

Un modèle de système vacuolaire : les lutoïdes du latex d'*Hevea Brasiliensis*

(Rapport sur 15 années de recherches effectuées en Côte d'Ivoire et en France)

par C. LIORET

Laboratoire de Physiologie Végétale,
Services Scientifiques Centraux
ORSTOM - 74 Route d'Aulnay - 93140 Bondy, France.

Résumé.— Le latex d'*Hevea Brasiliensis* est un protoplasme à partir duquel on peut isoler des vacuoles intactes, les lutoïdes.

Ces lutoïdes possèdent des activités hydrolases acides (phosphatase acide, ARNase, protéase, phosphodiesterase etc.) qui leur confèrent une fonction lysosomale.

Ils constituent un compartiment acide (pH entre 5,6 et 6,2) qui accumule divers métabolites minéraux et organiques (Ca^{++} , Mg^{++} , citrate, acides aminés basiques) et est moins riche en glucides libres et en diacides aminés que le compartiment cytoplasmique qui est neutre (pH entre 6,5 et 7). Les capacités d'accumulation peuvent être observées *in vitro* sur des lutoïdes isolées et sont exaltées par l'ATP.

Leur membrane, très riche en acide phosphatidique, supporte une ATPase spécifique et une activité NADH cytochrome C réductase. Le fonctionnement de l'ATPase provoque un influx électrogène de protons, celui de l'oxydo reductase un efflux de protons. Les mécanismes de pénétration des métabolites accumulés dépendent du gradient de protons.

Summary.— Latex of *Hevea Brasiliensis* is a protoplasm from which it is possible to isolate intact vacuoles, named lutoids.

These lutoids have acidic hydrolase activities (acidic phosphatase, ARNase, protéases, phosphodiesterase etc.) which give them a lysosomal function.

They constitute an acidic compartment (pH between 5,6 and 6,2) which accumulates various inorganic and organic metabolites (Ca^{++} , Mg^{++} , citrate, basic amino acids) and is less rich in free sugars and acidic aminoacids than the cytoplasmic compartment which is neuter (pH between 6,5 and 7). Accumulation capacities can be observed *in vitro* with isolated lutoids and are increased by ATP.

The lutoid membrane, which is very rich in phosphatic acid, supports specific ATPase and a NADH-cytochrome C reductase activity. Operating of ATPase induces an electrogenic influx of protons. Operating of oxydoreductase induces an efflux of protons. The mechanisms of accumulation of metabolites are linked with the gradient of protons.

*
**

I - INTRODUCTION

L'*Hevea brasiliensis* est cultivé en plantations sur des surfaces considérables dans les régions équatoriales et constitue la source quasi exclusive de caoutchouc naturel.

L'écorce contient un système laticifère constitué de conduits résultant de la fu-

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 15722, ex 1

Cote : B

sion de cellules issues du cambium et dont les parois transversales se sont résorbées. Le fonctionnement du cambium est rythmique, les conduits laticifères sont répartis en manteaux concentriques et sont anastomosés au sein d'un même manteau.

Une entaille de l'écorce (la « saignée ») entraîne une section de ces conduits. Le contenu des laticifères, nommé « latex », s'écoule pendant un temps variant entre une demi heure et plusieurs heures selon une cinétique caractéristique (Lioret et coll., 1978). L'écoulement s'arrête du fait de l'obturation des sections par coagulation superficielle du latex. De 150 à 300 ml peuvent être recueillis. En exploitation normale, on procède à 2 saignées par semaine pendant toute l'année à l'exception d'une période de repos d'environ 1 mois.

La nature du latex a fait l'objet de discussions. L'opinion orthodoxe fut longtemps celle selon laquelle il s'agissait d'un suc vacuolaire (Bobiloff, 1923, 1930). Milanez (1946, 1948) proposa qu'il s'agissait d'un protoplasme. Ce point de vue initialement critiqué fut confirmé par l'étude des constituants du latex.

On connaissait depuis longtemps l'existence des particules de caoutchouc, sphères de quelques dixièmes de μm de diamètre, composées de caoutchouc entouré d'une membrane. En 1929, Frey-Wyssling avait décrit l'existence de globules d'aspect « résineux » souvent jaunes brillants. Ces structures reçurent par la suite le nom de particules de Frey-Wyssling. A partir de 1937, l'emploi de la centrifugation (Van Harpen, 1937 ; Mc Colm, 1940 ; Homans et coll., 1948 a et b ; Cook et Sekhar, 1953 ; Moir, 1959) mit en évidence la complexité de ce liquide biologique que le procédé pouvait résoudre en plusieurs fractions.

La figure 1, due à Moir et Tata (dans Gomez et Moir, 1979) illustre cette complexité au sein de laquelle trois fractions principales dominent :

- 1 fraction crémeuse légère qui correspond essentiellement aux particules de caoutchouc.

- 1 fraction translucide médiane, qui fut identifiée ensuite au cytoplasme au sein duquel se trouvent localisées les enzymes du métabolisme glucidique (Jacob, 1970) et de la synthèse protéique (Coupé et d'Auzac, 1974).

- 1 fraction plus lourde au fond des tubes dite fraction du fond (« bottom fraction »).

