

Étude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg.

II. Systèmes enzymatiques impliqués dans le processus

1. Phénol oxydases

JANINA BRZOWSKA-HANOWER *, PAWEŁ HANOWER * et CLAUDE LIORET **

* Laboratoire de Physiologie végétale, Centre O.R.S.T.O.M. d'Adiopodoumé,
B.P. n° 51 Abidjan (Côte-d'Ivoire)

** Laboratoire de Biologie moléculaire végétale (L.A. au C.N.R.S. n° 40),
Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

(Manuscrit reçu le 17 octobre 1977)

RÉSUMÉ

Les activités phénol oxydasiques du latex d'Hévéa sont étudiées. Les activités monophénol oxydase, *o*-diphénol oxydase et peroxydase sont mises en évidence, à l'exclusion de toute activité *p*-phénol oxydase (laccase).

L'*o*-diphénol oxydase, manifestant de loin l'activité la plus grande, est présente à la fois dans les particules de FREY-WYSSLING et dans le cytoplasme. Mais dans ce dernier compartiment, l'enzyme est à l'état latent, car inhibée par un constituant naturel, thermostable et dialysable.

L'électrophorèse sur gel (polyacrylamide ou amidon) met en évidence l'existence de plusieurs isoenzymes à activité *o*-diphénol oxydase. Les zymogrammes des extraits cytoplasmiques (avec principalement des protéines anioniques) sont qualitativement différents des zymogrammes issus d'extraits particuliers (avec des protéines cationiques).

Il existe un parallélisme étroit concernant l'action de divers effecteurs sur la coagulation du latex et sur l'activité *o*-diphénol oxydase des particules : les cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}) activent les deux phénomènes; les substances réductrices, le diéthylthiocarbamate les inhibent. Le latex d'arbres traités par l'éthylène présente une activité *o*-diphénol oxydase très réduite. Il existe une bonne corrélation entre l'activité *o*-diphénol oxydase des particules et la vitesse de coagulation, pour les latex de cinq clones (PR 107, Tjir I, BD 5, GT 1 et PB 86) différant pour ce dernier paramètre.

Ces résultats confirment le rôle supposé de la phénol oxydase dans le processus de coagulation du latex.

SUMMARY

Phenol oxidase enzymatic activities of Hevea latex are studied. Monophenol oxidase, o-diphenol oxidase, peroxidase activities, but no p-phenol oxidase (laccase) activity, are demonstrated.

O-diphenol oxidase activity, the most active one, is present both in FREY-WYSSLING particles and in cytoplasm. In cytoplasmic compartment, the activity is masked by a natural, thermostable and dialysable component.

Gel electrophoresis (on polyacrylamide or starch) demonstrates the existence of several isoenzymes with *o*-diphenol oxidase activity. The zymograms of cytoplasmic enzymes (with principally anionic proteins) are qualitatively different from zymograms (with cationic proteins) obtained from particles.

There is a close parallelism for the action of various effectors both on latex coagulation and on *o*-diphenol oxidase activity of particles: divalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}) increase the two phenomenons; reductive substances, diethyldithiocarbamate decrease them. Latex from ethylene treated trees has a very lowered *o*-diphenol oxidase activity. There is a good correlation between *o*-diphenol oxidase activity of particles and rate of coagulation of latex issued from five clones (PR 107, Tjir 1, BD 5, GT 1 et PB 86) displaying differences for this last parameter.

These results confirm the postulated role of phenol oxidase in latex coagulation process.

INTRODUCTION

Les systèmes phénol oxydasiques du latex d'*Hevea brasiliensis* ont fait l'objet d'un nombre élevé d'études. La présence d'activités phénol oxydase et per oxydase semble bien établie, celle de laccase est controversée (SPENCE, 1908 *a* et *b*; WHITBY, 1920; DE VRIES, 1920; BOBILIOF, 1923; DE HAAN-HOMANS 1950; LUSTINEC et RESING, 1967; TATA et EDVIN, 1970). L'activité phénol oxydase paraît être localisée dans la fraction sédimentable et plus particulièrement dans les particules de FREY-WYSSLING, l'activité peroxydase est répartie entre fraction sédimentable et surnageant (HSIA, 1958; COUPÉ *et al.*, 1972).

Dans un travail précédent (HANOWER *et al.*, 1976), nous avons mis en évidence une série de facteurs internes et externes favorisant la coagulation du latex parmi lesquels un pH acide, des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}), le sérum de la fraction sédimentable (sérum S), l'oxygène, certains composés phénoliques. L'addition de trypsine ou de phénol oxydase exogènes entraîne une coagulation très rapide du latex. A la suite de ce travail, nous avons entrepris une étude des activités phénol oxydasiques du latex en vue de préciser le rapport pouvant exister entre ces activités et la coagulation.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1) MATÉRIEL VÉGÉTAL, EXPLOITATION DES ARBRES, TRAITEMENT STIMULANT, RÉCOLTE DU LATEX

Le matériel végétal ainsi que le mode d'exploitation des arbres et de prélèvement du latex sont les mêmes que ceux décrits dans la première partie de cette étude (HANOWER *et al.*, 1976).

ABRÉVIATIONS

DIECA, diéthylthiocarbamate; DOPA, 3,4-dihydroxyphénylalanine; *o*-DPO, *o*-diphénol oxydase; *p*-DPO, *p*-diphénol oxydase; EDTA, éthylène diamine-tetraacétate; MPO, monophénol oxydase; MSH, 2-mercaptoéthanol; Pase, phosphatase acide; PerOx, peroxydase; Sérum C, sérum cytoplasmique; Sérum S, sérum du sédiment; Suspension S, suspension du sédiment; Tris, Tri (hydroxyméthyl) aminométhane.

La plupart des expériences ont été réalisées sur le clone PR 107. Dans la recherche des différences d'origine clonale, quatre autres clones ont été étudiés en plus du PR 107 : Tjir 1, GT 1, PB 86 et BD 5.

2) TRAITEMENT DU LATEX

a) Centrifugation différentielle

Le latex prélevé est traité de deux manières différentes :

(i) 40 ml de latex dilué au 2/5 avec du tampon isotonique Tris (0,05 M)-mannitol (0,3 M) de pH 7,5 sont centrifugés 30 minutes à $31\,000 \times g$ (Sorvall, rotor SS 34). Le surnageant est éliminé et le sédiment est lavé une fois avec la même solution tampon et centrifugé 30 minutes à $31\,000 \times g$. Le sédiment purifié, constitué pour la majeure partie par les lutoïdes et les particules de FREY-WYSSLING, est remis en suspension, soit dans le tampon Tris-mannitol (pour mesurer les activités enzymatiques « libres »), soit dans le tampon Tris contenant du Triton X-100 à la concentration de 0,1 % (pour mesurer les activités enzymatiques « totales »). Le volume est complété à 40 ml. La préparation est nommée *suspension S*.

Alors que l'activité « libre » correspond à l'activité de l'enzyme accessible à son substrat lorsque les organites sont intacts, l'activité « totale » représente le potentiel actif global de l'enzyme contenue dans les particules.

(ii) 40 ml de latex non dilué sont centrifugés 30 minutes à $31\,000 \times g$ (Sorvall, rotor SS 34). La couche supérieure, constituée par le caoutchouc, est éliminée. Le surnageant trouble et le sédiment sont récupérés séparément.

Le surnageant est recentrifugé 2 heures à $120\,000 \times g$ (Spinco, rotor Ti 50) et le sérum clair est récupéré (*sérum C*).

Le sédiment est lavé une fois avec le tampon Tris-mannitol, centrifugé à 30 minutes à $31\,000 \times g$ (Sorvall, rotor SS 34) et soumis à l'action des ultra-sons (5 minutes) afin de faire éclater les organites. La suspension liquéfiée ainsi obtenue est centrifugée 2 heures à $120\,000 \times g$ (Spinco, rotor Ti 50) et le sérum clair d'origine particulaire est récupéré (*sérum S*).

Le sérum C et le sérum S servent aux mesures d'activités enzymatiques et à l'électrophorèse.

b) Centrifugation en gradient de densité

8 ml de latex dilué au 2/5 dans le tampon Tris-mannitol ou 8 ml d'une suspension du sédiment dans le même tampon sont déposés au sommet d'un tube de centrifugation de 34 ml contenant 23 ml d'un gradient linéaire de saccharose allant de 0 à 50 %. Un « coussin » de 2 ml de saccharose à 75 % est placé au fond du tube. Après 90 minutes de centrifugation à $64\,000 \times g$ (Spinco, rotor SW 25), le fond du tube est percé et les fractions de 2 ml (15 à 16) sont recueillies dans des tubes gradués. Les teneurs en protéines et les activités enzymatiques sont déterminées sur des aliquotes de ces fractions.

c) Incubation du sédiment avec de la digitonine

Le sédiment est préincubé dans le tampon Tris-mannitol contenant de la digitonine à concentrations variables. A la fin de l'incubation, dont la durée varie entre 5 minutes et 2 heures, on prélève une aliquote sur laquelle on mesure les activités enzymatiques « libres ». Une autre aliquote est centrifugée 20 minutes à $31\,000 \times g$. Le surnageant récupéré sert à la détermination des activités « solubles » correspondant aux enzymes entièrement libérées et qui se trouvent alors sous forme soluble. Les activités « totales » qui servent de référence sont mesurées sur la suspension traitée au desoxycholate de sodium à la concentration de 5 mM ou au triton X-100.

