ; néanmoins, une certaine quantité (9 %) est localisée dans la fraction membranaire et doit être vraisemblablement constituée soit par des phosphates de calcium et de magnésium insolubles, soit par des ions phosphates adsorbés par les membranes. Ces quantités importantes de phosphates pourraient s'expliquer par la très grande activité phosphatase des lutoïdes.

TABLEAU III  
*Distribution du phosphore dans les différentes fractions de lutoïdes*

	<i>P. total</i> (mg/ml de latex)	<i>P. protéique</i> (mg/ml de latex)	<i>P. lipidique</i> (mg/ml de latex)	<i>P. minéral</i> (mg/ml de latex)
Lutoïdes entiers ...	0,165 ± 0,041 *	0,034 ± 0,004	0,0064 ± 0,0020	0,140 ± 0,072
Fraction soluble ..	0,112 ± 0,032	0,0024 ± 0,0016	0,0018 ± 0,0014	0,123 ± 0,059
Fraction membra- naire .....	0,049 ± 0,008	0,028 ± 0,003	0,0046 ± 0,0014	0,013 ± 0,006

\* = Intervalle de confiance pour  $p = 0,05$ .

Le reste du phosphore lutoïdique est constitué en grande partie, par des phosphoprotéines (17 % du total) et par des phospholipides (4 % du total). Ces deux constituants se retrouvent principalement dans la fraction membranaire.

L'azote contenu dans les lutoïdes est principalement sous forme soluble (65 % du total), mais aucune tentative n'a été faite pour déterminer sous quelle forme, minérale ou organique, il se trouve.

Le reste de l'azote lutoïdique est en très grande partie constitué par des protéines (33 % du total) qui se répartit de façon à peu près égale entre la fraction soluble et la fraction mem-

TABLEAU IV

Distribution de l'azote et des lipides dans les différentes fractions de lutoïdes

	Azote total (mg/ml de latex)	Azote protéique (mg/ml de latex)	Azote lipidique (mg/ml de latex)	Lipides (mg/ml de latex)
Lutoïdes entiers ...	0,533 ± 0,055 *	0,186 ± 0,039	0,010 ± 0,005	1,700 ± 1,300
Fraction soluble ..	0,378 ± 0,041	0,114 ± 0,019	0,002 ± 0,001	0,220 ± 0,080
Fraction membra- naire .....	0,154 ± 0,031	0,101 ± 0,018	0,005 ± 0,002	1,560 ± 0,400

\* = Intervalle de confiance pour  $p = 0,05$ .

branaire. De son côté l'azote lipidique (2 % du total) est en grande majorité associé aux membranes.

Enfin, on remarquera la teneur relativement élevée en lipides des lutoïdes.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Avant d'aborder toute discussion concernant les résultats exposés dans ce chapitre, il est nécessaire de souligner le fait qu'ils ne sont pas à l'abri de toutes critiques.

Compte tenu de la grande variabilité du latex d'hévéa, particulièrement mis en évidence par RESING (124) et par D'AUZAC (12), le fait de n'avoir travaillé que sur une quinzaine d'arbres et à un moment déterminé de l'année, ne peut nullement donner des résultats représentatifs pour tous les hévéas.

D'autre part, la centrifugation différentielle qui a été utilisée pour séparer les lutoïdes, malgré l'augmentation du nombre de lavages, ne fournit pas une fraction absolument pure.

C'est pour ces raisons que je ne me suis pas attardé sur les valeurs absolues, et les conclusions qu'il sera possible de dégager seront basées sur les valeurs relatives. Il est bien évident que ces conclusions sont loin d'être générales et ne sont valables que dans ce cas précis. Elles ont cependant l'avantage de nous donner une idée de la composition des lutoïdes.

Ces réserves ayant été faites, on peut dire que les lutoïdes contiennent des quantités relativement grandes de phosphate minéral et de composés azotés (minéraux et organiques). Environ 50 % des protéines qui les constituent sont sous forme soluble, pourcentage légèrement supérieur à celui des lysosomes de foie de rat (151).

La membrane lutoïdique paraît être de nature lipo-protéique. En outre, elle semble particulièrement riche en phosphoprotéines comparativement aux lysosomes des tissus hépatiques de rat (151). Cette grande richesse en phospholipides et en lipides expliquerait la faible densité des lutoïdes (voir chapitre VIII) comparativement à celle des lysosomes.

## Chapitre V

# PROPRIÉTÉS CARACTÉRISTIQUES DES LUTOIDES

Une des particularités des lysosomes est que leurs hydrolases sont normalement enfermées dans la particule, et réagissent peu ou pas sur le substrat en solution dans le milieu qui les entoure, du fait de l'imperméabilité de la membrane. Néanmoins, l'activité de ces enzymes peut être révélée par des traitements qui mettent en cause l'intégrité de cette membrane. On constate alors la libération des hydrolases qui passent en solution, et deviennent ainsi pleinement actifs.

Les lutoïdes présentent également des réactions analogues. Lorsque la phosphatase est prise comme enzyme caractéristique de cette particule, on constate que son activité est peu importante dans le latex ou la fraction lutoïdes, mais qu'elle augmente rapidement à la suite de divers traitements mettant en cause l'intégrité de sa membrane.

## Action de la pression osmotique du milieu (lyse osmotique)

Comme tout système osmotique, les lutoïdes sont sensibles à leur environnement. Les milieux hypertoniques, et surtout hypotoniques provoquent des perturbations dans la structure de la particule. Il s'ensuit alors une libération plus ou moins prononcée de leurs enzymes, en l'occurrence de la phosphatase acide, comme l'indique la figure 7.

Dans le cas d'une suspension de lutoïdes, l'activité libre de la phosphatase acide passe par un minimum pour des concentrations de mannitol comprises entre 0,3 et 0,4 M, puis augmente légèrement pour une concentration de 0,5 M. Par contre, dans le cas du latex, ce minimum est atteint pour une concentration de 0,25 M de mannitol, et reste stable malgré l'augmentation du mannitol. Il est probable que le latex contient des produits solubles qui stabilisent les lutoïdes et les rendent insensibles à l'hypertonie. Etant donné que ces constituants sont éliminés lors de la séparation des lutoïdes, et qu'en outre, les manipulations ont eu pour effet de provoquer quelques perturbations dans leur structure, ils deviennent alors plus fragiles et sensibles aux milieux hypertoniques.

Cependant, c'est surtout les milieux hypotoniques qui provoquent les perturbations les plus importantes dans la structure de la particule. Que l'on ait affaire à du latex ou à une préparation de lutoïdes, pour des concentrations en mannitol inférieures à 0,3 M, l'activité phosphatase libre augmente très rapidement. On assiste ainsi à la libération de cette hydrolase, libération provoquée par la lyse osmotique *irréversible* des particules.

Toutefois, même pour des concentrations en mannitol aussi faibles que 0,025 M, l'activité phosphatase libre reste encore inférieure à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de

Triton X-114 ; la lyse des lutoïdes n'est donc pas totale, et de ce point de vue, ces particules paraissent plus résistantes que les lysosomes.

## Action des détergents

Depuis fort longtemps, on sait que les détergents anioniques à fort pouvoir tensio-actif, sont capables de détruire certaines structures cellulaires en dissociant les lipides des protéines. En outre, WATTIAUX et De DUVE (161) ont montré que les détergents non ioniques à action hémolytique provoquent aussi la destruction de la membrane des lysosomes.

Ces deux types de composés ont été testés sur les lutoïdes, et on a étudié d'une part, l'action du Triton X-114 (Rhom and Haas, U.S.A.), et d'autre part, celle du désoxycholate de sodium (Calbiochem, U.S.A.) sur la libération de la phosphatase acide. Les résultats, rapportés à l'activité totale obtenue en présence de 0,1 % de Triton X-114, sont représentés dans les figures 8 et 9.

Au-delà de 0,04 % de Triton X-114, l'activité phosphatase libre reste constante, et est égale à l'activité totale. La concentration de 0,1 % adoptée pour provoquer la lyse complète des lutoïdes lors des mesures d'activité totale, est donc largement suffisante, et n'a en outre, aucun effet inhibiteur sur la phosphatase acide.

Le désoxycholate a une action semblable à celle du détergent non ionique. Son action commence à se faire sentir à une concentration de  $5 \cdot 10^{-5}$  M, et à  $5 \cdot 10^{-4}$  M la lyse des lutoïdes est totale.

Ainsi, les détergents non ioniques et anioniques sont particulièrement efficaces pour détruire la membrane lutoïdique, et libérer les enzymes qui y sont enfermés. Ces résultats laissent penser que cette membrane est de nature lipo-protéique.

## Action de la lysolécithine

La lysolécithine est connue comme un puissant agent hémolytique. Elle est obtenue à la suite de l'hydrolyse de la lécithine, par la phospholipase A. Cet enzyme se rencontre très fréquemment dans les venins de serpents, et rend compte d'une partie de leur action toxique.

WEISSMANN et al. (166) ont montré que ce produit commence à provoquer la lyse des lysosomes de leucocytes à des concentrations aussi faibles que  $2 \cdot 10^{-6}$  M. Cependant, dans le cas des lysosomes hépatiques, pour obtenir le même résultat, il est nécessaire d'augmenter considérablement cette concentration et d'atteindre  $5 \cdot 10^{-4}$  M (163). Son action sur les organites cellulaires est vraisemblablement due à ses propriétés tensio-actives. Elle agirait donc comme les détergents, en dissociant les lipides de la membrane.

Avec les lutoïdes, la lysolécithine (Koch-Light, Grande-Bretagne) agit aussi comme un puissant destabilisant. D'après les résultats de la figure 10, on peut observer qu'elle commence à agir à une concentration de  $5 \cdot 10^{-5}$  M, et à  $5 \cdot 10^{-4}$  M, toute la phosphatase des lutoïdes est libérée, et son activité libre est alors sensiblement égale à l'activité totale obtenue en présence de 0,1 % de Triton X-114.

## Action du pH

Toutes les particules cellulaires restent stables dans une zone de pH bien déterminée. C'est généralement aux alentours de la neutralité que se situe cette zone.

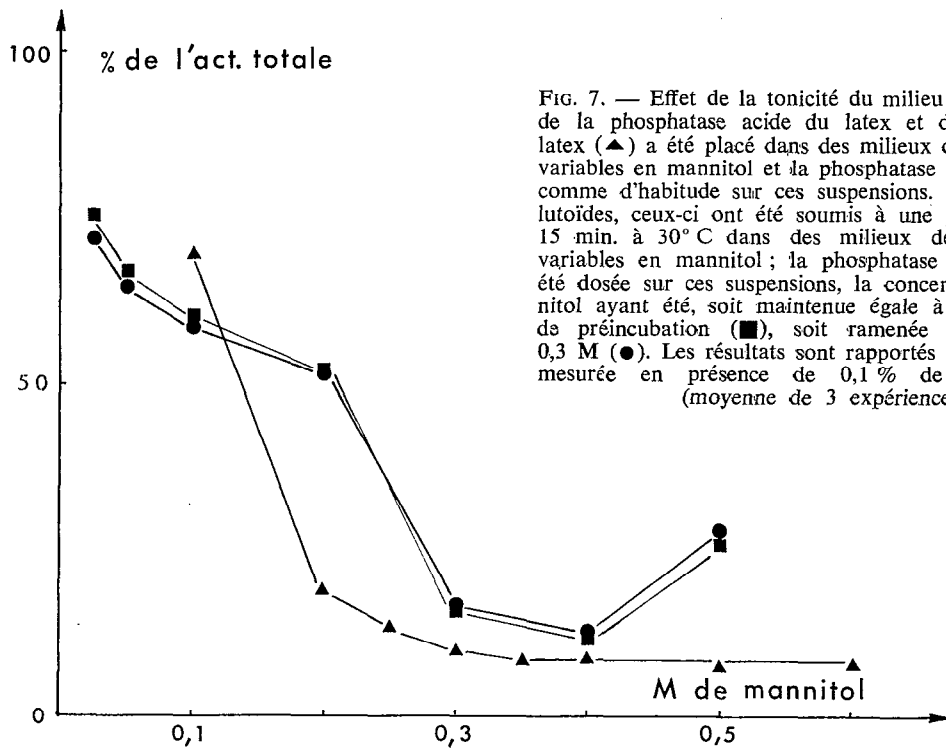


FIG. 7. — Effet de la tonicité du milieu sur la libération de la phosphatase acide du latex et des lutoïdes. Du latex (▲) a été placé dans des milieux de concentrations variables en mannitol et la phosphatase libre a été dosée comme d'habitude sur ces suspensions. Dans le cas des lutoïdes, ceux-ci ont été soumis à une préincubation de 15 min. à 30° C dans des milieux de concentrations variables en mannitol ; la phosphatase libre a ensuite été dosée sur ces suspensions, la concentration en mannitol ayant été, soit maintenue égale à celle du milieu de préincubation (■), soit ramenée au préalable à 0,3 M (●). Les résultats sont rapportés à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 3 expériences)

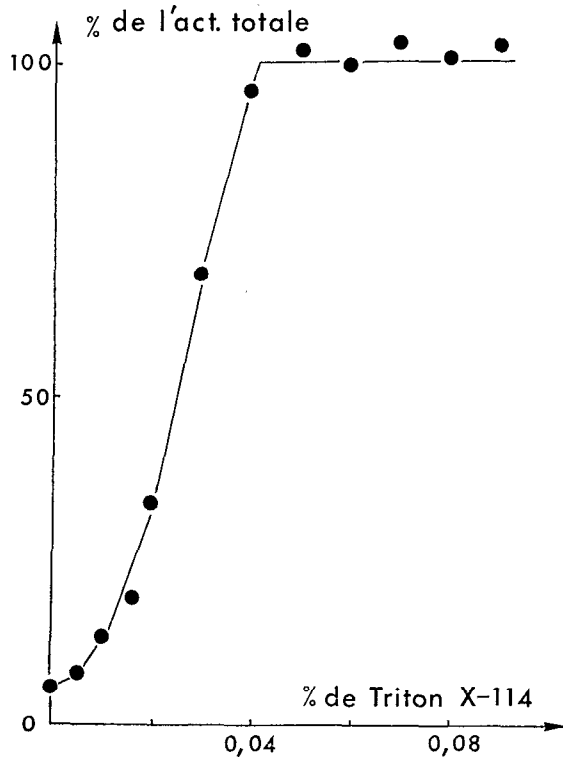


FIG. 8. — Action du Triton X-114 sur la libération de la phosphatase acide des lutoïdes. Les incubations ont été effectuées dans des milieux contenant du mannitol 0,3 M et diverses quantités de Triton X-114. La phosphatase libre a ensuite été mesurée de manière habituelle sur ces suspensions. Les résultats obtenus ont été rapportés à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 3 expériences)

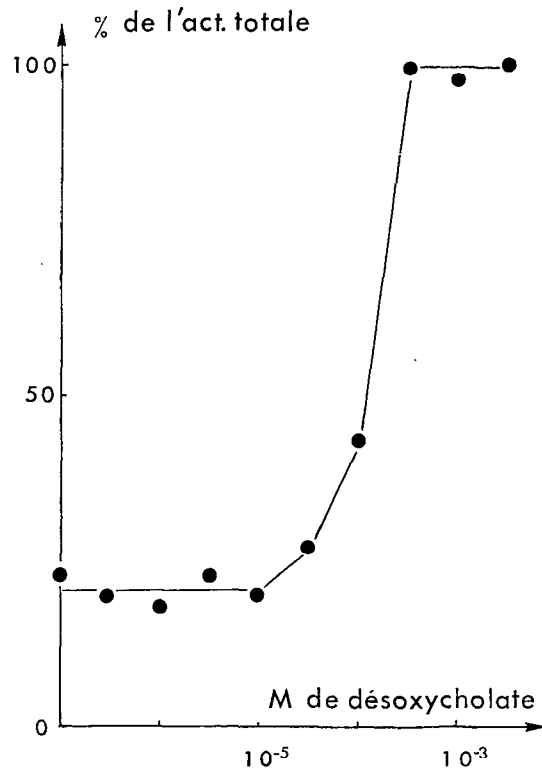


FIG. 9. — Action du désoxycholate de sodium sur la libération de la phosphatase acide des lutoïdes. Même protocole expérimental que celui de la figure 8, mais le Triton X-114 est ici remplacé par du désoxycholate de sodium (moyenne de 4 expériences)

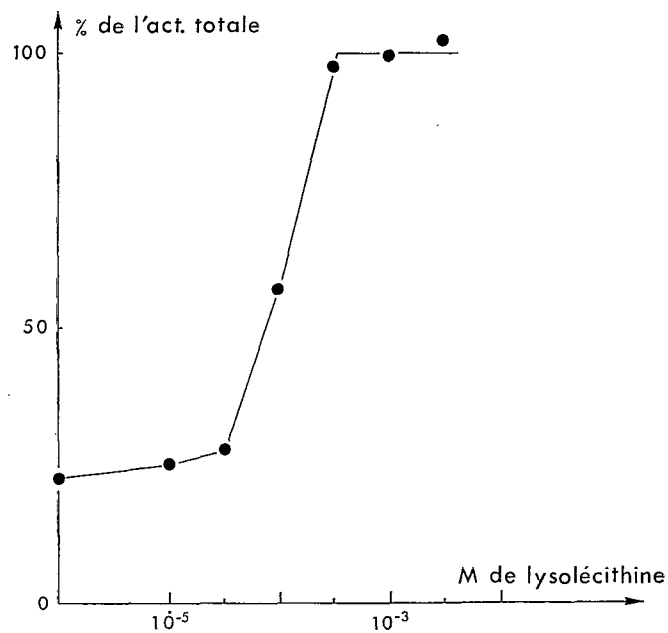


FIG. 10. — Action de la lysolécithine sur la libération de la phosphatase acide des lutoïdes. Des lutoïdes sont abandonnés à 0° C dans des milieux isotoniques contenant de la lysolécithine. Au bout de 15 mn environ, la phosphatase libre est dosée de manière habituelle. Les résultats sont rapportés à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 6 expériences).

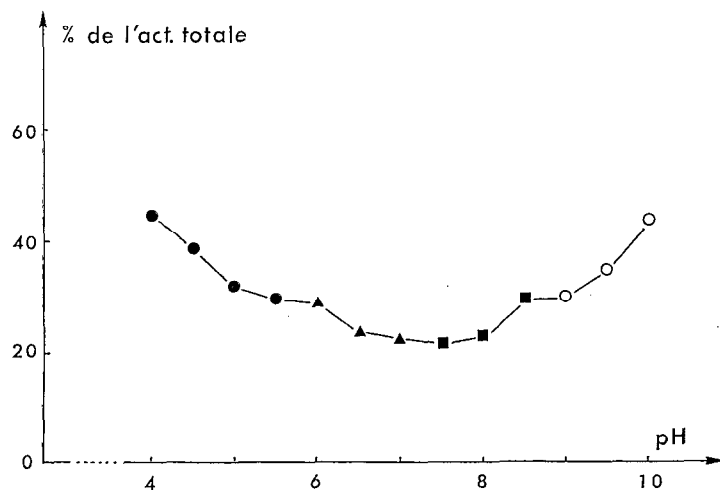


FIG. 11. — Action du pH sur la stabilité des lutoïdes. Tampon acétate (●), cacodylate (▲), Tris-ClH (■) et Glycine-NaOH (○). Les résultats sont rapportés à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 4 expériences).

L'action du pH a été étudiée dans le cas des lutoïdes. Ces particules ont été mises en suspension dans des milieux contenant du mannitol 0,3 M, et divers tampons, à une concentration de 0,05 M, puis abandonnées 15 minutes environ à 0°C. L'activité libre de la phosphatase a ensuite été mesurée à pH 5,0 de manière habituelle.

Les résultats donnés dans la figure 11 montrent que les lutoïdes restent stables entre pH 6,5 et 8,0. En dehors de ces limites, l'activité libre augmente. Cependant, on notera qu'à cette température, même aux pH extrêmes (3,7 et 10,0), les variations de l'activité libre sont assez peu importantes.

## Action de la température a pH 5,0 (lyse thermique)

Comme cela est illustré dans la figure 12, le fait de préincuber les lutoïdes à pH 5,0 et à 30°C, provoque une déstabilisation progressive de ces particules, et la libération de la phosphatase acide, libération qui est beaucoup plus rapide à 37° qu'à 30°C.

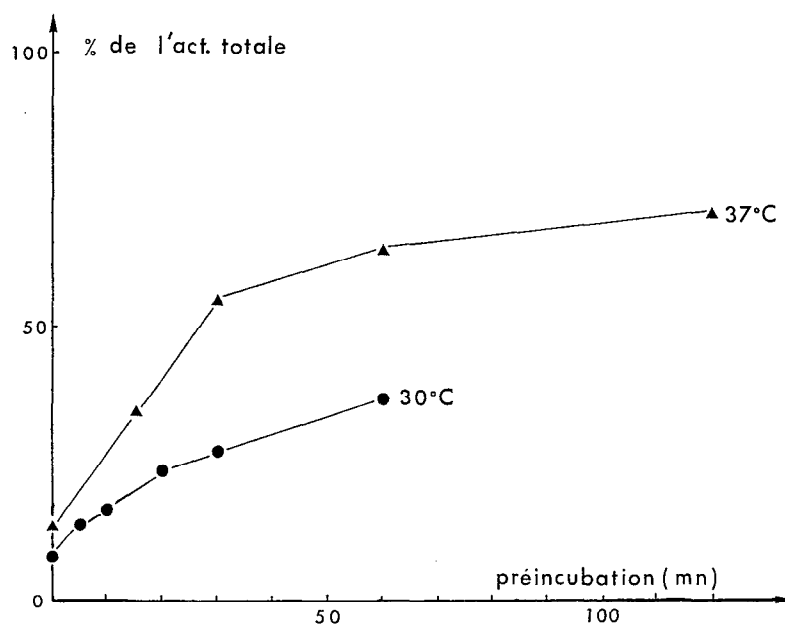


FIG. 12. — Action d'une préincubation à pH 5,0 et à 30° C ou à 37° C sur la libération de la phosphatase des lutoïdes. Une suspension de lutoïdes a été soumise à une préincubation à 30° C (●) ou à 37° C (▲) en milieu mannitol 0,3 M et à pH 5,0 (tampon acétate 0,1 M). A divers intervalles de temps l'activité libre de la phosphatase est mesurée à 30° C de manière habituelle sur une aliquote de la suspension. Les résultats sont rapportés à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 3 expériences)

Certains auteurs ont appelé « auto-activation » ce type de déstabilisation, et ont suggéré que la cathepsine est impliquée dans ce phénomène. Il faut cependant remarquer que cette « auto-activation » est peut-être la résultante de l'action de la température et d'un pH acide, qui sont connus pour provoquer la déstabilisation de tous les organites cellulaires.

Enfin, notons que les lutoïdes sont plus résistants à la lyse thermique que les lysosomes. En effet, alors que pour ces derniers leur lyse est sensiblement totale au bout de 50 minutes à

pH 5,0 et à 37°C (74), dans le cas des lutoïdes, pour les mêmes paramètres expérimentaux, il n'y en a que 60 % de détruits.

## Influence du vieillissement

Sur une partie d'une suspension de lutoïdes fraîchement préparée, l'activité libre de la phosphatase a été mesurée à divers pH (tampon acétate 0,1 M). Le reste a été conservé pendant trois jours en chambre froide, et des dosages analogues aux précédents ont été exécutés.

TABLEAU V  
*Influence du vieillissement sur l'activité libre de la phosphatase des lutoïdes*

<i>pH du milieu</i>	<i>Activité libre des lutoïdes fraîchement préparés (U./ml de suspension)</i>	<i>Activité libre des lutoïdes après 3 j. de stockage à 0° C (U./ml de suspension)</i>
3,7	0,023	0,123
4,0	0,057	0,140
4,5	0,104	0,182
5,0	0,125	0,217
5,5	0,123	0,211

Il ressort des résultats du tableau V, que le stockage des lutoïdes, même à basse température, entraîne la lyse de ces particules et la libération de la phosphatase acide.

## CONCLUSIONS

A la lumière des résultats expérimentaux rapportés dans ce chapitre, les lutoïdes caractérisés par leur activité phosphatase acide, présentent les particularités suivantes :

— La phosphatase lutoïdique est sous forme latente, et donc peu active lorsque les précautions d'usage ont été prises pour la séparation de ces organites. 5 à 30 % de l'activité de cet enzyme se trouve sous forme libre, suivant les hévéas et leur cycle végétatif, le reste étant lié aux particules. Il n'a jamais été possible d'obtenir une préparation ayant une activité phosphatase libre nulle, car malgré tous les soins apportés, les manipulations successives nécessaires pour séparer les lutoïdes, entraînent une dégradation plus ou moins poussée de ces particules.

— La phosphatase est rapidement libérée et voit son activité augmenter à la suite des traitements qui sont connus pour provoquer un phénomène identique chez les lysosomes. Ce sont entre autres :

- le choc osmotique ;
- l'action de détergents (anionique ou non ionique) et de la lysolécithine ;
- l'action des pH extrêmes (en dessous de pH 6,5 et au-delà de pH 8,0) ;
- l'action de la température à pH 5,0 ;
- le vieillissement.



Divers autres traitements tels que les congélations et décongélations répétées, l'action des forces de cisaillement, des rayons ultraviolets, etc. qui entraînent la rupture de la membrane lysosomale, n'ont pas été étudiés ici. Il est cependant plus que probable qu'ils provoqueraient eux aussi, la libération de la phosphatase lutoïdique.

Il existe cependant certaines différences entre les lutoïdes et les lysosomes concernant l'intensité avec laquelle ils libèrent leurs enzymes lors des traitements qui ont été mis en œuvre. Si la libération totale de la phosphatase est obtenue dans ces deux types de particules avec les mêmes concentrations de Triton ou de lysolécithine, lors du choc osmotique ou de la lyse thermique, leur comportement n'est pas identique. En effet, les lutoïdes paraissent beaucoup mieux résister à ces deux derniers traitements que les lysosomes. Les réactions légèrement distinctes de ces deux organites doivent vraisemblablement refléter certaines différences dans la structure de leur membrane.

DICKENSON (47) avait déjà constaté au microscope électronique que les lutoïdes sont entourés d'une membrane simple. Les résultats rapportés ici permettent de tirer quelques conclusions supplémentaires quant à la structure des lutoïdes et à la nature de sa membrane :

— Elle serait de nature lipo-protéique, car elle est détruite par des détergents anioniques (désoxycholate de sodium) ou non ioniques (Triton X-114), et elle serait particulièrement riche en lipides (cf. chapitre IV). On verra ultérieurement (chapitre X) que cette membrane est aussi détruite par la pronase et la phospholipase.

— Elle est semi-perméable, car sensible au choc osmotique. Elle est imperméable au mannitol et au saccharose ainsi qu'au p-nitro-phényl-phosphate de sodium, substrat utilisé pour le dosage de la phosphatase. On verra cependant (chapitre X) qu'elle peut être plus ou moins perméable à certains substrats.

— Les enzymes passent rapidement en solution dès que l'intégrité de cette membrane est affectée.