Homans et coll., (1948 a et b) établissent que cette dernière est essentiellement constituée de particules, différentes des grains de caoutchouc et des particules de Frey-Wyssling, qu'ils nommèrent lutoïdes.

Ruinen (1950) précise qu'il s'agit de spérules unimembranaires. Wiersum (1957) établit que ce sont les lutoïdes qui fixent le rouge neutre et propose que l'ensemble de ces organelles représente un vacuome polydispersé.

L'utilisation de la microscopie électronique (Andrews et Dickenson, 1961 ; Dickenson, 1969 ; Gomez, 1966 ; Gomez et Moir, 1979) permet de mieux définir leur structure (fig. 2). Les lutoïdes sont abondants et viennent en seconde position après les particules de caoutchouc pour la fréquence. Leur diamètre est compris entre 0,5 et 3 μm et sont délimités par une membrane de 80 Å d'épaisseur. Leur sensibilité osmotique, causant leur lyse en milieu hypotonique, fut très rapidement constatée (Homans et coll., 1948 a ; Ruinen, 1950).

Il est particulièrement intéressant que la saignée de l'écorce de l'*Hevea brasiliensis* permette de recueillir des quantités importantes de protoplasme et ce, sans utiliser les moyens drastiques habituels (broyage au mortier ou broyeur à lames coupantes etc...) qui provoquent inévitablement le mélange des phases cytoplasmiques et vacuolaires.

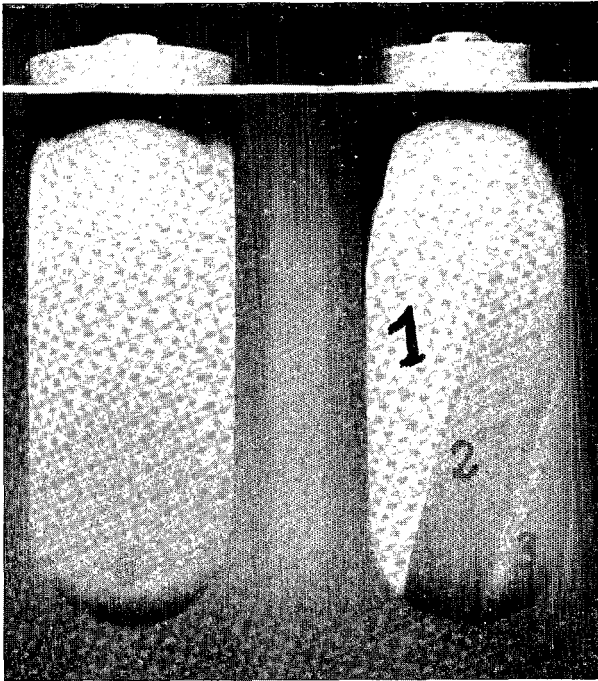


Fig. 1.— Aspect du latex d'*Hevea brasiliensis*, après coloration par le rouge neutre et centrifugation. (Cliché de Moir et Tata dans Gomez et Moir, 1979).

1 — fraction légère : caoutchouc.

2 — fraction médiane : cytoplasme.

3 — fraction lourde : lutoïdes ayant fixé le rouge neutre.

La zone orangée, disposée horizontalement au sommet de la fraction cytoplasmique, correspond aux particules de Frey-Wyssling.

A partir de ce protoplasme il est possible d'isoler par centrifugation, une préparation d'un matériel de type vacuolaire intact que l'on peut remettre en suspension dans une solution isotonique (généralement du mannitol 0,3 M) tamponnée. Si l'on dispose de laboratoires convenablement équipés à proximité de plantations d'*Hevea*, il est possible d'expérimenter sur les propriétés de ce que l'on peut considérer comme des vacuoles intactes disponibles en quantités non limitantes. Cette conjoncture s'est réalisée en Côte d'Ivoire où, depuis 1965, des chercheurs appartenant à l'ORSTOM (Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer), à l'IRCA (Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique) et à l'Université d'Abidjan ont pu apporter un ensemble important de contributions sur ce sujet. Des collaborations fructueuses ont été réalisées avec des Laboratoires métropolitains et plus récemment avec des Laboratoires de la République Fédérale d'Allemagne.

II — LA FONCTION LYSOSOMALE DES LUTOIDES.

Pujarniscle (1968, 1971) montra que le contenu des lutoïdes est le siège d'un ensemble d'activités hydrolasiques se déroulant à pH acide.

Du latex frais est dilué quatre fois dans un tampon mannitol 0,3 M de pH 7 puis centrifugé (6 600g, 10 min.). Le culot est repris dans le même tampon et soumis à une



Fig. 2.— Electromicrographie d'une coupe de jeune vaisseau laticifère d'*Hevea brasiliensis*. L : lutoïdes ; M : mitochondries ; C.W : paroi cellulaire ; R : réticulum. Les particules de caoutchouc correspondent aux nombreuses sphérules denses aux électrons (Cliché de Gomez et Moir, 1979).

nouvelle centrifugation (1 650g ; 10 min.). Le sédiment de lutoïdes, remis en suspension dans un très petit volume de tampon, est disposé à la partie supérieure d'un mélange progressif de solution à 50% de saccharose et de tampon mannitol 0,3 M de fa-

çon à obtenir un gradient de densité compris entre 1,02 et 1,19. Après centrifugation (110.000 g, 2 heures), les divers constituants sont répartis, en fonction de leurs densités le long du gradient. Quatorze niveaux (le n° 1 correspondant à la fraction la plus lourde) sont recueillis séparément. L'addition de Triton X 114 détruit les membranes et solubilise le contenu intralutoïdique. Différentes activités enzymatiques sont mesurées sur chacune des 14 fractions.