3) MÉTHODES ANALYTIQUES

a) Mesures enzymatiques

(i) *Phénol oxydase* (E.C.1.10.3.1) L'activité *o*-diphénol oxydase (*o*-DPO) est mesurée en utilisant la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) comme substrat, selon la technique de LANCE (1963)

modifiée. Le milieu d'incubation contient : le matériel enzymatique, tampon cacodylate 100 mM de pH 6,0, CaCl_2 5 mM et DOPA 10 mM dans un volume total de 5 ml. Le mélange réactionnel est vigoureusement agité sur un agitateur-vibreux et la densité optique est mesurée au bout de 3 à 10 minutes, suivant l'activité du matériel étudié, à 420 nm (Klett-Summerson, filtre n° 42 ou Spectronic 20).

Dans les mesures de l'activité monophénol oxydase (MPO), la DOPA est remplacée par de la tyrosine 2 mM et les lectures de D.O. sont effectuées au bout de 30 à 90 minutes, toutes les autres conditions restant inchangées.

Pour chaque dosage on prépare deux témoins, l'un contenant le matériel enzymatique et tous les réactifs sauf la DOPA, l'autre tous les réactifs sans le matériel enzymatique. Les densités optiques des deux témoins sont soustraites de celle obtenue dans le dosage.

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires : Δ D.O. par unité de temps et par unité de volume (latex, suspension S, sérum S ou C).

L'activité de la laccase (*p*-diphénol oxydase, E.C.1.10.3.2) a été testée en utilisant comme substrat, soit l'hydroquinone, soit la *p*-phénylènediamine.

(ii) *Peroxydases* (E.C.1.11.1.7). L'activité peroxydase (PerOx) est déterminée en utilisant le gaïacol comme substrat (LANCE, 1963). Le milieu d'incubation contient : matériel enzymatique, tampon cacodylate 100 mM de pH 6,0, CaCl_2 5 mM, gaïacol 16 mM et H_2O_2 20 mM. On agite vigoureusement le mélange réactionnel pendant 3 ou, au plus, 5 minutes et l'on fait la lecture de D.O. à 420 nm (Klett et Summerson ou Spectronic 20).

Les densités optiques des deux témoins contenant l'un le matériel enzymatique et tous les réactifs sauf H_2O_2 et l'autre tous les réactifs sauf le matériel enzymatique sont soustraites des valeurs obtenues.

Ce procédé simplifié n'est utilisé que dans le cas où on dispose de peu de matériel enzymatique, notamment lors des dosages effectués sur les fractions récupérées du gradient de densité. Autrement, on suit la cinétique de l'oxydation du gaïacol en faisant les lectures toutes les 30 secondes pendant une période de 3 minutes. Les valeurs de D.O./unité de temps se rapportent alors à la partie droite de la courbe D.O. = f (temps).

Le mode d'expression des résultats est le même que pour l'activité des phénol oxydases.

(iii) *Phosphatase acide* (E.C.3.1.3.2). L'activité de la phosphatase acide (Pase) est déterminée à pH 5,4 (tampon acétate) en utilisant le *p*-nitrophényl phosphate (10 mM) selon la méthode de LINHARDT et WALTER (1963) décrite précédemment (HANOWER et BRZOWSKA, 1973). Les résultats sont exprimés en micromoles de *p*-nitrophénol libérées par unité de temps (minute) et par unité de volume (latex, suspension S, sérum S ou C).

b) Dosages des protéines

Les protéines ont été dosées selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951) après leur précipitation par l'acide trichloracétique et en utilisant le sérum-albumine bovine comme étalon.

c) Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

La technique d'ORNSTEIN et DAVIS (1964 *a* et *b*) est employée en utilisant l'appareil SHANDON dans les conditions expérimentales suivantes : gel contenant 7,5 % d'acrylamide, tampon Tris (0,05 M)-glycine (0,38 M), pH 8,3, un courant de 2,5 mA par tube, température : 4°C, durée moyenne de 90 minutes (migration complète du bleu de bromophénol). 5 μ l de sérum S et 15 μ l de sérum C, préalablement chargés en saccharose (à 10 %), sont déposés par tube.

Les isoenzymes à activité *o*-DPO sont révélées de deux manières :

(i) par la DOPA, le milieu réactionnel étant celui employé dans les mesures d'activité *o*-DPO;

(ii) par le mélange (catéchol + proline) selon la technique de STAHMANN *et al.* (1966); après un séjour de 30 minutes dans un tampon phosphate 100 mM de pH 6,5 le gel est incubé dans une solution contenant du catéchol (10 mM) et de la proline (10 mM) dans le même tampon.

d) Électrophorèse sur plaques de gel d'amidon

L'électrophorèse est effectuée selon la technique horizontale décrite par SMITHIES (1955) avec des plaques de gel d'amidon à 14 %. Les rondelles de papier Whatman n° 3 de 6 mm de diamètre imbibées de sérum S ou de sérum C sont déposées entre anode et cathode du gel.

Deux systèmes de tampons sont utilisés :

(i) système de BREWER (1970) : pour le tampon du gel, histidine monochlorhydrate 5 mM, NaCl 2,5 mM ajusté à pH 6,0 avec NaOH 0,1 M; pour le tampon de l'électrophorèse, acide citrique 0,41 M ajusté à pH 6,0 avec NaOH M; voltage « réel » 250 V, intensité 15-20 mA par plaque, durée 4-5 heures;

(ii) système de SMITHIES (1955) : tampon du gel : acide borique 0,03 M, NaOH 0,012 M, pH 8,5; tampon de l'électrophorèse : acide borique 0,3 M, NaOH 0,06 M, pH 8,0; voltage « réel » 250 V, intensité 15-20 mA par plaque, durée 4-5 heures.

Les isoenzymes *o*-DPO sont révélés par la DOPA en milieu cacodylate-CaCl₂, pH 6,0.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1) NATURE DES PHÉNOL OXYDASES DU LATEX

Les résultats du tableau I rendent compte du comportement du sérum S en fonction de la nature du substrat. Ce comportement est comparé avec ceux du même sérum additionné d'eau oxygénée (activité peroxydase), et de diverses préparations commerciales (tyrosinase de champignons, peroxydase de raifort, laccase de *Lep-toporus lignosus*).

Ces résultats permettent de conclure à la présence d'activité monophénol oxydase, *o*-diphénol oxydase et à l'absence, sans équivoque possible d'activité *p*-diphénol oxydase (laccase). Le sérum S se montre en effet inactif vis-à-vis de l'hydroquinone, de la *p*-phénylènediamine et des autres dérivés *p*-aminés.

L'activité MPO du latex se manifeste par l'oxydation du phénol simple et de ses dérivés méthylés en para et méta, la tyrosine et l'acide *p*-coumarique, les deux derniers composés étant des constituants du latex (résultats non publiés). L'ombelliférone n'est que faiblement utilisé. Par contre, l'*o*-crésol, l' α -naphtol, les acides monohydroxybenzoïques (*ortho* et *méta*) et les acides *o*- et *m*-coumariques ne semblent pas pouvoir être oxydés par le système enzymatique.

Les meilleurs substrats de l'activité *o*-DPO sont le pyrocatechol et la DOPA; viennent ensuite le pyrogallol, l'acide 3.4-dihydroxyphénylacétique et l'aesculéline suivis des dérivés des acides benzoïque et cinnamique : acides protocatéchique, gallique et tannique et acides caféique et chlorogénique. Le pouvoir oxydant vis-à-vis de la quercétine, représentant des flavonols, semble relativement faible. Le trait commun de ces di- et polyphénols, dont un certain nombre (la DOPA, l'aesculéline, l'acide protocatéchique, l'acide caféique et la quercétine) se trouvent parmi les composés phénoliques que nous avons identifiés dans le latex, est qu'ils contiennent tous au moins deux groupements OH libres en position ortho. La substitution d'un des groupements OH par un groupement OCH₃ enlève aux dérivés méthoxy correspondants l'aptitude à être utilisés comme substrats par l'enzyme ou, en tout cas, réduit fortement la vitesse d'utilisation (*cf.* pyrocatechol et gaïacol, acides caféique et férulique, aesculéline et scopoléline, etc.).

D'autre part, ni les dérivés *para*-, ni les dérivés *metadihydroxyphénoliques* ne semblent pouvoir être oxydés par la polyphénol oxydase du latex. Cette dernière

peut donc être considérée comme étant une *o*-diphénol : O_2 oxydoréductase (E.C.1.10.3.1).

L'examen du tableau I suscite d'autres remarques encore concernant les composés phénoliques naturels du latex. Il permet de constater que certains d'entre eux, telle la tyrosine, servent de substrats exclusivement à la phénoloxydase (aucune oxydation n'est observée en présence de H_2O_2). D'autres substances présentes naturellement dans le latex, apparemment non oxydées par les phénol oxydases

TABLEAU I

Activité oxydasique du sérum du sédiment (S) : tests qualitatifs d'oxydation des différents substrats (phénols et amines) par le sérum S, sérum S + H_2O_2 , Tyrosinase de Champignons, Peroxydase de Raifort et « Laccase » de *L. lignosus* à pH 6,0. Critères d'appréciation adoptés : - négatif; ± incertain; + faible; ++ moyen; +++ assez fort; ++++ fort; +++++ très fort.