Les lutoïdes pourraient donc être considérés comme de petits sacs entourés d'une membrane périphérique qui aurait le rôle d'une barrière de perméabilité entre les produits externes en solution dans le cytoplasme et les enzymes enfermés dans la particule. Cette structure simple explique les propriétés des lutoïdes et la forme latente sous laquelle se trouve la phosphatase. C'est la structure même des lysosomes, proposée par De DUVE (54).

## Chapitre VI

# LES HYDROLASES DU LATEX ET LEUR LOCALISATION

Nous avons vu précédemment que les enzymes lysosomaux sont *tous* des hydrolases du type acide. En ce qui concerne le latex, un certain nombre d'hydrolases qui, dans le cas des tissus hépatiques de rat, sont connues pour appartenir aux lysosomes, ont été recherchées dans la fraction lutoïdes. L'activité des enzymes ainsi caractérisés a été étudiée en fonction du pH, et on a recherché leur répartition dans la « fraction lutoïdes » et la « fraction surnageante » après centrifugation du latex.

## Activité des hydrolases en fonction du pH

Il avait été observé par SMITH (142) qu'au cours du stockage la teneur en choline du latex augmente et qu'un mélange du sérum et du culot obtenus par centrifugation du latex est susceptible de libérer de la choline à partir de lécithine d'œuf. Ces faits laissent supposer l'existence d'une phospholipase. Par la suite, ARCHER et al. (8) montrèrent que le culot de centrifugation du latex possède une activité phosphatase intense. Ces deux enzymes ont pu être caractérisés dans la « fraction lutoïdes ». En outre, on y a aussi trouvé des activités  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, cathepsine, ribonucléase, désoxyribonucléase et estérase. Ces activités enzymatiques ont été étudiées en fonction du pH en divers milieux tampons.

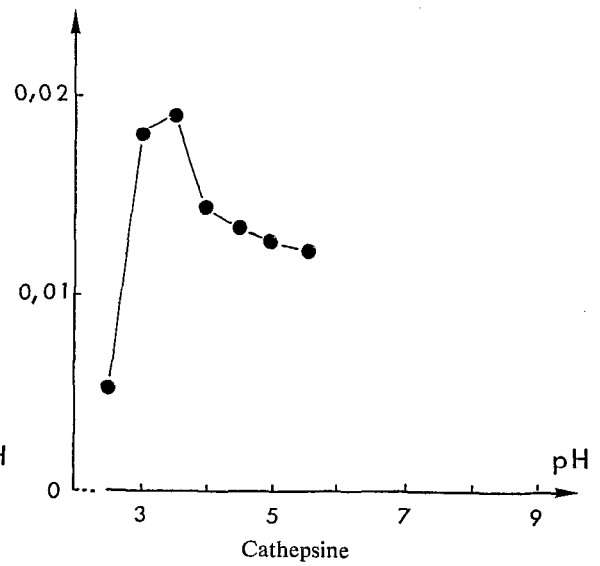
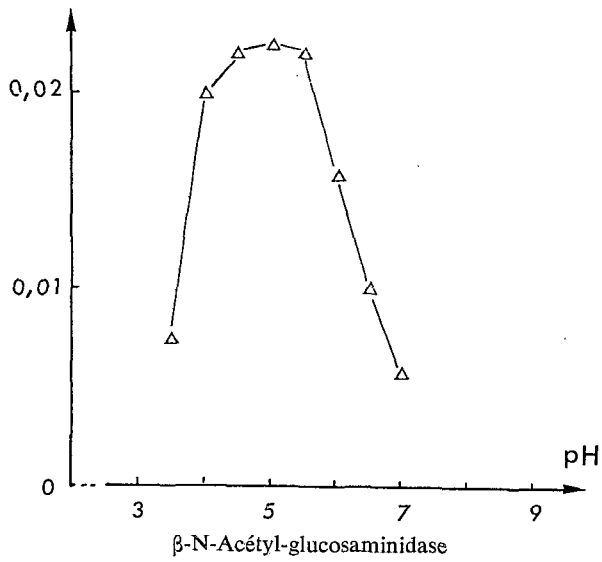
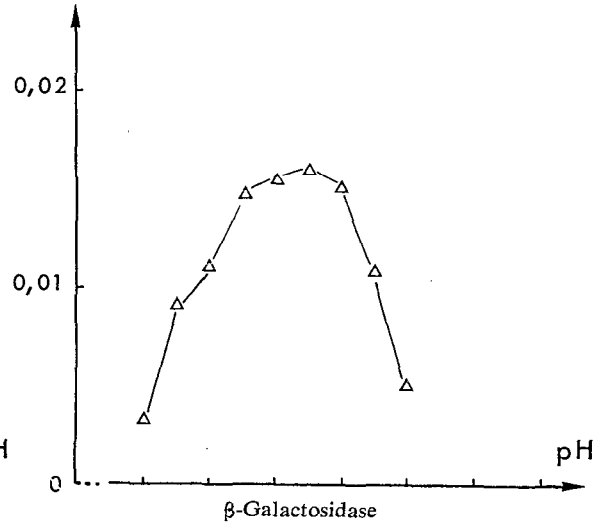
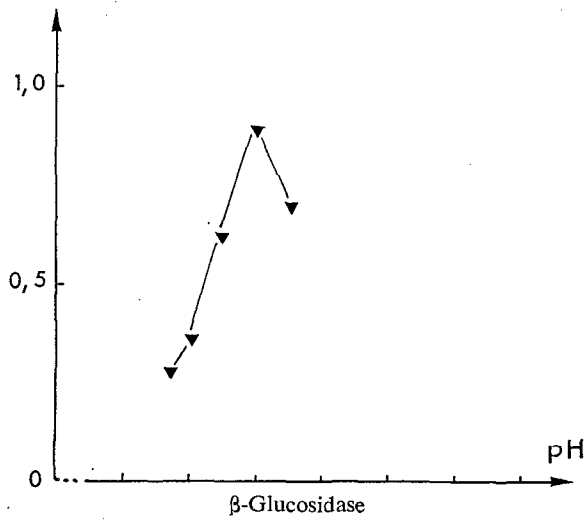
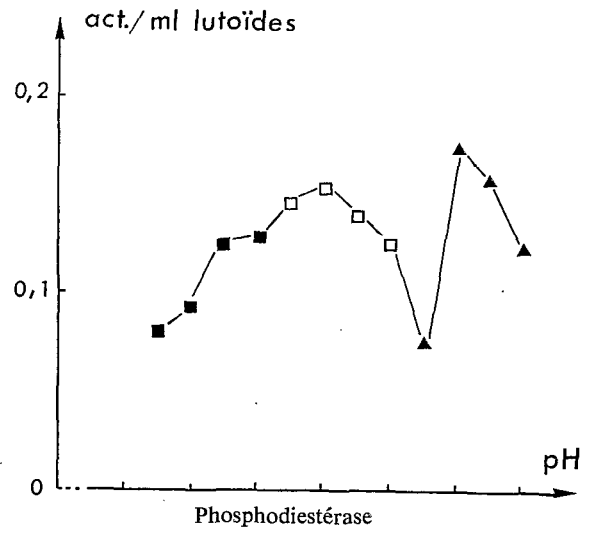
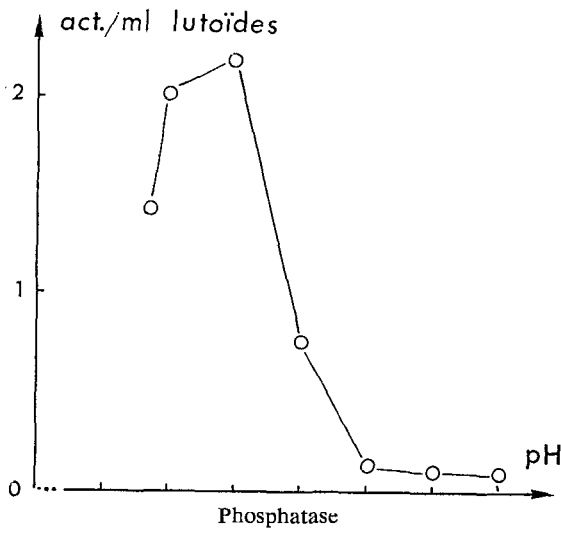
La figure 13 illustre les résultats ainsi obtenus avec comme source d'enzyme une suspension de lutoïdes ayant subi une lyse totale à l'aide de Triton X-114. On peut constater que toutes les hydrolases étudiées ont leur maximum d'activité à pH acide.

Il est à noter que la phosphodiesterase a deux maximum d'activité, l'un à pH 6,0, l'autre à pH 8,0, et que la cathepsine a son optimum à un pH très acide (pH 3,7). Les autres enzymes ont leur maximum d'activité aux alentours de pH 5-6 : pH 5,0 pour la phosphatase, la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase et la  $\beta$ -glucosidase ; pH 5,5 pour la  $\beta$ -galactosidase, la ribonucléase, la phospholipase et l'estérase ; pH 6,0 pour la désoxyribonucléase.

## Profil de sédimentation des hydrolases

Afin de localiser les hydrolases précédemment étudiées, le latex a été centrifugé de façon à obtenir, d'une part la fraction lutoïdes, et d'autre part, la fraction surnageante.

Sur le latex entier, ainsi que sur les fractions obtenues après centrifugation, les activités hydrolytiques et l'azote protéique ont été mesurés. Il n'a pas été possible de doser les activités



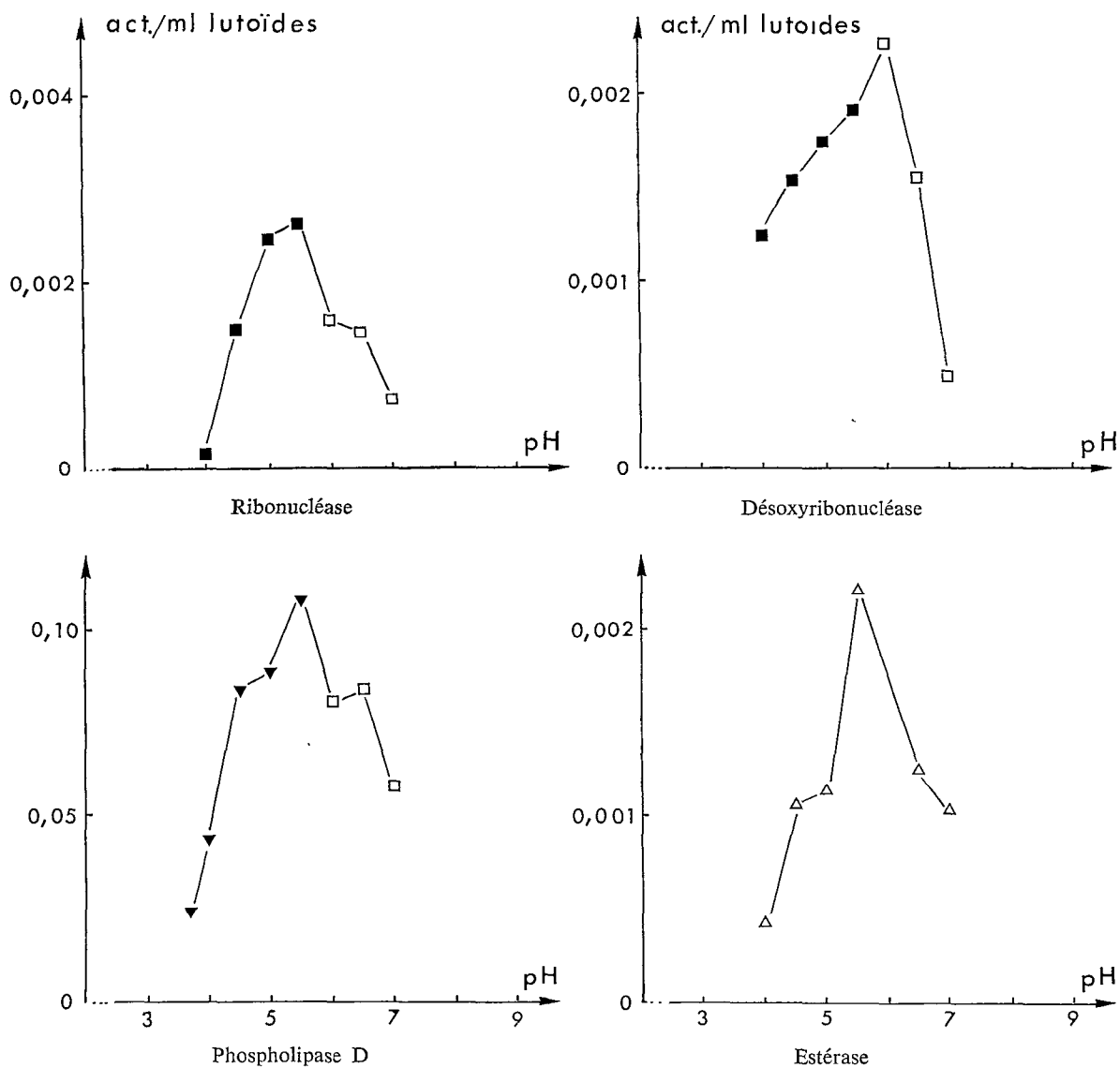


FIG. 13. — Action du pH sur l'activité des hydrolases lutoïdiques. Les mesures ont été effectuées sur des suspensions de lutoïdes ayant subi une lyse totale par traitement au Triton X-114 et en milieu tampon divers : acétate-borate-cacodylate 0,1 M (○); citrate 0,1 M (■); citrate 0,2 M (●); cacodylate 0,1 M (□); Tris-ClH 0,1 M (▲); phosphate-citrate 0,1 M (△); et acétate 0,1 M (▲).

ribonucléase et désoxyribonucléase dans le latex. La présence du caoutchouc amène des interférences telles, que les dosages ne sont absolument pas reproductibles. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VI.

Dans l'ensemble, la récupération des activités hydrolytiques est très satisfaisante lorsque les activités obtenues dans les lutoïdes et le surnageant sont comparées à celles du latex entier. A noter cependant, les valeurs de récupération un peu fortes pour la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase et la phosphodiesterase, et faibles dans le cas de la  $\beta$ -glucosidase et de l'estérase.

A partir des chiffres du tableau VI, la distribution de ces enzymes par rapport aux fractions obtenues par centrifugation a été représentée dans la figure 14, selon le schéma préconisé

par De DUVE (55). En abscisses, on a fait figurer le pourcentage d'azote protéique de chaque fraction, et en ordonnées, l'activité spécifique relative de l'enzyme, c'est-à-dire le rapport entre le pourcentage d'activité enzymatique, et le pourcentage d'azote protéique de la fraction considérée. Ce mode d'expression présente l'avantage de pouvoir comparer les différents enzymes entre eux quelle que soit leur activité spécifique. Dans le latex initial, l'activité spécifique relative est évidemment égale à 1, et le pourcentage d'azote protéique de 100. Il sera donc représenté par un rectangle de surface égale à 100. Le fractionnement du latex a pour conséquence d'augmenter l'activité spécifique relative de la fraction où se trouve concentré l'enzyme, donc de la hauteur du rectangle qui le représente. Par contre, il rabaisse la hauteur de la fraction où l'enzyme s'appauvrit. La hauteur d'une fraction indique donc le degré de purification de l'enzyme par rapport au latex de départ, et ce, *quelle que soit son activité*. La surface totale du profil de sédimentation reste toujours égale à 100.

TABLEAU VI

*Distribution des hydrolases dans le latex*

Enzymes	Latex	Surnageant		Lutoïdes		% de récupération p.r. à l'act. tot. du latex
	Activité	Activité	% de l'act. totale du latex	Activité	% de l'act. totale du latex	
Azote protéique (32) *	1,78 (± 0,12) **	1,59 (± 0,14) **	89,3	0,23 (± 0,03) **	12,9	102,2
Phosphatase libre (13)	0,61 (± 0,20)	0,75 (± 0,13)	21,6	0,53 (± 0,19)	15,2	36,7
Phosphatase totale (13)	3,48 (± 0,26)	0,98 (± 0,14)	28,2	2,40 (± 0,24)	69,0	97,1
β-glucosidase totale (8)	1,14 (± 0,16)	0,32 (± 0,08)	28,1	0,76 (± 0,14)	66,7	94,8
β-galactosidase totale (7)	0,069 (± 0,005)	0,053 (± 0,015)	76,8	0,018 (± 0,005)	26,1	102,9
β-N-acétyl-glucosaminidase totale (7) .....	0,046 (± 0,011)	0,018 (± 0,013)	39,1	0,037 (± 0,005)	80,4	119,6
Phosphodiesterase totale (7) .....	0,137 (± 0,019)	0,057 (± 0,024)	41,6	0,103 (± 0,024)	75,2	116,8
Cathepsine totale (4) ..	22,8.10 <sup>-3</sup> (± 8,2.10 <sup>-3</sup> )	3,7.10 <sup>-3</sup> (± 2,5.10 <sup>-3</sup> )	16,2	19,4.10 <sup>-3</sup> (± 5,7.10 <sup>-3</sup> )	85,1	101,3
Estérase (non spécifique) totale (5) .....	8,5.10 <sup>-3</sup> (± 2,4.10 <sup>-3</sup> )	3,5.10 <sup>-3</sup> (± 1,1.10 <sup>-3</sup> )	41,2	2,8.10 <sup>-3</sup> (± 0,8.10 <sup>-3</sup> )	32,9	74,1
Phospholipase totale (5)	0,252 (± 0,045)	0,239 (± 0,052)	94,8	0,015 (± 0,010)	6,0	100,8

L'azote protéique est exprimé en mg d'azote/ml de latex.  
 Les activités enzymatiques sont exprimées en unités internationales par ml de latex.  
 \* Nombre de mesures.  
 \*\* Intervalle de confiance pour  $p = 0,05$ .

Ainsi, que les activités des enzymes étudiés soient fortes ou faibles, il est toujours possible de les comparer entre elles en confrontant les surfaces des divers profils de sédimentation. Il est donc possible de se rendre compte si le degré d'enrichissement ou d'appauvrissement est du même ordre dans les différentes fractions, pour un groupe d'enzymes donnés.

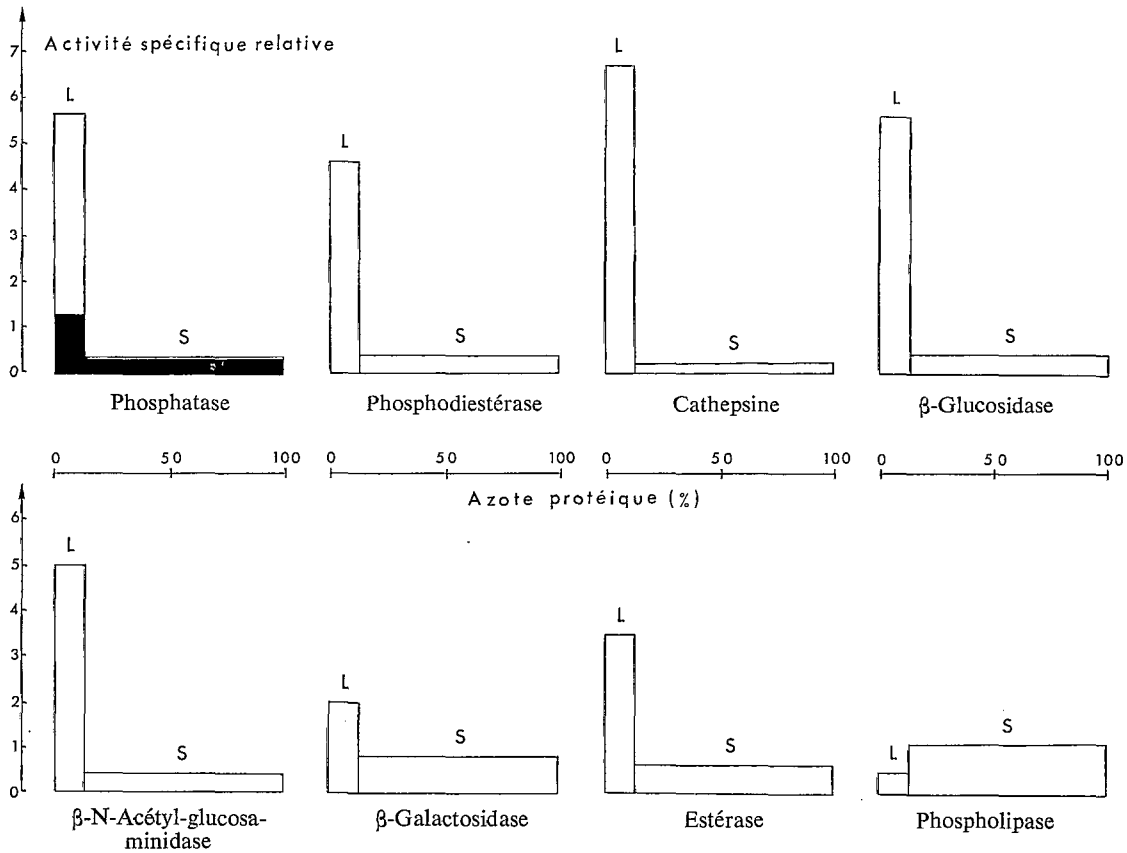


Fig. 14. — Distribution des hydrolases dans la « fraction surnageante » et la « fraction lutoïde ». On a représenté, en abscisses, le pourcentage d'azote protéique contenu dans chacune des fractions (S étant la fraction surnageante et L la fraction lutoïdes), en ordonnées, l'activité spécifique relative de l'enzyme (% de l'activité enzymatique/% de l'azote protéique) pour chacune des fractions considérées

Dans le cas de la phosphatase acide, l'activité spécifique relative de l'enzyme libre a été représentée en noir pour chacune des fractions étudiées.

D'après les résultats obtenus, il est clair que les hydrolases étudiées sont toutes concentrées dans la fraction lutoïdes, exception faite de la phospholipase. L'activité de celle-ci est beaucoup plus importante dans le surnageant que dans les lutoïdes. Cependant, dans cette dernière fraction, elle est loin d'être nulle (6 % de l'activité du latex), mais il est vraisemblable que sa présence est due à un phénomène d'adsorption. On peut raisonnablement admettre que la phospholipase n'est pas d'origine lutoïdique.

Deux enzymes paraissent avoir une distribution assez complexe dans le latex : la  $\beta$ -galactosidase et l'estérase. Leur activité spécifique relative bien que plus importante dans les lutoïdes que dans le surnageant, est néanmoins nettement plus faible que dans les autres cas.

Les autres hydrolases étudiées, phosphatase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, phosphodiesterase et cathepsine, présentent des activités spécifiques relatives du même ordre de grandeur et très supérieures à celle du surnageant (de 10 à 20 fois plus importantes).

Enfin, dans le cas de la phosphatase qui est l'hydrolase la plus active du latex, son *activité libre* a été mesurée dans les préparations non lysées de lutoïdes et de surnageant, obtenus par centrifugation. Dans ces conditions, il est à noter que :

*a* Pour la fraction lutoïdes, l'activité libre représente 22 % de l'activité totale ; l'enzyme est donc enfermée pour 78 % dans les particules ;

*b* Pour la fraction surnageante, l'activité libre représente 77 % de l'activité totale ; la phosphatase est donc pratiquement sous forme libre, les 13 % qui sont enfermés dans les particules proviendraient vraisemblablement de lutoïdes ayant échappé à la centrifugation.

A l'heure actuelle, il ne nous est pas possible de savoir si l'activité phosphatase libre du surnageant provient *uniquement ou partiellement* des lutoïdes lysés, autrement dit, si la fraction surnageante contient une phosphatase spécifique, différente de celle des lutoïdes. Pour répondre à cette question, il aurait fallu séparer la phosphatase des deux fractions, puis étudier les propriétés de ces enzymes. Ce problème sortant du cadre de ce sujet n'a pas été abordé. La question reste donc posée, aussi bien du reste pour la phosphatase, que pour les autres enzymes.

## DISCUSSION

A la lumière des résultats qui viennent d'être exposés, on a pu observer que les hydrolases étudiées sont toutes du type *acide*. Elles présentent un maximum d'activité à des pH compris entre 3,5 et 6,0, exception faite cependant, de la phosphodiesterase qui possède deux maximum. Dans ce dernier cas, il n'a pas été possible de savoir s'il s'agissait de deux enzymes attaquant le même substrat ou d'un seul enzyme.

La  $\beta$ -glucosidase de son côté, pose un problème particulier. Durant les deux à trois mois qui suivent la reprise de la saignée, après l'hivernage, son optimum se situe à pH 7,0, puis passe à pH 5,0 pendant le reste de l'année. Aucune interprétation de ces changements n'a pu être donnée, et il n'a pas été observé de phénomènes analogues pour les autres enzymes.

Du point de vue de leur répartition, les hydrolases étudiées peuvent être divisées en trois groupes :

— La phosphatase, la  $\beta$ -glucosidase, la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, la phosphodiesterase et la cathepsine sont particulièrement actives dans la fraction lutoïdes. On peut ainsi conclure raisonnablement que ces enzymes sont essentiellement particulières, et que les activités trouvées dans le surnageant proviennent des lutoïdes lésés lors des manipulations.

— La  $\beta$ -galactosidase et l'estérase dont les activités sont plus importantes dans la fraction lutoïdes que dans le surnageant, mais dans un rapport moindre que pour le groupe précédent. Leur répartition dans le latex serait donc assez complexe, et au minimum bimodale. Une autre interprétation peut encore être donnée à cette distribution. En effet, il est possible de supposer que ces enzymes sont liés assez faiblement à la membrane des lutoïdes, et peuvent ainsi passer facilement en solution. Une telle hypothèse ne peut être exclue, des cas semblables ayant déjà été signalés par divers auteurs. A ce point de vue, De DUVE et al. (64) signalent que l'acétylestérase est normalement associée aux lysosomes dans la cellule intacte, mais un simple lavage avec du saccharose 0,25 M suffit à la déplacer (78). D'un autre côté, BECK et TAPPEL (26) ont trouvé que la  $\beta$ -glucosidase lysosomale est liée à la membrane, et passe beaucoup plus facilement en solution que la phosphatase acide.

— Enfin, la phospholipase dont l'activité est beaucoup plus importante dans le surnageant que dans la fraction lutoïdes. Elle proviendrait ainsi d'un autre type de particules, ou serait simplement en solution dans le surnageant. Il est à noter cependant, que dans le cas particulier du latex, vu la très forte activité phosphatase, on dose aussi bien la phospholipidase D que la phospholipidase C. L'activité mesurée est la résultante du fonctionnement de ces deux enzymes et il est toujours possible d'alléguer que l'un d'eux est d'origine lutoïdique.

D'autres enzymes, tels que l'aryl-sulfate et la  $\beta$ -glucuronidase connus comme appartenant aux lysosomes et qui ont été caractérisés dans les sphérosomes du méristème d'*Allium cepa* (159), n'ont pu être trouvés dans les lutoïdes.

En définitive, toutes les hydrolases étudiées, exception faite de la phospholipase, sont concentrées à un degré plus ou moins grand dans la fraction lourde du latex, constituée principalement par des lutoïdes. Il serait cependant prématuré de conclure que ces hydrolases sont d'origine lutoïdique, compte tenu des réserves faites précédemment sur la pureté des fractions obtenues par centrifugation différentielle. Néanmoins, il y a de fortes présomptions pour que ce soit le cas.

