

BIOCHIMIE CELLULAIRE. — Mise en évidence d'une glutathion réductase dans le sérum cytoplasmique du latex d'*Hevea brasiliensis*. Note de Jean-Claude Prévôt, Hervé Cretin et Jean-Louis Jacob, présentée par Roger Buvat.

Remise le 7 novembre 1983, acceptée le 21 novembre 1983.

Une glutathion réductase (EC 1.6.4.2) a été mise en évidence dans le latex d'*Hevea brasiliensis*. Elle est localisée, en majeure partie, dans le cytosol mais elle est aussi adsorbée partiellement sur les membranes des lutoïdes (microvacuoles lysosomales) de la cellule laticifère. Cette enzyme catalyse irréversiblement la réduction de GSSG en GSH. Elle fonctionne essentiellement avec du NADPH comme cofacteur, et son substrat, le GSSG est très spécifique. Dans la zone physiologique du pH (6,6 à 7,5), l'affinité de l'enzyme varie respectivement de 15 μ M à 6 μ M pour le NADPH, et de 40 à 80 μ M pour le GSSG. Le pH optimum de son activité se situe entre pH 7,5 et 8,0. En régénérant du GSH, molécule activatrice d'enzymes clés de la biosynthèse du caoutchouc et protectrice des membranes subcellulaires, cette enzyme pourrait jouer un rôle important dans la physiologie de la production du latex.

CELLULAR BIOCHEMISTRY. — Evidence for a Glutathione Reductase Activity in the Cytosol from the Latex of *Hevea brasiliensis*.

A glutathione reductase (EC 1.6.4.2.) activity has been characterized in latex from *Hevea brasiliensis*. It is essentially a cytosolic enzyme, which can be however partially adsorbed on membranes of lutoïds, the latex vacuolysomal compartment. This enzyme irreversibly catalyses the reduction of GSSG into its reduced form (GSH). It functions essentially with NADPH as cofactor and is fairly specific for GSSG as substrate. In the physiological pH range (6.6 to 7.5), its affinity is respectively 15 μ M to 6 μ M for NADPH, and 40 μ M to 80 μ M for GSSG. Its pH optimum is around pH 7.5-8.0. As GSH has been shown to act as an activator for several key enzymes in rubber biosynthesis, and as protective agent of subcellular membranes, it is suggested that this enzyme plays a major role in the biochemical mechanisms involved in the latex production.

INTRODUCTION. — Chez l'*Hevea brasiliensis*, le latex est récolté par l'incision (saignées) des laticifères de l'écorce. La stabilité de la suspension colloïdale qu'est le latex et l'activité des enzymes assurant sa régénération entre les saignées, sont les deux principaux facteurs limitants de la production.

Les molécules à groupe SH, et le glutathion en particulier, qui représente en général la plus grande partie des groupes thiols, interviennent sur ces deux facteurs. Le rôle protecteur des thiols vis-à-vis des formes toxiques de l'oxygène est généralement reconnu [1]; dans le latex il assure la protection des membranes lutoïdiques contre la dégradation peroxydative [2]. D'autre part, diverses enzymes clés du métabolisme laticifère sont activées par les thiols ([3], [4], [5]).

La régénération du glutathion à partir de sa forme oxydée, revêt donc logiquement une grande importance. L'existence d'une glutathion réductase (EC 1.6.4.2) est démontrée dans le latex d'Hévéa.

MÉTHODES. — Le latex récolté par saignée de l'arbre est recueilli dans un flacon entouré de glace, puis centrifugé (40 000 \times g 60 mn). La phase aqueuse, correspondant au sérum cytoplasmique (sérum C) est prélevée, elle est utilisée immédiatement ou lyophilisée et conservée à -30°C . Après trois lavages dans un tampon isotonique; la phase sédimentaire constituée essentiellement de microvacuoles-lysosomales (lutoïdes) est, soit traitée aux ultrasons (30 s dans la glace), soit au triton X-100 à 0,2% pour détruire la membrane de ces organites [6]. Les lysats ainsi obtenus sont centrifugés (40 000 \times g; 20 mn) ou non afin d'éliminer les fragments de membrane et, soit utilisés directement, soit lyophilisés et conservés à -30°C , pour analyses ultérieures.