Les activités enzymatiques suivantes, phosphatase acide, phosphodiesterase, cathepsine, β - glucosidase, β - galactosidase, β - acétylglucoseamidinase, ribonucléase, se trouvent toutes localisées principalement dans les fractions n° 5 et 6, correspondant à une densité de 1,14. Ce sont ces fractions qui fixent le rouge neutre et correspondent donc aux lutoïdes. Ces organelles ont donc la fonction de lysosomes. La fonction lysosomale des vacuoles des cellules végétales a pu être généralisée par Matile (1969). La mise en évidence d'ARN dégradés liés à la fraction lutoïdique (Marin et Trouslot, 1975) indique la possibilité pour ces organelles d'hydrolyser les ARN.

On trouve toujours une activité décelable dans les fractions légères (n° 13 et 14) mais beaucoup plus faible que dans les fractions lutoïdiques (n° 5 et 6). Pujarnic (1971) et Ribailier (1972) ont montré que ces activités correspondaient à des enzymes solubilisées du fait de la déstabilisation des particules au cours des manipulations. Ribailier (1972) a défini un « indice d'éclatement » rendant compte de l'intégrité des préparations de lutoïdes. Cet indice est le quotient de l'activité phosphatase acide d'une préparation avant traitement par le Triton (due à l'activité solubilisée du fait de la lyse d'une partie des lutoïdes) à l'activité de cette enzyme après traitement par le détergent (correspondant à l'activité totale). La préparation est d'autant plus intacte que l'indice est plus faible.

III — LES LUTOIDES ET LA COMPARTIMENTATION INTRA-CELLULAIRE DES METABOLITES.

Southorn et Edwin (1969) constatèrent que le contenu lutoïdique était plus acide que la phase cytoplasmique. Brzozowska-Hanower et coll. (1979) suivirent de façon précise les pH des 2 phases tout au long d'un cycle annuel d'exploitation. Ils montrèrent que les pH cytoplasmiques évoluent entre 6,5 pendant la saison sèche et 6,9 - 7,0 lors de la saison humide. Les pH intralutoïdiques évoluent de façon inverse et sont compris entre 5,6 après les pluies et 6,2 pendant la saison sèche. Fait intéressant, il existe une corrélation hautement positive entre la production et la différence de pH entre les 2 compartiments.

Outre les protons, on constata également que le contenu lutoïdique présentait une concentration en certains métabolites nettement supérieure à celle du sérum cytoplasmique. Archer et coll. (1969) montrèrent que l'ergothionéine absorbée à partir du sol se retrouve accumulée dans les lutoïdes.

Ribailier et coll. (1971) dosèrent un certain nombre de métabolites minéraux (K^+ , Ca^{++} , Cu^{++} , (phosphates), et organiques (sucres, acides citrique et malique). Pour les ions phosphate, citrate, Ca^{++} , Mg^{++} , (1) le sérum lutoïdique est de 6 à 10 fois plus concentré que le sérum cytoplasmique. Le cuivre y est deux fois plus concentré. Les concentrations en K^+ et en malate sont du même ordre de grandeur pour les 2 phases. La concentration en glucides solubles est de 2 à 7 fois plus élevée dans le sérum cytoplasmique que dans le sérum lutoïdique.

(1) Le rapport de concentrations pour le Mg^{++} voisin de 100 indiqué dans la publication de Ribailier et coll. (1971) fut par la suite trouvé excessif. Un rapport voisin de 10 est plus proche de la réalité.

Brzowska et coll. (1974) étudièrent la répartition des acides aminés solubles entre les deux phases cellulaires et, là encore, des effets de compartimentation furent mis en évidence. Les acides aminés basiques sont en concentrations nettement plus élevées dans le sérum lutoïdique par rapport au sérum cytoplasmique. Les rapports d'accumulation sont de 5 à 7 pour l'arginine, l'ornithine et la lysine. Ils sont plus élevés pour des dérivés métaboliques non inclus dans les protéines : 13 pour l'acide γ -aminobutyrique, 20 pour l'acide α - γ diaminobutyrique, 15 pour un dérivé guanidique non identifié. Au contraire, l'alanine, la glutamine et les diacides aminés sont en concentration trois fois plus importante dans le sérum cytoplasmique que dans le sérum lutoïdique.

IV – LES PROPRIETES D'ACCUMULATION DES LUTOIDES EN SUSPENSION *IN VITRO*.