A l'heure actuelle, une seule chose semble certaine, l'appartenance de la phosphatase acide aux lutoïdes (cf. page 16). C'est en me basant sur ce résultat, et en mettant à profit les propriétés caractéristiques des lutoïdes, que je vais tenter au cours des prochains chapitres, de montrer l'origine unique de ces hydrolases.



## Chapitre VII

# UNITÉ STRUCTURALE DES HYDROLASES (RÉVÉLATION SIMULTANÉE DE LEUR ACTIVITÉ)

Afin de mettre en évidence le caractère lysosomal des lutoïdes, il est essentiel de démontrer l'origine particulière unique des hydrolases qui ont été étudiées jusqu'ici. Pour atteindre ce but, je me suis appuyé sur le fait qu'il est possible de révéler progressivement la phosphatase lutoïdique par divers moyens (cf. chapitre V). Si les lutoïdes contiennent d'autres enzymes, ceux-ci doivent être activés d'une *manière identique* à la phosphatase acide. De DUVE et son école (55) ont appelé cette méthode « démembrement contrôlé des granules » et l'ont brillamment appliquée dans l'étude des lysosomes (voir par exemple : 74, 90, 137 et 161).

Les expériences décrites dans ce chapitre sont basées sur la déstabilisation progressive des lutoïdes obtenue par choc osmotique, lyse thermique à pH acide, traitement par le Triton ou la lysolécithine. Les variations de l'activité de quelques hydrolases des lutoïdes ayant subi ces traitements sont mesurées et comparées entre elles.

## Action de la lyse osmotique sur la libération des hydrolases

Les graphiques de la figure 15 représentent les variations de l'activité libre d'un certain nombre d'hydrolases en fonction de la pression osmotique du milieu. Les lutoïdes ont été placés dans des solutions de concentrations différentes en mannitol, et ont été abandonnés 15 minutes à 0°C. Les activités libres de quelques hydrolases ont ensuite été mesurées. La concentration du milieu ayant été ramenée à 0,3 M de mannitol.

En ce qui concerne les enzymes relativement actifs, comme la phosphatase, la  $\beta$ -glucosidase et la phosphodiesterase, il a été possible de faire des incubations courtes (10 minutes à 30°C) pour mesurer l'activité libre de ces enzymes. Dans ce cas, les courbes d'activation de la  $\beta$ -glucosidase et de la phosphodiesterase sont sensiblement identiques à celle de la phosphatase prise comme enzyme caractéristique des lutoïdes. Pour une concentration de mannitol inférieure à 0,3 M, l'activité augmente très rapidement. Elle passe par un minimum entre 0,3 et 0,4 M de mannitol, et augmente légèrement au-delà de 0,4 M (figure 15 A).

Par contre, en ce qui concerne la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, enzymes peu actifs dans les lutoïdes, il a fallu doubler les durées d'incubation pour obtenir des résultats à peu près mesurables. Dans ce cas, les courbes d'activation de ces deux hydrolases ne sont pas identiques à celles de la phosphatase (figure 15 B). Il est probable que ces différences sont dues à une dégradation plus marquée des particules à la suite de cette incubation de 20 minutes à 30°C et à pH acide. Elle a vraisemblablement entraîné des altérations dans la perméabilité de la membrane lutoïdique vis-à-vis des substrats utilisés, d'où les différences constatées.

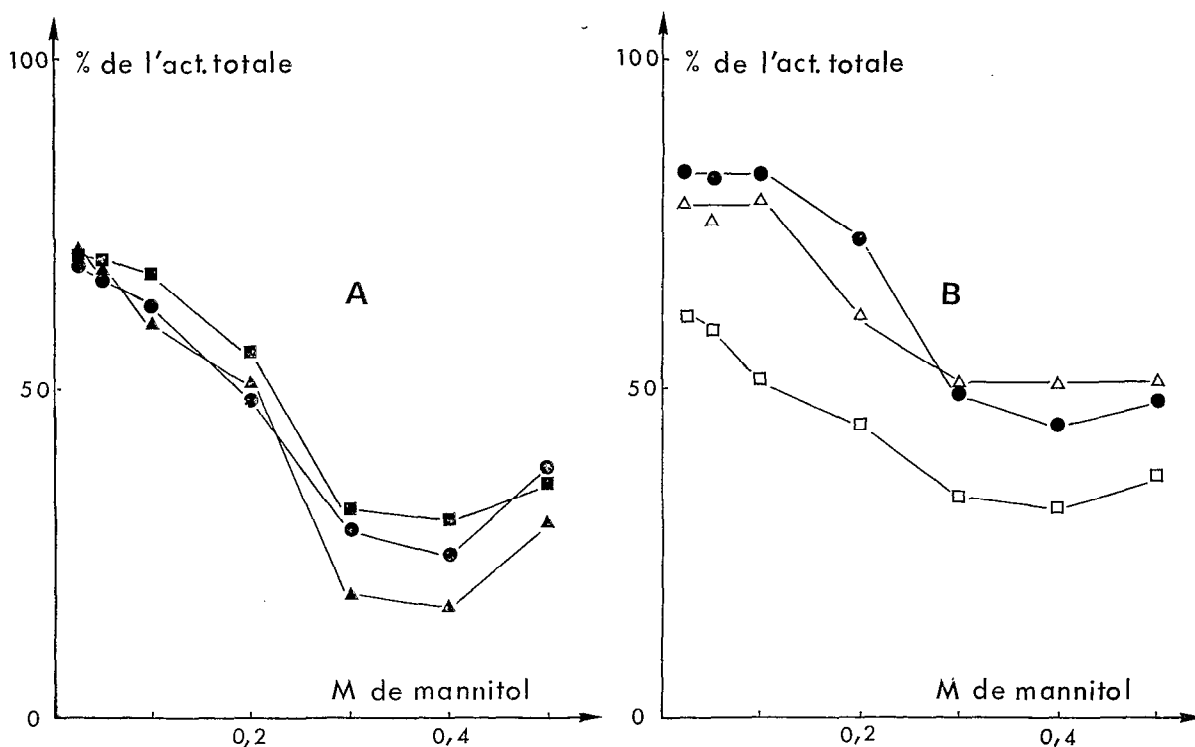


FIG. 15. — Action de la lyse osmotique sur la libération de quelques hydrolases. A) Incubation de 10 minutes à 30° C lors des dosages : phosphatase acide (●),  $\beta$ -glucosidase mesurée à pH 7,0 (▲) et phosphodiesterase (■). B) Incubation de 20 minutes à 30° C lors des dosages : phosphatase acide (●),  $\beta$ -galactosidase ( $\Delta$ ) et  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase ( $\square$ ).

Pour chaque hydrolase, les résultats sont ramenés à l'activité totale mesurée dans les mêmes conditions, mais en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 3 expériences).

Cependant, on notera un certain parallélisme entre les trois courbes d'activation qui sont qualitativement du même type que les précédentes, avec un minimum pour des concentrations de mannitol comprises entre 0,3 et 0,4 M.

Précédemment, il avait été souligné que la mesure des activités libres ne fournit pas un critère adéquate lorsqu'il s'agit d'enzymes à activité relativement faible (cf. page 32). Cela peut être constaté dans le cas de la figure 15 B. En outre, dans le cas des enzymes très peu actifs, ce critère n'est alors absolument pas utilisable. C'est pour ces raisons qu'il a été fait appel à la notion d'*activité soluble* afin de pouvoir inclure des enzymes à faible activité dans cette étude.

Les méthodes utilisées étant longues et laborieuses, il n'était matériellement pas possible de les étendre à toutes les hydrolases caractérisées dans la fraction lutoïdes. Quatre enzymes qui, ensemble, sont susceptibles d'hydrolyser la plupart des constituants biologiques à haut poids moléculaire ont été choisis :

— La phosphatase qui dégrade tous les composés phosphorylés (esters phosphoriques, phosphoprotéines, etc.), et sert d'enzyme témoin caractéristique des lutoïdes.

— La phosphodiesterase qui attaque les liaisons diphosphates (acides nucléiques, lécitine, etc.).

— La  $\beta$ -glucosidase qui dégrade les liaisons  $\beta$ -glucosides des polysaccharides.

— La cathepsine qui hydrolyse les protéines.

## Action de la lyse osmotique sur la solubilisation des hydrolases

Comme précédemment, les lutoïdes ont été placés dans des solutions de concentrations diverses en mannitol, et abandonnés 15 minutes environ à 0°C. Ces suspensions ont ensuite été centrifugées, et sur le surnageant obtenu, les *activités solubles* des quatre hydrolases choisies ont été mesurées. En ce qui concerne l'activité mesurée sur le surnageant obtenu après centrifugation d'une suspension de lutoïdes ayant subi une lyse complète par l'action de 0,1 % de Triton X-114, elles est sensiblement égale à l'activité totale mesurée dans les conditions standards.

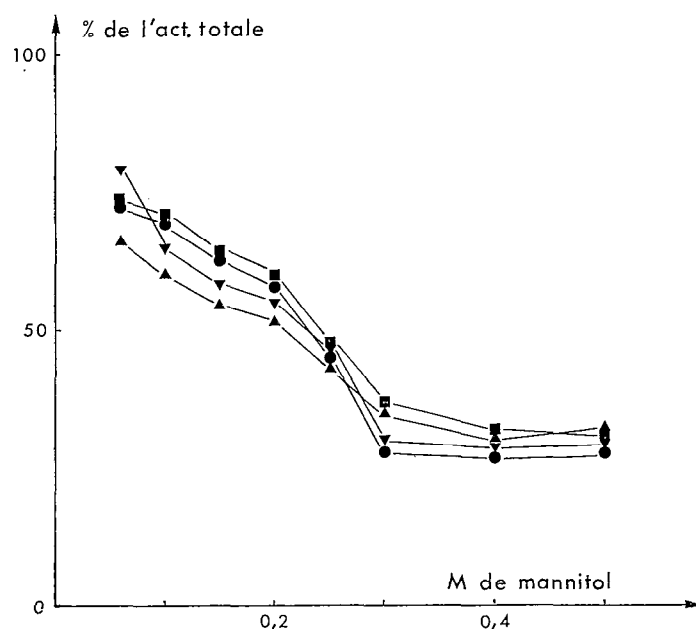


FIG. 16. — Action de la lyse osmotique sur la solubilisation des hydrolases d'une suspension de lutoïdes. Phosphatase (●), β-glucosidase (▲), phosphodiesterase (■) et cathepsine (▼) (moyenne de 2 expériences)

Les courbes de la figure 16 représentent les variations en fonction de la pression osmotique du milieu, des activités solubles des quatre hydrolases étudiées, les résultats étant rapportés aux activités totales des enzymes.

Comme dans le cas des activités libres, les activités solubles augmentent très rapidement lorsque la concentration en mannitol est inférieure à 0,3 M. Elles passent par un minimum pour 0,3 M en mannitol et semblent alors rester constantes pour des concentrations supérieures, du moins jusqu'à 0,5 M.

On notera que les courbes d'activation des trois hydrolases étudiées, sans être confondues, sont peu différentes de celles de la phosphatase

## Action de la lyse thermique sur la solubilisation des hydrolases

Une suspension de lutoïdes en milieu mannitol 0,3 M, maintenue à pH 5,0 par du tampon acétate 0,1 M, est placée au bain-marie à 30°C. A des intervalles de temps déterminés, une

certaine quantité de suspension est prélevée, et immédiatement centrifugée. Les hydrolases sont ensuite dosées sur le surnageant obtenu.

Aux temps zéro et cent vingt minutes, une aliquote de la suspension est diluée avec une solution de Triton X-114, de façon à ce que la concentration finale de ce détergent soit de 0,1 %. Ces suspensions sont centrifugées, et les mêmes dosages sont effectués sur le surnageant. Pour une même préparation, les activités totales aux temps zéro et cent vingt minutes sont peu différentes, et leur moyenne a été prise pour représenter l'activité totale de l'enzyme considéré.

Les courbes de la figure 17 représentent les résultats ainsi obtenus. Il semble que, dans ce cas, les hydrolases étudiées se classent en deux groupes : la phosphatase et la  $\beta$ -glucosidase dont l'activation est relativement forte ; la phosphodiesterase et la cathepsine dont l'activation est moins importante. Il est possible que ces résultats divergents soient dus à la faiblesse des activités cathepsine et phosphodiesterase lors de ces expériences. Cette explication paraît cependant quelque peu simpliste. Il est plus normal de supposer qu'au sein des lutoïdes, il existe des liaisons plus ou moins fortes enzyme-membrane. Ces liaisons seraient du type ionique, et leur rupture dépendrait étroitement du pH. Ce problème sera d'ailleurs repris au cours du dernier chapitre de ce mémoire.

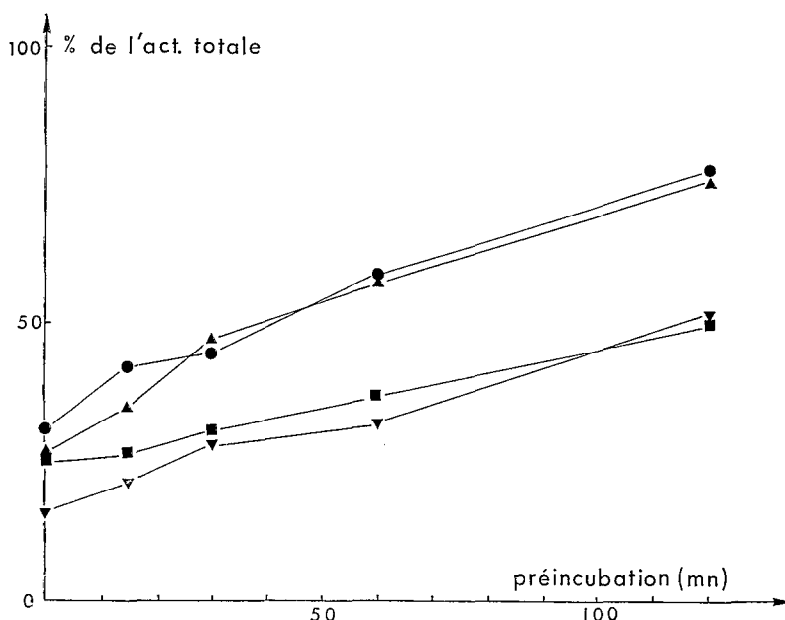


FIG. 17. — Action de la lyse thermique pendant des temps variables à 30° C et à pH 5,0 sur la solubilisation des hydrolases d'une suspension de lutoïdes. Phosphatase (●);  $\beta$ -glucosidase (▲); phosphodiesterase (■); cathepsine (▼). Les résultats sont rapportés à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 2 expériences)

## Action du triton X-114 sur la solubilisation des hydrolases

Les lutoïdes ont été placés ici, en milieu mannitol 0,3 M et en présence de quantités croissantes de Triton X-114, puis abandonnés pendant 15 minutes à 0°C. Après centrifugation de ces suspensions, les dosages habituels ont été effectués sur les surnageants ainsi obtenus.

Les courbes d'activation des quatre hydrolases sont représentées dans la figure 18. Elles sont presque confondues. Aux erreurs d'expériences près, on peut admettre que la révélation de la  $\beta$ -glucosidase, la phosphodiesterase et la cathepsine est identique à celle de la phosphatase.

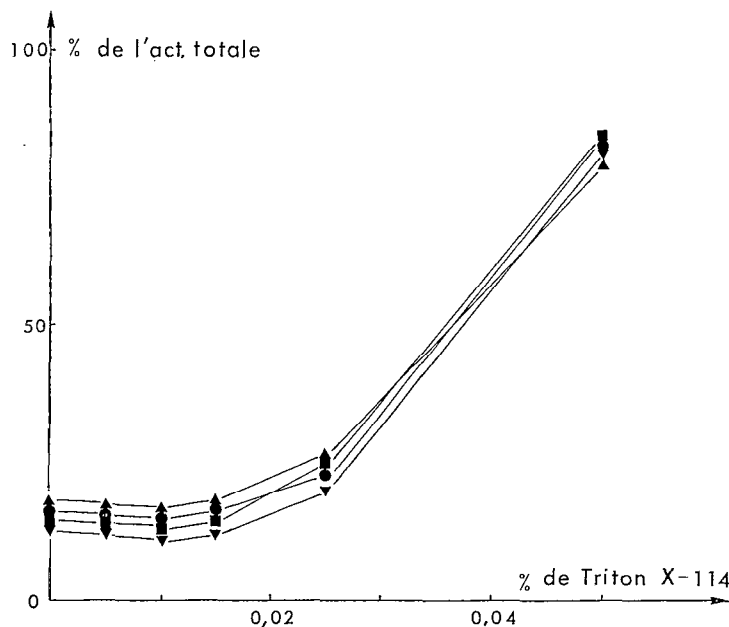


FIG. 18. — Action du Triton X-114 sur la solubilisation des hydrolases d'une suspension de lutoïdes. Phosphatase (●);  $\beta$ -glucosidase (▲); phosphodiesterase (■); cathepsine (▼). Les résultats sont rapportés à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 3 expériences)

## Action de la lysolécithine sur la solubilisation des hydrolases

L'expérience précédente a été renouvelée en remplaçant le Triton par de la lysolécithine.

Les variations de l'activité des quatre hydrolases en fonction de la concentration de lysolécithine sont représentées par les graphiques de la figure 19. Sans être confondues, les courbes d'activation présentent une bonne similitude. Là aussi, on peut admettre que ces hydrolases sont révélées d'une manière identique, aux erreurs d'expériences près.

## CONCLUSIONS

A la lumière des résultats expérimentaux rapportés dans ce chapitre, il ne fait aucun doute que toutes les hydrolases étudiées voient leur activité augmenter lorsque la fraction lutoïdes est soumise à divers traitements mettant en cause l'intégrité de sa membrane.

En ayant soin de prendre la phosphatase acide comme enzyme caractéristique des lutoïdes, il s'avère que dans tous les traitements mis en œuvre dans cette étude, la  $\beta$ -glucosidase se comporte de façon presque identique à celle-ci. Il en est de même pour la phosphodiesterase et la cathepsine, excepté dans un cas (lyse thermique à pH 5,0).

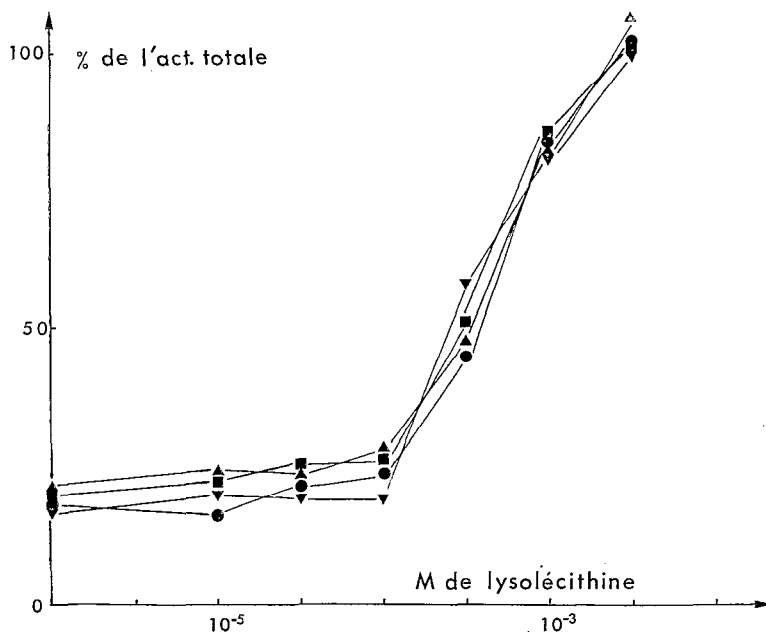


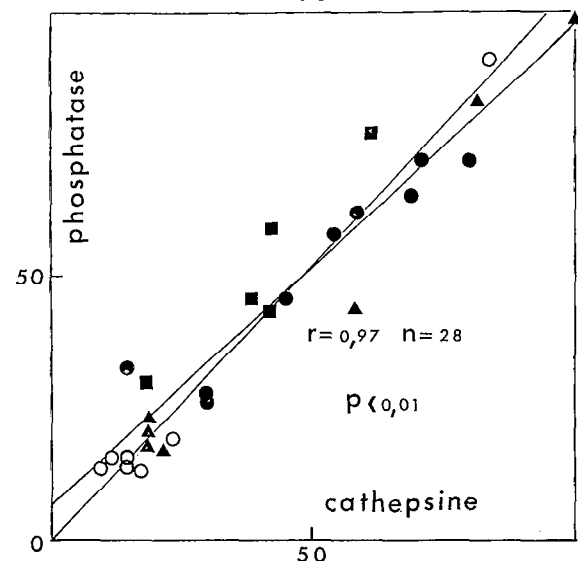
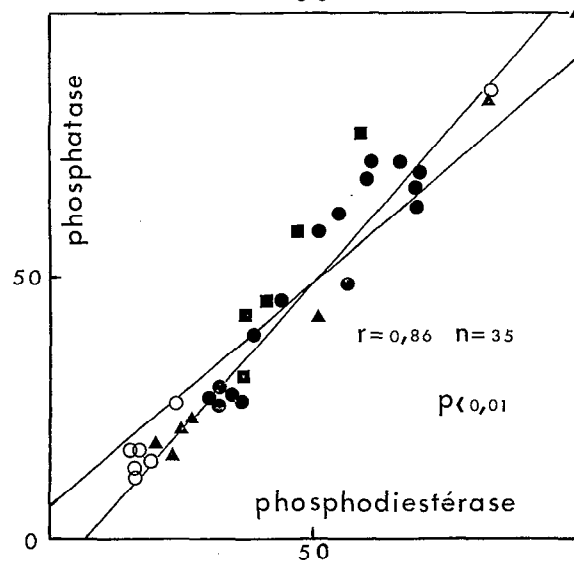
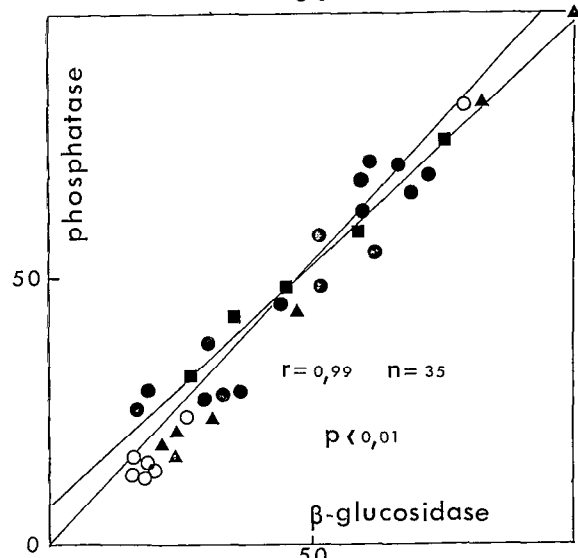
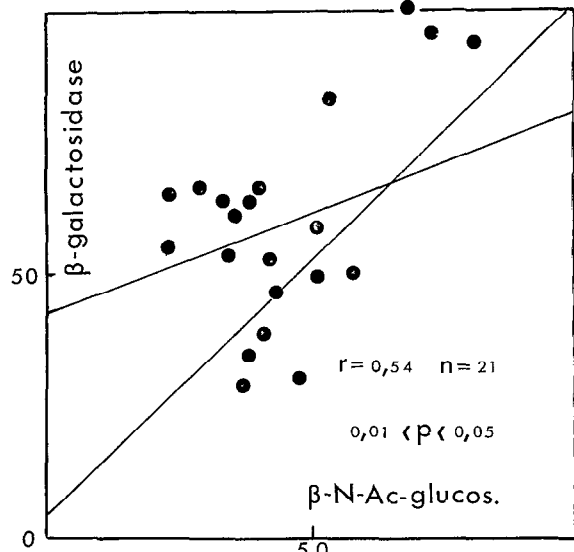
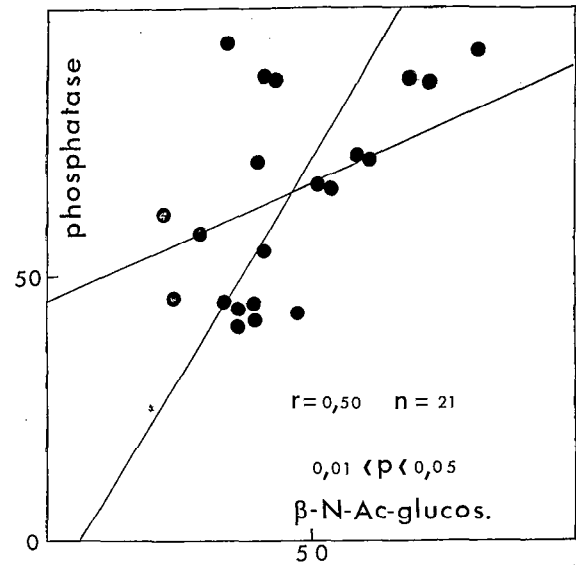
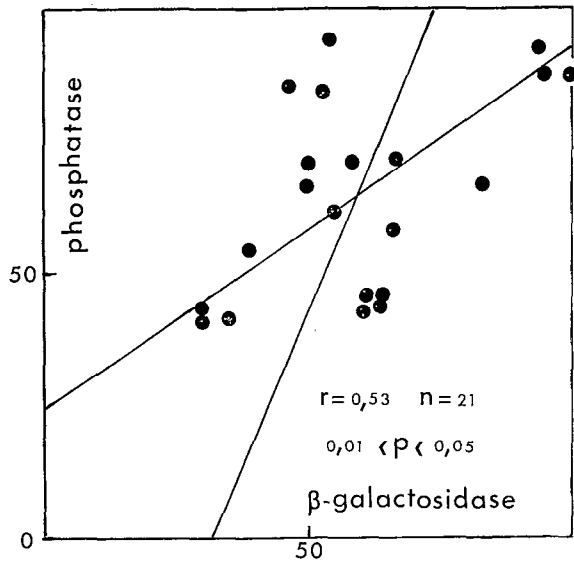
FIG. 19. — Action de la lysolécithine sur la *solubilisation* des hydrolases d'une suspension de lutoïdes. Phosphatase (●),  $\beta$ -glucoSIDase (▲), phosphodiESTÉrase (■) et cathePSINE (▼). Les résultats sont rapportés à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 (moyenne de 2 expériences)

En ce qui concerne la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, seule l'action du choc osmotique sur l'activation de ces enzymes a été étudiée. Dans ce cas, il existe des écarts assez importants entre les variations de l'activité de ces hydrolases, et celles de la phosphatase. Néanmoins, ces courbes sont qualitativement du même type. Quant aux divergences observées, elles pourraient s'expliquer par la lyse thermique provoquée par une trop longue durée d'incubation à pH acide. On notera à ce sujet, que les activités libres de ces hydrolases sont relativement importantes pour une concentration en mannitol comprise entre 0,3 et 0,4 M.