Les électrophorèses des extraits cytoplasmiques ou lutoïdiques ont été réalisées sur gel de polyacrylamide et les activités enzymatiques révélées selon Harris et Hopkinson [7] dans du tampon Tris-HCl 0,25 M pH 8,4 : 20 ml, contenant du NADPH : 10 mg, du 2,6-dichlorophénol indophénol : 0,2 mg, du méthyl thiasolyl tetrazolium : 10 mg, en présence ou non (à titre de contrôle) de GSSG : 40 mg.

La détermination de l'activité de la glutathion réductase a été réalisée suivant la méthode de Shadle et Bassham [8] à 25°C , en suivant la disparition du NADPH à 340 nm au spectromètre (sauf cas particulier) en tampon triéthanolamine-HCl : 0,1 M, pH 7,5; EDTA, 1 mM; glutathion oxydé, 1 mM; NADPH, 0,15 mM.

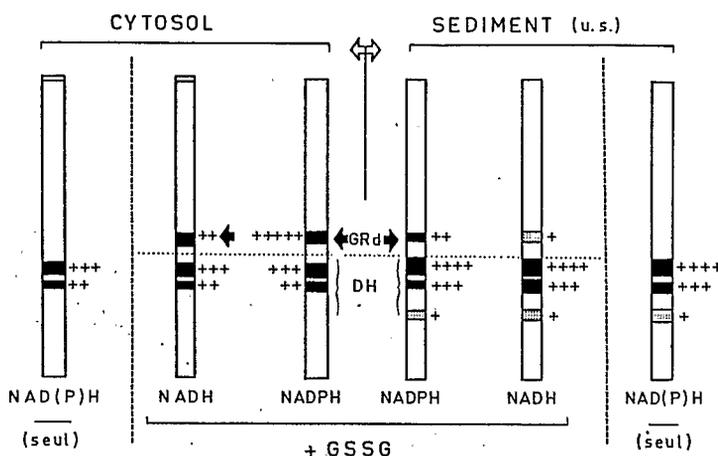


Fig. 1. — Schéma des électrophorogrammes obtenus avec des extraits de différents compartiments du latex : le cytosol (Sérum C) et les particules sédimentées, après ultracentrifugation et traitement aux ultra-sons (sédiment u.s). GRd : glutathion réductase. DH : NAD(P)H oxydases et/ou diaphorases.

Fig. 1. — Schematic representation of the electrophoregrams visualized from the two main compartments of the latex: the cytosol (C serum) and pelleted lutoids after centrifugation, washings and sonication (u.s. sediment). GRd: glutathione reductase; DH: NAD(P)H oxidase and/or diaphorase activities.

La réduction du GSSG en GSH a été déterminée par dosage des thiols réduits selon la méthode de Ellman [9]; l'incubation dans ce cas était conduite en tampon phosphate 50 mM à pH 6,8, arrêtée par acidification à l'acide trichloracétique (0,1 N final) à 4°C.

La concentration en substrat et en cofacteur de la réaction a varié lors de la mesure de leur K_m entre 0,025 et 0,15 mM pour le NADPH et entre 0,025 et 5 mM pour le glutathion oxydé. La détermination des K_m a été faite selon la méthode de Lineweaver et Burk.

Pour obtenir les solutions enzymatiques, les lyophilisats ont été dissous dans un tampon triethanolamine-HCl 0,1 M, pH 7,50 à raison de 50 mg. ml⁻¹ d'extrait cytosolique ou lutoïdique (concentration physiologique). Pour la caractérisation partielle de l'enzyme, les substances à bas poids moléculaires (effecteurs, substrats et produits endogènes) ont été éliminées par filtration sur « Ultrogel AcA 202 » et les fractions protéiques récoltées ont été ensuite concentrées sur une membrane « AMICON PM 10 ».

RÉSULTATS. — L'addition d'un extrait cytosolique de latex dans un milieu contenant du GSSG et du NADPH induit l'apparition de glutathion réduit. La réaction est linéaire en fonction du temps pendant au moins 10 mn. Corrélativement, on peut observer une oxydation du NADPH.

Des essais ont montré que la réaction est linéaire en fonction de la quantité d'extrait enzymatique ajoutée.