Test n°	Substrat	Sérum S	Sérum S + H_2O_2	Tyrosinase de Champignons	Peroxydase de Raifort	« Laccase » de <i>L. lignosus</i> (*)
1....	3-amino-9-éthyl-carbazole	-	++	-	+++	+
2....	<i>p</i> -phénylène-diamine (**)	-	++++	+	++++	++++
3....	Benzidine	-	++++	-	++++	++++
4....	<i>p</i> -anisidine	-	++++	+	++++	++++
5....	<i>o</i> -dianisidine	-	++++	+	++++	+++
6....	Phénol	+++				++
7....	<i>o</i> -crésol	-				
8....	<i>m</i> -crésol	+		+	-	-
9....	<i>p</i> -crésol	++		++	-	-
10....	Pyrocatechol	++++	++++	++++	++++	+++
11....	Pyrocatechol + proline	++++	++++	++++	++++	++++
12....	Résorcinol	-				-
13....	Hydroquinone	-	+	+	+++	+
14....	Gaiacol	-	++++	-	++++	++++
15....	Pyrogallol	+++	++++	+++	+++	++
16....	α -naphthol	-	++++	-	++++	+++
17....	1.3-naphtalène-diol	-	++++	-	++++	+++
18....	Tyrosine	++	-	++	-	-
19....	DOPA	++++	++++	++++	++++	+++
20....	Acide salicylique	-	+		++	
21....	Acide <i>m</i> -hydroxy-benzoïque	-	±	-	±	
22....	Acide protocatéchique	+++	++++	+++	+++	+++
23....	Acide gentisique	-	+++		++++	++
24....	Acide α -résorcylique	-	±			+
25....	Acide β -résorcylique	-	±			+

TABLEAU I (suite)

Test n°	Substrat	Sérum S	Sérum S + H ₂ O ₂	Tyrosinase de Champignons	Peroxydase de Raifort	« Laccase » de <i>L. lignosus</i> (*)
26....	Acide δ-résorcylique	—	±			±
27....	Acide vanilique	—	+		++++	++
28....	Acide gallique	++	++++	++	++++	++++
29....	Acide tannique	++	++++	++	++++	++++
30....	Acide syringique	—	+		+++	±
31....	Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	++++	++++	+++	++++	
32....	Acide o-coumarique	—	±		+	
33....	Acide m-coumarique	—	+		+++	
34....	Acide p-coumarique	++	++		++++	±
35....	Acide caféique	++	++++	+++	++++	++
36....	Acide chlorogénique	++	+++	+++	++++	++
37....	Acide ferulique	±	+++	+	++++	++++
38....	Acide sinapique	±	++	+	++++	++++
39....	Ombelliférone	+	+		++	—
40....	Aesculétine	++++	++++	+++	++++	
41....	Scopolétine	—	++++	—	++++	
42....	Quercétine	+				

Milieu réactionnel : tampon cacodylate 0,1 M, pH 6, concentration en substrat 10 mM sauf dans les cas de faible solubilité où on utilise des solutions à saturation.

(*) Résultats de tests sur « Laccase » excrétée par *Leptoporus lignosus* en culture pure communiqués par J.-P. GEIGER du Laboratoire de Phytopathologie de l'O.R.S.T.O.M. d'Adiopodoumé en Côte-d'Ivoire.

(**) Auto-oxydation rapide à l'air.

le sont, et, parfois très énergiquement, par les peroxydases : la scopolétine (un des principaux composants du « pool » phénolique), les acides ferulique et sinapique et quelques dérivés benzoïques (acides salicylique, gentisique, vanilique et syringique). Le dernier groupe, enfin, est constitué par les composés susceptibles d'être utilisés comme substrats tant par les phénoloxydases que par les peroxydases du latex; la DOPA y appartient.

L'ensemble de ces observations suggère que le fonctionnement des phénoloxydases au sein du latex est tributaire des interactions entre ces enzymes, les peroxydases et les substrats phénoliques naturels communs aux deux systèmes enzymatiques ou spécifiques de l'un d'eux.

Le tableau II permet de comparer les activités MPO et o-DPO de la fraction sédimentable du latex. C'est cette dernière activité, de loin la plus importante, surtout dans le latex de certains clones (voir plus loin « différences clonales »), qui a fait l'objet des études plus détaillées.

2) LOCALISATION DE L'ACTIVITÉ *o*-DPO AU NIVEAU SUBCELLULAIRE

a) Présence d'un inhibiteur cytoplasmique non protéique

L'activité *o*-DPO est toujours liée à la fraction particulaire. Le surnageant (sérum C) est pratiquement inactif. Cette constatation a pu être vérifiée maintes fois (au total près de 100 mesures) et sur les latex provenant des différents clones. Il nous est arrivé, toutefois, de rencontrer exceptionnellement des surnageants (sérum C) manifestant une faible activité *o*-DPO, notamment au moment de la floraison de l'*Hévéa*.

Ajouté au sédiment, le sérum C inhibe fortement son activité *o*-DPO (fig. 1). Ceci explique le fait que les mesures enzymatiques effectuées sur le latex dépourvu de caoutchouc mais contenant tous les éléments figurés éclatés (lyse au Triton X-100

TABLEAU II

Comparaison entre les activités mono-
et polyphénol oxydase (*o*-diphénol oxydase) du latex (Clone PR 107)

Latex n°	Activité enzymatique mesurée sur la suspension du sédiment (S) avec comme substrat	
	Tyrosine (*) (D.O./ml latex/h)	DOPA (D.O./ml latex/mn)
1.....	3,65	1,66
2.....	2,33	1,83
3.....	5,44	1,99
4.....	3,87	1,50
5.....	3,20	1,38

(*) La mesure de l'activité avec tyrosine comme substrat rend compte de la transformation de la tyrosine en DOPA suivie de son oxydation avec formation des produits colorés.

ou aux ultra-sons) mélangés au surnageant clair ne révèlent qu'une faible activité *o*-DPO voir l'absence totale de cette dernière. C'est cette inhibition qui, selon toute vraisemblance, est à l'origine des renseignements antérieurs contradictoires concernant l'existence, dans le latex, des phénoloxydases.

L'inactivité du sérum C ne signifie cependant pas que l'*o*-DPO du latex est localisée exclusivement dans les particules. Au contraire, comme l'ont montré les études électrophorétiques, l'enzyme est de double origine, particulaire et sérique, mais se trouve, dans le sérum cytoplasmique, à l'état latent, totalement inhibée par certains constituants naturels.

Déjà COUPE *et al.* (1972) ont signalé la présence sur les électrophorogrammes du surnageant d'une bande *o*-DPO distincte de celle propre au sédiment. Nous avons mis en évidence, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et sur plaques

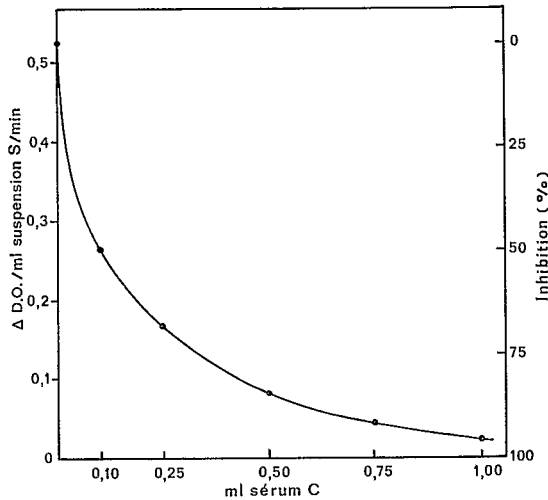


FIG. 1. — Inhibition de l'activité *o*-diphénol oxydase de la suspension du sédiment (suspension S) par des quantités croissantes de sérum cytoplasmique (sérum C).

d'amidon, la présence dans le sérum cytoplasmique, de plusieurs isoenzymes dont certaines, à caractère anionique, sont propres à cette fraction (*voir* plus loin « Différences clonales. Caractérisation des isoenzymes *o*-DPO »).

L'inhibiteur sérique de l'activité *o*-DPO est thermostable. Le sérum C maintenu 15 minutes à 100°C (et centrifugé) exerce toujours une forte action inhibitrice sur l'activité *o*-DPO du sédiment. Son effet est même un peu plus prononcé que celui du sérum C « frais » (tableau III). Il ne s'agit pas donc d'une protéine.

TABLEAU III

*Inhibition de l'activité o-DPO du sédiment (S)
par le sérum cytoplasmique (C) « frais » ou « bouilli » (maintenu 15 minutes à 100°C)*

Motifs	Activité <i>o</i> -DPO (Δ D.O./ml mélange/mn)	Inhibition (%)
Suspension S (1) + tampon.....	0,500	0
Suspension S (2) + tampon.....	0,540	0
Suspension S (1) + sérum C « frais ».....	0,080	84,0
Suspension S (2) + sérum C « frais ».....	0,040	92,6
Suspension S (1) + sérum C « bouilli ».....	0,040	92,0
Suspension S (2) + sérum C « bouilli ».....	0	100,0

Sédiment désintégré, soit aux ultra-sons (1), soit au Triton X-100 (2) ; 1 ml de suspension S est additionné de 3 ml de tampon ou de sérum C.