Compte tenu de ces résultats, il existe une forte probabilité pour que la phosphatase, la  $\beta$ -glucoSIDase, la phosphodiESTÉrase ainsi que la cathePSINE appartiennent à un même type de particules, en l'occurrence les lutoïdes. En outre, il y a aussi quelques présomptions pour que la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase soient de même d'origine lutoïdique.

Enfin, tous les résultats obtenus dans les différentes expériences décrites dans ce chapitre ont été rassemblés, et les corrélations existant entre les différentes hydrolases prises deux à deux, ont été calculées. Les valeurs ainsi trouvées sont données dans les graphiques de la figure 20.

En ce qui concerne les corrélations entre : phosphatase- $\beta$ -glucoSIDase-phosphodiESTÉrase et cathePSINE, elles sont hautement significatives ( $p < 0,01$ ). Il ne fait aucun doute que, quelle que soit la technique utilisée pour entraîner une lyse partielle des lutoïdes, ces quatre enzymes sont libérés dans les mêmes proportions. Les probabilités pour que ces quatre enzymes appartiennent aux lutoïdes sont donc très grandes, car les traitements mis en œuvre ici mettent en cause des propriétés différentes de la membrane. Il est peu vraisemblable que des organites n'appartenant pas à un même groupe puissent posséder des réactions aussi identiques. De même, on peut rejeter l'hypothèse d'une adsorption de ces hydrolases sur les lutoïdes.



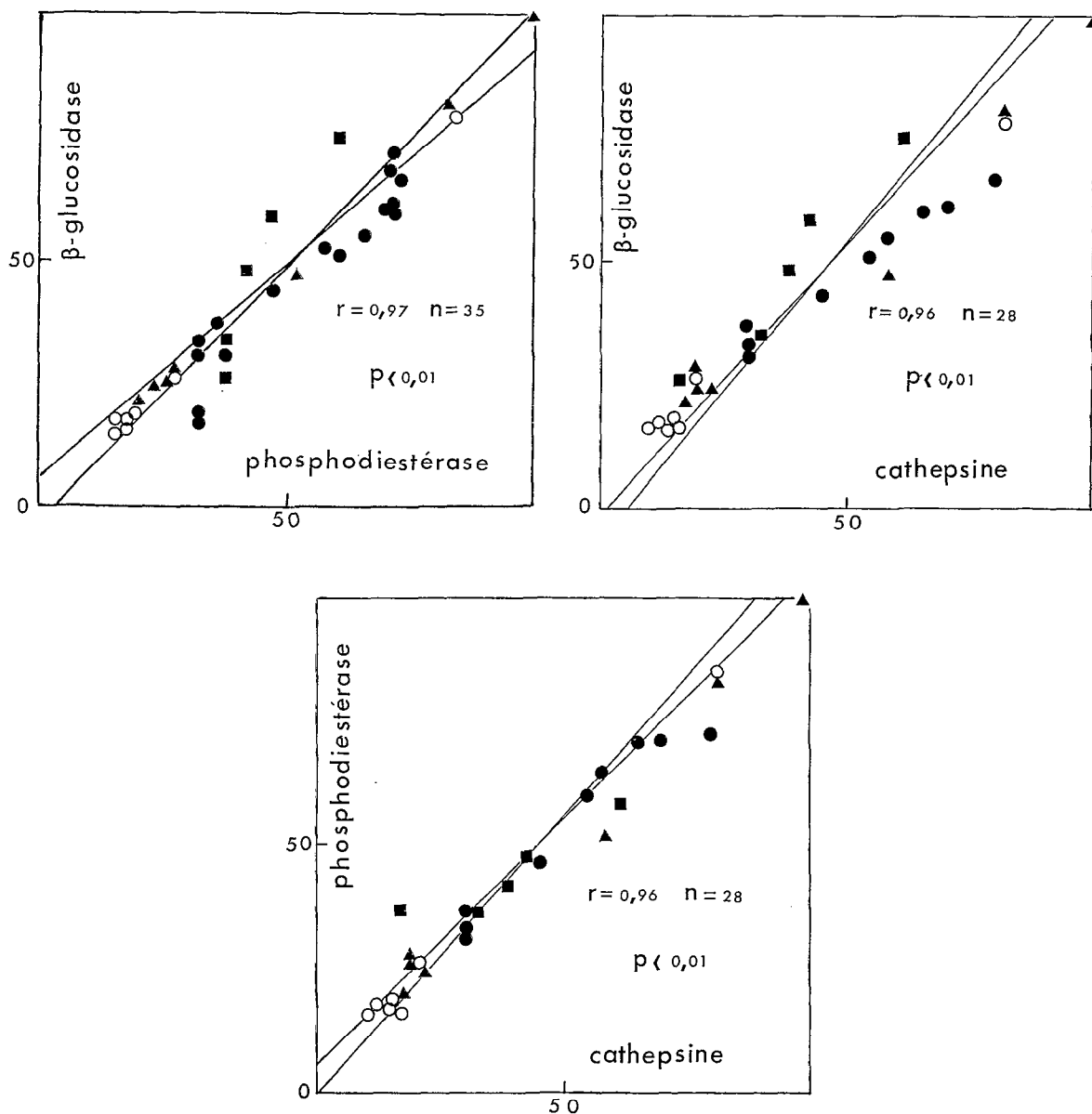


FIG. 20. — Corrélations entre les activités libres et solubles des hydrolases prises deux à deux. Lutoïdes soumis à la lyse osmotique (●), à la lyse thermique à pH 5,0 et à 30°C (■), à la lyse provoquée par l'action du Triton X-114 (○) ou de la lysolécithine (▲).

Pour ce qui est de la  $\beta$ -galactosidase et de la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, un seul traitement a été mis en œuvre dans l'étude de leur activation. Dans ces conditions, les corrélations, bien que significatives, sont nettement moins étroites ( $0,01 < p < 0,05$ ) que dans les cas précédents. Les raisons probables de ces faibles corrélations ont été données précédemment.

Compte tenu de toutes ces données, on peut raisonnablement admettre, en faisant néanmoins certaines réserves, que ces deux hydrolases appartiennent aussi aux lutoïdes.



## Chapitre VIII

# UNITÉ STRUCTURALE DES HYDROLASES

## (LOCALISATION PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE)

La centrifugation en gradient de densité ou isopycnique a été utilisée en premier lieu par BRAKKE (33) pour séparer des virus, et par HOLTER (79) dans le fractionnement cellulaire des tissus animaux. Cette technique fut, par la suite, reprise par HOLTER et al. (80), et par OTTESEN et WEBER (111) dans la séparation des organites cellulaires d'homogénats de foie de *Xenopus*, et par JAMES et DAS (84) ainsi que par DUCET (52) pour fractionner et séparer les chloroplastes et mitochondries des feuilles.

Depuis, cette méthode a été universellement adoptée par les biochimistes dans l'étude des constituants cellulaires, car elle présente d'énormes avantages sur la centrifugation différentielle. De DUVE et al. (61) ont étudié ce problème d'un point de vue théorique et ont énoncé un certain nombre de principes dont l'application a été extrêmement fructueuse (21).

Rappelons que dans cette méthode, les particules étalées sur un gradient de densité sont centrifugées à grande vitesse jusqu'à ce qu'elles atteignent une zone où leur déplacement devient presque nul. La zone ainsi atteinte a une densité égale à celle des particules. Dans cette technique, la séparation des organites cellulaires se fait donc suivant la densité qu'ils acquièrent dans le milieu de centrifugation.

Afin de résoudre le problème de la localisation des hydrolases dans l'étude des lutoïdes du latex, j'ai été amené à faire appel à cette méthode.

Du latex dilué avec du mannitol 0,3 M, ou une suspension de lutoïdes, est centrifugé à très grande vitesse sur un gradient linéaire de densité allant de 1,02 à 1,19.

La figure 21 donne l'aspect général des tubes après centrifugation. Dans le cas du latex, on peut observer quatre zones très nettes :

- En haut du tube, une couche de caoutchouc compacte ;
- un peu en dessous, une bande jaune-orangée, très fine, mais nettement visible, qui correspondrait aux particules de Frey-Wyssling ;
- Aux deux tiers du tube, une zone gris clair, plus ou moins large : elle serait constituée par des lutoïdes ;
- Enfin, au fond du tube, un sédiment plus ou moins important suivant les latex ; ce sédiment est vraisemblablement composé de particules de Frey-Wyssling et de lutoïdes agglomérés.

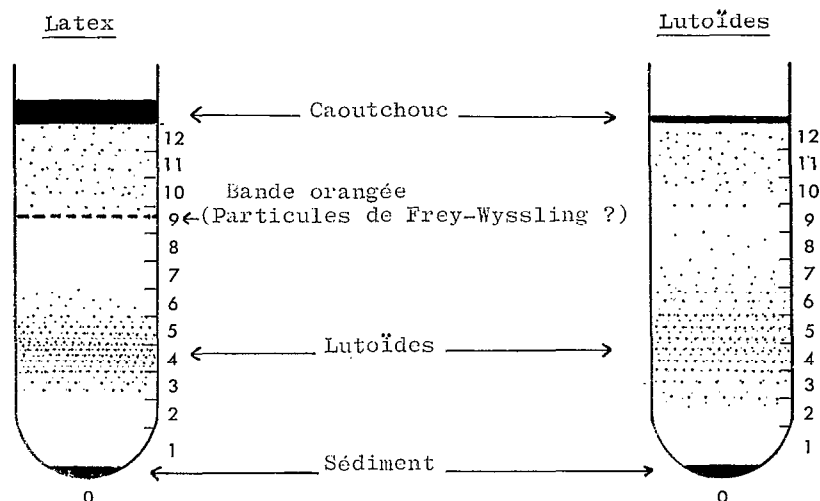


FIG. 21. — Aspect des tubes après centrifugation isopycnique du latex et des lutoïdes

Dans le cas où la centrifugation a été effectuée avec une suspension de lutoïdes, on observe une répartition à peu près analogue, excepté que la couche de caoutchouc est maintenant formée d'une très fine pellicule blanche, la bande jaune-orangé a disparu, et la zone correspondant aux lutoïdes est beaucoup plus large.

Après centrifugation, le fond du tube est percé. Douze fractions de quelques gouttes chacune sont recueillies et ensuite diluées. En ce qui concerne le sédiment, il constitue la fraction zéro. Dans le cas du latex, la couche de caoutchouc est récupérée et après remise en suspension, elle constitue la fraction treize.

Les figures 22 et 23 illustrent les résultats obtenus, d'une part avec le latex, et d'autre part avec une suspension de lutoïdes. Les numéros des fractions dans l'ordre décroissant de densité ont été représentés en abscisses, et les pourcentages de l'activité totale récupérée en ordonnées (cette récupération est de l'ordre de 95 %).

On obtient ainsi un histogramme représentant la distribution des activités hydrolytiques le long de ce gradient.

Dans le cas du latex (figure 22), toutes les activités présentent un maximum très net dans la fraction 4 dont la densité est de 1,15. Ce maximum varie d'un latex à l'autre, et peut parfois coïncider avec le sédiment ou avec le surnageant. Ces cas extrêmes qui correspondent respectivement à une agglomération ou à une lyse totale des lutoïdes, se présentent pour des latex particulièrement instables. Lorsqu'on a affaire à des latex stables, la fraction dans laquelle se retrouve le maximum d'activité hydrolytique possède une densité qui peut varier de 1,17 à 1,12. Néanmoins, dans *tous les cas*, quelle que soit la localisation de ce maximum, la distribution des hydrolases étudiées le long du tube, est semblable à celle de la phosphatase acide.

Il est à remarquer, cependant, que la répartition de la  $\beta$ -galactosidase est légèrement différente de celle des autres hydrolases. Cette divergence avait déjà été notée dans l'étude des profils de sédimentation (cf. page 52). Ici, le maximum d'activité dans la fraction 4 existe toujours, mais il est moins important que dans le cas des autres hydrolases. Par contre, les activités concentrées dans les trois dernières fractions et qui correspondent à la phase soluble, sont supérieures à ce que l'on a l'habitude de trouver dans les autres cas.

Dans le caoutchouc (fraction 13), les activités hydrolytiques pouvant être mesurées, sont très faibles et pratiquement négligeables. Il n'est pas possible de se prononcer à propos de la

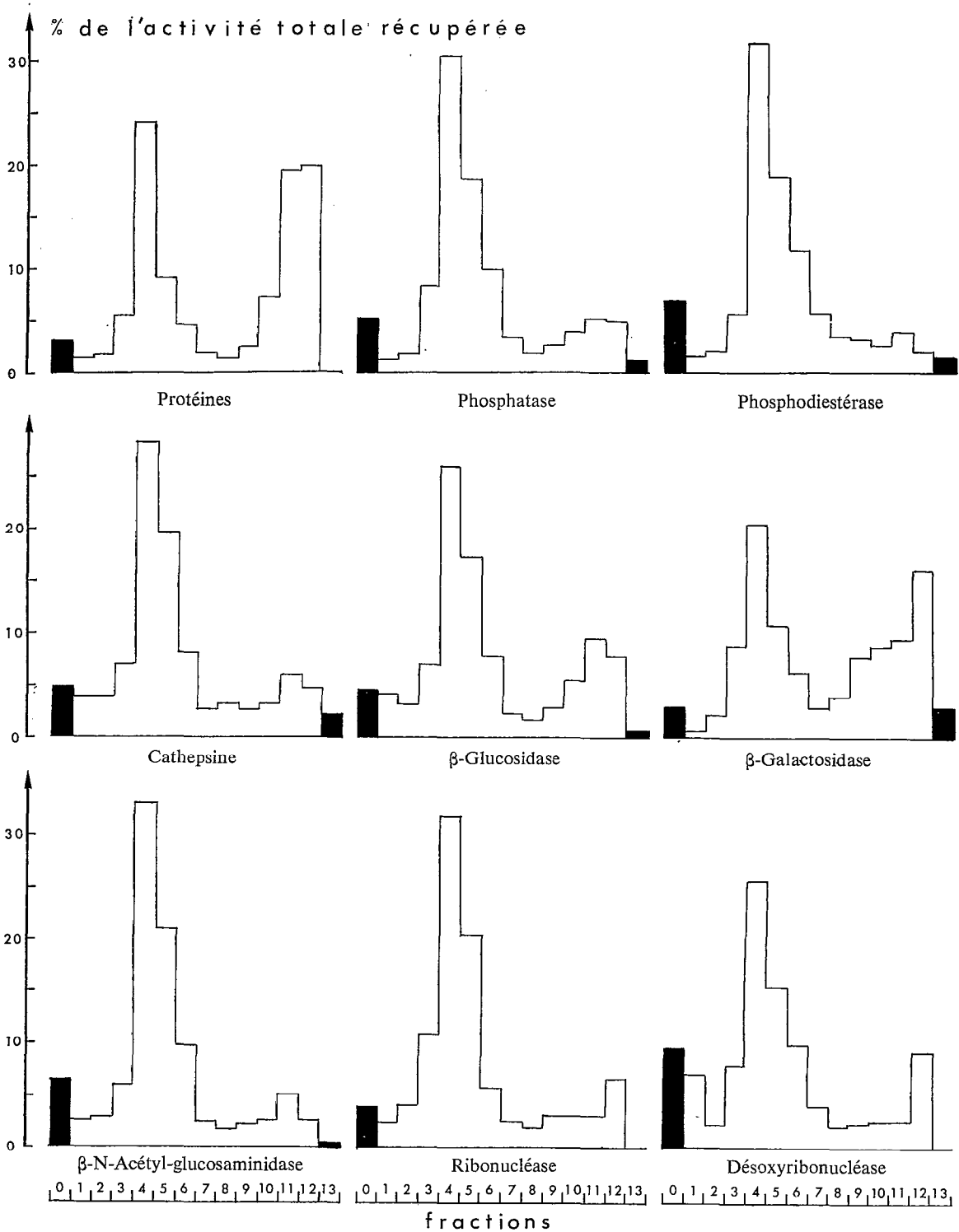


FIG. 22. — Distribution des hydrolases après centrifugation isopycniqne du latex. En abscisses on a représenté le nombre de fractions et en ordonnées le pourcentage d'activité récupérée dans chaque fraction. La fraction zéro correspond au sédiment et la 13, au caoutchouc.

ribonucléase et de la désoxyribonucléase, pour lesquelles les activités ne sont pratiquement pas mesurables en présence de grandes quantités de caoutchouc.

Pour ce qui est des protéines, le même maximum se retrouve dans la fraction 4, mais il en existe beaucoup plus dans les trois dernières fractions (protéines solubles), et très certainement aussi dans le caoutchouc (fraction 13) où elles n'ont pas pu être mesurées par colorimétrie directe. Ces derniers résultats sont tout à fait logiques puisque les protéines des lutoïdes ne représentent que 10 à 15 % de celles du latex. Il est à noter qu'il n'y a pas d'autre maximum dans cet histogramme. Ceci confirme le fait que les lutoïdes sont les constituants particuliers les plus abondants du latex après le caoutchouc. Dans nos conditions expérimentales, les autres organites ne peuvent être décelés par leur teneur en protéines. En particulier, les particules de Frey-Wyssling, bien que nettement visibles dans la fraction 9 grâce à leur coloration jaune-orangé caractéristique, sont en quantités trop faibles pour être mises en évidence par leur teneur en protéines.

Le cas du sédiment (fraction 0) restant au fond du tube de centrifugation pose un problème. Cette fraction contient une proportion non négligeable de protéines et d'hydrolases. On pourrait penser qu'il s'agit là d'une seconde population de lutoïdes de densité plus forte (supérieure à 1,19). Cependant, un examen minutieux de ce sédiment montre qu'il n'est pas homogène et qu'il renferme à côté des lutoïdes, des granules jaune-orangés, probablement des particules de Frey-Wyssling. Il est donc plus normal de supposer qu'il est constitué par des organites agglutinés.

Des suspensions de lutoïdes soumises à une centrifugation isopycnique donnent des résultats très proches de ceux obtenus avec du latex (cf. figure 23). Cependant, la fraction où culminent les activités hydrolytiques est légèrement décalée et correspond ici à une densité de 1,13. En outre, ce maximum est moins important que dans le cas du latex, la distribution des activités hydrolytiques le long du gradient est plus étalée. Ces différences peuvent s'expliquer par une dégradation plus ou moins prononcée des lutoïdes. Les centrifugations et manipulations successives, nécessaires à la préparation de la suspension ont vraisemblablement entraîné un gonflement plus ou moins accentué des particules qui a eu pour effet une légère diminution et une plus grande hétérogénéité de leur densité.

En ce qui concerne la distribution des protéines, le fort pourcentage observé dans les trois dernières fractions lorsqu'il s'agissait du latex, ne se retrouve pas ici. Cela n'est guère étonnant en soi, car ces fractions représentent la phase soluble de la suspension étudiée, et dans le cas des lutoïdes, les protéines du sérum et du caoutchouc ont été éliminées en grande partie lors de leur préparation par centrifugation différentielle.

## CONCLUSIONS

L'analyse de la répartition de sept hydrolases après centrifugation isopycnique du latex et d'une suspension de lutoïdes permet de constater que six d'entre elles : la  $\beta$ -glucosidase, la  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase, la cathepsine, la phosphodiesterase, la ribonucléase, la désoxyribonucléase et la phosphatase acide ont une distribution quasiment semblable. On peut donc admettre qu'elles appartiennent à un même type de particules, ayant dans le cas considéré une densité de 1,15 dans un gradient de saccharose contenant du mannitol 0,3 M et du tampon imidazole 0,05 M de pH 7,0. Ces particules seraient en l'occurrence des lutoïdes, étant donné que la phosphatase est connue comme appartenant à ces organites.

La  $\beta$ -galactosidase de son côté, présente certaines anomalies par rapport aux autres hydrolases. Ces anomalies pourraient s'expliquer soit par sa localisation à la surface de la membrane lutoïdique ce qui aurait pour conséquence sa solubilisation relativement aisée, soit plus vraisemblablement, par l'existence de deux enzymes hydrolysant le p-nitro-phényl- $\beta$ -D-galactopyranoside. L'un serait d'origine lutoïdique, l'autre serait soluble dans le sérum du latex.

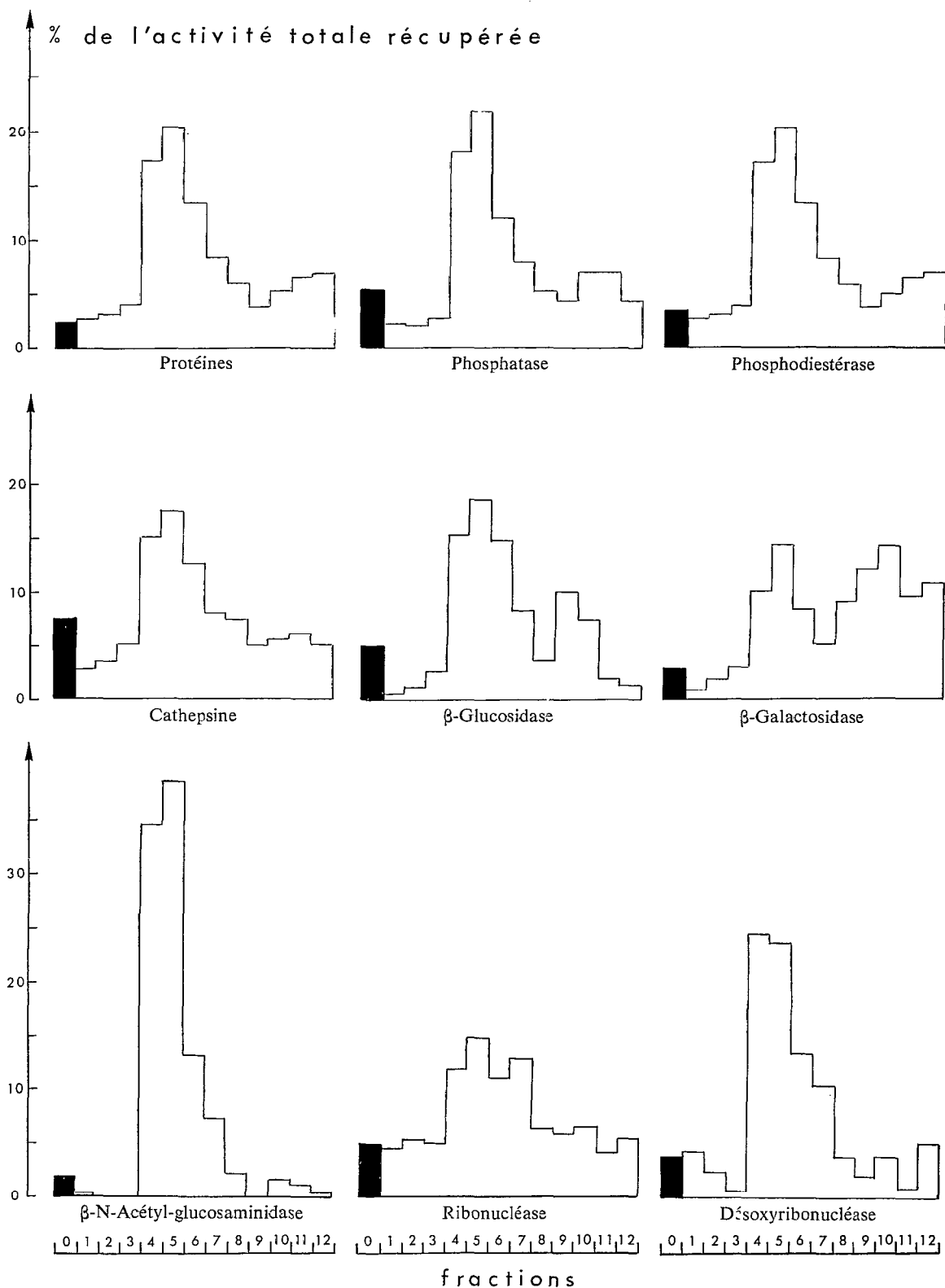


FIG. 23. — Distribution des hydrolases après centrifugation isopycnique d'une suspension de lutoïdes. Même représentation que celle de la figure 22.

## *Chapitre IX*

# *LES ENZYMES D'OXYDO-RÉDUCTION LEUR LOCALISATION DANS LE LATEX*

Il existe dans le latex, de nombreux enzymes d'oxydo-réduction. Deux d'entre eux nous intéressent plus particulièrement dans cette étude. Ce sont la polyphénol-oxydase et la malate-déshydrogénase.

La polyphénol-oxydase est certainement un des enzymes oxydatifs les plus actifs du latex. Les premières publications sur ce sujet sont assez confuses et ce n'est qu'à partir de 1950 avec De HAAN-HOMANS (76) que l'on commença à y voir un peu plus clair. Cet auteur arriva à la conclusion que le latex devait contenir au moins deux phénol-oxydases. Plus tard HSIA (82) reprit ce problème et montra que l'absorption d'oxygène est très intense dans le culot obtenu par ultracentrifugation du latex à 40.000 g pendant 60 minutes. Selon HSIA, cette absorption d'oxygène a pour cause la présence d'une polyphénol-oxydase susceptible d'oxyder le phénol, le p-crésol, le p-chlorophénol, le m-crésol, la tyrosine, la 3-4 dihydroxy-phénylalanine (DOPA), le catechol, le pyrogallol, etc. La fraction sédimentable étant constituée principalement de lutoïdes, cet auteur a ainsi été amené à penser que cette polyphénol-oxydase appartiendrait à ces particules.

Etant donné que cet enzyme est généralement considéré comme étant sous forme soluble et qu'il n'a jamais été décrit dans les lysosomes ou dans des particules appartenant à cette famille, il a paru nécessaire de tenter de la localiser dans le latex.

La malate-déshydrogénase (NAD-dépendante) étudiée par D'AUZAC et JACOB (13) dans le latex, y est très active. De nombreux auteurs ont cherché à la localiser dans divers tissus au moyen de la centrifugation différentielle. Tous les résultats obtenus à ce jour tendent à indiquer que sa distribution est bimodale (64). Une partie de son activité est associée aux mitochondries, le reste est sous forme soluble dans le surnageant.

Pour ce qui est du latex, étant donné la forte activité de la malate-déshydrogénase, l'étude de sa localisation paraît présenter un certain intérêt. Au cas où elle aurait, comme dans les autres tissus, une répartition bimodale, elle permettrait de caractériser les mitochondries et de les situer par rapport aux lutoïdes. Jusqu'à ce jour, il n'a en effet pas été possible de mettre ces organites en évidence par la mesure de l'activité cytochrome-oxydase du latex, bien que DICKENSON (47) ait pu en observer au microscope électronique. S'il existe une activité cytochrome-oxydase, elle est trop faible pour être mesurée à l'aide de la méthode spectrophotométrique classique (143).

L'étude de la localisation de ces deux enzymes d'oxydo-réduction a donc été entreprise dans le latex.

## POLYPHENOL-OXYDASE

## Localisation par centrifugation isopycnique

La répartition de la polyphénol-oxydase le long d'un gradient de saccharose est extrêmement variable. Parfois, cet enzyme paraît être sous forme soluble, parfois sous forme particulaire. La figure 24 donne un exemple de ces deux types de distribution.