L'existence de concentrations nettement plus élevées en certains métabolites dans les lutoïdes conduisit à rechercher si ces organelles isolées du contexte protoplasmique étaient douées de propriétés d'absorption. On réalisa des expériences *in vitro*, au cours desquelles des métabolites marqués par un isotope radioactif étaient mis en présence de préparations purifiées de lutoïdes. Après un certain temps d'incubation, les processus sont arrêtés par refroidissement ; les lutoïdes sont séparés du milieu réactionnel par centrifugation rapide, les radioactivités du culot (lutoïdes) et du surnageant (milieu réactionnel) sont mesurées. L'ion citrate (Ribailier, 1972 ; d'Auzac et Lioret, 1974 ; Montardy et Lambert, 1977) et les acides aminés basiques (Hanower et coll., 1977) marqués par ^{14}C furent essentiellement expérimentés.

Il fut montré que les lutoïdes isolés, en suspension dans un milieu isotonique et non énergétique, peuvent absorber, contre le gradient de concentration, ces métabolites.

Le tableau I, tiré de d'Auzac et coll. (1977) résume les propriétés de ce phénomène. Ces données laissent supposer l'existence sur la membrane lutoïdique de deux systèmes spécifiques de transport l'un pour l'ion citrate, l'autre pour les acides aminés basiques.

L'ATP active nettement la pénétration de ces métabolites de charges ioniques opposées. En absence d'ATP, il y a cependant pénétration contre le gradient de concentration. Malgré des essais, il ne fut pas possible de mesurer directement à l'aide de micro-électrodes, la différence de potentiel électrique entre l'intérieur des lutoïdes et le milieu externe, et de ce fait déterminer si le transport était du type actif, c'est à dire contre le gradient thermodynamique. Les hypothèses sur les modalités du transport seront discutées plus loin.

Des expériences d'exsorption de molécules radioactives préalablement absorbées furent effectuées. Les résultats, difficiles à interpréter du fait de la fragilité des particules, vont dans le sens d'un piégeage des espèces chimiques absorbées. Une fois à l'intérieur des lutoïdes, le citrate et la l-lysine paraissent sortir très difficilement.

V – LES PROPRIETES DES MEMBRANES LUTOIDIQUES.

Les lutoïdes ayant des propriétés d'absorption impliquant des transport à travers la membrane, il convenait d'étudier les composants de celle-ci.

1) Stabilité aux détergents :

Il s'agit d'une membrane phospholipidoprotéique qui a la particularité d'être détruite en présence de Triton X 114 (Pujarnicla, 1971), du désoxycholate 5.10^{-4}M , mais curieusement résiste à la digitonine 5.10^{-4}M (Coupé et coll., 1972).

TABLEAU I

Pénétration du citrate et la l-lysine dans des lutoïdes en suspension dans un milieu isotonique

	CITRATE	I-LYSINE
Vitesse de pénétration en nmoles/min, mg de protéines à 25° C à 0° C	linéaire pdt. 30 min. 10 à 20 ≅ 0,5	linéaire pdt. 30 min. ≅ 0,1 ≅ 0,005
Cinétique de pénétration en fonction de la concentration extérieure en substrat	Michaelienne km ≅ 7.10 ⁻³ M	Michaelienne km ≅ 1.2 10 ⁻² M
Spécificité	Aucune inhibition par d'autres acides organiques, dont des analogues structuraux (isocitrate, tricarballylate), n'a pu être détectée	Inhibition compétitive par l'arginine avec Ki ≅ 5,6 10 ⁻³ M. Aucune inhibition en présence de D-lysine ou de L-α alanine
Stimulation par l'ATP	Stimulation de 100% avec ATP 5.10 ⁻³ M. Action positive si ATP fourni en préincubation. Joue sur V max et non sur km	Stimulation de 40% avec ATP 2,5 10 ⁻³ M
Inhibition par 2-4 DNP	Inhibition de 50% avec 2-4 DNP 2.10 ⁻³ M.	Inhibition de 35% avec 2-4 DNP 10 ⁻² M.
Inhibition par NH ₄ ⁺ Cl ⁻	Aucune inhibition constatée avec NH ₄ Cl 5.10 ⁻³ M	Inhibition de 50% avec NH ₄ Cl 7.10 ⁻³ M
Inhibition par NEM	Inhibition de 50% avec NEM 5.10 ⁻³ M.	Inhibition de 40% avec NEM 10 ⁻² M.

2) La composition phospholipidique de la membrane.

(Dupont et coll., 1976). A partir des membranes lutoïdiques purifiées à partir de 15ml de latex, on obtient 8,8 mg de protéines et 132 µg de P lipidique. En admettant que le P représente 4% de la masse des phospholipides, ceux-ci constitueraient 27% en masse de la membrane.

Par chromatographie en couche mince, on observe que l'acide phosphatidique représente 82% du P lipidique. Le diphosphatidyl glycérol caractéristique des crêtes mitochondriales est absent. Le taux extraordinairement élevé d'acide phosphatidique faisait craindre un artéfact dû à l'action d'une phospholipase D. La destruction préalable des activités enzymatiques dans l'alcool bouillant avant l'analyse, l'analyse simultanée de la membrane des particules de caoutchouc opérée dans les mêmes conditions que celle de la membrane lutoïdique, l'analyse faite directement sur place immédiatement après prélèvement (Hanower, communication personnelle) confirmèrent qu'il ne s'agissait pas d'un artéfact.