Une dialyse de 24 heures du sérum C contre de l'eau et surtout contre un tampon (cacodylate de pH 6,5 ou Tris de pH 7,3) lui confère à la fois une activité *o*-DPO et abolit ses propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'enzyme particulaire. Cette activité, comparée à celle manifestée par le sérum C correspondant est toutefois relativement faible : 0,07 (dialyse contre cacodylate) ou 0,11 (dialyse contre Tris) contre 1,36 par le sérum S, les valeurs étant exprimées en Δ D.O./min/ml de sérum respectif.

Les recherches sur la nature de l'inhibiteur sérique se poursuivent.

b) Localisation de l'activité *o*-DPO particulaire

En ce qui concerne l'*o*-DPO du sédiment, sa localisation au niveau des particules de FREY-WYSSLING, mise en évidence par COUPE *et al.* (1972), a pu être confirmée en utilisant après quelques modifications les deux techniques empruntées aux auteurs.

La première met à profit l'action sélective de la digitonine sur les organites du sédiment. Dans des conditions expérimentales bien déterminées après 30 minutes d'incubation du sédiment avec la digitonine 0,5 mM (*fig. 2 a*) on obtient la lyse

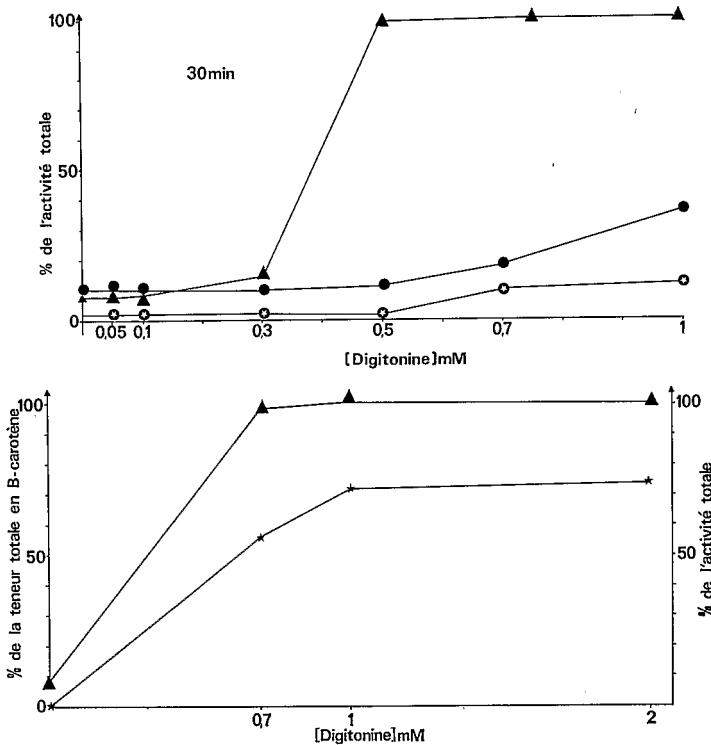


FIG. 2. — Action sélective de la digitonine sur les organites du sédiment. (a) activités enzymatiques « solubles » libérées du sédiment par un traitement à la digitonine, en fonction de la concentration; *o*-diphénol oxydase (triangles); phosphatase acide (points); peroxydase (étoiles); (b) Mise en évidence de la libération simultanée de l'activité *o*-diphénol oxydase (triangles) et du β-carotène (étoiles).

quasi complète des particules contenant l'*o*-DPO avec « solubilisation » de l'enzyme qui passe dans le surnageant, alors que les lutoïdes, caractérisés par leur activité phosphatase acide (Pase), demeurent entiers. L'activité PerOx reste également liée aux organites n'ayant pas subi de lyse.

Parallèlement à la « solubilisation » de l'*o*-DPO il y a libération, dans le surnageant, du β -carotène (*fig. 2 b*); il s'agit donc bien des particules de FREY-WYSSLING.

La deuxième technique emploie une centrifugation en gradient de densité. La distribution des protéines et des activités enzymatiques le long d'un gradient continu de saccharose (*fig. 3*) montre que les protéines, la Pase et la PerOx suivent la même distribution, distincte de celle de l'*o*-DPO. Remarquons, en passant, le déplacement très caractéristique du pic des lutoïdes (Pase) provenant du latex des arbres stimulés

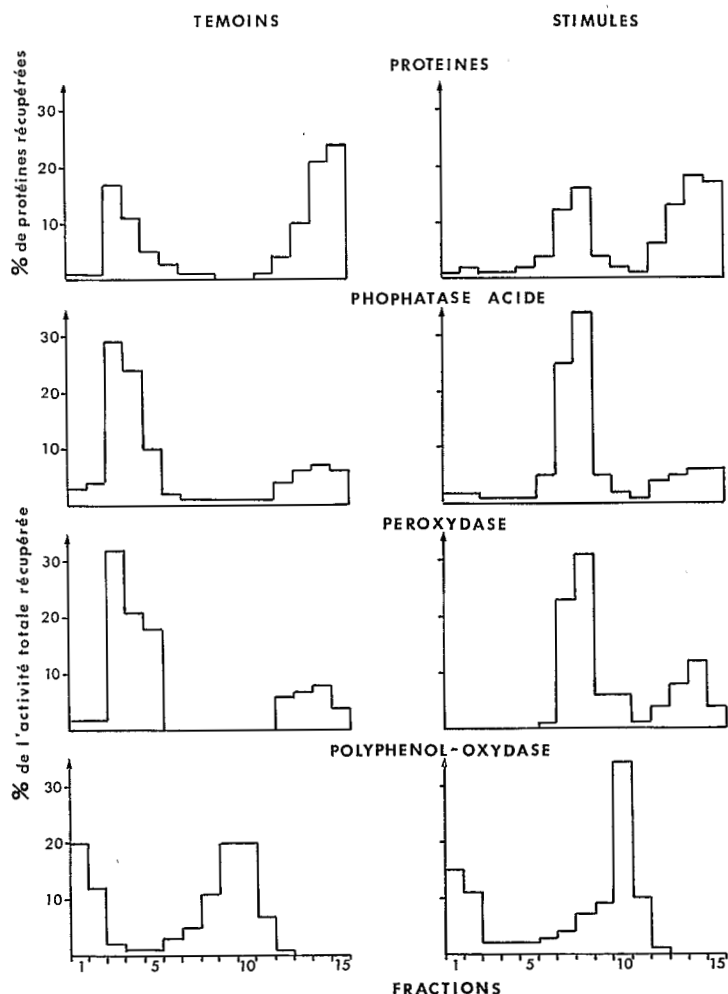


FIG. 3. — Distribution des protéines et des activités enzymatiques le long du gradient linéaire de saccharose (de 0 à 50 %); à gauche, latex non stimulé, à droite latex stimulé par l'éthrel.

vers les fractions plus légères du gradient et le « resserrement » simultané du pic de l'*o*-DPO.

L'*o*-DPO, en plus du pic principal (fractions 8-11) correspondant aux particules de FREY-WYSSLING, présente systématiquement un deuxième pic lié aux fractions les plus lourdes (1-2), fractions habituellement assimilées soit à une population de lutoïdes de densité plus forte, soit aux particules agglutinées. Ce qui frappe, toutefois, c'est que l'on n'y décèle que très peu de protéines, de Pase et de PerOx.

Compte tenu de ce fait, ainsi que de certaines observations faites au cours des centrifugations différentielles du latex (la présence constante, au fond des tubes, d'un petit culot grisâtre et gélatineux facilement séparable de l'abondant culot lutoïdique dont il diffère par son aspect et sa consistance; on y décèle toujours une activité *o*-DPO, mais pratiquement pas de Pase ni de PerOx), nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait s'agir là d'un type de particules riche en *o*-DPO, non encore identifié, distinct de celles de FREY-WYSSLING, correspondant à la zone 11 de MOIR (1959). Examinée au microscope électronique, sa composition s'est montrée très hétérogène et aucune structure particulière distincte et caractéristique n'a pu être décelée. L'examen au microscope électronique mérite d'être repris sur cette fraction purifiée.

3) QUELQUES CARACTÉRISTIQUES DE L'*o*-DPO DU LATEX

a) pH optimal

Les courbes de la figure 4 *a* et *b* traduisent les variations de l'activité *o*-DPO de la fraction sédimentable en fonction du pH. Qu'elle soit mesurée sur le sérum S clair ou sur la suspension S, en présence ou en l'absence des ions Ca^{2+} et indépendamment de la nature du tampon utilisé (cacodylate ou phosphate), l'activité de l'enzyme est toujours optimale aux environs de pH 6,0, valeur adoptée pour effectuer les mesures habituelles. L'allure des courbes change suivant le cas considéré, mais toutes se caractérisent par une chute de l'activité nettement plus sensible pour les pH inférieurs à 6 que pour les pH supérieurs à cette valeur.

Toutefois à partir du pH neutre et, surtout pour les pH basiques (tampon phosphate ou Tris), une oxydation spontanée non négligeable de la DOPA s'ajoute à l'oxydation enzymatique, ce qui rend l'évaluation de l'activité dans cette région de pH peu fiable.

A pH optimum la nature du tampon influe peu sur l'activité *o*-DPO. Les valeurs suivantes ont été obtenues pour trois tampons : 0,140 pour phosphate 0,1 M, 0,125 pour cacodylate 0,1 M et 0,122 pour Tris-maléate 0,1 M (résultats exprimés en $\Delta D.O./0,1$ ml sérum S dilué/mn).