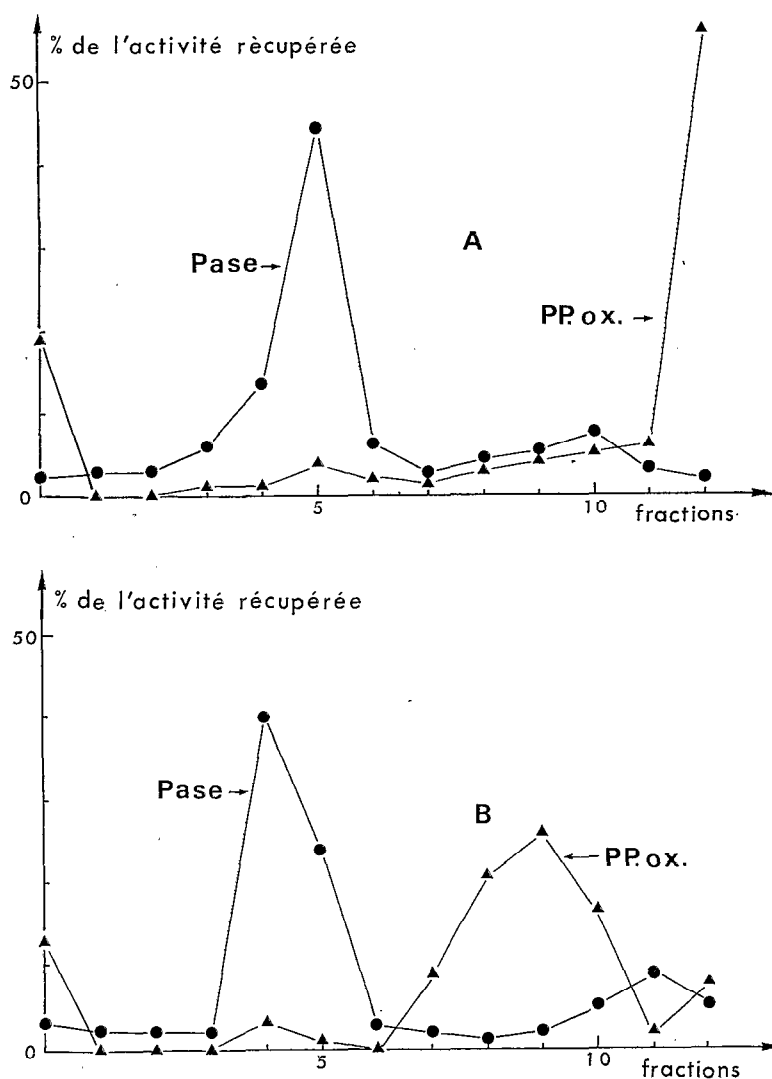


FIG. 24. — Deux types de distribution de la polyphénol-oxydase, comparée à celle de la phosphatase acide, après centrifugation isopycnique du latex. Polyphénol-oxydase ( $\blacktriangle$ ); phosphatase acide ( $\bullet$ )

Activité totale des enzymes récupérée dans le gradient :

— Polyphénol-oxydase : en A = 28 U./mn ; en B = 58 U./mn.

— Phosphatase acide : en A = 1,4 U./mn ; en B = 1,9 U./mn.

Dans les deux exemples donnés ci-après, la répartition de la polyphénol-oxydase est totalement différente de celle de la phosphatase acide. Cet enzyme n'est donc pas d'origine lutoïdique. Le petit pic trouvé dans la fraction correspondant au maximum d'activité de la phosphatase, peut être considéré comme étant dû à des phénomènes d'adsorption.

Les divergences trouvées dans la distribution de la polyphénol-oxydase suivant les latex utilisés pourraient s'expliquer par sa localisation dans des particules différentes des lutoïdes et relativement instables.

Dans le cas de la figure 24 A, ces particules seraient partiellement agglutinées : près de 20 % de l'activité est dans le sédiment. Le reste aurait subi une lyse totale, entraînant la solubilisation de l'enzyme : plus de 60 % de son activité se trouve dans le surnageant.

Dans le cas de la figure 25 B, une partie des granules à polyphénol-oxydase serait agglutinée (plus de 10 % dans le sédiment), mais la majorité semble cette fois-ci intacte et se localiserait juste sous le surnageant (densité de 1,04 environ). Cette zone est celle qui correspond aux particules de Frey-Wyssling (cf. figure 21). Il est donc possible que la polyphénol-oxydase soit localisée dans ces particules. Pour pouvoir le démontrer il faudrait comparer la distribution de cette oxydase avec celle du  $\beta$ -carotène. Malheureusement, le dosage de ce corps par extraction à l'éther de pétrole et colorimétrie de cet extrait à 450 m $\mu$ , n'est pas assez sensible pour pouvoir être utilisé dans le cas présent. Le problème de la localisation de cet enzyme reste donc entier.

Cependant, malgré les résultats qui viennent d'être exposés, certaines objections peuvent être avancées. Entre autres, on trouve souvent des activités polyphénol-oxydase élevées dans la fraction lutoïdes obtenue par centrifugation différentielle. Il est donc toujours possible de supposer que cet enzyme possède une répartition polymodale dans le latex. Il pourrait appartenir à la fraction soluble, aux lutoïdes et à un autre groupe de particules. Afin de répondre à cette objection, l'expérience suivante a été réalisée :

## Libération de la polyphenol-oxydase

Le comportement de la polyphénol-oxydase a été examiné en fonction de la pression osmotique du milieu.

Pour ce faire, une suspension de lutoïdes fraîchement préparée a été placée dans des milieux contenant des quantités différentes de mannitol. Ces mélanges ont été abandonnés 15 minutes à 0°C. Une partie a ensuite été utilisée directement pour le dosage des activités libres de la phosphatase et de la polyphénol-oxydase, la concentration en mannitol du milieu de dosage ayant été ramenée à 0,3 M. Le reste a été centrifugé et les activités solubles de ces deux enzymes ont été mesurées sur le surnageant ainsi obtenu. Les résultats sont représentés dans les graphiques de la figure 25.

L'activation de la polyphénol-oxydase suit *qualitativement* la même loi que celle de la phosphatase, mais *quantitativement* les deux courbes sont dissemblables. Les lutoïdes paraissent nettement plus sensibles à l'action d'un milieu hypotonique que ne le sont les particules à polyphénol-oxydase. Pour ces dernières, la libération de l'enzyme ne commence à être significative que dans un milieu où la concentration en mannitol est inférieure à 0,15 M, alors que dans le cas des lutoïdes, elle a lieu dès que la concentration en mannitol descend au-dessous de 0,3 M.

Il apparaît ainsi que l'activité polyphénol-oxydase trouvée dans la fraction lutoïdes serait originaire d'un groupe de particules ayant une vitesse de sédimentation proche de celle des lutoïdes, ou qui, s'étant agglutinées avec ces derniers, auraient été entraînées dans le culot lors de la centrifugation.



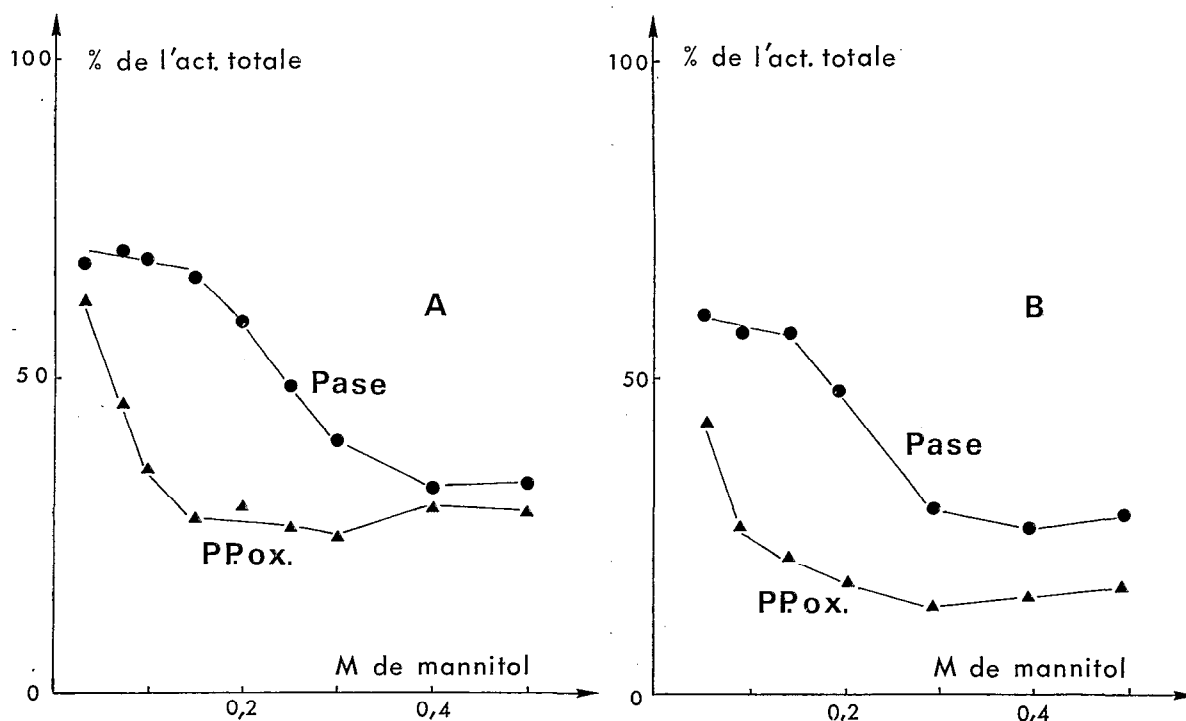


FIG. 25. — Variation des activités libres (A) et solubles (B) de la phosphatase acide (●) et de la polyphénol-oxydase (▲) en fonction de la pression osmotique du milieu. Les résultats sont rapportés aux activités totales mesurées en présence de 0,1 % de Triton X-114.

A = une expérience ; B = moyenne de 3 expériences

## MALATE-DESHYDROGENASE

### Localisation par centrifugation isopycniqque

La malate-déshydrogénase (NAD-dépendante) a été localisée dans le latex à l'aide de la centrifugation isopycniqque, et sa distribution le long du gradient a été comparée à celle de la phosphatase. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 26.

L'activité de cet enzyme se retrouve presque entièrement dans les trois dernières fractions du gradient qui correspondent au sérum du latex. La très faible activité localisée dans les fractions où la phosphatase est maximum doit très certainement être due à une légère adsorption de cet enzyme sur les lutoïdes. En conséquence, la malate-déshydrogénase n'appartient pas aux lutoïdes et paraît être un enzyme essentiellement soluble dans le latex.

## CONCLUSIONS

Les deux enzymes d'oxydo-réduction étudiés dans ce chapitre ne paraissent absolument pas liés aux lutoïdes.

La polyphénol-oxydase semble appartenir à un type de particules dont la vitesse de sédimentation serait assez voisine de celle des lutoïdes. En outre, ces organites doivent avoir une

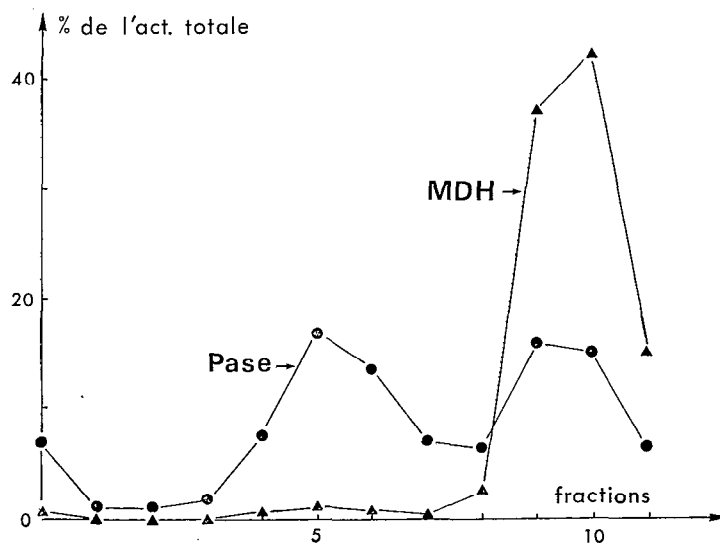


FIG. 26. — Distribution de la malate-déshydrogénase ( $\blacktriangle$ ) et de la phosphatase acide ( $\bullet$ ) après centrifugation isopycnique du latex  
 Activité totale des enzymes récupérée dans le gradient :  
 — Malate-déshydrogénase = 21,8 U./mn.  
 — Phosphatase acide = 1,4 U./mn.

membrane semi-perméable, car ils sont sensibles aux variations de la pression osmotique du milieu. Néanmoins, cette sensibilité est moins importante que celle des lutoïdes. Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux obtenus par BENDALL et De DUVE (27) sur la malate et la glutamate-déshydrogénase des mitochondries et la phosphatase acide lysosomale (figure 27). On notera en effet que la courbe d'activation des lutoïdes a la même allure que celle des lysosomes. De même, la libération de la polyphénol-oxydase présente certains caractères communs avec celle des déshydrogénases mitochondriales.

L'allure de la courbe d'activation des deux déshydrogénases représente les réactions des mitochondries, organites à double membrane, aux variations de la pression osmotique du milieu. Par ailleurs, nous venons de voir que le latex ne contient pas de mitochondries, ou alors en quantité tellement infime, qu'ils ne sont pas détectables par les méthodes biochimiques habituelles. Les seuls organites à double membrane qui ont pu être caractérisés à l'heure actuelle dans le latex sont les particules de Frey-Wyssling. Il est donc tentant de considérer la polyphénol-oxydase comme étant originaire de ces organites. Cela est d'autant plus vraisemblable que les particules de Frey-Wyssling se trouvent en quantité suffisamment grande dans le latex pour rendre compte de sa forte activité polyphénol-oxydase et qu'en outre, le maximum d'activité de cet enzyme semble se situer dans la zone présentant une coloration jaune-orangée après centrifugation isopycnique du latex. Il est bien évident que ces déductions ne peuvent que constituer la base d'une hypothèse de travail qui devra être vérifiée par la suite, à l'aide de méthodes rigoureuses.

Cependant, si la polyphénol-oxydase appartient à une structure à double membrane, cet organite devrait être, en toute logique, plus stable que les lutoïdes. Or, il ne semble pas que cela soit le cas. Il arrive souvent que dans le latex, la majorité de l'activité oxydase se retrouve sous forme soluble. Aucune explication n'a pu être donnée à ces faits. On ne peut qu'échafauder des hypothèses et supposer par exemple, que dans le latex récupéré à la sortie des laticifères, il se forme des composés susceptibles de provoquer la déstabilisation des particules de Frey-Wyssling.

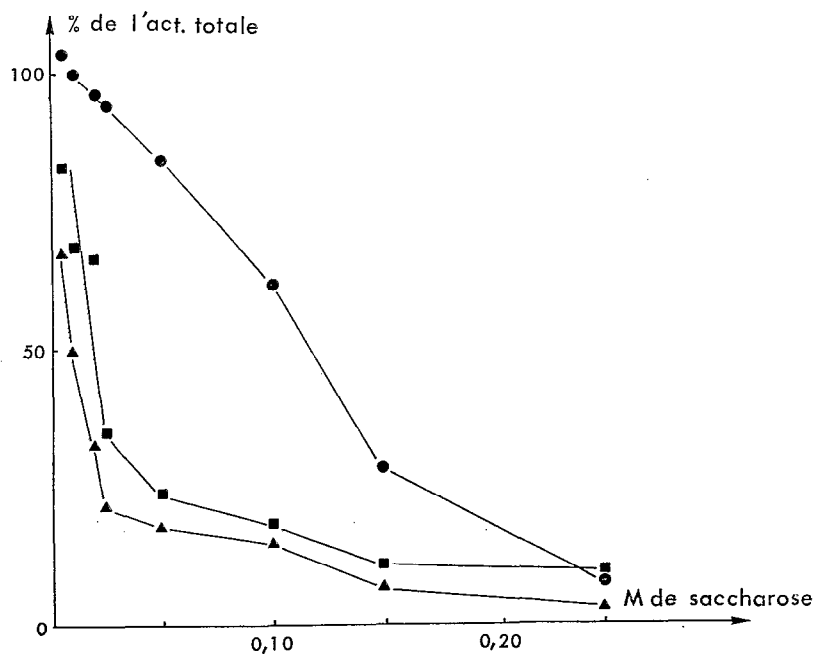


FIG. 27. — Activation osmotique de la malate-déshydrogénase (▲), de la glutamate-déshydrogénase (■) et de la phosphatase acide (●) d'une fraction mitochondriale obtenue après centrifugation d'un homogénat de foie de rat, selon BENDALL et DE DUVE (27)

La malate-déshydrogénase de son côté, se retrouve entièrement sous forme soluble. La tentative qui a été faite pour caractériser et situer les mitochondries a donc été un échec. Bien que ces organites aient pu être observés dans le latex, ils doivent être en si petit nombre qu'il n'est pas possible de les détecter par les techniques biochimiques utilisées ici. Ceci n'a rien d'étonnant en fin de compte, quand on se rappelle que pour mettre en évidence les oxydations respiratoires dans le latex, D'AUZAC (12) a dû avoir recours à l'utilisation de promoteurs marqués, tant ces oxydations sont réduites.

## Chapitre X

# ÉTUDE DE LA MEMBRANE DES LUTOIDES

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

Les lutoïdes pourraient ainsi jouer un rôle négatif, mais d'une grande importance, sur la stabilité colloïdale du latex et par là, sur la productivité de l'hévéa.

En collaboration avec RIBAILLIER, j'ai pu établir une relation inverse entre la stabilité des lutoïdes et l'activité biosynthétique du latex (20). De leur côté, PAKIANATHAN et al. (112) ont avancé l'hypothèse selon laquelle l'écoulement du latex lors de la saignée pourrait être ralenti, et même totalement arrêtée par l'éclatement des lutoïdes, à la suite de la formation de bouchons constitués par des particules coagulées, à la sortie des laticifères.

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

## Nature lipo-protéique de la membrane

On a vu précédemment que la fraction correspondant à la membrane des lutoïdes est très riche en lipides, phospholipides et protéines (cf. chapitre IV), et que les détergents sont de puissants déstabilisants de ces particules (cf. chapitre V). Ces résultats amènent naturellement à envisager que la membrane lutoïdique est de nature lipo-protéique. Cela est d'autant plus probable que les cytomembranes paraissent être toutes de cette nature (70). Il m'a cependant paru nécessaire de confirmer ce point de vue. Pour ce faire, l'action de la phospholipase C (*Clostridium perfringens*, Koch-Light, Grande-Bretagne) et de la pronase (*Streptomyces griseus*, Calbiochem, U.S.A.) sur la stabilité des lutoïdes a été étudiée.

La pronase et la phospholipase C contenant une activité phosphatase acide non négligeable, la  $\beta$ -glucosidase qui est absente des deux préparations commerciales a été prise comme enzyme témoin.

Des lutoïdes fraîchement préparés ont été soumis à des préincubations à 30°C, dans des milieux contenant du mannitol 0,3 M et :

- soit de la pronase, les suspensions étant tamponnées à pH 7,0 par un mélange imidazole-C1H 0,1 M ;
- soit de la phospholipase C, les suspensions étant comme précédemment à pH 7,0 et contenant en outre, du chlorure de calcium à la concentration de 4 mM.

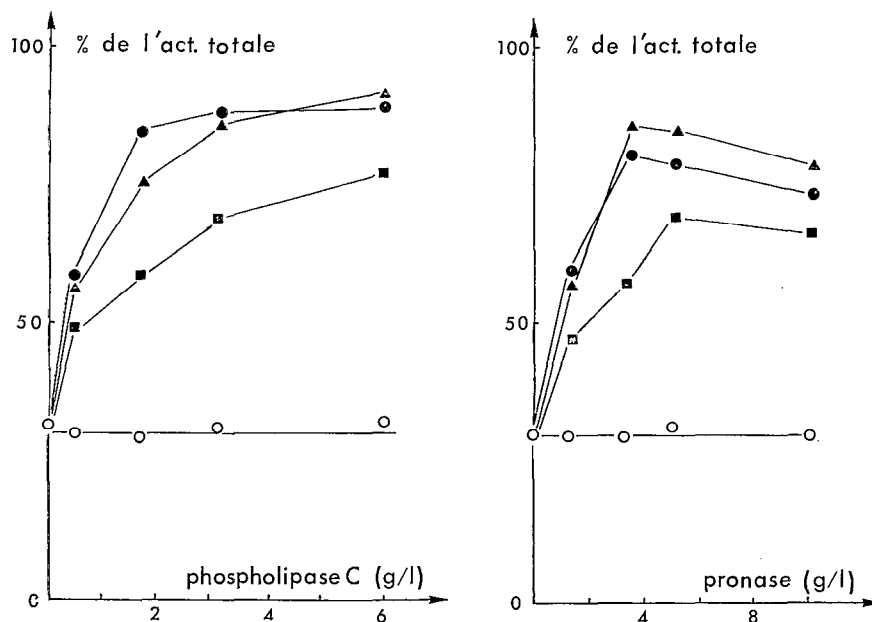


Fig. 28. — Action de la phospholipase C et de la pronase sur la libération de la  $\beta$ -glucosidase d'une suspension de lutoïdes. Les résultats sont rapportés à l'activité totale mesurée au temps zéro en présence de 0,1 % de Triton X-114. Pré-incubation de 0 mn ( $\circ$ ), 30 mn ( $\blacksquare$ ), 60 mn ( $\blacktriangle$ ) et 90 mn ( $\bullet$ ), en présence des hydrolases testées

A des intervalles de temps déterminés, un prélèvement est effectué sur chacune de ces suspensions. L'activité libre de la  $\beta$ -glucosidase est ensuite mesurée sur chaque prélèvement.

Les résultats, résumés dans la figure 28, montrent que la phospholipase C, de même que la pronase sont susceptibles d'attaquer la membrane lutoïdique et de libérer la  $\beta$ -glucosidase.

On notera que dans le cas de la pronase, les activités libres de la  $\beta$ -glucosidase obtenues au bout de 90 minutes de préincubation sont plus faibles qu'à 60 minutes. De même, au-delà d'une certaine concentration de pronase, les activités libres diminuent. Il est vraisemblable que cette protéase hydrolyse l'enzyme, dont la  $\beta$ -glucosidase, en solution dans le milieu, ce qui expliquerait la baisse d'activité constatée ici.

A la lumière de ces résultats, il apparaît donc que la membrane des lutoïdes est bien de nature lipo-protéique.

## Etude de quelques facteurs intervenant

### dans la perméabilité et la stabilité de la membrane des lutoïdes

Tout au long de cette étude, on a toujours supposé que la membrane des lutoïdes était parfaitement imperméable aux substrats extérieurs. De même, on a supposé que certains traitements, en provoquant la lyse des lutoïdes, libéraient les enzymes qui, passant en solution, deviennent alors pleinement actifs. Cependant, une analyse plus poussée des résultats obtenus montre la fragilité d'un tel point de vue.

On a vu, par exemple, que lors de la lyse osmotique, dans le cas où les hydrolases sont relativement peu actives et qu'il est nécessaire de prolonger les durées d'incubation pour leur

dosage, la libération de ces hydrolases ne se fait pas de manière identique (cf. page 56). Ces résultats peuvent aisément s'expliquer par une augmentation de la perméabilité de la membrane avec une vitesse de diffusion différente pour les divers substrats (140). Cependant, on verra par ailleurs qu'il est aussi possible d'interpréter ces résultats en supposant que les enzymes sont plus ou moins retenus dans la particule par des liaisons polaires (87).

D'autre part, pour un enzyme donné, son activité libre est constamment supérieure à son activité soluble. Cette différence peut naturellement s'interpréter comme étant la conséquence d'une adsorption ou d'une rétention mécanique de l'enzyme par des membranes et des lutoïdes entraînés par centrifugation. Néanmoins, elle est parfois trop importante pour pouvoir être expliquée aussi simplement.

C'est pour toutes ces raisons que j'ai tenté d'étudier ici le mécanisme de la libération des enzymes lutoïdiques dans certains cas particuliers. Les traitements mis en œuvre pour provoquer cette libération ont été la lyse osmotique, l'action du Triton X-114 et la lyse thermique à divers pH.

Il n'était pas possible d'étudier la libération des neuf hydrolases caractérisées dans les lutoïdes. Il fallait faire un choix parmi celles-ci. J'ai donc choisi la phosphatase acide et la  $\beta$ -glucosidase comme enzymes de références, car ce sont les hydrolases lutoïdiques les plus actives. Les variations de leurs activités libres et solubles, ainsi que celle du taux de protéines solubles ont été suivies au cours de chaque traitement.

#### — Lyse osmotique

Les résultats, donnés dans les graphiques de la figure 29, montrent que les variations du pourcentage des activités solubles des deux hydrolases de référence en fonction de la concentration en mannitol sont quasi identiques, confirmant ce qui avait été trouvé précédemment.

En ce qui concerne la phosphatase, dans la gamme de concentrations en mannitol comprises entre 0,25 et 0,50 M, les variations de son activité libre et soluble sont quasi identiques. Pour des concentrations en mannitol plus faibles, les variations de l'activité libre sont nettement plus importantes que celles de son activité soluble.

Dans le cas de la  $\beta$ -glucosidase, la courbe représentant les variations du pourcentage de son activité libre est très nettement au-dessus des autres courbes.

#### — Action du Triton X-114

On peut constater, d'après les graphiques de la figure 30, que, comme dans le cas précédent, les variations du pourcentage des activités solubles des deux hydrolases en fonction de la concentration en Triton sont presque identiques.

Pour ce qui est de la phosphatase, à faible concentration en Triton (en dessous de 0,01 %), les activités libres et solubles sont égales et restent constantes. Le Triton n'a encore aucune action destabilisatrice sur les lutoïdes. Lorsqu'on fait croître la concentration en détergent jusqu'à 0,75 % environ, l'activité soluble augmente, mais moins rapidement que l'activité libre. Au-delà de cette concentration, tous les lutoïdes sont entièrement lysés, et les deux types d'activités étudiées égalent l'activité totale.

En ce qui concerne la  $\beta$ -glucosidase libre, la courbe représentant les variations du rapport activité libre/activité totale est très nettement au-dessus des autres courbes. Son activité libre est presque égale à son activité totale dès que la concentration du milieu atteint 0,03 % de Triton.

Enfin, comme dans le cas de la lyse osmotique, la courbe représentant la solubilisation des protéines lutoïdiques en fonction de la concentration en Triton suit assez bien celles représentant le passage en solution de la  $\beta$ -glucosidase et de la phosphatase.