Le chauffage de l'extrait cytosolique au bain-marie bouillant supprime toute activité.

La suspension lutoïdique montre également une légère activité GSSG réductase (<10 % de l'activité cytosolique) qui n'est plus décelable après élimination, par centrifugation, des fragments membranaires.

En présence de NADPH seul, l'électrophorèse montre deux bandes d'activité dans le sérum cytoplasmique et trois sur le sédiment soniqué (fig. 1). Elles correspondent probablement à des activités diaphorases et/ou NAD(P)H oxydase [2]. L'addition de GSSG fait apparaître une seule bande supplémentaire, migrant de façon identique; elle est particulièrement intense dans le sérum cytoplasmique et plus faible dans le sédiment soniqué. L'intensité de cette bande est beaucoup plus faible lorsque le NADH est substitué

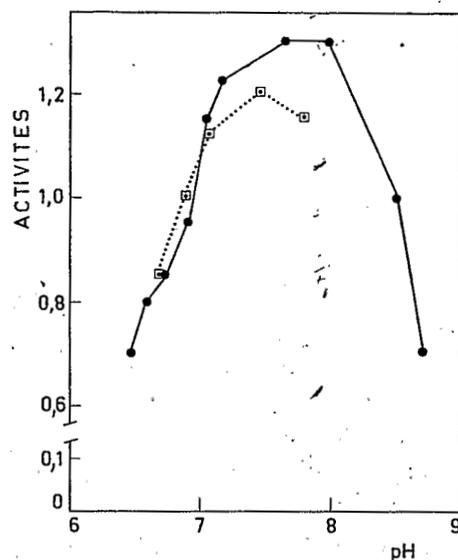


Fig. 2. — Activités glutathion réductase du latex en fonction du pH. Les activités sont exprimées en unités arbitraires. □ . . □ tampon phosphate 50 mM. ●—●—● tampon tris-maléate 50 mM.

Fig. 2. — *Latex cytosolic glutathione reductase activities as a function of pH. Activities are expressed in arbitrary units. □ . . □: Phosphate buffer (50 mM). ●—●—● Tris maleate buffer (50 mM).*

TABLEAU

Valeurs des K_m de la glutathion réductase du latex d'*Hevea brasiliensis*. Conditions expérimentales : cf. méthodes. Le K_m NADPH a été déterminé en présence de 1 mM de glutathion oxydé et le K_m GSSG en présence de 0,15 mM de NADPH.

K_m values of the glutathione reductase from the latex of *Hevea brasiliensis*. For the experimental conditions, see methods. K_m for NADPH were determined in the presence of 1 mM oxidized glutathione and K_m for GSSG with 0.15 mM NADPH.

pH	NADPH	GSSG
6,5	13 μ M \pm 3	40 μ M \pm 5
7,5	6 μ M \pm 1	80 μ M \pm 6

au NADPH et nécessite un temps de révélation beaucoup plus long. Aucune activité GSSG-réductase dans le sérum lutoïdique débarrassé de ses membranes, n'a été décelée.

Ces résultats conduisent à penser que l'enzyme est essentiellement cytosolique, mais peut-être partiellement adsorbée sur les membranes particulières du latex (notamment les lutoïdes).

Certaines caractéristiques de cette activité glutathion réductase ont été étudiées à partir de fractions protéiques obtenues après filtration du cytosol, sur « Ultrogel AcA 202 ».

Son activité spécifique a été estimée entre $25 \cdot 10^{-4} \mu$ kat à $33 \cdot 10^{-4} \mu$ kat par milligramme de protéines cytosoliques.

La spécificité de l'enzyme pour le NADPH n'est pas stricte mais son activité en présence de NADH ne représente que 5% de celle induite par le NADPH, ce qui confirme les résultats électrophorétiques. Elle semble assez spécifique du glutathion oxydé et fonctionne très peu avec d'autres substrats tels que la cystine, la méthionine ou l'acide α -lipoïque.

Il n'a pas été possible de faire fonctionner la réaction dans le sens de l'oxydation du glutathion réduit, ce qui est en accord avec les résultats de Shaedle et Bassham [8].

