

**TRAVAUX
ET DOCUMENTS
DE L'O.R.S.T.O.M.**



**Colloque
sur la Physiologie
du latex d'*Hevea brasiliensis***

Journées LATEX

Montpellier

[9 et 10 septembre 1975]



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

RENSEIGNEMENTS, CONDITIONS DE VENTE

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

SERVICE CENTRAL DE DOCUMENTATION DE L'ORSTOM
70-74, route d'Aulnay, 93140 BONDY (France)

- Tout paiement sera effectué par chèque bancaire barré au nom de RÉGIE ORSTOM BONDY, ou par chèque postal (compte n° 9.152.54, Paris, RÉGIE ORSTOM BONDY).
- Achat au comptant possible à la bibliothèque de l'ORSTOM, 24, rue Bayard, 75008 PARIS.

I - CAHIERS ORSTOM

BIOLOGIE
ENTOMOLOGIE MÉDICALE ET PARASITOLOGIE
HYDROBIOLOGIE
HYDROLOGIE

Océanographie
PÉDOLOGIE
SCIENCE HUMAINES

series trimestrielles

Abonnement : France 120 F
Etranger 156 F 36,30 US dollars

GÉOLOGIE - *série semestrielle*

Abonnement : France 96 F
Etranger 120 F 28,00 US dollars

II - BULLETIN ANALYTIQUE D'ENTOMOLOGIE MÉDICALE ET VÉTÉRINAIRE

12 numéros par an
(15 fascicules)

Abonnement : France 115 F
Etranger 130 F 30,25 US dollars

Nous vous rappelons, dans la collection «Mémoires de l'ORSTOM»,

**Étude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.
Différences et analogies avec les lysosomes**

S. PUJARNISCLE

n° 48, 100 p., ISBN 2-7099-0052-1 30 F

TRAVAUX ET DOCUMENTS DE L'O.R.S.T.O.M.
N° 68

Colloque
sur la
Physiologie du latex d'*Hevea brasiliensis*

Journées LATEX
Montpellier
[9 et 10 septembre 1975]

(with english summary)

O.R.S.T.O.M.
PARIS
1977

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

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

AVANT-PROPOS

Dès 1959, les planteurs de caoutchouc français, sur les conseils de M. le Professeur CAMUS, décidaient de financer dans leurs instituts de recherches, d'abord au Viet-Nam où ils avaient déjà amorcé quelques travaux de ce type sous l'impulsion de M. LE BRAS et de M. COMPAGNON, puis en France, un groupe de recherches spécialisé en physiologie végétale ; il s'agissait de mieux cerner les conditions de formation du caoutchouc dans l'arbre pour s'efforcer ensuite de trouver les modes d'action permettant de tirer le maximum de la capacité de production des hévéas. Il faut reconnaître aux planteurs le mérite d'avoir su, au milieu des graves difficultés indochinoises, faire un acte de foi dans un domaine, riche de potentiel certes mais d'une utilité pratique qui n'apparaissait pas immédiate, de façon évidente.

Ceci devait, en effet, conduire les Instituts français du caoutchouc à des travaux d'un certain caractère fondamental, sans cesse articulés étroitement avec ceux de l'O.R.S.T.O.M.

M. d'AUZAC, après y avoir coopéré en Indochine, en a pris la responsabilité en France ; sa nomination ensuite à la Faculté des Sciences à Abidjan renforçait les équipes qui travaillaient dans cette voie. Sa présence aujourd'hui à la Faculté des Sciences de Montpellier, près des nouveaux laboratoires du G.E.R.D.A.T. (1) dont l'Institut du Caoutchouc est membre, est une nouvelle contribution.

M. le Professeur LIORET, Président du Comité Technique de biologie et de physiologie végétale de l'O.R.S.T.O.M., suivait attentivement ces travaux et le Ministère de la Recherche de Côte d'Ivoire s'y intéressait tout particulièrement.

M. le Professeur CAMUS faisait également poursuivre des travaux de haute valeur par l'Université de Paris.

Mais il importait, après plus de quinze années, de faire le point ; aussi, M. le Professeur CAMUS et moi-même avons-nous pensé utile d'organiser à Montpellier un colloque entre tous les scientifiques français qui étudiaient la physiologie de l'hévéa.

Il était logique que le Professeur d'AUZAC animât les débats.

(1) Groupement d'Études et de Recherches pour le Développement de l'Agronomie Tropicale.

Le présent document en fait rapport. Il est particulièrement riche de conclusions.

Il est, sur le plan français, un témoignage d'étroite coopération entre l'Université, l'O.R.S.T.O.M. et un Institut de recherche appliquée.