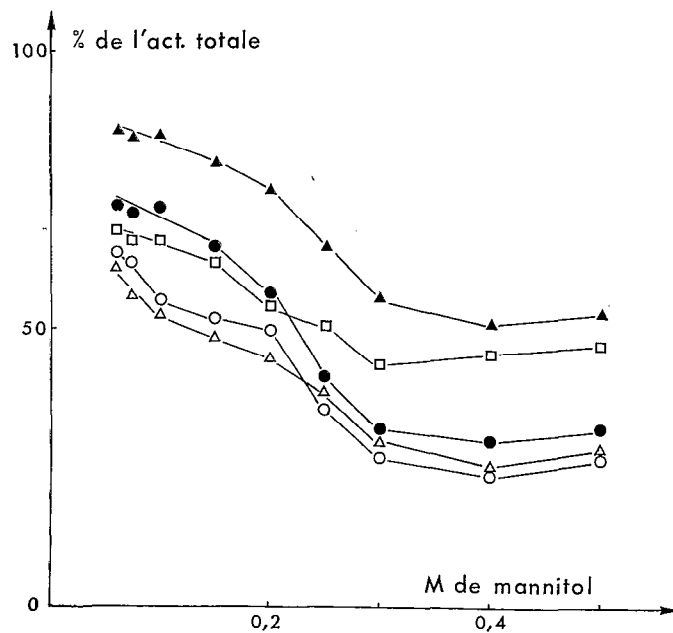


FIG. 29. — Action de la lyse osmotique sur l'activation des enzymes lutoïdiques. Des lutoïdes sont abandonnés 15 minutes environ à 0° C dans des milieux de concentrations diverses en mannitol. Les *activités libres* de ces enzymes sont ensuite mesurées directement sur une aliquote des suspensions, la concentration finale du milieu de dosage ayant été ramenée à 0,3 M en mannitol. Les *activités solubles* des hydrolases ainsi que le taux de protéines *en solution* sont mesurés sur les surnageants obtenus après centrifugation du reste des suspensions. Phosphatase acide libre (●) et soluble (○); β-glucosidase libre (▲) et soluble (△); protéines *en solution* (□); (moyenne de 4 expériences).

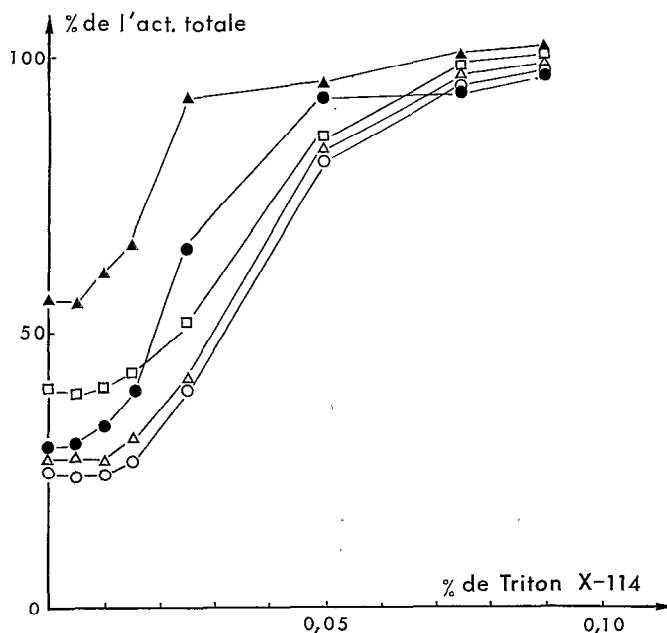


FIG. 30. — Action du Triton X-114 sur l'activation des enzymes lutoïdiques. Des lutoïdes sont abandonnés 15 minutes environ à 0° C dans des milieux contenant du mannitol 0,3 M et du Triton X-114 à diverses concentrations. Les *activités libres* sont ensuite mesurées directement sur une aliquote des suspensions. Les *activités solubles* ainsi que le taux de protéines *en solution* sont mesurés sur les surnageants obtenus après centrifugation du reste des suspensions. Phosphatase acide libre (●) et soluble (○); β-glucosidase libre (▲) et soluble (△); protéines *en solution* (□); (moyenne de 4 expériences).

### — Lyse thermique à divers pH

Des lutoïdes fraîchement préparés, en suspension dans des milieux mannitol 0,3 M tamponnés à pH 5,0, 7,0 et 8,5, ont été soumis à la lyse thermique à 30°C. A des intervalles de temps divers, des prélèvements ont été effectués. Une partie a été utilisée pour la mesure des activités libres, le reste pour celle des activités solubles après centrifugation.

On peut constater, d'après les résultats de la figure 31, que l'activation des deux hydrolases étudiées et la solubilisation des protéines dépendent étroitement du pH.

En milieu acide, la solubilisation de la phosphatase, de la  $\beta$ -glucosidase et des protéines en général croît avec la durée de la période de préincubation, phénomène qui avait été précédemment observé. Cependant, cet accroissement est nettement moins marqué que celui des activités libres de ces enzymes.

A pH 7,0, bien qu'il y ait une très nette solubilisation des protéines en fonction de la durée des préincubations, il ne semble pas que cela soit le cas pour les deux hydrolases de référence. En outre, les activités libres de ces deux enzymes augmentent au cours des préincubations, mais beaucoup moins rapidement que précédemment.

A pH 8,5, on n'observe pratiquement aucune variation des protéines et enzymes solubles au cours du temps. Par contre, les activités phosphatase et  $\beta$ -glucosidase libres vont en augmentant avec la durée des préincubations.

Enfin, on notera que, sauf à pH 7,0, la courbe représentant les variations de la  $\beta$ -glucosidase libre est constamment supérieure à celle de la phosphatase libre.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats qui viennent d'être décrits indiquent d'une manière particulièrement nette que les lutoïdes sont entourés d'une membrane lipoprotéique. Ils mettent aussi en évidence que le processus au cours duquel se produit l'activation des hydrolases et leur libération dans le milieu de suspension n'est pas un phénomène simple.

Les différences existant entre les valeurs des activités libres et solubles des deux enzymes de référence, particulièrement en ce qui concerne la  $\beta$ -glucosidase, sont parfois très importantes. Il est difficile d'en rendre responsable l'adsorption ou l'entraînement mécanique de ces protéines par les membranes ou les particules intactes. On peut imaginer *a priori* deux hypothèses afin d'éclairer ce comportement :

- 1) Suivant les conditions expérimentales, la membrane peut devenir plus ou moins perméable vis-à-vis des substances en solution dans le milieu environnant.
- 2) Il existe des liaisons enzyme-membrane au sein des lutoïdes qui font que, même lorsque les particules sont lésées, les enzymes restent plus ou moins accrochés aux membranes et sont entraînés dans le culot lors d'une centrifugation.

Ces deux points vont être examinés à la lumière des résultats expérimentaux décrits précédemment.

### 1) PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE.

On se souvient que De DUVE et son école représentent les lysosomes comme de petits sacs contenant en solution des hydrolases et dont l'enveloppe est imperméable aux substrats externes. Ce concept se dégage des résultats obtenus lors des études effectuées sur les lysosomes par APPELMANS et De DUVE (5) à partir de tissus hépatiques, par BOWERS et al. (32), à partir de tissus lymphatiques et par VAES (157) à partir de tissus osseux. Néanmoins, cette représentation



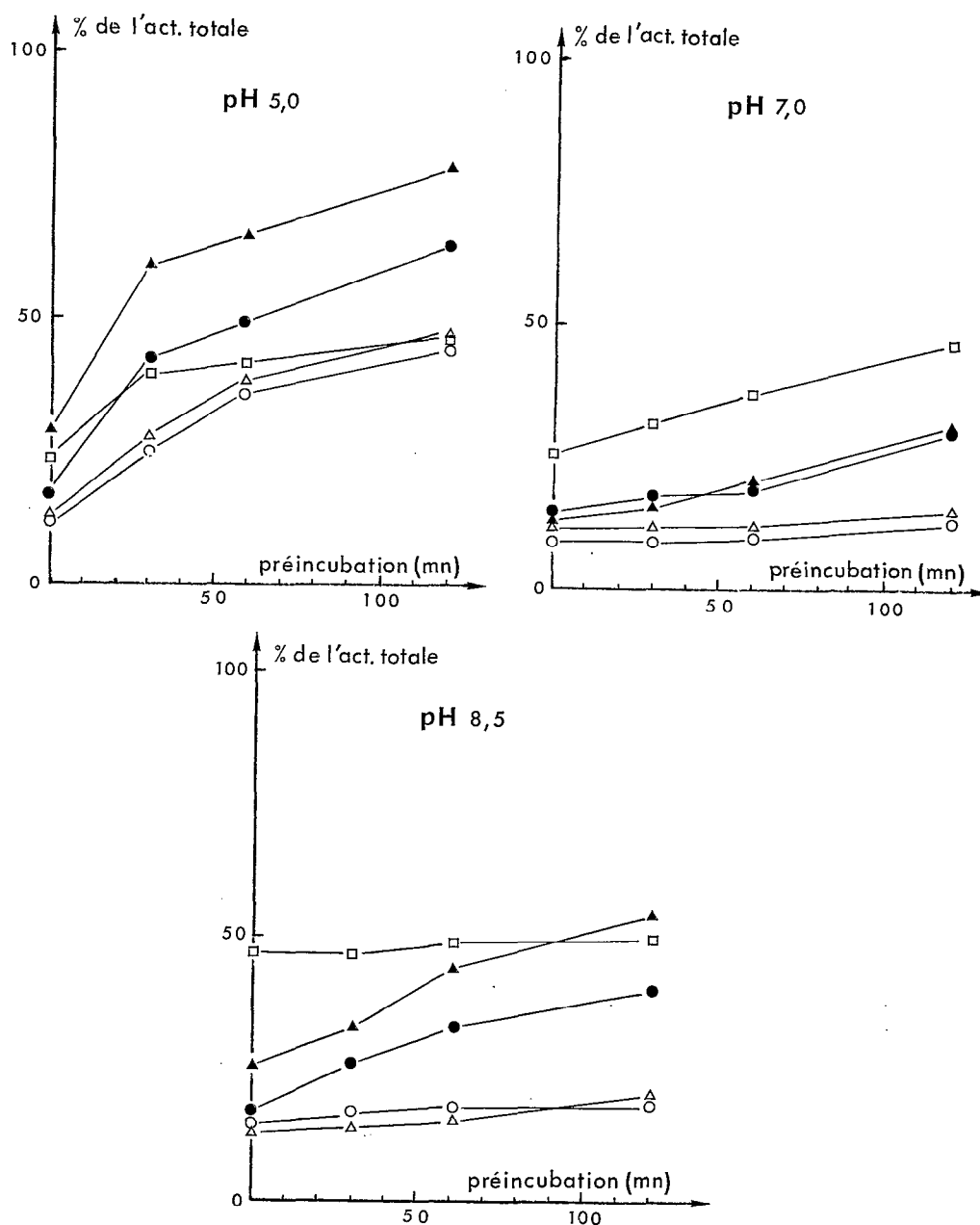


Fig. 31. — Action de la lyse thermique à 30° C et à divers pH sur l'activation des enzymes lutoïdiques. Des lutoïdes mis en suspension dans des milieux contenant du mannitol 0,3 M et tamponnés à pH 5,0 (acétate 0,1 M), 7,0 (imidazole 0,1 M) ou 8,5 (Tris-ClH 0,1 M) sont maintenus à 30° C. A des intervalles de temps déterminés, des prélèvements sont effectués sur chaque suspension. Les *activités libres* sont mesurées directement sur une partie des prélèvements. Les *activités solubles* ainsi que le taux de protéines *en solution* sont mesurés sur les surnageants obtenus après centrifugation de ce qui reste des prélèvements.

Phosphatase acide *libre* (●) et *soluble* (○);  $\beta$ -glucosidase *libre* (▲) et *soluble* (△); protéines *en solution* (□); (moyenne de 3 expériences).

*Nota*: Le dosage des hydrolases a été effectué au même pH que celui des préincubations.

a été contestée par LEVY et CONCHIE (91) à la suite des observations qu'ils ont faites sur les lysosomes de la rate. Cette opinion a été recoupée ultérieurement par les résultats de HAINSWORTH et WYNN (77) et de ROSENBERG et JANOFF (126), obtenus sur des lysosomes hépatiques.

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

Reste à vérifier ce point de vue. Pour cela, les variations des activités libres et totales de la phosphatase acide et de la  $\beta$ -glucosidase ont été étudiées en fonction de la concentration en leur substrat respectif.

Selon les résultats consignés dans le tableau VII, il est visible que, dans les conditions normales et à partir du moment où le seuil de saturation de l'enzyme en substrat est atteint, le rapport entre l'activité libre et activité totale de la phosphatase acide reste pratiquement constant. En revanche, dans le cas de la  $\beta$ -glucosidase, il n'en est plus ainsi : ce rapport va en augmentant avec la concentration en substrat. En l'occurrence, il ne fait aucun doute que la membrane des lutoïdes présente une barrière infranchissable au p-nitro-phényl-phosphate de sodium et que, par contre, elle est relativement perméable au p-nitro-phényl- $\beta$ -D-glucopyranoside. Toutefois, lorsque les lutoïdes sont partiellement lésés à la suite d'une lyse thermique à pH 5,0, la phosphatase acide devient alors relativement accessible à son substrat (tableau VII).

TABLEAU VII

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

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

Il n'a pas été possible, pour le moment, de savoir si les variations dans la perméabilité de la membrane lutoïdique sont réversibles ou non.

Ces résultats expliquent donc parfaitement pourquoi dans la plupart des cas les valeurs du rapport entre l'activité libre et l'activité totale de la  $\beta$ -glucosidase sont supérieures à celles de la phosphatase acide. En outre, ils rendent compte, au moins en partie, du fait que l'activité libre d'une hydrolase lutoïdique est plus élevée que son activité soluble lorsque ces organites sont légèrement destabilisés.

Il faut cependant remarquer qu'au cours de la lyse thermique à pH 7,0 (figure 31) les valeurs des rapports activité libre/activité totale, de la phosphatase acide et de la  $\beta$ -glucosidase sont équivalentes. A ce pH, la membrane présente donc une perméabilité identique aux deux substrats considérés.

Ainsi, *in vitro*, la perméabilité différentielle de la membrane vis-à-vis des substances dissoutes dans le milieu externe dépend de divers facteurs (dans ce cas précis, du pH du milieu).

Ce point est très important et mérite qu'on s'y attarde quelque peu. Il est en effet possible de supposer qu'*in vivo*, suivant les conditions physiologiques de la cellule, il se produise par exemple un changement de pH du cytoplasme. Certaines molécules peuvent alors éventuellement pénétrer dans les lutoïdes à la suite d'une modification de la perméabilité de la membrane ; elles sont ainsi susceptibles d'être hydrolysées, et les produits de dégradation seraient alors mis à la disposition de la cellule après avoir franchi en sens inverse la membrane pour passer dans le cytoplasme. Il est tentant d'invoquer un tel mécanisme, basé sur des variations *réversibles* dans la perméabilité de la membrane, pour expliquer l'intervention des lutoïdes dans le métabolisme cellulaire.

## 2) RÔLE DE CERTAINES LIAISONS DANS LA LIBÉRATION DES HYDROLASES ET DES PROTÉINES.

Au cours de la lyse thermique, les activités libres des deux hydrolases de référence augmentent plus ou moins rapidement quel que soit le pH du milieu. Il n'en est plus de même lorsque leurs activités solubles sont prises en considération. En effet, ces dernières varient peu en milieu neutre ou basique.

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

Pour expliquer ces résultats, on peut raisonnablement envisager que, bien qu'il y ait une lyse partielle des lutoïdes avec passage en solution des protéines, certains enzymes (phosphatase et  $\beta$ -glucosidase, dans le cas considéré) sont retenus par la membrane. Comme cette rétention dépend nettement du pH du milieu, on peut avancer l'hypothèse selon laquelle ce seraient des liaisons de nature polaire qui seraient responsables de la fixation des enzymes à la membrane.

Il est à noter, en outre, qu'à pH 8,5 le taux de protéines solubles reste constant tout au long de la préincubation. Toutefois, ce taux est nettement plus important que dans les deux autres cas ; il est de l'ordre de grandeur de celui obtenu après deux heures de lyse thermique à pH 5,0 et 7,0. Tout se passe comme si ces organites, dès leur mise en suspension dans un milieu basique, libéraient brutalement une partie de leurs protéines. Etant donné qu'au démarrage des préincubations les lutoïdes sont encore intacts, il faut bien admettre que les protéines ainsi libérées proviennent de la surface externe de la membrane où elles seraient vraisemblablement fixées sur des sites cationiques.

Pour le moment, on ne sait rien quant à la nature des protéines situées sur la face externe des membranes lutoïdiques. Les deux hydrolases qui ont été prises comme enzymes de référence paraissent être de leur côté liées d'une manière identique à la face interne de la membrane. Néanmoins, il est vraisemblable que ce dernier type de liaison n'est pas valable pour toutes les hydrolases lutoïdiques. Il n'est qu'à se rappeler les courbes de la figure 17 pour se rendre compte que la solubilisation de la phosphatase acide et de la  $\beta$ -glucosidase ne se fait pas de manière identique à celle de la cathepsine et de la phosphodiesterase lors de la lyse thermique à pH 5,0. Ce comportement n'est d'ailleurs pas particulier aux lutoïdes, SAWANT et al. (131) avaient déjà observé que les liaisons entre les hydrolases et la membrane des lysosomes hépatiques ne sont pas les mêmes pour toutes.

Enfin, on ignore à peu près tout des sites précis où ont lieu ces types de liaisons. Dans le cas des lysosomes de tissus cérébraux, KOENIG et JIBRIL (87) ont avancé l'hypothèse selon laquelle ces organites consisteraient en un complexe solide gangliosides-protéines dans lequel les hydrolases seraient retenues par liaison avec l'acide sialique ; la rupture de ces conjugaisons provoquerait l'activation des enzymes. Ce point de vue a d'ailleurs été vivement combattu. S'il est en effet difficile de retenir ce concept concernant la structure des lysosomes, on ne peut rejeter *a priori* l'existence d'une telle liaison du type protéine-glycolipide. Il est donc possible que les hydrolases lutoïdiques soient retenues à la membrane par des liaisons de même nature que celles avancées par KOENIG et JIBRIL, ou bien par des liaisons du type imidazole qui sont connues comme étant responsables de la séquestration de certains enzymes dans les mitochondries (66).

Ainsi, à la lumière de l'ensemble de ces observations, il est possible de tirer quelques conclusions concernant quelques-unes des propriétés de la membrane des lutoïdes.

Cette membrane est de nature lipo-protéique. Elle est semi-perméable et constitue une barrière infranchissable à certains substrats. Cependant, elle peut être relativement perméable à d'autres substances. Du reste, ces variations dans la perméabilité de la membrane dépendent de divers facteurs, entre autres de l'état structural de la particule ou des changements dans le pH du milieu environnant.

Enfin, on a pu remarquer que la libération et l'activation des hydrolases lors de la destabilisation expérimentale des lutoïdes ne s'effectuent pas selon un processus simple. Compte tenu des observations qui ont pu être faites, tout se passe comme si une légère destabilisation des lutoïdes aurait pour première conséquence une augmentation de la perméabilité de la membrane. Les substances pourraient alors pénétrer dans les particules et être hydrolysées, alors que celles-ci sont morphologiquement intactes. Par la suite, la destabilisation devenant plus importante, il y aurait rupture de la membrane, suivie de la solubilisation d'une partie des protéines, le reste étant plus ou moins retenu à la membrane par des liaisons vraisemblablement de nature polaire.

## DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Parvenu au terme de ce mémoire, il convient maintenant de tirer les conclusions générales qui se dégagent des résultats expérimentaux obtenus au cours de cette étude.

Le principal objectif de ce travail était de mettre en évidence le caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Dans cette intention, j'ai fait appel aux principes et à la méthodologie qui ont été codifiés par De DUVE (58) en vue du fractionnement et de l'étude des composants structuraux de la cellule.

Les principaux résultats expérimentaux seront brièvement rappelés, et les conclusions qui s'en dégageront concernant les propriétés des lutoïdes seront confrontées à celles des lysosomes hépatiques et, lorsque cela sera possible, à celles des organites végétaux présentant également le caractère lysosomal (sphérosomes).

### Caractères physiques des lutoïdes

Bien que je n'ai entrepris aucune étude morphologique des lutoïdes, il me semble cependant nécessaire de rappeler brièvement les principales caractéristiques de ces organites qui ont été établies à la suite des observations effectuées au microscope électronique par DICKENSON (47 et 48) et par SOUTHORN (146).

Les lutoïdes se présentent dans le latex comme des vésicules dont le diamètre peut varier de 2 à 10  $\mu$ . Ils possèdent une enveloppe constituée par une membrane simple de 80 à 100 Å d'épaisseur, et contiennent un stroma relativement dense aux électrons qui présente parfois des inclusions fibrillaires.

Comparativement aux lysosomes dont la taille est comprise entre 0,2 et 0,4  $\mu$  (107) et aux sphérosomes ayant un diamètre de 1  $\mu$  environ (98), les lutoïdes sont bien plus volumineux. Cependant, la structure de base (membrane simple, stroma relativement dense aux électrons, présence d'inclusions) est la même pour ces trois types d'organites.

En ce qui concerne la densité des lutoïdes ( $d = 1,15$ ), elle est nettement plus faible que celle des lysosomes ( $d = 1,22$ ) (21) et se rapprocherait assez de celle des sphérosomes ( $d = 1,11$ ) et des prosphérosomes ( $d = 1,14$ ) des feuilles de Tabac et de Maïs (98). Ces différences seraient sans doute implicables à leur richesse en lipides et phospholipides. Cependant, il ne faut pas attacher une très grande importance à la valeur absolue de la densité des lutoïdes. Elle varie d'une manière assez importante d'un latex à l'autre. En revanche, pour un latex donné, la distribution des hydrolases lutoïdiques le long d'un gradient paraît plus homogène que celle des enzymes des lysosomes ou des sphérosomes.

### Caractères biologiques des lutoïdes

On trouvera dans le tableau VIII, les différentes hydrolases dont les activités ont été mesurées dans les lutoïdes. Ces valeurs ont été calculées à partir des résultats moyens obtenus sur la fraction la plus riche en hydrolases après centrifugation isopycnique du latex (fraction 4 de

la figure 22) et elles ont été comparées aux valeurs trouvées dans la littérature pour les lysosomes et les sphérosomes.

Il est évident qu'il ne faut attacher qu'une importance toute relative aux valeurs trouvées dans le cas des lutoïdes, compte tenu de la variabilité inhérente de l'hévéa. En outre, on ne doit pas perdre de vue que les activités enzymatiques du latex dépendent dans une grande mesure de facteurs tels que l'origine clonale, le cycle végétatif, l'âge, etc. Néanmoins, les chiffres du tableau VIII ont tout de même l'avantage de permettre de situer les lutoïdes par rapport aux lysosomes des autres cellules, et d'en tirer quelques conclusions d'ordre général.

— Le latex est beaucoup plus riche en lutoïdes (13 % de l'azote protéique du latex) que le tissu hépatique ne l'est en lysosomes (7 % de l'azote total du tissu). C'est cependant l'endosperme du Tabac qui contient le plus fort pourcentage de protéines dans la fraction correspondant aux sphérosomes.

— La phosphatase acide et la  $\beta$ -glucosidase sont beaucoup plus actives dans les lutoïdes que dans les lysosomes. Par contre, pour ce qui est des autres hydrolases, leur activité est plus élevée dans le cas des lysosomes. Ces résultats doivent vraisemblablement refléter les différences de métabolisme existant entre ces deux types de cellules. On sait que le latex contient de grandes quantités de phosphore sous forme minérale (environ 10 mM de P/l de latex). La cellule laticifère est en outre, spécialisée dans la formation de caoutchouc, et la biogénèse de ce corps nécessite énormément d'énergie. Il est donc indispensable que la cellule puisse disposer d'une grande quantité de phosphate qui pourrait lui être fournie par l'intermédiaire de la phosphatase lutoïdique. D'autre part, D'AUZAC (12) a attiré l'attention sur le fait que la dégradation des glucides est d'une importance primordiale dans la biogénèse du caoutchouc. Il est possible que ce soit pour cette raison, et sans doute pour d'autres qui nous sont inconnues, que l'activité  $\beta$ -glucosidase est très intense dans les lutoïdes, afin de mettre à la disposition de la cellule les substrats nécessaires à la glycolyse et à la biosynthèse du caoutchouc.

Il n'a pas été trouvé d'enzymes d'oxydo-réduction dans les lutoïdes. Il ne semble pas non plus que les lysosomes en contiennent, bien que RAGAB et al. (121) aient noté la présence d'une déshydrogénase à NADH. Cette observation n'a jamais été confirmée, et le problème des oxydases au sein des lysosomes est trop important pour que cette question ne soit pas approfondie. Il est fort possible que cette déshydrogénase soit une impureté en provenance des microsomes. Quant à la présence de deux oxydo-réductases (NADH-cytochrome-c-réductase et NADH-dichloro-phénol-indophénol diaphorase) et de deux aminotransférases (glutamate-oxalacétate et glutamate-pyruvate transaminase) signalées par MATILE (96 et 97) dans des particules lysosomales provenant des cellules de radicules de plant de Maïs, elle demande à être vérifiée. Ces deux oxydo-réductases sont connues comme appartenant aux membranes du réticulum endoplasmique (67) et les deux transaminases, aux mitochondries et à la fraction soluble (64). Il est possible que ces activités soient des artefacts provenant de débris de membranes adsorbés par des particules lysosomales.

## Caractères de la membrane des lutoïdes

### Activation et libération des hydrolases

Comme dans le cas des lysosomes, les lutoïdes possèdent une membrane de nature lipoprotéique. Alors qu'il est généralement admis que le cholestérol est un important constituant de la membrane lysosomale, GOMEZ et SOUTHORN (75) suggèrent que dans le cas des lutoïdes, ce corps est remplacé par le  $\beta$ -sitostérol. Le fait que je n'ai jamais pu observer une action stabili-

satrice du cholestérol sur les lutoïdes alors qu'il est très efficace dans le cas des lysosomes *in vitro* (65), semble apporter quelque soutien à ce point de vue. Il serait toutefois intéressant d'étudier l'action du  $\beta$ -sitostérol sur la stabilité des lutoïdes.

On admet généralement que la membrane des lysosomes intacts est imperméable aux substrats externes. De nombreux résultats expérimentaux sont venus étayer cette conception qui est par ailleurs, contestée par d'autres auteurs sur la base de leurs propres résultats. Le problème de la perméabilité de la membrane lysosomale reste donc posé. Mais en ce qui concerne les lutoïdes, il apparaît nettement que ses hydrolases peuvent être plus ou moins accessibles aux substrats. Ces variations dans la perméabilité de la membrane dépendent par ailleurs, de l'état structural de la particule, ainsi que des conditions externes, et plus particulièrement du pH.

Enfin, les traitements mettant en cause l'intégrité de la membrane des lutoïdes entraînent *ipso facto* l'activation des hydrolases. Le processus de cette activation semblerait se dérouler en deux temps. Au début, lorsque la déstabilisation est légère, la perméabilité de la membrane augmenterait, permettant ainsi aux enzymes, d'attaquer leurs substrats. Il y aurait ensuite rupture de la membrane et libération des protéines lutoïdiques. Une partie passerait alors en suspension dans le milieu externe, le reste serait retenu à la membrane par des liaisons vraisemblablement du type polaire.