Remarquons que le pH optimal pour l'activité *o*-DPO particulière est assez proche du pH physiologique du latex qui oscille autour de 6,7-6,8 (RIBAILLIER, 1972); il se situe à mi-chemin entre celui du sérum S ($\approx 5,6$) et celui du sérum C (≈ 8).

b) Effecteurs

Pour apprécier l'effet de divers effecteurs sur l'activité phénoloxydase de la fraction sédimentable, ces substances ont été introduites, en concentrations variables, dans le milieu réactionnel habituel (tampon cacodylate, pH 6,0) (tableau IV). L'activité était mesurée systématiquement avec la DOPA (10 mM) comme substrat. Dans quelques cas particuliers, d'autres substrats, le catéchol et la tyrosine, ont été également testés.

(i) *Cations minéraux*

Les deux cations divalents, calcium et magnésium, apparaissent comme activateurs très efficaces de l'enzyme. L'effet stimulant de l'ion Ca^{2+} sur l'*o*-DPO du latex a déjà été observé par COUPÉ *et al.* (1972). Il est à l'origine de l'insertion du CaCl_2 5 mM dans le milieu réactionnel lors des mesures standard de l'activité *o*-DPO.

Les activations maximales sont obtenues avec des concentrations 10 mM pour le Ca^{2+} et 50 mM pour le Mg^{2+} .

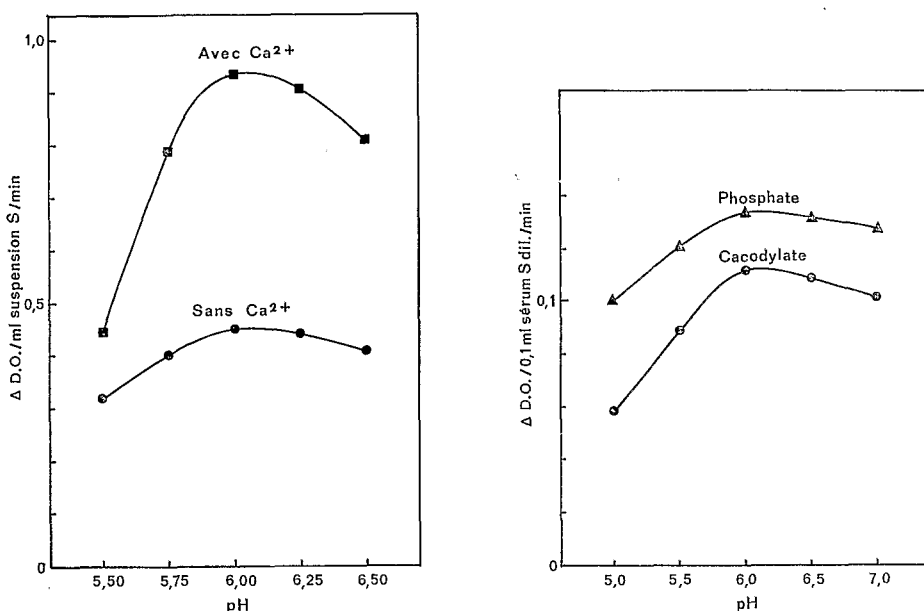


FIG. 4. — Variation de l'activité *o*-diphénol oxydase du sédiment en fonction du pH du milieu réactionnel. (a) mesurée sur la suspension du sédiment (suspension S) en présence ou en absence des ions Ca^{2+} (tampon cacodylate 0,1 M); (b) mesurée sur le sérum du sédiment (sérum S) clair, en absence des ions Ca^{2+} , avec tampon cacodylate 0,1 M et avec tampon phosphate 0,02 M¹

L'effet positif de ces deux cations sur l'activité *o*-DPO est à rapprocher de leur action stimulant sur la coagulation du latex rapportée précédemment.

Une remarque analogue peut être formulée à l'égard de l'ion Cu^{2+} lequel, à faibles concentrations (l'activation maximale est obtenue pour des concentrations inférieures à 10^{-4} M), stimule à la fois l'activité *o*-DPO et la coagulation du latex.

La stimulation de l'activité *o*-DPO par les trois cations étudiés, Ca^{2+} , Mg^{2+} et Cu^{2+} , se montre la plus efficace chez les Pb 86, clone qui se distingue des autres par une activité *o*-DPO particulièrement faible (voir plus loin « Différences clonales »).

Les deux autres cations divalents, le Co^{2+} et le Zn^{2+} , à concentrations comparables à celles du Cu^{2+} , n'exercent pratiquement aucun effet sur l'activité de l'enzyme.

TABLEAU IV

Activité relative de la phénol oxydase du sédiment (S) en présence des différents effecteurs — certains cations divalents, antioxydants, agents chélateurs et autres — avec DOPA comme substrat (sauf les cas indiqués par astérisques). Résultats exprimés en pourcentage de l'activité sans effecteur. Milieu réactionnel habituel (tampon cacodylate 0,1 M, pH 6,0).

Effecteur testé	Concentration { M }			Clone											
				PR 107			Tjir 1			GT 1			Pb 86		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Sans effecteur.....				100			100			100			100		
CaCl ₂	5.10 ⁻³	2.10 ⁻³	5.10 ⁻²	341	491	399	216	279	239	466	639	571	500	919	898
MgCl ₂	5.10 ⁻³	5.10 ⁻²	10 ⁻¹	233	432	345	147	284	192	236	633	545	333	783	700
CuCl ₂	5.10 ⁻⁵	2.10 ⁻⁴	10 ⁻³	256	177	160	221	171	147	188	182	152	290	272	247
CoCl ₂	2.10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	96	97	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZnSo ₄	2.10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	102	99	99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ascorbate.....	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	71	6	0	66	17	5	78	29	6	10	0	0
Dithionite de Na...	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	67	14	3	-	-	-	-	-	-	-	0	0
				68 (*)	19 (*)	4 (*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSH.....	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	86	42	3	90	47	6	79	30	0	-	0	0
Cystéine.....	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	85	33	0	91	44	6	73	27	0	-	0	0
Thiourée.....	10 ⁻³	2.10 ⁻³	5.10 ⁻³	28	13	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN.....	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	73	56	4	74	65	11	57	28	0	98	60	20
DIECA.....	2.10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	77	32	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				100	102	110	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EDTA.....	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³	5.10 ⁻³	99 (*)	101 (*)	108 (*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				103	102	102	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o-Phénantroline....	5.10 ⁻⁴	10 ⁻³	2.10 ⁻³	100 (*)	101 (*)	101 (*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) Avec Catéchol comme substrat.

(ii) *Substances réductrices*

Les quatre substances réductrices testées, l'ascorbate, le dithionite, le MSH et la cystéine, inhibent très fortement l'activité *o*-DPO. L'ascorbate et les composés à $-SH$ donnent des résultats en tous points comparables : l'inhibition s'amorce déjà à concentration très faible, de l'ordre de 10^{-5} M, et devient quasi totale à 5×10^{-4} M. Le dithionite exerce un effet inhibiteur encore plus puissant mais, contrairement aux antioxydants précédents, son action, à faible concentration, n'est pas durable. Cette inhibition de l'activité *o*-DPO, mesurée avec les deux substrats, DOPA et catéchol, s'avère réversible à faibles molarités de dithionite (de l'ordre de 10^{-5}). Si l'on abandonne le milieu réactionnel à l'air, sous agitation vigoureuse, l'enzyme est progressivement réoxydée et son activité restituée.

Comme pour les activateurs, le clone Pb 86 se montre le plus sensible à l'action des inhibiteurs.

Rappelons que l'addition au latex des réducteurs cités ci-dessus ralentit la coagulation (HANOWER *et al.*, 1976).

(iii) *Complexeurs de métaux* (tableau IV, fig. 5)

L'inhibition de l'activité *o*-DPO par KCN et par le DIECA, complexants du Cu^{2+} et son insensibilité à l'EDTA et à l'*o*-diphénantroline, complexants du Fe^{2+} , montrent qu'il s'agit bien de la phénoloxydase classique à cuivre. Ceci est

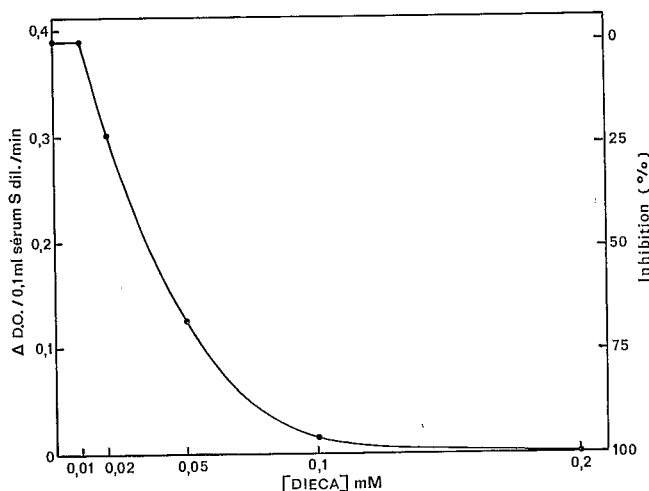


FIG. 5. — Inhibition de l'activité *o*-diphénol oxydase du sérum de sédiment (sérum S) par le diéthylthiocarbamate.

est confirmé par l'expérience suivante : le sérum S additionné de KCN et dialysé, puis concentré contre une solution de polyéthylène glycol, s'avère dépourvu d'activité *o*-DPO. Si on ajoute, à ce sérum inactif, des ions Cu^{2+} exogènes, l'activité oxydasique se rétablit partiellement. Vis-à-vis de l'EDTA, l'*o*-diphénol oxydase du latex paraît différer de celle du raisin dont l'activité est diminuée par le chélateur (DUBERNET et RIBEREAU-GAYON, 1973), mais se comporte comme l'enzyme de feuilles d'Épinard qui est insensible (ODA *et al.*, 1973).