Il est, sur le plan international, un témoignage de l'apport considérable fait en physiologie végétale sur l'hévéa par les équipes françaises, plus particulièrement au sein de l'organisation internationale de recherche et de développement sur le caoutchouc : l'International Rubber Research and Development Board. Peut-être même révèle-t-il l'avance des équipes françaises dans ce domaine.

R. de PADIRAC
 Directeur Général de l'Institut Français du Caoutchouc
 et de l'Institut de Recherches sur le Caoutchouc
 Vice-Président
 de l'International Rubber Research and Development Board



FOREWORD

As early as 1959, French rubber planters, on the advice of Professor CAMUS, decided to finance in their research institutes, first in Viet Nam where they had already initiated some work of this type at the instigation of M. LE BRAS and M. COMPAGNON, then in France, a research team specialising in plant physiology. The object was to obtain a more precise understanding of the conditions under which rubber is formed in the tree, so that efforts could then be made to find ways and means of exploiting to the full the productive capacity of the Hevea. The planters must be given the credit due to them for having, at a time of serious difficulties in Indochina, made an act of faith in a sphere so full of promise beyond doubt, but clearly far removed from immediate practical value.

This was, however, to lead the French Rubber Institutes to carry out research work of a somewhat fundamental nature at all times closely co-ordinated with that of O.R.S.T.O.M.

After having co-operated in this work in Indochina, M. d'AUZAC took over responsibility for it in France. His subsequent appointment to the Faculty of Sciences in Abidjan strengthened the teams already working in this field. His presence at the present time at the Faculty of Sciences in Montpellier, close to the new laboratories of G.E.R.D.A.T. (1) of which the Institut du Caoutchouc is a member, is a further contribution.

(1) Groupement d'Études et de Recherches pour le Développement de l'Agronomie Tropicale.

Professor LIORET, Chairman of the Technical Committee on Plant Physiology and Biology of O.R.S.T.O.M. followed this research work with considerable attention, and special interest was taken in it by the Ivory Coast Ministry of Research.

Professor CAMUS was also instrumental in having work of considerable value carried out by the University of Paris.

However, after more than fifteen years had elapsed, the time had come to take stock of the situation. For this reason, Professor CAMUS and myself considered that it would be worthwhile to hold a symposium in Montpellier, which would be attended by all French scientific workers engaged in studying the physiology of the hevea.

It was quite natural that the discussions should be led by Professor d'AUZAC.

The present document is a report of the proceedings. It presents a wide range of conclusions.

From the French point of view, it bears witness to the close co-operation which exists between the University, O.R.S.T.O.M. and an Institute of applied research.

In the international field, it is evidence of the considerable contribution made in plant physiology with particular reference to the Hevea, by French teams, most particularly within the framework of the International Rubber Research and Development Board. Perhaps it even serves to show the lead taken by French teams in this field.

*R. de PADIRAC
Director General of the Institut Français du Caoutchouc
and of the Institut de Recherches sur le Caoutchouc
Vice Chairman
of the International Rubber Research and Development Board*

*Pratique puis connaissance,
pratique et de nouveau connaissance,
cette forme rythmique est un processus
qui n'a pas de fin.*

Au début de 1975, sur l'instigation de Monsieur le Professeur CAMUS et de l'I.R.C.A., une réunion fut projetée dans le but de réunir les chercheurs francophones travaillant sur le latex d'*Hevea brasiliensis*. Ce projet avait plusieurs objectifs:

- faire le point des connaissances ;
- renforcer les liens de coopération entre les équipes, en permettant notamment aux participants de mieux se connaître ;
- échanger des idées et en faire naître.

L'organisation et la mise sur pied de ces «Journées Latex» furent difficiles du fait de la localisation très éparse de ces équipes, rendant la coordination mal aisée. Toutefois, la bonne volonté de chacun et des organismes impliqués permit de surmonter les obstacles.

Pour la première fois, les 9 et 10 septembre 1975, toutes les équipes francophones s'occupant du latex et de sa biologie, animées par Monsieur le Professeur d'AUZAC, se sont donc réunies à Montpellier pour confronter leurs résultats, présenter leurs projets, discuter de leurs problèmes.