Les traitements provoquant la lyse des lutoïdes sont de même nature que ceux qui entraînent la déstabilisation des lysosomes.

## Fonctions des lutoïdes

Alors que les différents aspects fonctionnels des lysosomes dans la cellule commencent à être bien connus, dans le cas des lutoïdes on est réduit à des hypothèses et à des présomptions quant à leur rôle au sein de la cellule laticifère.

La présence d'un large spectre d'hydrolases dans les lutoïdes implique nécessairement un rôle dans les phénomènes de dégradation. Le problème est de savoir si le processus qui se déroule est le même que dans les cellules animales où le corps à digérer est absorbé par des phagosomes qui, après fusion avec des lysosomes primaires, forment des vacuoles digestives dans lesquelles s'effectuent les phénomènes de dégradation.

De nombreux auteurs ont souligné l'étroite relation entre l'absorption de colorants vitaux comme le rouge neutre, et celle des protéines, car ils se concentrent dans les mêmes types d'organites. Or, il est bien connu que les lutoïdes absorbent facilement le rouge neutre. Je l'ai vérifié de mon côté, et j'ai pu constater que cette absorption est de nature passive, c'est-à-dire qu'elle a lieu même avec des lutoïdes séparés du latex. En outre, après avoir provoqué une lyse totale des lutoïdes colorés au rouge neutre, une faible partie seulement du colorant passe en solution, la majorité restant fixée aux membranes. Il est plus que probable que ce colorant basique se concentre dans les lutoïdes en raison de la nature cationique de ses protéines, et que cette absorption purement physique n'ait rien de commun avec la pinocytose.

J'ai alors essayé de mettre en évidence d'une autre manière cette pinocytose : en ajoutant au latex fraîchement recueilli, soit du prométhéum colloïdal préparé selon la méthode de RAHMAN et LINDENBAUM (123), soit de la ribonucléase, soit de la ferritine. Dans aucun cas, je n'ai pu observer une absorption de ces produits par les lutoïdes. Enfin, il n'est signalé nulle part dans la littérature, que l'on ait observé des organites, tels que des mitochondries par exemple, en voie de digestion dans les lutoïdes.

Ces échecs dans les tentatives de mise en évidence d'une éventuelle « activité pinocytique » des lutoïdes ne signifient nullement que ces particules ne soient pas aptes à remplir une telle fonction, mais il n'y a à l'heure actuelle aucune preuve expérimentale permettant de parler de pinocytose dans le cas des lutoïdes. Il faut cependant reconnaître que les méthodes biochimiques

ques sont assez mal adaptées pour effectuer de telles recherches. Ce problème pourrait être abordé plus aisément en faisant appel à la microscopie électronique qui est mieux appropriée à ce genre d'étude.

Dans le domaine de la physiologie de l'écoulement du latex, le rôle des lutoïdes devient plus clair. Ils interviennent dans ce processus d'une manière négative, qui présente toutefois une certaine importance.

De la stabilité des lutoïdes, dépend l'activité biosynthétique du latex, c'est-à-dire sa capacité à transformer l'écétate marqué en caoutchouc radioactif. En outre, lorsqu'ils libèrent leur contenu, les lutoïdes peuvent provoquer des perturbations dans la stabilité colloïdale du latex ainsi que l'arrêt de son écoulement par suite de la formation de micro-bouchons de coagulum qui entraînent l'obturation des vaisseaux laticifères (112 et 147).

A la suite de la lyse des lutoïdes, on peut admettre que la libération des hydrolases, et particulièrement de la cathepsine, provoque la dégradation de la couche lipo-protéique qui maintient la stabilité colloïdale des particules de caoutchouc. De plus, les lutoïdes contiennent des ions calcium, leur libération dans le latex où il existe une phospholipase peut entraîner l'activation de cet enzyme qui viendrait ainsi augmenter les effets de la cathepsine sur la couche protectrice des particules de caoutchouc.

Cependant, SOUTHORN (147) pense que la déstabilisation du latex par les lutoïdes serait due en très grande partie à la neutralisation des protéines du sérum, qui sont principalement du type anionique, par les protéines cationiques des lutoïdes. En outre, TATA et YIP (153) ont séparé des lutoïdes, une protéine de point isoélectrique très haut qui possède une très forte action destabilisatrice sur le latex.

En fin de compte, si le mode d'action des lutoïdes sur la coagulation du latex n'est pas encore clair, leur rôle dans la stabilité colloïdale des particules de caoutchouc semble bien établi et même primordial.

Enfin, dans les cas extrêmes, leur déstabilisation *in vivo* pourrait être la cause des accidents physiologiques de saignée, connus sous le nom de « Brown-bast disease ». Ces accidents atteignent plus particulièrement les hévéas hauts producteurs ou ceux soumis à une exploitation intensive (40). Ils se manifestent généralement par un brunissement de l'écorce ainsi que l'éclatement du panneau de saignée, et dans les cas les plus graves, l'écorce peut se nécroser. Il est à noter que ce genre de phénomène présente de grandes analogies avec les nécroses tissulaires provoquées par la déstabilisation des lysosomes (22). C'est encore un point commun supplémentaire entre les lutoïdes et les lysosomes.

\*\*

L'ensemble de toutes ces observations permet maintenant de définir les lutoïdes avec suffisamment de précision. Du reste, leurs propriétés ainsi que celles des lysosomes et des sphérosomes ont été rassemblées dans le tableau VIII. Il donne les principales caractéristiques des lutoïdes qui sont les suivantes :

— Ces particules sont entourées d'une membrane simple, semi-perméable, et de nature lipo-protéique.

— Ils contiennent un large spectre d'enzymes hydrolytiques du type acide susceptibles de dégrader la majorité des composés biologiques de la cellule. Normalement, ces hydrolases ne sont pas, ou sont difficilement accessibles aux substrats externes.

— Lorsqu'il y a lyse de la particule, elle entraîne la libération des enzymes qui deviennent alors pleinement actifs. Cette lyse peut être obtenue expérimentalement par divers traitements mettant en cause l'intégrité de la membrane.



TABLEAU VIII

Caractères envisagés	Lutoïdes	Lysosomes	Sphérosomes
<b>MORPHOLOGIQUE</b>			
diamètre.	2 à 10 $\mu$	0,2 à 0,4 $\mu$	1 $\mu$ environ
membrane.	simple, semi-perméable	simple, semi-perméable	simple, semi-perméable
<b>BIOCHIMIQUE</b>			
protéines.	13 % du latex	7 % du tissu hépatique.	23 % de l'endosperme de tabac (e)
<i>Hydrolases.</i>			
phosphatase acide.	2,2 U./mg prot. (a)	1,0 U./mg N tot. (c)	0,25 U./mg prot. (e)
$\beta$ -glucosidase.	0,6 »	0,22.10 <sup>-3</sup> U./mg prot. (d)	++
phosphodiesterase.	66,3.10 <sup>-3</sup> »	++	—
$\beta$ -N-acétyl-glucosaminidase.	33,2.10 <sup>-3</sup> »	1,13 U./mg N tot. (g)	—
cathepsine.	22,7.10 <sup>-3</sup> »	0,26 » (c)	0,08 U./mg prot./mg prot. (e)
$\beta$ -galactosidase.	20,4.10 <sup>-3</sup> »	0,44 » (g)	++
estérase.	2,0.10 <sup>-3</sup> » (b)	2,71 » (f)	0,29 U./mg prot. (e)
ribonucléase.	7,9.10 <sup>-3</sup> » (a)	0,38 » (c)	6,5.10 <sup>-3</sup> »
désoxyribonucléase.	5,1.10 <sup>-3</sup> »	0,17 »	4,5.10 <sup>-3</sup> »
$\beta$ -glucuronidase.	0	9,3.10 <sup>-3</sup> »	++
aryl-sulfatase.	0	0,7 » (h)	++
<i>Enzymes d'oxydo-réduction.</i>	0	déshydrogénase à NADH ?	cytochrome réductase ?
<i>Autres enzymes.</i>	?	0	diaphorase ? aspartate et alanine amino-transférase ?
<b>DE LA MEMBRANE</b>			
nature.	lipo-protéique	lipo-protéique	lipo-protéique
perméabilité.	présente une certaine perméabilité suivant les conditions expérimentales.	en principe imperméable	?
activation des enzymes.	choc osmotique. lyse thermique à pH 5,0. agents tensio-actifs. enzymes protéolytiques. lécithinase.	choc osmotique. lyse thermique à pH 5,0. agents tensio-actifs. enzymes protéolytiques. lécithinase. forces mécaniques. ultra-sons, etc...	agents tensio-actifs.
liaisons enzyme-membrane.	liaisons vraisemblablement du type polaire rouge neutre.	liaisons vraisemblablement du type polaire rouge neutre.	
coloration vitale.			sulfate de berbérine.
<b>FONCTIONNEL</b>	commande la stabilité colloïdale du latex.	— endocytose.  — désintoxication cellulaire. — régression tissulaire. — nécrose, etc...	— dégradation autolytique du matériel tissulaire ?

(a) chiffres tirés des résultats obtenus sur la fraction 4 d'une centrifugation isopycnique du latex.  
(b) chiffre tiré du tableau V.  
(c) résultats de DE DUVE et al. (62).  
(d) résultats de BECK et TAPPEL (26).  
(e) résultats de MATILE et SPICHER (101).  
(f) résultats de HOLT et al. (78).  
(g) résultats de SELLINGER et al. (137).  
(h) résultats de TAPPEL et al. (151).

Ces caractéristiques répondent parfaitement à la définition physico-chimique des lysosomes. Il existe cependant certaines différences entre ces deux types d'organites. Entre autres, leurs tailles, leur bagage enzymatique ainsi que l'activité de leurs enzymes. En outre, leurs réactions vis-à-vis de certains traitements ne sont pas identiques ; les lutoïdes, par exemple, sont plus résistants que les lysosomes à la lyse osmotique et à la lyse thermique.

Ces différences sont cependant minimales, et somme toute, assez normales quand on songe que ces deux types de particules proviennent de cellules totalement différentes. Par contre, comme on vient de le voir, ils possèdent de très nombreux points communs. Les analogies sont en fin de compte, nettement plus importantes que les différences. Il semble donc justifié de considérer les lutoïdes comme des structures cellulaires qui, dans le latex, correspondent aux lysosomes de la cellule animale.

\*

\*\*

Ayant tiré les conclusions qui s'imposaient à la suite de cette étude, il convient maintenant de souligner les insuffisances qu'elle comporte.

La principale concerne les fonctions des lutoïdes au sein de la cellule laticifère, car elles n'ont pas pu être définies avec précision.

Il se pose ensuite, le problème de la stabilité de ces particules. S'il est aisé de provoquer leur lyse expérimentale, en revanche, le déterminisme de leur déstabilisation dans le latex ou dans la cellule laticifère reste encore très obscure. Ce point mérite d'être approfondi, car il présente une très grande importance dans le cadre de la productivité de l'hévéa.

Enfin, on ignore tout de l'ontogénèse des lutoïdes, ni par quel mécanisme leur population se maintient à une forte concentration lors de l'écoulement du latex.

Les réponses à toutes ces questions ne pourraient être données à l'aide des seules méthodes d'investigations biochimiques. Il faudra nécessairement faire appel à la microscopie, et spécialement à la microscopie électronique. C'est à l'aide de ces deux voies d'approche qu'il sera peut-être possible de résoudre un jour ces problèmes.

D'un point de vue plus général, dans l'étude des particules à caractère lysosomal, le latex s'est révélé comme un matériel de choix. Les lutoïdes y sont en effet en forte concentration et faciles à séparer. En outre, ayant affaire à un homogénat naturel, le broyage préliminaire, toujours mutilant pour les structures, est ici parfaitement inutile.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALLISON A., 1967. — Lysosomes and disease. *Sci. Amer.*, 217, 62-72.
- (2) ALTMAN R. F. A., 1940. — Organische analyse van Hevea-latex. IV. Aminozuren. *Arch. V. Rubbercult.*, 24, 267-654.
- (3) ANDERSON N. G. et BURGER C. L., 1961. — Separation of cell components in the zonal ultracentrifuge. *Science*, 136, 646-648.
- (4) ANDREWS E. H. et DICKENSON P. B., 1960. — Preliminary electron microscope observations on the ultra-structure of the latex vessel and its contents in young tissues of *Hevea brasiliensis*. *Proceed. Rubb. Res. Conf., Kuala-Lumpur*, 756-765.
- (5) APPELMANS F. et de DUVE C., 1955. — Tissue fractionation studies. 3) Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles. *Biochem. J.*, 59, 426-433.
- (6) APPELMANS F., WATTIAUX R. et DE DUVE C., 1955. — Tissue fractionation studies. 5) The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat-liver. *Biochem. J.*, 59, 438-445.
- (7) ARCHER B. L., 1960. — The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem. J.*, 75, 236-240.
- (8) ARCHER B. L., AUDLEY B. G., COCKBAIN E. G. et McSWEENEY G. P., 1963. — The biosynthesis of rubber. Incorporation of mevalonate and isopentenylpyrophosphate into rubber by *Hevea brasiliensis* latex fractions. *Biochem. J.*, 89, 565-574.
- (9) ARCHER B. L. et COCKBAIN E. G., 1955. — The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 2) Isolation of the  $\alpha$ -globulin of fresh latex serum. *Biochem. J.*, 61, 508-512.
- (10) ARCHER B. L. et McSWEENEY G. P., cité par FOURNIER P. et TUONG-CHI-CUONG, 1961. — The biosynthesis of rubber. *Rubb. Chem. Technol.*, 34, 1229-1305.
- (11) AUDLEY B. G., 1964. — Studies of an organelle in Hevea latex containing helical protein microfibrils. *Proceed. Nat. Rubb. Prod. Res. Assoc., Jubilee Conf., Cambridge*, 67-79.
- (12) D'AUZAC J., 1965. — Etude de quelques réactions métaboliques liées, au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*, à la biosynthèse du caoutchouc. *Thèse Doctorat d'Etat*, n° 5447, Paris.
- (13) D'AUZAC J. et JACOB J.-L., 1968. — Inhibition par l'A.T.P. de la malate-déshydrogénase, de l'alcool-déshydrogénase et de la lactate-déshydrogénase du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 143-156.
- (14) D'AUZAC J. et PUJARNISCLE S., 1959. — Sur les différentes formes de phosphore présentes dans le latex d'hévéa. *Rev. Gén. Caout.*, 36, 862-870.
- (15) D'AUZAC J. et PUJARNISCLE S., 1959. — Les glucides de l'*Hevea brasiliensis*. Etude qualitative. *Rev. Gén. Caout.*, 36, 1687-1692.
- (16) D'AUZAC J. et PUJARNISCLE S., 1959. — Analyse des acides organiques fixes du latex. *Rapp. Ann. Inst. Rech. Caout. Viêt-nam*, 49-50 et 58-59.
- (17) D'AUZAC J. et PUJARNISCLE S., 1959. — Acides aminés libres du latex. *Rapp. Ann. Inst. Rech. Caout. Viêt-nam*, 51-52.
- (18) AVERS C. J. et KING E. E., 1960. — Histochemical evidence of intracellular enzymatic heterogeneity of plant mitochondria. *Amer. J. Bot.*, 47, 220-225.
- (19) BALZ H. P., 1966. — Intrazelluläre lokalisation und funktion von hydrolytischen enzymen bei tabak. *Planta.*, 70, 207-236.
- (20) BANDURSKI R. S. et TEAS H. J., 1957. — Rubber biosynthesis in latex of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol.*, 32, 643-648.

- (21) BEAUFAY H., BENDALL D. S., BAUDHUIN P., WATTIAUX R. et DE DUVE C., 1959. — Tissue fractionation studies. 13) Analysis of mitochondrial fractions from rat-liver by density gradient centrifuging. *Biochem. J.*, 73, 628-637.
- (22) BEAUFAY H., Van CAMPENHOUT E. et DE DUVE C., 1959. — Tissue fractionation studies. 11) Influence of hepatotoxic treatments on the state of bound enzymes in rat-liver. *Biochem. J.*, 73, 617-623.
- (23) BEAUFAY H. et DE DUVE C., 1959. — Tissue fractionation studies. 9) Enzymatic release of bound hydrolases. *Biochem. J.*, 73, 604-609.
- (24) BEAUFAY H., JACQUES P., BAUDHUIN P., SELLINGER O. Z., BERTHET J. et DE DUVE C., 1964. — Tissue fractionation studies. 18) Resolution of mitochondrial fractions from rat-liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem. J.*, 92, 184-205.
- (25) BEAUFILS E.-R.-B., 1961. — Les déséquilibres dans la composition chimique de l'hévéa. La méthode du diagnostic physiologique. *Thèse d'Ingénieur Docteur*, n° 700, Paris.
- (26) BECK C. et TAPPEL A. L., 1968. — Rat-liver lysosomal  $\beta$ -glucosidase. A membrane enzyme. *Biochem. Biophys. Acta*, 151, 159-164.
- (27) BENDALL D. S. et DE DUVE C., 1960. — Tissue fractionation studies. 14) The activation of latent deshydrogenase in mitochondria from rat-liver. *Biochem. J.*, 74, 444-450.
- (28) BERTHOLD G., 1886. — *Studien über protoplasm mechanick*, Leipzig.
- (29) BOBILIOFF W., 1923. — Anatomy and physiology of *Hevea brasiliensis*. *Zurich Art. Inst.*, Orell Füssli.
- (30) BOLLE-JONES E. W., 1961. — Nutrition of *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 14, 183-207, 209-230 et 231-256.
- (31) BOWERS W. E. et DE DUVE C., 1967. — Lysosomes in lymphoid tissue. II) Intracellular distribution of acid hydrolases. *J. Cell. Biol.*, 32, 339-348.
- (32) BOWERS W. E., FINKENSTAEDT J. T. et DE DUVE C., 1967. — Lysosomes in lymphoid tissue. I) The measurements of hydrolytic activities in whole homogenates. *J. Cell. Biol.*, 32, 325-337.
- (33) BRASSE M., 1951. — Density-gradient centrifugation. A new separation technique. *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 1847-1848.
- (34) BUTTROSE M. S., 1963. — Ultrastructure of the developing aleurone cells of wheat grain. *Aust. J. Biol. Sci.*, 16, 768-774.
- (35) BUTTERY B. R. et BOATMAN S. G., 1964. — Turgor pressures in phloem. Measurements on *Hevea latex*. *Science*, 145, 285-286.
- (36) CHESTERTON C. J. et KECKWICK R. G. O., 1968. — Formation of  $\Delta$ -3-isopentenyl-monophosphate and pyrophosphate in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 76-85.
- (37) CLAUDE A., 1946. — Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. I) Problems, methods and preparation of extracts. *J. Exp. Med.*, 84, 51-59.
- (38) CLAUDE A., 1946. — Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. II) Experimental procedures and results. *J. Exp. Med.*, 84, 61-89.
- (39) COHN Z. A., HIRSCH J. G. et WIENER E., 1963. — The cytoplasmic granules of phagocytic cells and the degradation of bacteria. In *Lysosomes, Ciba Fund. Symp.*, DE REUCK A. V. S. et CAMERON M. P., Ed. J. et A. CHURCHILL, Londres, 126-144.
- (40) COMPAGNON P., TIXIER P. et ROUJANSKY G., 1953. — Contribution à l'étude des accidents physiologiques de saignée. *Arch. Rubb. Cult.*, Extra-number., 54-69.
- (41) CONCHIE J. et LEVY G. A., 1957. — Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration. *Biochem. J.*, 65, 389-395.
- (42) COOK A. S. et SEKHAR B. C., 1955. — Fractions from *Hevea brasiliensis* latex centrifuged at 59.000 g. *J. Rubb. Inst. Malaya*, 14, 163-167.

- (43) CORBETT J. R. et PRICE C. A., 1967. — Intracellular distribution of p-nitro-phenylphosphatase in plants. *Plant Physiol.*, 42, 827-830.
- (44) CRONSHAW J., 1964. — Crystal containing bodies of plant cells. *Protoplasma*, 59, 318-325.
- (45) DANZIANI M. U., 1963. — Lysosomes changes in liver injury. In *Lysosomes, Ciba Fund. Symp.*, DE REUCK A. V. S. et CAMERON M. P. Ed., J. et A. CHURCHILL, Londres, 335-352.
- (46) DICKEN C. H. et DECKER R. H., 1966. — Biochemical evidence for the presence of lysosomes in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 47, 426-431.
- (47) DICKENSON P. B., 1964. — The ultra-structure of the latex vessels of *Hevea brasiliensis*. *Proceed. Nat. Rubb. Prod. Res. Assoc., Jubilee Conf.*, Cambridge, 52-66.
- (48) DICKENSON P. B., 1968. — Electron microscopical studies of the latex vessel of *Hevea brasiliensis*. *Nat. Rubb. Conf. Kuala-Lumpur*, Preprint.
- (49) DINGLE J. T., 1963. — Action of vitamin A on the stability of lysosomes *in vivo* and *in vitro*. In *Lysosomes, Ciba Fund. Symp.*, DE REUCK A. V. S. et CAMERON M. P. Ed., J. et A. CHURCHILL, Londres, 384-397.
- (50) DRACKE G. V., 1951. — The amino-acid constituents of the proteins of Hevea latex. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.*, 13, 145.
- (51) DUCET G., 1949. — Etude des variations des différentes formes de la choline au cours de la croissance de quelques végétaux. *Ann. Agron.*, 19, 184-260.
- (52) DUCET G., 1960. — Fractionnement cellulaire de feuilles par centrifugation en gradient de densité. *Ann. Physiol. Vég.*, 1, 19-28.
- (53) DE DUVE C., 1958. — Les lysosomes. *Bull. Acad. Roy. Med. Belgique.*, 23, 608-618.
- (54) DE DUVE C., 1959. — Lysosomes a new group of cytoplasmic particles. In *Subcellular particles*. HAYASHI T. Ed., The Ronald Press Co., New-York, 128-159.
- (55) DE DUVE C., 1960. — La localisation des enzymes dans les éléments figurés des cellules. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42, 11-29.
- (56) DE DUVE C., 1960. — Intracellular localization of enzymes. *Nature.*, 187, 836.
- (57) DE DUVE C., 1963. — The lysosome concept. In *Lysosomes, Ciba Fund. Symp.* DE REUCK A. V. S. et CAMERON M. P. Ed., J. et A. CHURCHILL, Londres, 1-31.
- (58) DE DUVE C., 1964. — Principles of tissue fractionation. *J. Theor. Biol.*, 6, 33-59.
- (59) DE DUVE C. et BAUDHUIN P., 1966. — Peroxysomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.*, 46, 323-357.
- (60) DE DUVE C. et BEAUFAY H., 1959. — Tissue fractionation studies. 10) Influence of ischemia on the state of some bound enzymes in rat-liver. *Biochem. J.*, 73, 610-616.
- (61) DE DUVE C., BERTHET J. et BEAUFAY H., 1959. — Gradient centrifugation of cells particles. Theory and applications. *Progr. Biophys.*, 9, 325-369.
- (62) DE DUVE C., PRESSMAN B. C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS F., 1955. — Tissue fractionation studies. 6) Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, 60, 604-617.
- (63) DE DUVE C. et WATTIAUX R., 1966. — Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.*, 28, 435-492.
- (64) DE DUVE C., WATTIAUX R. et BAUDHUIN P., 1962. — Distribution of enzymes in animal tissues. *Adv. Enzymol.*, 24, 291-358.
- (65) DE DUVE C., WATTIAUX R. et WIBO M., 1962. — Effects of fat-soluble compounds on lysosomes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 9, 97-116.
- (66) EGGER E. et RAPOPORT S., 1963. — Role of non-covalent bonds for the holding, activation and release of mitochondrial enzymes. *Nature.*, 200, 240-242.
- (67) ERNSTER L., SIEKVITZ P. et PALADE G. E., 1963. — Enzyme-structure relationships in the endoplasmic reticulum of rat-liver. *J. Cell Biol.*, 15, 541-562.
- (68) FOURNIER P. et TUONG-CHI-CUONG., 1961. — The biosynthesis of rubber. *Rubb. Chem. Technol.*, 34, 1230-1305.

- (69) FREY-WYSSLING A., 1929. — Microscopisch onderzoek naar het voorkomen van harsen in latex van hevea. *Arch. Rubbercult.*, 13, 394-434.
- (70) FREY-WYSSLING A. et MUHLETHALER K., 1965. — Ultrastructural plant cytology. Elsevier Publish. Co., Londres.
- (71) GAHAN P. B., 1965. — Histochemical evidence for the presence of lysosome-like particles in root meristem cells of *Vicia fabia*. *J. Exp. Bot.*, 16, 350-355.
- (72) GAHAN P. B. et MCLEAN J., 1967. — Acid phosphatase in roots of *Vicia fabia*. *Biochem. J.*, 102, 47 p-48 p.
- (73) GENÈVES L., LANCE A. et BUVAT R., 1958. — Sur la présence dans le cytoplasme, et sur la nature ergastoplasmique de constituants figurés analogues aux « lysosomes » ou aux « dense-bodies » des cellules animales. *C.R. Acad. Sci.*, 247, 2028-2029.
- (74) GIANETTO R. et DE DUVE C., 1955. — Tissue fractionation studies. 4) Comparative study of the binding of acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles. *Biochem. J.*, 59, 433-438.
- (75) GOMEZ J. B. et SOUTHOORN W. A., 1968. — Studies on lutoïd membrane ultra-structure. *Nat. Rubb. Conf. Kuala-Lumpur*. Preprint.
- (76) DE HAAN-HOMANS L. N. S., 1950. — Oxydation processes in latex of *Hevea brasiliensis*. *Ind. Rubb. Ind. Trans.*, 25, 346-363.
- (77) HAINSWORTH B. et WYNN C. H., 1966. — The permeability of lysosomal membrane to glycerol, sorbose and p-nitrophenol. *Biochem. J.*, 101, 9 p.
- (78) HOLT S. J., BEAUFAY H. et DE DUVE C., 1956. — Intercellular localization of esterase in rat-liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 635-637.
- (79) HOLTER H., 1952. — Localization of enzymes in cytoplasm. *Adv. Enzymol.*, 13, 1-20.
- (80) HOLTER H., OTTESEN M. et WEBER R., 1953. — Separation of cytoplasmic particles by centrifugation in density-gradient. *Experientia.*, 9, 346-348.
- (81) HOMANS L. N. S. et VAN GILS G. E., 1948. — Fresh Hevea latex. A complex colloïdal system. *Proceed. Sec. Rubb. Technol. Conf.*, Londres, 292-302.
- (82) HSIA R. Ch., 1958. — Oxygen absorption by *Hevea brasiliensis* latex. *Ind. Rubb. Ind. Trans.*, 34, 267-290.
- (83) HSU L. et TAPPEL A. L., 1964. — Lysosomal enzymes of rat intestinal mucosa. *J. Cell. Biol.*, 23, 233-240.
- (84) JAMES W. O. et DAS V. R. S., 1957. — The organization of respiration in chlorophyllous cells. *New Phytol.*, 56, 325.
- (85) JENSEN W. A., 1956. — The cytochemical localization of acid phosphatase in root tip cells. *Amer. J. Bot.*, 43, 50-54.
- (86) KARUNAKARAN A., MOIR G. F. J. et TATA S. J., 1960. — The proteins of Hevea latex: Ion exchange chromatography and starch gel electrophoresis. *Proceed. Nat. Rubb. Res. Conf. Kuala-Lumpur.*, 798-808.
- (87) KOENIG H. et JIBRIL A., 1962. — Acid glycolipids and the role of ionic bonds in the structure-linked latency of lysosomal hydrolases. *Biochem. Biophys. Acta.*, 65, 543-545.
- (88) KRISCH K., 1966. — Reaction of microsomal esterase from hog-liver with diethyl-p-nitrophenylphosphate. *Biochem. Biophys. Acta.* 122, 265-280.
- (89) LANCE C., 1963. — Recherche sur la croissance et le métabolisme respiratoire des tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés « in vitro ». *Thèse Doctorat d'Etat*, n° 4063, Paris.
- (90) LEJEUNE N., THINES-SEMPOUX D. et HERS G., 1963. — Tissue fractionation studies. 16) Intracellular distribution and properties of  $\alpha$ -glucosidase in rat-liver. *Biochem. J.*, 86, 16-21.
- (91) LEVY G. A. et CONCHIE J., 1964. — The subcellular localization of lysosomal enzymes and its biological significance. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 14, 107-128.
- (92) LINHARDT K. et WALTER K., 1963. — Phosphatase: détermination in serum with p-nitrophenylphosphate. In *Methods of Enzymatic Analysis*; BERGMAYER H. U., Ed. Acad. Press, New-York et Londres, 783-785.