L'analyse des acides gras met en évidence une relative abondance en acides gras saturés (palmitique et stéarique : plus de 60%), la présence d'acides oléique et linoléique, et l'absence d'acide linoléique.

3) La présence d'une ATPase membranaire.

L'ATP exaltant la pénétration du citrate et de la l-lysine, il devrait exister un mécanisme utilisant l'ATP. D'Auzac, (1975, 1977), après avoir éliminé tout fonctionnement résiduel de la phosphatase acide, a démontré l'existence d'une activité ATPase liée à la membrane. Son pH optimum se situe aux environs de 7. Le fonctionnement nécessite la présence d'un cation divalent, essentiellement Mg^{++} , avec une stoechiométrie de 1 mole de Mg^{++} /mole d'ATP. L'enzyme est insensible aux cations monovalents (K^+ et Na^+) mais paraît être activée par les anions notamment Cl^- . L'ATP est le meilleur substrat suivi par ordre décroissant de GTP, CTP, et UTP. L'ADP est un inhibiteur non compétitif. Le FCCP, agent découplant, à la concentration de $10^{-5}M$ inhibe 50% de l'activité.

4) La présence d'une activité NADH-cytochrome C réductase.

L'existence d'activité oxydoréductase, liée à la présence de cytochromes du type b, au niveau de fractions membranaires indéterminées regroupées sous le terme de «microsomes», est un fait connu (Lioret, 1963). Moreau et coll. (1975) ont pu mettre en évidence sur la membrane lutoïdique, un système oxydant le NADH et réduisant le cytochrome C et de façon plus importante le ferricyanure. Le système est insensible à l'Antimycine A et est donc complètement différent de la chaîne rédox mitochondriale. L'analyse spectrophotométrique des membranes met en évidence deux cytochromes de type b, b 563 et b 561. Seul le cytochrome b 563 peut être réduit par NADH et est donc un composant de ce système. Le NADPH ne peut pas être oxydé, aucun des deux cytochromes ne se combine avec CO, ce qui exclut la présence d'un cytochrome P 450, souvent trouvé au niveau des microsomes.

VI – LES TRANSFERTS ELECTROGENES DE PROTONS.

Lambert (1975) montra que l'addition d'ATP $10^{-3}M$ à une suspension de lutoïdes purifiés provoque une différence de pH entre l'extérieur et le sérum lutoïdique d'environ 0,3 unités pH. Hanower et coll. (1977) montrèrent que la pénétration de la l-lysine dans les lutoïdes était en corrélation étroite avec la différence de pH. De plus l'ATP active la pénétration des métabolites testés. Ces faits ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle le gradient de protons pouvait être la force motrice des absorptions et que ce gradient pouvait être établi soit du fait de l'activité ATPase, soit du fait du fonctionnement du système redox.

Il était nécessaire pour vérifier ces hypothèses d'évaluer les gradients du potentiel thermodynamique tant des protons que des substances accumulées et donc de mesurer les différences de potentiels électriques entre l'intérieur et l'extérieur. Comme il a été dit plus haut, il n'a pas été possible, compte tenu du petit diamètre des particules, de procéder à des mesures directes par introduction de microélectrodes. Le problème fut résolu en utilisant la méthode de Komor et Tanner (1976) basée sur la répartition d'un ion organique très perméant, marqué par le ^{14}C , entre les deux compartiments. Les différences de pH furent déterminées par la répartition de la méthylamine ^{14}C , dont l'équilibre entre forme dissociée ($CH_3-NH_3^+$) et forme non dissociée (CH_3-NH_2) dépend du pH. La forme dissociée n'est pas perméante alors que la forme non dissociée est perméante et se trouve à la même concentration de part et d'autre de la membrane (Johnson et Scarpa, 1976).

1) Influx électrogène de protons lié à l'activité ATPase.

En utilisant ces techniques, Marin et coll. (1981 a) d'une part, Créatin (1982)

d'autre part mirent en évidence les faits suivants :

En conditions *in vitro*, le pH interne se maintient à un niveau nettement inférieur au pH externe. Pour un pH externe de 7,5, le pH interne se situe à 6,3. D'autre part, en milieu à faible concentration en K^+ , une différence de potentiel transmembranaire $\Delta \psi$ de $-0,100$ volts peut être observée.

L'addition d'ATP et de $Mg^{2+} + 5 \cdot 10^{-3}M$, le milieu extérieur étant à pH 7,5, est suivie d'un abaissement du pH, d'une diminution de la valeur absolue du $\Delta \psi$ (tableau II). L'ATP ajouté est quasi totalement hydrolysé. Les phénomènes sont totalement inhibés en présence de FCCP $1,5 \cdot 10^{-5}M$.

Ces faits s'interprètent parfaitement par l'existence d'un couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et l'injection non compensée électriquement de protons dans le contenu vacuolaire, l'apport de charge + entraîne une dépolarisation partielle.

TABLEAU II
Influx électrogène de protons, couplé avec une activité ATPase.

	Témoin	+ATP +Mg ²⁺ +5mM	Auteurs
pH externe	7,5	7,5	Marin et coll.(1981 a)
pH interne	6,3	5,8	
$\Delta \psi$ (volts)	-0,130	-0,080	(lutoïdes âgés de 36 h)
pH externe	7,45	7,45	Crétin (1982)
pH interne	5,85	5,00	(lutoïdes frais âgés de 3 h)
$\Delta \psi$ (volts)	-0,083	-0,020	

2) Efflux électrogène de protons lié à l'activité oxydo réductase.