Assistaient à ce séminaire :

- M. le Prof. J. d'AUZAC (Université de Montpellier),
- Mme J. BRZOWSKA (ORSTOM Côte d'Ivoire),
- M. P. COMPAGNON (Coordonnateur des problèmes de production IRCA Paris)
- M. M. COUPÉ (Maître-Assistant, Faculté des Sciences d'Abidjan),
- M. DUPONT (Assistant, Université Pierre et Marie Curie Paris VI),
- M. le Prof. F. HALLÉ (Institut de Botanique de Montpellier),
- M. J.-L. JACOB (Laboratoire Biochimie IRCA, Centre GERDAT de Montpellier),
- M. le Prof. C. LANCE (Université Pierre et Marie Curie Paris VI),
- M. C. LAMBERT (Maître de conférence, Faculté des Sciences d'Abidjan),
- M. J. LÉVÊQUE (Directeur de la Technologie IRCA Paris),
- M. le Prof. C. LIORÉ (Université de Paris XI, Orsay, Président du Comité Technique de Botanique et Biologie végétale de l'ORSTOM),
- M. B. MARIN (ORSTOM, Montpellier),
- Mme MONTARDY (Faculté des Sciences d'Abidjan),
- M. F. MOREAU (Assistant, Université Pierre et Marie Curie Paris VI),

- M. J.-C. PRÉVOT (Laboratoire de biochimie IRCA, Centre GERDAT de Montpellier),
- M. L. PRIMOT (Laboratoire de physiologie végétale et de biochimie de Bimbesso IRCA, Côte d'Ivoire).

Monsieur BOUYCHOU (Directeur des Recherches IRCA Paris) et Monsieur HANOWER (Maître de recherches ORSTOM Côte d'Ivoire), pour des raisons de santé, ne purent hélas participer à la réunion. L'absence de Monsieur le Professeur CAMUS, retenu au dernier moment par les devoirs de sa charge, fut vivement regrettée. Mme G. SOUCIET, Assistante à la Faculté des Sciences d'Abidjan, ne put également assister à cette réunion.

Monsieur le Professeur LIORET fit remarquer que l'ensemble des chercheurs présents constituait une véritable École francophone du latex, dont il avait déjà pu mesurer l'audience, à l'étranger, auprès de scientifiques éminents, spécialistes des problèmes liés à l'hévéa.

Les sujets abordés furent aussi divers que nombreux, comme le montre l'ensemble des exposés. La nécessité de les replacer dans un contexte global afin de progresser efficacement, tant sur le plan fondamental de la biologie du latex que dans le domaine pratique et essentiel de la productivité en hévéaculture, est apparue très nettement. Cette réunion a été un moyen d'atteindre ce but par l'intermédiaire des travaux présentés, des discussions qui en ont résulté et des conclusions qui ont pu être tirées.

Ce volume, qui est une compilation de travaux récents, peut paraître hétérogène dans sa structure. Il n'en est pas moins un outil nécessaire et efficace pour la continuation de l'effort entrepris dans le domaine de la biologie du latex ; effort double qui doit aboutir, tant au plan de la connaissance générale, qu'au plan des progrès pratiques en hévéaculture.

J O U R N É E S L A T E X

Le mardi 9 septembre et le mercredi 10 septembre 1975

Laboratoire de Physiologie végétale
 Université des Sciences et Techniques du Languedoc
 MONTPELLIER

PHYSIOLOGIE DU LATEX ET DES LATICIFÈRES

1 - PHYSIOLOGIE DE LA SAIGNÉE	P.
1.1 - Introduction : Écoulement et coagulation (J. d'Auzac)	15
1.2 - Coagulation	
1.2.1 - Historique des processus de coagulation (J. d'Auzac)	21
1.2.2 - Les phénol-oxydases et la coagulation (P. Hanower et J. Brzozowska)	25
1.2.3 - Morphologie du système laticifère : laticifère, phloème, cellules à tannin (F. Halle)	35
1.2.4 - Stabilisation des lutoïdes, influence de la stimulation (J.L. Jacob)	38
1.2.5 - Phospholipides et acides gras de la membrane des lutoïdes du latex (J. Dupont)	42
1.2.6 - Les phospholipases du latex (J.L. Jacob)	46
1.3 - Saignée, microsaignée et productivité	
1.3.1 - Longueur de saignée, teneur en saccharose et productivité (L. Primot)	49
1.3.2 - La microsaignée (L. Primot)	60
1.4 - La coagulation naturelle en saignée cumulée et les problèmes qu'elle pose (J. Lévêque)	69
Odeur, noircissement et baisse du P.R.I.	
Recherche de remèdes	
2 - PHYSIOLOGIE DE LA RÉGÉNÉRATION	
2.1 - Introduction : Importance de la régénération, notion de fatigue, enco- che sèche (J. d'Auzac)	77