- (93) LOWE J. S., 1960. — Substrate for V.F.A. formation in natural rubber latex. *Proceed. Nat. Rubb. Res. Conf., Kuala-Lumpur*, 822-832.
- (94) LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. I., FARR A. L. et RANDALL R. J., 1961. — Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- (95) MARTY F., 1968. — Infrastructure des laticifères différenciés d'*Euphorbia characias*. *C.R. Acad. Sci.*, 267, 299-302.
- (96) MATILE P., 1966. — Enzyme der vakuolen aus wurzelzellen von maiskeimlingen. Ein Beitrag zur funktionellen bedeutung de vakude bei der intravellulären verdanung. *Z. Naturfors.*, 21 b, 871-878.
- (97) MATILE P., 1968. — Lysosomes in root tip cells in corn seedlings. *Planta.*, 79, 181-196.
- (98) MATILE P., 1968. — Aleurone vacuoles as lysosomes. *Z. Pflanzenphysiol.*, 58, 365-368.
- (99) MATILE P., BALZ J. P., SEMADENI E. et JOST M., 1965. Isolation of spherosomes with lysosome characteristics from seedlings. *Z. Naturfors.*, 20 b., 693-698.
- (100) MATILE P. et MOOR H., 1968. — Vacuolation : origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta.*, 80, 159-175.
- (101) MATILE P. et SPICHTER J., 1968. — Lysosomal enzymes in spherosomes (oil droplets) of tobacco endosperm. *Z. Pflanzenphysiol.*, 58, 277-280.
- (102) MILANEZ F. R., 1946. — Nota preveca sobre os laticiferos de *Hevea brasiliensis*. *Arquiv. do Serv. Forrestal do Brazil.*, 2, 39.
- (103) MOIR G. F. U., 1959. — Ultracentrifugation and staining of Hevea latex. *Nature.*, 184, 1626-1628.
- (104) MOLISCH H., 1901. — Studien über den Milchsafte und schleimsafte der pflanzen. Iena, Gustav Fisher Verlag.
- (105) McMULLEN A. I., 1960. — Thiols of low molecular weight in *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem. J.*, 85, 491-495.
- (106) McMULLEN A. I., 1962. — Particulate ribonucleoprotein components of *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem. J.*, 85, 491-495.
- (107) NOVIKOFF A. B., BEAUFAY H. et DE DUVE C., 1956. — Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat-liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol., supplement*, 2, 179-184.
- (108) OCHOA S., 1955. — Malic deshydrogenase from pig-heart. In *Methods in Enzymology*, COLOWICK S. P. et KAPLAN N. O., Ed., Acad. Press, New-York et Londres, 1, 735-739.
- (109) OLSZEWSKA M. J. et GABARA B., 1964. — Recherches cytochimiques sur la présence de certaines hydrolases au cours de la cytotinèse chez les plantes supérieures. *Protoplasma*, 53, 163-179.
- (110) ORY R. L., YATSU L. Y. et KIRCHER H. W., 1968. — Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 123, 255-264.
- (111) OTTESEN M. et WEBER R., 1955. — Density-gradient centrifugation as a mean of separating cytoplasmic particles. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg (série chimique)*, 29, 417-434.
- (112) PAKIANATHAN S. W., BOATMAN S. G. et TAYSUM D. H., 1966. — Particles aggregation following dilution of Hevea latex : A possible mechanism for the closure of latex vessels after tapping. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 19, 259-271.
- (113) PHILPOTT M. W. et SEKCHAR K. C., 1951. — Determination of volatile fatty acids in latex. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 31, 164-165.
- (114) POUX N., 1963. — Sur la présence d'enclaves cytoplasmiques en voie de dégénérescence dans les vacuoles de cellules végétales. *C.R. Acad. Sci.*, 257, 736-738.
- (115) POUX N., 1963. — Localisation de la phosphatase acide dans les cellules méristématiques de Blé (*Triticum vulgare* VILL.), *J. Microsc.*, 2, 485-489.
- (116) POUX N., 1963. — Localisation des phosphates et de la phosphatase acide dans les cellules des embryons de Blé (*Triticum vulgare* VILL.), *J. Microsc.*, 2, 557-558.

- (117) PUJARNISCLE S., 1965. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Analogie avec les lysosomes. *C.R. Acad. Sci.*, 261, 2127-2130.
- (118) PUJARNISCLE S., 1966. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Distribution de la phosphatase acide, de la  $\beta$ -glucosidase et de la cathepsine dans le latex. *C.R. Acad. Sci.*, 262, 923-925.
- (119) PUJARNISCLE S., 1968. — Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Mull. Arg. Physiol. Vég.*, 6, 27-46.
- (120) PUJARNISCLE S. et RIBAILLIER D., 1966. — Etude préliminaire sur les lutoïdes du latex et leur possibilité d'intervention dans la biosynthèse du caoutchouc. *Rev. Gén. Caout. Plast.*, 43, 226-228.
- (121) RAGAB H., HASSIB M. et TAPPEL A. L., 1964. — The redox enzyme system of lysosomes. *Int. Congr. Biochem.*, 6, 663 (résumé).
- (122) RAGLETI H. W. J., WEINTRAUB M. et RINK U. M., 1966. — Latent acid phosphatase in chloroplasts. *Canad. J. Bot.*, 44, 1723-1725.
- (123) RAHMAN Y. E. et LINDENBAUM A., 1964. — Lysosomes particles and subcellular distributions of polymeric tetravalent plutonium-239. *Rad. Res.*, 21, 575-583.
- (124) RESING W. L., 1955. — Variability of Hevea latex. *Communication I.P.P.K.* (ex. *I.N.I.R.O.*), n° 104.
- (125) ROMEO D., STAGNI N., SOTTOCASA G. L., PUGLIARELLO M. C., DE BERNARD B. et VITTUR F., 1966. — Lysosomes in heart tissue. *Biochem. Biophys. Acta.*, 130, 64-80.
- (126) ROSENBERG M. et JANOFF A., 1968. — Hydrolytic activities within intact lysosomes in vitro. *Biochem. J.*, 108, 889-891.
- (127) ROUILLER R. et BERNHARD W., 1956. — « Microbodies » and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol., supplément.* 2, 355-359.
- (128) RUINEN J., 1950. — Microscopy of the lutoïds in Hevea latex. *Ann. Bogorienses*, 1, 27-45.
- (129) RUINEN J., 1950. — Comparative microscopical observations on latices of Hevea and other plants. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 31, 121-132.
- (130) RUINEN J. et DE HAAN-HOMANS L. N. S., 1950. — Investigations concerning the origine of the lutoïds of the latex of *Hevea brasiliensis*. *Arch. Rubbercult.*, 27, 243-253.
- (131) SAWANT P. L., DESAI I. D. et TAPPEL A. L., 1964. — Factors affecting the lysosomal membrane and availability of enzymes. *ArchBiochem. Biophys.*, 105, 247-253.
- (132) SAWANT P. L., SHIBKO S., KUMTA U. S. et TAPPEL A. L., 1964. — Isolation of rat-liver lysosomes and their general properties. *Biochem. Biophys. Acta.*, 85, 82-92.
- (133) SCHEIB D., 1963. — Properties and role of acide hydrolases of the Müllerian ducts during sexual differentiation in the male chick embryo. In *Lysosomes. Ciba Fund. Symp.* DE REUCK A. V. S. et CAMERON M. P., Ed., J. et A. CHURCHILL, Londres, 264-277.
- (134) SCHEIB D. et WATTIAUX R., 1962. — Etude des hydrolases acides des canaux de Müller de l'embryon de poulet. 1) Activités totales et solubles des canaux d'embryons de 8 à 10 jours d'incubation. *Developm. Biol.*, 5, 205-217.
- (135) SCHMIDT G., HECHT L., STRICKLER N. S. et THANHAUSER S. J., 1949. — The quantitative determination of glyceryl-phosphoryl-choline. *Fed. Proceed.*, 8, 249.
- (136) SCHOON Th. G. F. et PHOA K. L., 1956 — Morphology of rubber particles in natural latices. *Arch. Rubbercult.*, 33, 195-216.
- (137) SELLINGER O. B., BEAUFAY H., JACQUES P., DOYEN A. et DE DUVE C., 1960. — Tissue fractionation studies. 15) Intracellular distribution and properties of  $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase and  $\beta$ -galactosidase in rat-liver. *Biochem. J.*, 74, 450-456.
- (138) SEMADENI E. G., 1967. — Enzymatische charakterisierung der lysosomen-äquivalente (sphärosomen) von maiskeimlingen. *Planta.*, 72, 91-118.
- (139) SHAPIRO B., 1953. — Purification and properties of a lysolecithinase from pancreas. *Biochem. J.*, 53, 663-666.



- (140) SHIBKO S., PANGBORN J. et TAPPEL A. L., 1965. — Studies on the release of lysosomal enzymes from kidney lysosomes. *J. Cell. Biol.*, 25, 479-483.
- (141) SINSHEIMER R. L. et KOERNER J. F., 1952. — A purification of venon phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, 198, 293-296.
- (142) SMITH R. H., 1954. — The phosphatides of the latex of *Hevea brasiliensis*. *Biochem. J.*, 56, 240-250.
- (143) SMITH L. S., 1955. — Cytochrome a, a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> and a<sub>3</sub>. In *Methods in Enzymology*. COLOWICK S. P. et KAPLAN N. O., Ed., Acad. Press., New-York et Londres, II, 732-740.
- (144) SOUTHORN W. A., 1960. — Microscopy of Hevea latex. *Proceed. Nat. Rubb. Res. Conf., Kuala-Lumpur*, 766-776.
- (145) SOUTHORN W. A., 1964. — A complex sub-cellular component of widespread occurrence in plant latices. *J. Exp. Bot.*, 51, 616-621.
- (146) SOUTHORN W. A., 1966. — Electron microscope study on the latex of *Hevea brasiliensis*. *6th Int. Congr. Electr. Microsc., Kyoto*, 385-386.
- (147) SOUTHORN W. A., 1968. — Physiology of Hevea (latex flow). *Nat. Rubb. Conf., Kuala-Lumpur*. Preprint.
- (148) STRAUSS W., 1957. — Segregation of an intravenously injected proteins by « droplets » on the cells or rat kidney. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3, 1037-1040.
- (149) STRAUSS W., 1959. — Rapid cytochemical identification of phagosomes in various tissues of the rat and their differentiation from mitochondria by the peroxydase method. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5, 193-213.
- (150) STRAUSS W., 1967. — Lysosomes, phagosomes and related particles. In *Enzyme cytology*, ROODYN D. B., Ed., Acad. Press, New-York et Londres, 239-319.
- (151) TAPPEL A. L., SAWANT P. L. et SHIBKO S., 1963. — Lysosomes : distribution in animal, hydrolytic capacity and other properties. In *Lysosomes. Ciba. Fund. Symp.*, DE REUCK A. V. S. et CAMERON M. P., Ed., J. et A. CHURCHILL, Londres, 78-108.
- (152) TAPPEL A. L., ZALKIN H., CALDWELL K. A., DESAI I. D. et SHIBKO S., 1962. — Increased lysosomal enzymes in genetic muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 340-346.
- (153) TATA S. J. et YIP E., 1968. — A protein fraction from B-serum with strong destabilising activity on latex. *Docum. 59. Res. Archs. Rubb. Res. Inst.*, Malaya.
- (154) TAYSUM D. H., 1958. — A possible basis for phyto-immunity. *Nature.*, 181, 174.
- (155) TAYSUM D. H., 1960. — The establishment of a bacterial population of latex vessels during normal tapping. *Proceed. Nat. Rubb. Res. Conf., Kuala-Lumpur.*, 858-871.
- (156) UMBREIT W. W., BURRIS R. H. et STAUFFER J. F., 1957. — *Manometric techniques*, Burgess publ. Minneapolis, 274.
- (157) VAES G., 1965. — Studies on bone enzymes. The activation and release of latent acid hydrolases and catalase in bone-tissue homogenates. *Biochem. J.*, 97, 393-402.
- (158) VAES G. et JACQUES P., 1965. — Studies on bone enzymes. Distribution of acid hydrolases, alkaline phenylphosphatase, cytochrome oxydase and catalase in sub-cellular fractions of bone-tissue homogenates. *Biochem., J.*, 97, 389-392.
- (159) WALECK-CZERNECKA A., 1962. — Mise en évidence de la phosphatase acide (monophosphoestérase II) dans les sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*. *Acta Soc. Bot. Poloniae.*, 31, 539-543.
- (160) WALECK-CZERNECKA A., 1965. — Histochemical demonstration for some hydrolytic enzymes in the spherosomes on plant cells. *Acta Soc. Bot. Poloniae.*, 34, 573-588.
- (161) WATTIAUX R. et DE DUVE C., 1956. — Tissue fractionation studies. 7) Release of bound hydrolases by means of Triton X-100. *Biochem. J.*, 63, 606-608.
- (162) WEBER R., 1957. — Die kathepsinaktivität in schwanz von *Xenopus* larven während wachstum und metamorphose. *Rev. Suisse Zool.*, 64, 326-336.

- (163) WEISSMANN G., 1964. — Labilization and stabilization of lysosomes. *Fed. Proceed.*, 23, 1038-1044.
- (164) WEISSMANN G., 1964. — Lysosomes., *Blood*, 24, 594-606.
- (165) WEISSMANN G., 1967. — Structure and fuction of lysosomes. *Rheumatology*, 1, 1-28.
- (166) WEISSMANN G., BECHER B. et THOMAS L., 1964. — Studies on Lysosomes. V) The effects of streptolysins and other hemolytic agents on isolated leucocyte granules. *J. Cell. Biol.*, 23, 115-126.
- (167) WIERSUM L. K., 1957. — Enkele latex problemen. *Vakbl. Biol.*, 37, 17-25.
- (168) WILLIAMSON I. P. et KEKWICK R. G. O., 1965. — The formation of 5-phosphomevalonate kinase in *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem. J.*, 96, 862-871.
- (169) YATSU L. Y. et JACKS T. J., 1968. — Association of lysosomal activities with aleurone grains in plant seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 124, 466-471.

## Table des Matières

INTRODUCTION .....	7
I. LA CELLULE LATICIFÈRE ET LE LATEX .....	9
<i>Laticifères et production du caoutchouc</i> .....	9
— Structure des vaisseaux laticifères .....	9
— Ecoulement du latex .....	9
LE LATEX ET SES CONSTITUANTS .....	10
— Composition organo-minérale .....	11
— Composés protéiques .....	11
— Organites cellulaires .....	11
— Noyaux .....	13
— Mitochondries .....	13
— Ribosomes .....	13
— Particules de caoutchouc .....	14
— Particules de Frey-Wyssling .....	14
— Lutoïdes .....	14
<i>Conclusions</i> .....	16
II. LES LYSOSOMES .....	17
— Propriétés des lysosomes .....	17
— Morphologie des lysosomes .....	18
— Fonction des lysosomes .....	18
— Lysosomes des tissus animaux .....	20
— Lysosomes des cellules végétales .....	20
— Conclusions .....	22
III. MATÉRIEL ET TECHNIQUES .....	25
— Matériel végétal et prélèvement du latex .....	26
— Centrifugation différentielle .....	26
— Centrifugation en gradient de densité ou « isopycnique » .....	26
— Dosage des enzymes hydrolytiques .....	28
— Dosage des enzymes d'oxydo-réduction .....	30
— Dosage des protéines .....	31
— Présentation des résultats .....	31
IV. COMPOSITION DES LUTOÏDES .....	35
— Mode opératoire .....	35
— Méthodes de dosages .....	35
— Résultats .....	36
— Discussion et conclusions .....	37

V. PROPRIÉTÉS CARACTÉRISTIQUES DES LUTOÏDES .....	39
— Action de la pression osmotique du milieu (lyse osmotique) .....	39
— Action des détergents .....	40
— Action de la lysolécithine .....	40
— Action du pH .....	40
— Action de la température à pH 5,0 (lyse thermique) .....	43
— Influence du vieillissement .....	44
— Conclusions .....	44
VI. LES HYDROLASES DU LATEX ET LEUR LOCALISATION .....	47
— Activité des hydrolases en fonction du pH .....	47
— Profil de sédimentation des hydrolases .....	47
— Discussion .....	52
VII. UNITÉ STRUCTURALE DES HYDROLASES (Révélation simultanée de leur activité) .....	55
— Action de la lyse osmotique sur la libération des hydrolases .....	55
— Action de la lyse osmotique sur la solubilisation des hydrolases .....	57
— Action de la lyse thermique sur la solubilisation des hydrolases .....	57
— Action du Triton X-114 sur la solubilisation des hydrolases .....	58
— Action de la lysolécithine sur la solubilisation des hydrolases .....	59
— Conclusions .....	59
VIII. UNITÉ STRUCTURALE DES HYDROLASES (localisation par centrifugation isopycnique) .....	63
— Conclusions .....	66
IX. LES ENZYMES D'OXYDO-RÉDUCTION, LEUR LOCALISATION DANS LE LATEX .....	69
<i>Polyphénol-oxydase</i> .....	69
— Localisation par centrifugation isopycnique .....	70
— Libération de la polyphénol-oxydase .....	71
<i>Malate-déshydrogénase</i> .....	72
— Localisation par centrifugation isopycnique .....	72
<i>Conclusions</i> .....	72
X. ETUDE DE LA MEMBRANE DES LUTOÏDES .....	75
— Nature lipo-protéique de la membrane .....	75
— Etude de quelques facteurs intervenant dans la perméabilité et la stabilité de la membrane des lutoïdes .....	76
— Lyse osmotique. Action du Triton X-114. Lyse thermique à divers pH .....	77
— Discussion et conclusions .....	79
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS .....	85
— Caractères physiques des lutoïdes .....	85
— Caractères biochimiques des lutoïdes .....	85
— Caractère de la membrane des lutoïdes. Activation et libération des hydrolases .....	86
— Fonction des lutoïdes .....	87
BIBLIOGRAPHIE .....	91

Les Editions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer tendent à constituer une documentation scientifique de base sur les zones intertropicales et méditerranéennes et les problèmes que pose le développement des pays qui s'y trouvent.

## CAHIERS ORSTOM.

### — Séries périodiques :

- **entomologie médicale et parasitologie** : articles relatifs à l'épidémiologie des grandes endémies tropicales transmises par des invertébrés, à la biologie de leurs vecteurs et des parasites, et aux méthodes de lutte.
- **géologie** : études sur les trois thèmes suivants : altération des roches, géologie marine des marges continentales, tectonique de la région andine.
- **hydrobiologie** : études biologiques des eaux à l'intérieur des terres, principalement dans les zones intertropicales.
- **hydrologie** : études, méthodes d'observation et d'exploitation des données concernant les cours d'eau intertropicaux et leurs régimes en Afrique, Madagascar, Amérique du Sud, Nouvelle-Calédonie...
- **océanographie** : études d'océanographie physique et biologique dans la zone intertropicale, dont une importante partie résulte des campagnes des navires océanographiques de l'ORSTOM ou utilisés par lui.
- **pédologie** : articles relatifs aux problèmes soulevés par l'étude des sols des régions intertropicales et méditerranéennes (morphologie, caractérisation physico-chimique et minéralogique, classification, relations entre sols et géomorphologie, problèmes liés aux sels, à l'eau, à l'érosion, à la fertilité des sols) ; résumés de thèses et notes techniques.
- **sciences humaines** : études géographiques, sociologiques, économiques, démographiques et ethnologiques concernant les milieux et les problèmes humains principalement dans les zones intertropicales.

### — Séries non périodiques :

- **biologie** : études consacrées à diverses branches de la biologie végétale et animale.
- **géophysique** : données et études concernant la gravimétrie, le magnétisme et la sismologie.

**MÉMOIRES ORSTOM** : consacrés aux études approfondies (synthèses régionales, thèses...) dans les diverses disciplines scientifiques (44 titres parus).

**ANNALES HYDROLOGIQUES D'OUTRE-MER** : depuis 1959, deux séries sont consacrées : l'une, aux Etats africains d'expression française et à Madagascar, l'autre aux Territoires et Départements français d'Outre-Mer.

**FAUNE TROPICALE** : ouvrages concernant l'Afrique du Nord, l'Afrique tropicale, Madagascar, la Réunion et la partie orientale de l'Atlantique tropical (18 titres parus).

**INITIATIONS/DOCUMENTATIONS TECHNIQUES** : mises au point et synthèses au niveau, soit de l'enseignement supérieur, soit d'une vulgarisation scientifiquement sûre (15 titres parus).

**TRAVAUX ET DOCUMENTS DE L'ORSTOM** : cette collection, très souple dans ses aspects et ses possibilités de diffusion, a été conçue pour s'adapter à des textes scientifiques ou techniques très divers par l'origine, la nature, la portée dans le temps ou l'espace, ou par leur degré de spécialisation (6 titres parus).

**L'HOMME D'OUTRE-MER** : exclusivement consacrée aux sciences de l'homme, cette collection est maintenant réservée à des auteurs n'appartenant pas aux structures de l'ORSTOM (13 ouvrages parus).

De nombreuses **CARTES THÉMATIQUES**, accompagnées de **NOTICES**, sont éditées chaque année, intéressant des domaines scientifiques ou des régions géographiques très variées.

**BULLETINS ET INDEX BIBLIOGRAPHIQUES** : Bulletin analytique d'entomologie médicale et vétérinaire (mensuel) et Index bibliographique de botanique tropicale (trimestriel).

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
ET TECHNIQUE OUTRE-MER

Direction générale

24, rue Bayard, PARIS-8<sup>e</sup>

Service Central de Documentation

70-74, route d'Aulnay, 93 - BONDY, FRANCE

---

I.T.Q.A.-CAHORS. — 00.889

O.R.S.T.O.M. Éditeur

Dépôt légal : 2<sup>e</sup> trim. 1971

Les Editions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer tendent à constituer une documentation scientifique de base sur les zones intertropicales et méditerranéennes et les problèmes que pose le développement des pays qui s'y trouvent.

## CAHIERS ORSTOM.

### — Séries périodiques :

- **entomologie médicale et parasitologie** : articles relatifs à l'épidémiologie des grandes endémies tropicales transmises par des invertébrés, à la biologie de leurs vecteurs et des parasites, et aux méthodes de lutte.
- **géologie** : études sur les trois thèmes suivants : altération des roches, géologie marine des marges continentales, tectonique de la région andine.
- **hydrobiologie** : études biologiques des eaux à l'intérieur des terres, principalement dans les zones intertropicales.
- **hydrologie** : études, méthodes d'observation et d'exploitation des données concernant les cours d'eau intertropicaux et leurs régimes en Afrique, Madagascar, Amérique du Sud, Nouvelle-Calédonie...
- **océanographie** : études d'océanographie physique et biologique dans la zone intertropicale, dont une importante partie résulte des campagnes des navires océanographiques de l'ORSTOM ou utilisés par lui.
- **pédologie** : articles relatifs aux problèmes soulevés par l'étude des sols des régions intertropicales et méditerranéennes (morphologie, caractérisation physico-chimique et minéralogique, classification, relations entre sols et géomorphologie, problèmes liés aux sels, à l'eau, à l'érosion, à la fertilité des sols) ; résumés de thèses et notes techniques.
- **sciences humaines** : études géographiques, sociologiques, économiques, démographiques et ethnologiques concernant les milieux et les problèmes humains principalement dans les zones intertropicales.

### — Séries non périodiques :

- **biologie** : études consacrées à diverses branches de la biologie végétale et animale.
- **géophysique** : données et études concernant la gravimétrie, le magnétisme et la sismologie.

**MÉMOIRES ORSTOM** : consacrés aux études approfondies (synthèses régionales, thèses...) dans les diverses disciplines scientifiques (44 titres parus).

**ANNALES HYDROLOGIQUES D'OUTRE-MER** : depuis 1959, deux séries sont consacrées : l'une, aux Etats africains d'expression française et à Madagascar, l'autre aux Territoires et Départements français d'Outre-Mer.

**FAUNE TROPICALE** : ouvrages concernant l'Afrique du Nord, l'Afrique tropicale, Madagascar, la Réunion et la partie orientale de l'Atlantique tropical (18 titres parus).

**INITIATIONS/DOCUMENTATIONS TECHNIQUES** : mises au point et synthèses au niveau, soit de l'enseignement supérieur, soit d'une vulgarisation scientifiquement sûre (15 titres parus).

**TRAVAUX ET DOCUMENTS DE L'ORSTOM** : cette collection, très souple dans ses aspects et ses possibilités de diffusion, a été conçue pour s'adapter à des textes scientifiques ou techniques très divers par l'origine, la nature, la portée dans le temps ou l'espace, ou par leur degré de spécialisation (6 titres parus).

**L'HOMME D'OUTRE-MER** : exclusivement consacrée aux sciences de l'homme, cette collection est maintenant réservée à des auteurs n'appartenant pas aux structures de l'ORSTOM (13 ouvrages parus).

De nombreuses **CARTES THÉMATIQUES**, accompagnées de **NOTICES**, sont éditées chaque année, intéressant des domaines scientifiques ou des régions géographiques très variées.

**BULLETINS ET INDEX BIBLIOGRAPHIQUES** : Bulletin analytique d'entomologie médicale et vétérinaire (mensuel) et Index bibliographique de botanique tropicale (trimestriel).

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

*Direction Générale :*  
24, rue Bayard, PARIS-8<sup>e</sup>

*Service Central de Documentation :*  
70 - 74, route d'Aulnay, 93 - BONDY