L'optimum de pH est situé entre 7,5 et 8,0. A pH 6,60 limite inférieure du pH cytoplasmique, l'activité potentielle de la glutathion réductase représente encore 70 à 80% de la valeur à l'optimum de pH (fig. 2). La cinétique de l'enzyme est de type michaélien.

Les valeurs des K_m obtenues pour le glutathion oxydé et le NADPH sont dépendantes du pH (tableau).

DISCUSSION. — Une glutathion réductase fonctionnelle (EC 1.6.4.2), susceptible de régénérer le glutathion réduit, est présente dans le sérum cytoplasmique du latex d'*Hevea brasiliensis* et au niveau des membranes vacuolysosomales (lutoïdes) du latex. Malgré la faible teneur en NADPH dans le latex [10], la forte affinité de l'enzyme pour le cofacteur, son activité spécifique importante et son irréversibilité doivent lui permettre de jouer un rôle dans la réduction du glutathion oxydé dont la teneur *in situ* est de l'ordre de 0,05 à 0,3 mM (Jacob et Prévôt, résultats non publiés).

Contrairement à certaines enzymes du latex déjà étudiées ([10], [11], [12]) l'activité potentielle de cette glutathion réductase varie relativement peu dans la zone de pH physiologique du sérum cytoplasmique, comprise entre pH 6,60 et pH 7,50 [13].

Cette enzyme peut avoir un rôle important en ce qui concerne la physiologie de la production de l'Hévéa. En effet, le GSH qu'elle régénère tient une place essentielle dans la protection des membranes subcellulaires contre les phénomènes d'oxydation pouvant se produire *in situ* [2]. Cette molécule peut être considérée comme un facteur favorable de la stabilité colloïdale et partant de l'écoulement du latex. Par ailleurs, le GSH active certaines étapes clés impliquées dans la biosynthèse du cis polyisoprène ([4], [5] et [14]) et peut de ce fait influencer positivement sur les mécanismes de régénération du caoutchouc entre deux saignées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] D. S. TARBELL, In *Organic sulfur compounds*, N. KHARASH, éd., Press, 1, 1961, p. 97.
- [2] H. CRETIN et J. BANGRAZ, *Comptes rendus*, 296, série III, 1983, p. 101.
- [3] J.-L. JACOB, J.-C. PRÉVÔT et L. PRIMOT, *Rev. Gén. Caout. Plast.*, 612, 1981, p. 89.
- [4] J.-L. JACOB, J.-C. PRÉVÔT et J. D'AUZAC, *Phytochem.*, 21, 1982, p. 851.
- [5] A. B. SIPAT, *Phytochem.*, 21, 1982, p. 2613.
- [6] D. RIBAILLIER, J.-L. JACOB et D'AUZAC, *Physiol. Vég.*, 9, 1971, p. 423.
- [7] H. HARRIS et D. A. HOPKINSON, in *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetic*, 1978, North Holland, Publishing Compagny.
- [8] M. SCHAEDELE et J. A. BASSHAM, *Plant Physiol.*, 59, 1977, p. 1011.
- [9] G. L. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 1959, p. 70.
- [10] J.-L. JACOB, *Thèse Doct. État Sc. Nat.*, 1970, A. O. 4129, Orsay.
- [11] J. TUPY, *Physiol. Vég.*, 11, 1973, p. 13.
- [12] H. CRETIN, J.-L. JACOB, J.-C. PRÉVÔT et J. D'AUZAC, *Rev. Gén. Caout. Plast.*, 603, 1980, p. 111.
- [13] J. BRZOWSKA-HANOWER, H. CRETIN, P. HANOWER et P. MICHEL, *Physiol. Vég.*, 17, 1979, p. 851.
- [14] J.-L. JACOB, J.-C. PRÉVÔT et L. PRIMOT, *Rev. Gén. Caout. Plast.*, 612, 1981, p. 89.

J.-C. P. et J.-L. J. : Laboratoire de Biochimie Végétale,
IRCA-GERDAT B. P. n° 5035, 34032 Montpellier Cedex;

H. C. : Laboratoire de Physiologie Végétale,
Centre ORSTOM d'Adiopodoumé, B. P. n° V-51, Abidjan, Côte-d'Ivoire.