2.2 - Régulation de la synthèse isoprénique	
2.2.1 - L'invertase (L. Primot)	79
2.2.2 - La PEP-carboxylase (J.C. Prévôt)	83
2.2.3 - Les phosphatases	
2.2.3.1 - La 2'nucléotidase du latex (J.L. Jacob)	85
2.2.3.2 - La phosphatase acide lutoïdique (J.L. Jacob)	89
2.2.3.3 - La phosphatase cytoplasmique dépendante du magnésium (G. Souciet)	92
2.2.4 - Du pyruvate à l'acétyl-coenzyme A (J.L. Jacob)	95
2.2.5 - La pyruvate décarboxylase (L. Primot)	98
2.2.6 - L'importance du pH dans la production du latex (L. Primot)	100
2.2.7 - Schéma général des problèmes de régulation de la synthèse isoprénique (J.L. Jacob)	101
2.3 - Protéines et leur métabolisme	
2.3.1 - La protéinogénèse (M. Coupé)	109
2.3.2 - Les acides aminés libres du latex (J. Brzozowska et P. Hanower)	116
2.4 - Les lutoïdes	
2.4.1 - Introduction (J. d'Auzac)	125
2.4.2 - L'ATP-ase membranaire lutoïdique (J. d'Auzac)	127
2.4.3 - Transfert d'électrons dans la membrane des lutoïdes du latex (F. Moreau)	133
2.4.4 - L'ARN intra et extra-lutoïdique (B. Marin)	137
2.4.5 - Les absorptions par les lutoïdes	
2.4.5.1 - Introduction (J. d'Auzac)	143
2.4.5.2 - L'absorption des acides organiques par les lutoïdes (C. Lambert)	144
2.4.5.3 - Pénétration des acides aminés dans les lutoïdes (P. Hanower et J. Brzozowska)	150
2.4.5.4 - «Énergisation» de l'accumulation intralutoïdique (J. d'Auzac)	157
2.5 - Notion de fatigue et problème des encoches sèches	
2.5.1 - La fatigue (J. d'Auzac)	163
2.5.2 - Importance actuelle des encoches sèches (L. Primot)	165
2.5.3 - Recherches de critères de fatigue au niveau du latex	166
2.5.4 - Propositions pour un plan d'étude du phénomène des encoches sèches.	167
CONCLUSIONS	169

INTRODUCTION

En l'absence du Professeur CAMUS, Directeur Général de l'ORSTOM, qui a initié et qui devait présider cette réunion, le Professeur d'AUZAC de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc souhaite la bienvenue aux chercheurs venus de divers laboratoires de France et de Côte d'Ivoire.

C'est la première fois que se trouvent rassemblés dans une réunion même informelle des chercheurs issus d'horizons très divers : recherche privée (IRCA) ou publique (ORSTOM), Universités française et ivoirienne. Cette réunion groupe des spécialistes confirmés du latex et des chercheurs chevronnés dans le domaine de la physiologie et de la biochimie végétale, mais sans expérience ancienne dans le domaine de l'Hévéa.

L'expérience a montré qu'un tel rassemblement de spécialistes et de physiologistes au sens large a été dans le passé extrêmement profitable. En effet, des idées nouvelles, en général fécondes, ne manquent pas de surgir de telle confrontation.

Deux raisons paraissent devoir assurer le succès du rassemblement d'aujourd'hui :

- 1 - l'hévéaculture a été dans le passé et sera une des ressources agricoles importantes de nombreux pays tropicaux. Il s'en est suivi depuis plus de cinquante ans un développement intensif de recherches qui ont amené la productivité en hévéaculture au niveau atteint à ce jour .
- 2 - le latex de l'hévéa constitue, sur le plan biologique, une sorte de bizarrerie mais il est surtout un outil de recherche incomparable en biologie, physiologie et biochimie.

Ces deux raisons font que se trouvent réunis ici des chercheurs de qualité appartenant à des disciplines différentes et qui rassemblent des moyens intellectuels et matériels relativement importants. On est en droit d'en attendre un certain élargissement des connaissances fondamentales dans le domaine de la biologie, de la physiologie et de la biochimie.

Un tel avancement des connaissances sera profitable à tous :

- à l'hévéaculture tout d'abord dans sa poursuite, économiquement indispensable, d'une productivité toujours améliorée,
- aux chercheurs présents, qui bénéficiant de l'outil tout à fait remarquable qu'est le latex d'hévéa, sont en bonne position pour contribuer à apporter des connaissances qu'il serait impossible d'obtenir sur d'autres matériels végétaux.

Des vœux de prompt rétablissement sont formulés à l'égard de MM. J.G. BOUYCHOU, directeur de recherches à l'IRCA et P. HANOWER, de l'ORSTOM, qui, tous deux hospitalisés, n'ont pu assister à cette réunion.