La thiourée, à 10^{-3} M, provoque une chute notable de l'activité *o*-DPO. A $5 \cdot 10^{-3}$ M, l'activité est quasi annulée.

Le tableau V met en évidence l'action inhibitrice nette du DIECA sur la coagulation du latex, ce qui est un nouvel argument concernant le rôle de l'activité *o*-DPO au cours de ce processus.

TABLEAU V

Action du DIECA sur le pouvoir coagulant du sérum du sédiment (S)

Motifs	Temps (minutes) nécessaire pour atteindre les étapes successives de coagulation			
	Déstabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
Latex.....	(*)	(*)	(*)	(*)
Latex + Sérum S.....	30	45	75	195
Latex + Sérum S + DIECA.....	120	180	(*)	(*)

Milieu : Latex, 3 ml; tampon cacodylate 0,5 M pH 6,0, 1 ml; Sérum S, 0,50 ml; DIECA 5 mM; H₂O, q.s.p. 5 ml.

(*) Étape de coagulation non atteinte après 4 heures.

4) ACTION DE LA STIMULATION DE LA PRODUCTIVITÉ DES ARBRES PAR DE L'ÉTHYLÈNE SUR L'ACTIVITÉ *o*-DPO DU LATEX

Quoique, à ce jour, la connaissance du mécanisme d'action de l'éthylène, agent utilisé à une très grande échelle en hévéaculture pour stimuler la productivité des arbres, fait défaut, son effet sur la prolongation de la durée de l'écoulement du latex est bien connu. La vitesse d'écoulement n'étant pas accélérée (RIBAILLIER, 1972), ce sont les propriétés coagulantes qui, supposons-nous, devaient subir une modification. Nous avons, en effet, démontré dans des expériences *in vitro* (HANOWER *et al.*, 1976) que le latex provenant des arbres stimulés se caractérise par un pouvoir coagulant nettement réduit par rapport au témoin non stimulé. A la lumière de ce fait, et vu le rôle postulé de la polyphénol oxydase dans le processus de la coagulation du latex, il a été logique de s'attendre à une influence du traitement stimulant sur l'activité *o*-DPO. Cette influence a été étudiée en effectuant, durant plusieurs saignées, des mesures systématiques de l'activité *o*-DPO sur la suspension S des latex provenant des deux lots d'arbres, un témoin, et un ayant subi un traitement stimulant à l'Ethrel (acide 2-chloro éthylphosphonique) générateur d'éthylène. Dans le premier temps l'évolution de l'activité *o*-DPO n'a été suivie qu'à partir de la quatrième récolte après la stimulation (*fig.* 6, courbes A 1 et A 2). Une chute spectaculaire de l'activité de l'enzyme sous l'action de l'éthylène a été constatée. Cette activité ne représentait que 35 % de la valeur témoin à la quatrième récolte et 19 % seulement à la dixième. L'effet dépressif s'est montré durable; il persistait encore à la quinzième récolte, c'est-à-dire près de deux mois après la stimulation.

Cette première expérience a été suivie d'autres, complétées par des mesures de l'activité *o*-DPO pendant quelques récoltes précédant le traitement stimulant et les premières récoltes après la stimulation (*fig. 6*, courbes B, C et D). Ces expériences ont permis, en premier lieu, de constater que les lots d'arbres choisis étaient bien, par paire (lots 1 et 11 d'une même expérience), très semblables en ce que

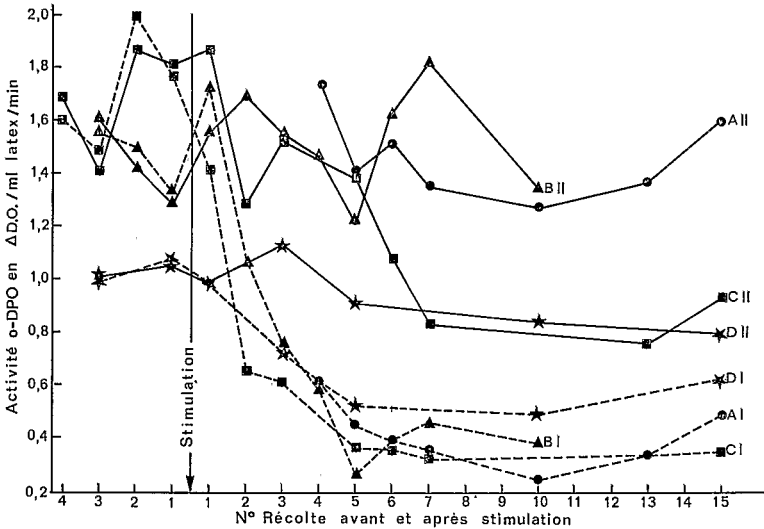


FIG. 6. — Influence de la stimulation des arbres par l'éthrel sur l'activité *o*-diphénol oxydase du sédiment. Clone PR 107. Quatre expériences : A (points); B (triangles), C (carrés), D (étoiles); lot 1 stimulés (tirets), lot 2 témoins (trait plein). Dates de stimulation : A-27/VII/72; B-5/X/72; C-13/XI/73; D-29/IV/75.

concerne leur activité *o*-DPO, quoique ces valeurs changeaient d'une expérience à l'autre. Elles ont, d'autre part, confirmé les premiers résultats tout en apportant certaines précisions. Il est, en effet, apparu que la baisse de l'activité *o*-DPO ne s'amorce qu'après une phase plus ou moins stationnaire, parfois même après une légère augmentation de cette activité (*fig. 6*, courbe B 1), observées immédiatement après le traitement stimulant, à la première récolte. Par la suite l'activité *o*-DPO décroît rapidement et passe par un minimum qui se situe, suivant l'expérience, entre la cinquième et la dixième récolte. Mise à part l'expérience D où la dose de l'Éthrel a été diminuée (concentration de 5 % de matière active au lieu de 10 % employée partout ailleurs) et où son action a été moins nette, les valeurs minimales oscillent autour de 20-25 % de celles du témoin. A la quinzième récolte, l'effet dépressif du traitement stimulant est encore très marqué.

Les résultats obtenus confirment, sans ambiguïté, l'existence d'un rapport direct entre l'activité *o*-DPO et le pouvoir coagulant du latex, les deux se trouvent fortement réduits sous l'influence de l'éthylène.

Notons encore que, parallèlement à la baisse sensible de l'activité *o*-DPO produite par le traitement stimulant, on constate une augmentation très nette de la teneur globale en phénol du latex (résultats non publiés).

5) DIFFÉRENCES CLONALES

La plupart des essais rapportés jusqu'à présent ont été effectués sur les latex du clone PR 107.

L'exceptionnelle variabilité de l'activité *o*-DPO du latex signalée par COUPÉ *et al.* (1972) ainsi que la recherche d'un rapport entre cette activité et les propriétés coagulantes du latex nous ont amené à étudier les variations d'origine clonale.

Quatre clones, très différents du point de vue de la qualité du latex, de la vitesse et de la durée d'écoulement, ont été choisis pour cette étude : PR 107, Tjir 1, GT 1 et PB 86 (MILFORD *et al.*, 1969). Quelques essais ont été également effectués sur BD 5, clone à latex très blanc.

a) Mesures de l'activité *o*-DPO

Les mesures d'activité *o*-DPO ont été réalisées, soit sur la suspension du sédiment (et ceci sur un grand nombre d'échantillons provenant d'arbres différents et prélevés à diverses époques de l'année), soit en nombre réduit (deux séries de dosages pour chacun des clones, à des dates rapprochées) sur le sérum S.

(i) Sédiment

Dans le tableau VI sont consignées les valeurs moyennes, minimales et maximales de l'activité *o*-DPO du sédiment (suspension S) chez les cinq clones étudiés. Ceux-ci peuvent être classés en trois groupes en fonction de l'activité *o*-DPO

TABLEAU VI

Variations de l'activité o-DPO du sédiment (suspension S) selon le clone

Clone	Activité <i>o</i> -DPO (Δ D.O./ml latex/mn)		
	moyenne	valeur minimale	valeur maximale
Tjir 1.....	2,23	0,96	5,76
PR 107.....	1,21	0,62	2,17
GT 1.....	0,36	0,23	0,48
Pb 86.....	0,06	0,03	0,07
BD 5.....	1,14	1,02	1,36

Moyennes des 72 déterminations pour Tjir 1; 84 pour PR 107; 15 pour GT 1; 21 pour Pb 86 et 4 pour BD 5. Mesures effectuées dans les conditions standard : tampon cacodylate 0,1 M; pH 6,0; CaCl₂ 5 mM; DOPA 10 mM comme substrat.

présente dans la fraction sédimentable. Le premier groupe à *o*-DPO très active comprend le Tjir 1 et le PR 107. Les valeurs minimales du premier se chevauchent avec les valeurs moyennes du second. A ce groupe on pourrait adjoindre le BD 5,

si on se base sur les résultats de quelques mesures effectuées (quatre) dont la moyenne se rapproche de celle trouvée pour le PR 107. Le deuxième groupe, à activité que l'on peut désigner comme moyenne, est représentée par le GT 1. Ses valeurs maximales ne sont pas trop éloignées des valeurs minimales du PR 107. Enfin, dans le dernier groupe, à activité *o*-DPO particulièrement faible, figure le Pb 86, pour lequel les valeurs maximales sont de loin inférieures à celles jamais trouvées dans les latex des autres clones. Mesurée en absence du CaCl_2 , l'activité *o*-DPO est à peine décelable (moyenne égale à 0,01). C'est chez ce clone que l'activation de l'enzyme par les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} se montre la plus efficace (tableau IV).