La théorie chimiosmotique de Mitchell prévoit qu'aux oxydo réductions membranaires sont couplés des transferts polarisés de protons. Crétin (1982) a montré que la réduction du cytochrome C par le NADH était couplée avec une augmentation du pH interne et une augmentation de la valeur absolue du $\Delta \psi$ (Tableau III). Le phénomène est insensible à l'antimycine A et au KCN. Réalisé en milieu faiblement tamponné, on observe une acidification du milieu extérieur.

Les faits s'interprètent par une liaison entre l'oxydo réduction et une sortie électriquement non compensée de protons, donc augmentant la polarisation.

TABLEAU III
Efflux électrogène de protons, couplé avec l'activité NADH-Cyt. C oxydoréductase d'après CRETIN (1983)

	Témoin	Témoin +Cyt. C 500mM	Témoin +Cyt. C 500mM +NADH 2 mM
pH externe	7,45	7,45	7,45
pH interne	5,95	6,02	6,48
$\Delta \psi$ (volts)	-0,080	-0,080	-0,103

3) Propriétés de vésicules reconstituées à partir de lyophilisats de préparations purifiées de lutoïdes.

Marin et coll. (1981 b) ont montré que certains lyophilisats permettaient l'obtention de vésicules ayant conservé la propriété de coupler l'hydrolyse d'ATP à un flux électrogène de protons. Les vésicules sont préparées dans un milieu de pH 6,0 et mises en suspension dans des milieux isotoniques de pH 7,5. Le pH s'équilibre à 6,8 – 6,9. Un $\Delta \psi$ initial de $-0,100$ volts s'établit et évolue pour atteindre $-0,050$ volts après 1/2 h. Pour les vésicules actives (l'activité dépend des lyophilisats initiaux), l'addition d'ATP Mg ($5 \cdot 10^{-3}$ M) est suivie d'une diminution du pH interne de 0,4 unités et d'une dépolarisation quasi totale, le $\Delta \psi$ devenant voisin de zéro.

4) Les gradients de pH et le transport des métabolites.

Les faits présentés ci-dessus montrent que l'énergie libérée par des réactions métaboliques (hydrolyse de l'ATP, oxydo-réduction) peut être stockée sous une forme que les adeptes de la théorie de Mitchell nomment «force motrice protonique». Des résultats préliminaires sembleraient indiquer que les mouvements de lysine utilisent cette force motrice.

Avec des vésicules reconstituées actives, Marin et coll. (1981 b) ont constaté des accumulations de citrate 14 C avec des coefficients d'accumulation pouvant dépasser 20. La capacité d'accumulation est liée à l'activité ATPase. Les vésicules inactives vis à vis de l'ATP et du mouvement de protons n'accumulent pas le citrate. Toutefois les enthalpies libres correspondant à l'accumulation de citrate sont de beaucoup supérieures aux enthalpies libres dues à l'activité ATPase. L'hypothèse d'un complexeur piégeant le citrate interne est nécessaire. L'ion Mg^{++} est le plus qualifié pour remplir ce rôle. Un modèle supposant un mécanisme antiport «citrate 2 fois ionisé contre proton», non lié directement au fonctionnement de l'ATPase, mais dépendant du gradient de protons existant, avec nécessité de couplage avec entrée d'un ion Mg^{++} et piégeage du complexe citrate Mg^{++} , permet d'intégrer l'ensemble des faits observés tout en respectant les contraintes thermodynamiques (Marin, 1981).

VII – CONCLUSION

Les résultats exposés ci-dessus montrent que le système lutoïdique joue un rôle prépondérant sur le fonctionnement du cytoplasme intralaticifère.

Les systèmes transportant les protons permettent de maintenir le pH cytoplasmique au voisinage de la neutralité assurant une meilleure efficacité des réactions métabolique. Cela est vrai aussi bien pour le métabolisme glucidique (Jacob, 1970 ; Jacob et coll. 1979 ; Tupy, 1973) que pour la synthèse protéique (Coupe et d'Auzac, 1974). C'est lorsque le pH cytoplasmique est élevé que la production de caoutchouc est maximum (Brzozowska-Hanower et coll., 1979).

De plus, l'existence d'une «force motrice protonique» disponible permet de rendre compte de l'accumulation d'autres métabolites par des mécanismes «symport» et «antiport». Ces effets d'accumulation ont des répercussions sur le fonctionnement du cytoplasme. Ainsi Jacob (1970) a montré que la teneur en Mg^{++} du cytoplasme est souvent limitante pour les réactions de la glycolyse et que le citrate peut être un inhibiteur de ces réactions. Le fait que ces ions minéraux ou organiques peuvent être accumulés dans le compartiment vacuolaire constitue donc une régulation du métabolisme cellulaire.

A la lumière des connaissances acquises avec le matériel extrêmement commode constitué par les lutoïdes du latex d'Hevea, deux fonctions vacuolaires essentielles se

dégagent :

— un rôle de nettoyage des macromolécules dégradées correspondant à l'activité lysosomale.