Il est à noter que les valeurs minimales du tableau VI se rapportent, en général, soit à la fin du cycle annuel, soit aux latex provenant des encoches très basses, situées non loin du porte-greffe. Ceci met en évidence l'importance des variations de l'activité *o*-DPO en fonction des facteurs tels que la saison ou la hauteur de l'encoche. Les études détaillées de ces variations se poursuivent actuellement.

(ii) *Sérum S*

Les mesures de l'activité *o*-DPO effectuées sur le sérum S des différents clones confirment le classement rapporté ci-dessus. Dans l'ordre d'activité décroissante, il faut citer le Tjir 1, le PR 107, le BD 5, le GT 1 et le Pb 86 avec des valeurs de Δ D.O. par 0,1 ml de sérum S et par minute égales respectivement à 2,77, 0,83, 0,70, 0,06, et 0,004.

b) Caractérisation des isoenzymes à activité *o*-DPO

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (*fig. 7* et *8*) ou sur gel d'amidon (*fig. 9*) des sérums S et C issus des latex provenant des différents clones a mis en évidence plusieurs isoenzymes à activité *o*-DPO.

(i) *isoenzymes particulières*

La révélation, par la DOPA, des électrophorégrammes sur gel de polyacrylamide des protéines particulières issues des clones PR 107, Tjir 1 et BD 5, entraîne un noircissement rapide et diffus de la partie supérieure du gel (*fig. 8 a, b, f, g*). Ce noircissement est quasi instantané à l'origine (bande *o* à l'enregistrement densitométrique sur la figure *7 a* et *b*) et témoigne de la présence d'isoenzymes cationiques ne migrant pas. La diffusion rapide de la coloration rend impossible toute localisation des bandes. L'emploi du catéchol comme révélateur (*fig. 8 c*) ou la dilution préalable du sérum S (*fig. 8 d* et *e*), permettent de déceler d'autres bandes (n^{os} 12, 22 et 25 de la figure *7*). Après de nombreux essais, la séparation en plusieurs isoenzymes de la bande principale a pu être obtenue en électrophorèse sur plaque de gel d'amidon. Quatre à cinq bandes cationiques ont pu être visualisées (*fig 9 b, c* et *d*).

Contrairement aux trois clones cités ci-dessus, les électrophorégrammes sur gel de polyacrylamide du sérum S de GT 1 et de Pb 86 ne révèlent que la présence des bandes 22 et 25 (*fig. 7 c, 8 h, i, et j*). Le temps nécessaire à leur révélation est beaucoup plus long, surtout chez Pb 86. Les origines des gels, presque incolores, indiquent une quasi-absence des isoenzymes cationiques.

(ii) *isoenzymes cytoplasmiques*

La révélation sur gel de polyacrylamide des isoenzymes cytoplasmiques est nettement plus lente que celle des isoenzymes particulières malgré des prises d'essais plus grandes (15 μl de sérum C contre 5 μl de sérum S). Le nombre des bandes visualisées varie, selon le clone : entre 7 pour le PR 107, le Tjir 1 et le BD 5 (*fig. 7 d*

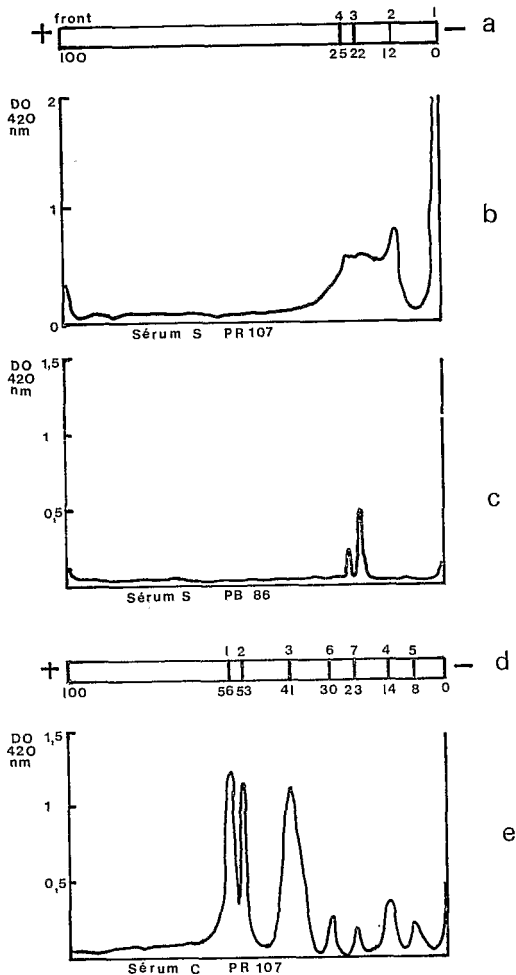


FIG. 7. — Représentation schématique de la mobilité électrophorétique des *o*-diphénol oxydases du sédiment (a) et du surnageant (d) sur gel de polyacrylamide. Le front est marqué au bleu de bromophénol (mobilité = 100). Enregistrement densitométrique des électrophorégrammes des sérums du sédiment (sérum S) PR 107 (b) et Pb 86 (c) et du sérum cytoplasmique (sérum C) PR 107 (e). Pour a et d, l'ordre d'apparition des bandes est porté au-dessus du schéma des gels.

et e, fig. 8 l, n et o), 5 pour le GTL (fig. 8 p) où manquent les bandes 53 et 8, et 4 pour le Pb 86 (fig. 8 r) où l'on note l'absence des bandes 53, 30 et 8.

Les électrophorégrammes obtenus à partir du sérum C sont ainsi caractérisés par la présence d'enzymes anioniques (bandes 56, 53, 41 et 30) qui n'apparaissent pas sur les électrophorégrammes provenant du sérum S. La figure 7 d indique que ces enzymes sont précisément celles qui sont le plus rapidement révélées.

Il est probable que certaines bandes plus cationiques proviennent du sérum S, libéré par la rupture des particules au cours de la séparation (bandes 23 et 14). La bande 8 paraît caractéristique du sérum C.

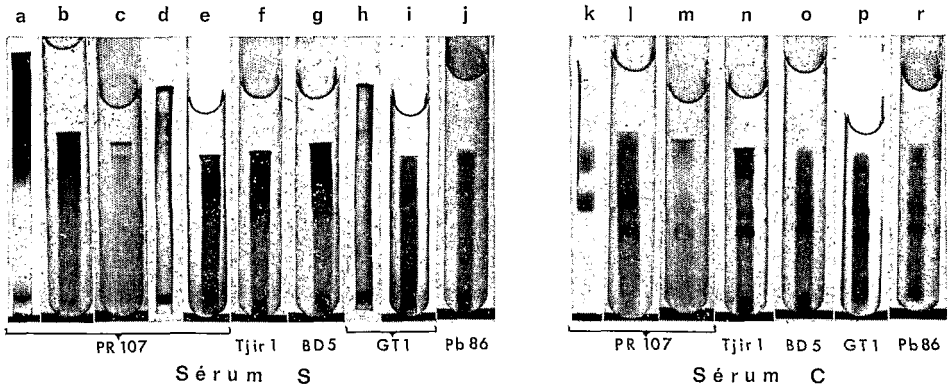


FIG. 8. — Électrophorèse sur gel de polyacrylamide des *o*-diphénol oxydases du sérum du sédiment (sérum S) — *a* à *j* — et du sérum cytoplasmique (sérum C) — *k* à *r* — des différents clones. Quantités déposées : 5 μ l sérum S et 15 μ l sérum C non dilués sauf pour *d* et *e* où le sérum S a été dilué au 1/5. Révélateur : la DOPA à l'exception des *c* et *m* révélées au catéchol. Durée de la révélation des isoenzymes du sédiment : *a* = 1 heure; *b* et *c* = 15 minutes; *d* = 30 minutes; *e* = 2 heures; *f* = 15 minutes; *g* = 1 heure; *h* = 30 minutes; *i* = 6 heures; *j* = 16 heures. Durée de la révélation des isoenzymes cytoplasmiques : *k* = 1 heure; *l* = 16 heures; *m* = 4 heures; *n* = 6 heures; *o*, *p* et *r* = 16 heures.