— un rôle de maintien de l'homéostasie cytoplasmique du fait des systèmes de transport liés à la membrane vacuolaire.

Remerciements.

Les travaux sur les membranes des lutoïdes réalisés en France et en Côte d'Ivoire ont bénéficié de trois contrats successifs (72 - 7 - 0229,74 - 7 - 0396 et 77 - 7 - 0255) de la DGRST dans le cadre de l'action concertée «Membranes biologiques. Structure et Fonctions».

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREWS E.H. et P.B. DICKENSON, 1961.— Preliminary electron microscope observations on the ultra-structure of the latex of *Hevea brasiliensis*. Proc. Nat. Rubb. Res. Conf. Kuala-Lumpur, 1960, 756.
- ARCHER B.L., G.B. AUDLEY, G.P. Mc SWEENEY et TAN CHEE HONG, 1969.— Studies on composition of latex serum and bottom fraction particles. J. Rubb. Res. Instit. Malaya, 21, 560 -
- D'AUZAC J., 1975.— Caractérisation d'une ATPase membranaire en présence d'une phosphatase acide dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Phytochemistry, 14, 671 -
- D'AUZAC J., 1977.— ATPase membranaire de vacuoles lysosomales : les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Phytochemistry, 16, 1881.
- D'AUZAC J. et C. LIORET, 1974.— Mise en évidence d'un mécanisme d'accumulation du citrate dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* (Künth ; Müll.Arg.). Physiol. Végét., 12, 617.
- D'AUZAC J., J. BRZOSOWSKA, P. HANOWER; C. LAMBERT, C. LIORET et M. NIAMIEN N'-GORAN, 1977.— Un modèle de structure vacuolaire isolée intacte : les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. I Accumulation et pénétration du citrate et de la l-lysine dans les lutoïdes. Colloque international du CNRS n. 258. Echanges ioniques transmembranaires chez les végétaux. Rouen et Paris VII, Juillet 1976, Edit. CNRS, 391.
- BOBILOFF W., 1923.— Anatomy and Physiology of *Hevea brasiliensis*. Zurich Institut Urell Fussli.
- BOBILOFF W., 1930.— Anatomie en physiologie van *Hevea brasiliensis*. Batavia. Drukkeryen Ruygroek.
- BROZOSOWSKA J., P. HANOWER et R. CHEZEAU, 1974.— Free amino-acids of *Hevea brasiliensis* latex. Experientia, 30, 894.
- BROZOSOWSKA-HANOWER J., H. CRETIN, P. HANOWER et P. MICHEL, 1979.— Variations de pH entre compartiments vacuolaire et cytoplasmique au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. Influence saisonnière et action du traitement par l'éthrel générateur d'éthylène. Répercussion sur la production et l'apparition d'encoches sèches. Physiol. végét., 17, 851 -
- COOK A.S. et B.C. SEKHAR, 1953.— Fractions from *Hevea brasiliensis* latex centrifuged at 59.000g. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 14, 163.
- COUPE M., S. PUJARNISCLE et J. d'AUZAC, 1972.— Compartimentation de diverses oxydoréductases (peroxydase, o-diphénol oxydase et malate déshydrogénase) dans le latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth). Müll. Arg. Physiol. végét., 10, 459.
- COUPE M. et J. d'AUZAC, 1974.— Action de l'acide - 2 - éthyl phosphonique (Ethrel) sur les polysomes du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg. Physiol. Végét., 12, 1 -
- CRETIN H., 1982.— The proton gradient across the vacuo-lysosomal membrane lutoids from the latex of *Hevea brasiliensis*. I. Further evidence for a proton translocating ATPase on the vacuo-lysosomal membrane of intact lutoids. J. Memb. Biol., 65, 175 - 184.