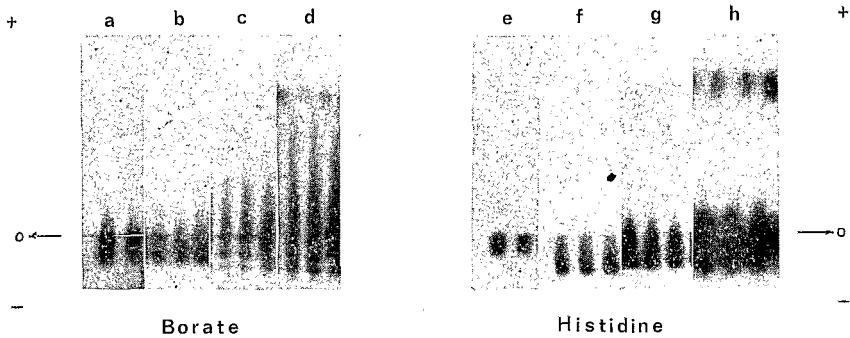


FIG. 9. — Séparation en électrophorèse sur plaques d'amidon des isoenzymes cationiques de l'*o*-diphénol oxydase du sédiment (S) du PR 107, avec, comme tampon de gel, acide borique-NaOH, pH 8,5 (*a*, *b*, *c*, *d*) et histidine-NaCl-NaOH, pH 6,0 (*e*, *f*, *g*, *h*). Révélateur : la DOPA. Durée de la révélation : *a* et *e* = 30 minutes; *b* et *f* = 4 heures; *c* et *g* = 16 heures; *d* et *h* = 24 heures.

La révélation des isoenzymes cytoplasmiques par le catéchol n'apporte aucune amélioration par rapport à la révélation par la DOPA (*fig. 8 m*).

En électrophorèse sur plaques d'amidon, seules les isoenzymes cytoplasmiques principales, à mobilité électrophorétique élevée, sont révélées par la DOPA. Elles apparaissent non séparées, sous forme d'une bande unique assez large, après révélation de longue durée (*fig. 9 c, d, g* et *h*).

En résumé, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et sur plaques de gel d'amidon a mis en évidence la nature qualitativement différente des protéines à

activité *o*-DPO des deux compartiments, particulaire et cytoplasmique. Dans le premier dominant les isoenzymes à caractère cationique; les isoenzymes du second, nettement moins actives vis-à-vis des substrats utilisés pour leur révélation (DOPA ou catéchol), sont essentiellement anioniques.

Les cinq clones étudiés diffèrent fortement sous le rapport de l'activité *o*-DPO particulaire. La nature des isoenzymes présentes dans les particules semble déterminer son activité. Ce seraient les isoenzymes cationiques, très abondantes chez le Tjir, le PR 107 et le BD 5, qui leur confèreraient leur forte activité *o*-DPO. Mal représentées chez le GT 1 et, surtout, chez le Pb 86, leur défaut serait à l'origine de l'activité particulièrement faible observée chez ce dernier clone. Certaines différences qualitatives apparaissent aussi au niveau des isoenzymes cytoplasmiques.

CONCLUSIONS

Les études décrites ci-dessus ont apporté un certain nombre de précisions concernant la nature, les propriétés et le fonctionnement des phénol oxydases du latex. Elles ont aussi mis en évidence les différences clonales très marquées concernant l'activité *o*-DPO particulaire et l'effet, non moins spectaculaire, d'une stimulation à l'Ethrel sur l'activité de l'enzyme.

Ces données mises en parallèle avec les résultats obtenus auparavant et concernant les facteurs agissant sur la coagulation du latex (HANOWER *et al.*, 1976), ont permis de confirmer l'hypothèse émise préalablement, selon laquelle la phénol oxydase est une des enzymes clefs impliquées dans le mécanisme de la coagulation du latex.

Les arguments plaçant en faveur de cette hypothèse sont les suivants :

- des deux compartiments, particulaire et cytoplasmique, où l'enzyme est localisée, seul le premier, manifestant une forte activité *o*-DPO, exerce un pouvoir coagulant sur le latex, pouvoir quasiment aboli en présence du DIECA, inhibiteur spécifique des phénol oxydases. Le surnageant, pratiquement dépourvu d'activité *o*-DPO à cause de la présence d'un inhibiteur naturel de l'enzyme, exerce une action à la fois anticoagulante et inhibitrice sur l'*o*-DPO du sédiment.

- d'une manière générale, les facteurs qui favorisent la coagulation, tels l'oxygène et les cations divalents, Ca^{2+} , Mg^{2+} et Cu^{2+} , activent l'*o*-DPO de la fraction sédimentable. Une semblable analogie est observée pour les substances réductrices comme l'ascorbate, le dithionite, le MSH ou la cystéine, lesquelles, à concentrations comparables, à la fois retardent la coagulation du latex et inhibent totalement l'enzyme.

- le traitement des arbres par l'Ethrel, dont l'effet principal se traduit par une prolongation de l'écoulement du latex et la diminution de ses propriétés coagulantes, se répercute sur l'activité *o*-DPO en provoquant sa baisse très sensible.

- les différences clonales aussi marquées concernant l'activité *o*-DPO particulaire que celles que l'on constate entre par exemple un Tjir 1 ou un PR 107, tous deux à *o*-DPO très active et un GT 1 à activité relativement faible, se reflètent dans les propriétés coagulantes très différentes des latex respectifs.

A la lumière de ce qui précède la participation des phénol oxydases dans le processus de la coagulation du latex paraît incontestable.

Un prochain article traitera des polyphénols naturellement présents dans le latex et de leur rôle régulateur possible.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. H. YOHOU ATIELE, assistant au laboratoire de Physiologie végétale d'Adiopodoumé, pour son aide technique dévouée et efficace dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- BOBILIOF F. W., 1923. — *Anatomy and Physiology of Hevea Brasiliensis*. Zurich Art. Inst. Orell Fussli, 85.
- BREWER G. J., 1970. — *An introduction to isozyme techniques*. Academic Press, New York, San Francisco-London, 186.
- COUPÉ M., PUJARNISCLE S. et d'AUZAC J., 1972. — Compartimentation de diverses oxydoreductases (peroxydase, *o*-diphénol oxydase et malate deshydrogénase) dans le latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg. *Physiol. vég.*, **10**, 459-480.
- DUBERNET M. et RIBEREAU-GAYON P., 1973. — Les « polyphénoloxydases » du raisin sain et du raisin parasité par *Botrytis cinerea*. C. R. Acad. Sc., Paris, **277**, série D, 975-978.
- HAAN-HOMANS (DE) L. N. S., 1950. — Oxidation Process in latex of *Hevea brasiliensis*. *Trans. Inst. Rubber Ind.*, **25**, 346-363.
- HANOWER P., et BRZOWSKA J., 1973. — Influence d'un choc hydrique sur l'activité de la phosphatase acide chez le Cotonnier (*Gossypium*). *Physiol. vég.*, **11**, 385-394.
- HANOWER P., BRZOWSKA J. et LIORET C., 1976. — Étude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth), Müll. Arg. I. Facteurs agissant sur la coagulation. *Physiol. vég.*, **14**, 677-693.
- HSIA R. C. H., 1958. — Oxygen Absorption by *Hevea brasiliensis* latex. *Trans. Inst. Rubb. Ind.*, **34**, 267-290.
- LANCE C., 1963. — Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire des tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés *in vitro*. Thèse Doct. État, Sc. nat., Paris.
- LINHARDT K. et WALTER K., 1963. — Phosphatase determination in serum with *p*-nitrophenylphosphate. In *Methods of Enzymatic Analysis*, BERGAMON H. U., éd., Acad. Press, New York et Londres, 783-785.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. I., FARR A. L. et RANDALL R. J., 1961. — Protein mesurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- LUSTINEC J. et RESING W. L., 1967. — Étude de la productivité et de quelques propriétés du latex de différentes parties du tronc de l'Hévéa., *Rev. gén. Caout. Plast.*, **44**, 345-352.
- MILFORD G. F. J., PAARDEKOOPER E. C. et HO CHAI YEE, 1969. — Latex vessel plugging, its importance to yield and clonal behaviour. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **21**, 274-282.
- MOIR G. F. U., 1959. — Ultra-centrifugation and staining of *Hevea* latex. *Nature*, **184**, 1626-1628.
- ODA Y., OH-E S. et WATANABE T., 1973. — Phenoloxydase in Spinach leaves : intracellular distribution, and some properties of the enzyme purified from the mitochondrial fraction. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **47**, 301-307.
- ORNSTEIN L. et DAVIS B. J., 1964 a. — Disc electrophoresis. 1) Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349.
- ORNSTEIN L. et DAVIS B. J., 1964 b. — Disc electrophoresis. II) Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **121**, 404-427.
- RIBAILLIER D., 1972. — Quelques aspects du rôle des lutoïdes dans la physiologie et l'écoulement du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll Arg. Action de produits libérant de l'éthylène. Thèse Doct. État, Sc. Nat., Abidjan.

- SMITHIES O., 1955. — Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J.*, **61**, 629-641.
- SPENCE D., 1908 *a.* — On the presence of oxydases in india rubber with a theory in regard to their function in the latex. *Biochem J.*, **3**, 165-181.
- SPENCE D., 1908 *b.* — On the presence of an oxidising enzyme in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Biochem. J.*, **3**, 351-352.
- STAHMANN M. A., CLARE B. G. et WOODBURY W., 1966. — Increased disease resistance and enzyme activity induced by ethylene and ethylene production by black rot infected sweet potato tissue. *Plant Physiol.*, **41**, 1505-1512.
- TATA S. J. et EDVIN E. E., 1970. — *Hevea* latex enzymes detected by zymogram technique after starch gel electrophoresis. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **23**, 1-12.
- VRIES (DE) O., 1920. — *Estate Rubber, Its Preparation, Properties and Testing*. Drukkerijen Ruygrok et Co, Batavia, 27.
- WHITBY G. S., 1920. — *Plantation Rubber and the Testing of Rubber*. Longmans, Green et Co, London, 54.