- CRETIN H., 1983.— Efflux transtonoplastique de protons. lors du fonctionnement de la NADH oxydoréductase membranaire des lutoïdes isolés intacts du latex d'*Hevea brasiliensis*. C.R. Acad. Sci., Paris (série D), sous presse.
- DICKENSON P.B., 1969.— Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. J. Rubb. Res. Instit. Malaya, 21, 543
- DUPONT J., F. MOREAU, C. LANCE et J.L. JACOB, 1976.— Lipidic composition of the membrane of lutoïdes from the latex of *Hevea brasiliensis*. Phytochem., 15, 1215 -
- FREY-WYSSLING A., 1929.— Microscopic investigations on the occurrence of resins in *Hevea* latex. Archiv. Rubbercult., 13, 392.
- GOMEZ J.B., 1966.— Electron microscopic studies on the development of latex vessels in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy ; University of Leeds.
- GOMEZ J.B. et G.F.J. MOIR, 1979.— The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. Malaysian Rubber Research and development Board. Monograph n.4 (Kuala-Lumpur).
- HANOWER P., J. BROZOWSKA et NIAMIEN N'GORAN, 1977.— Absorption des acides aminés par les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Physiol. Plant. 39, 299 -
- HOMANS L.N.S., J.W. VAN DALFSEN et G.E. VAN GILS, 1948 a.— Complexity of fresh *Hevea* latex. Nature (London), 161, 177.
- HOMANS L.N.S et G.E. VAN GILS, 1948 b.— Fresh *Hevea* latex. A complex colloïdal system. Proc 2nd Rubb. Technol. Conf. (London), 292.
- JACOB J.L., 1970.— Particularités de la glycolyse et de sa régulation au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. Physiol. Végét., 8, 395.
- JACOB J.L., L. PRIMOT et J.C. PREVOT, 1979.— Purification et étude de la phosphoénol pyruvate carboxylase du latex d'*Hevea brasiliensis*. Physiol. Végét., 17, 501.
- JOHNSON R.G. et A. SCARPA, 1976.— Internal pH of isolated chromaffin vesicles J. Biol. Chem. 251, 2189.
- KOMOR E. et W. TANNER, 1976.— The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*. Evidence for electrogenic sugar transport Eur. J. Biochem., 70, 197.
- LAMBERT C., 1975.— Influence de l'ATP sur le pH intralutoïdique et sur la pénétration du citrate dans les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. C.R.Acad. Sc. Paris. 281 ser. D, 1705.
- LIORET C., 1963.— Le métabolisme respiratoire des végétaux. Problèmes de métabolisme respiratoire et d'oxydations cellulaires. Masson édit. Paris 222 -
- LIORET C., D. RIBAILLIER et J.C COMBE, 1978.— Cinétique d'écoulement du latex d'*Hevea brasiliensis* après saignée. La houille blanche n. 3/4, 261 — Caout. et Plast., 578, 91 -
- Mc COLM E.M., 1940.— *Hevea* latex sludge. Existence of a sludge fraction in fresh unpreserved latex. Ind. Eng. Chem., 32, 439.
- MARIN B., 1981.— Le fonctionnement du transporteur tonoplastique du citrate du latex d'*Hevea brasiliensis* : relations avec l'activité adénosine triphosphatase membranaire. Thèse Doct. d'Etat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc (Montpellier). Travaux et Documents de l'ORSTOM, 409 p.
- MARIN B. et P. TROUSLOT, 1975.— The occurrence of ribonucleic acid in the lutoïd fraction (lysosomal compartment) from *Hevea brasiliensis* Kunth (Müll. Arg.) latex. *Planta* (Berl.) 124, 31.
- MARIN B., MARIN-LANZA et E. KOMOR, 1981 a.— The proton motive potential difference across the vacuo-lysosomal membrane of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) and its modification by a membrane-bound adenosine triphosphatase. Biochem. J., 198, 365.
- MARIN B., J. SMITH et U. LUTTGE, 1981 b.— The electrochemical proton gradient and its influence on citrate uptake in tonoplast vesicles of *Hevea brasiliensis* - *Planta*, sous presse.
- MATILE P., 1969.— Lysosomes Biology an Pathology. T. I : *Plant. lysosomos*. Dingle ed., H.D. FELL, North-Holland, p. 406.
- MILANEZ F.R., 1946.— Nota privia sobre os laticiferos de *Hevea brasiliensis*. Arquivos do serviço florestal do Brasil, 2, 39.

- MILANEZ F.R., 1948.— Sugunda nota sobre laticiferos. *Lilloa*, 16, 193.
- MOIR G.F.J., 1959.— Ultracentrifugation and staining of *Hevea* latex. *Nature* (London), 184, 1626.
- MONTARDY M.C. et C. LAMBERT, 1977.— Diverses propriétés de l'absorption du citrate, du malate et du succinate par les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 16, 677.
- MOREAU F., J.L. JACOB, J. DUPONT et C. LANCE, 1975.— Electron transport in the membrane of lutoïdes from the latex of *Hevea brasiliensis* *Biochem. Biophys. Act.*, 396 - 116.
- PUJARNISCLE S., 1968.— Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Müll. Arg. Physiol. Végét.*, 6, 27.
- PUJARNISCLE S., 1971.— Etude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, *Müll. Arg. Différences et analogies avec les lysosomes. Mémoires ORSTOM* (Editions ORSTOM, France).
- 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 l'éthylène. Thèse Doct. d'Etat. Université d'Abidjan. (Côte d'Ivoire)*.
- RIBAILLIER D., J.L. JACOB et J. D'AUZAC, 1971.— Sur certains caractères vacuolaires des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* *Müll. Arg. Physiol. Végét.*, 9, 423.
- RUINEN J., 1950.— Microscopy of the «lutoïdes» of *Hevea* latex. *Ann. Bogor*, 1, 27.
- SOUTHORN W.A. et E. EDWIN, 1968.— Latex flow studies. II ; Influence of lutoïdes on the stability and flow *Hevea* latex. *J. Rubb. Res. Instit. Malaya*, 20, 187.
- TUPY J., 1973.— The regulation of invertase activity in the latex of *Hevea brasiliensis* (*Müll. Arg.*). The effects of growth regulators, bark wounding and latex tapping. *J. exper. Bot.*, 29, 516.
- VAN HARPEN N.L., 1937.— De coagulatie van het melk sap van de *Hevea brasiliensis*. *Arch. Rubercult.*, 21 63.
- WIERSUM L.K., 1957.— Enkele latex problemen. *Vakbl. Biol.* 37, 17.