Il est précisé que cette réunion sera aussi informelle que possible bien qu'elle couvre par son programme l'ensemble des problèmes tournant autour de la physiologie des laticifères.

Après qu'aura été rappelé, pour chaque thème, l'état d'avancement des connaissances, chacun fera le point de ses recherches.

Afin que, d'une part, TOUS SOIENT AU COURANT DES TRAVAUX DE CHACUN et que, d'autre part et surtout, TOUS FASSENT DES SUGGESTIONS ET DES CRITIQUES SUR LES TRAVAUX DE CHACUN.

Il est donc demandé instamment aux participants d'intervenir pendant ou après les exposés afin d'obtenir des explications ou de fournir des idées. Il est en effet parfaitement reconnu que chaque chercheur risque d'être aveuglé par sa recherche et que les avis extérieurs sont souvent indispensables pour faire avancer les problèmes.

-I-

PHYSIOLOGIE DE LA SAIGNÉE

1 - 1
Écoulement et coagulation
J. d'Auzac

Les mécanismes commandant l'arrêt de l'écoulement et les relations entre l'écoulement et la productivité sont restés dans le vague jusqu'en 1968. A cette date, Milford et Paardekooper inventent l'index de Plugging (IP) :

$$\frac{\text{Volume de latex écoulé pendant les cinq premières minutes}}{\text{Volume total de latex écoulé}} \times 100 = \text{IP}$$

Plus ce rapport est fort, plus la durée d'écoulement est faible ; car l'écoulement est rapidement limité par des «pluggs» venant obturer l'extrémité des laticifères.

La figure 1 montre la variation de la vitesse d'écoulement et de la pression de turgescence dans l'écorce en fonction du temps s'écoulant après la saignée. On y considère un clône à faible production et à fort «plugging» : le Tj1 et un clône à forte production et à faible plugging : le RRIM 501.

Dans le même temps, ces auteurs mettent en évidence :

- des corrélations inverses entre IP et Production,
- des corrélations directes entre IP et DRC,
- des corrélations directes entre IP et réponse à la stimulation.

La dernière est particulièrement importante car elle confirme ce qui avait déjà été entrevu des mécanismes de la stimulation hormonale :
la stimulation agit apparemment en allongeant la durée d'écoulement donc en reportant à plus tard l'obturation des laticifères.

La relation entre Plugging et DRC est évidente si tant est qu'elle soit si simple : plus la teneur en caoutchouc du latex est élevée, plus il est visqueux et plus la coagulation est facile.

Par ailleurs, à des IP faibles correspondent des DRC faibles, ce qui peut signifier également que lorsque l'écoulement est relativement libre (faible IP) la régénération du caoutchouc dans le latex devient limitante et il s'établit alors un nouvel équilibre du DRC lequel se situera à un niveau plus bas.

IP est donc un moyen de comprendre la productivité sous l'angle de l'écoulement.

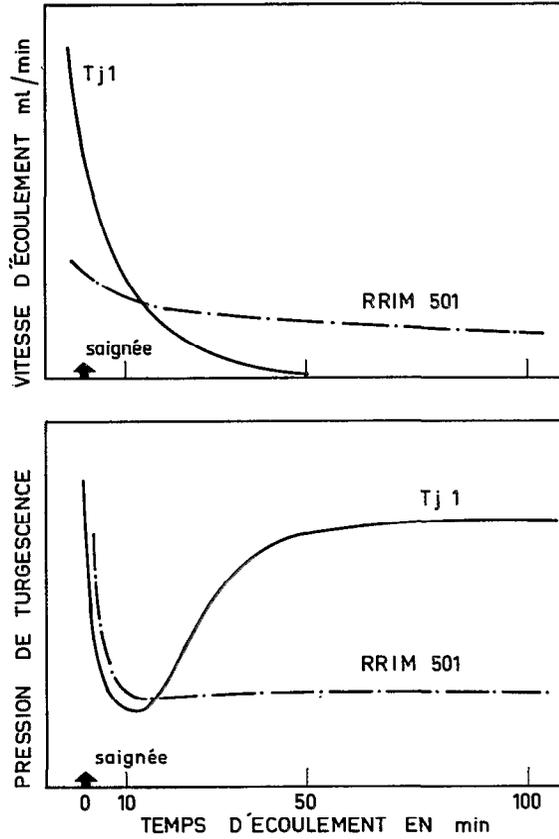


Figure 1

Écoulement du latex et plugging (MILFORD *et al.*, 1968)

$$\text{Index de Plugging (IP)} = \frac{\text{Volume de latex des 5 premières mn}}{\text{Volume total de latex}} \times 100$$

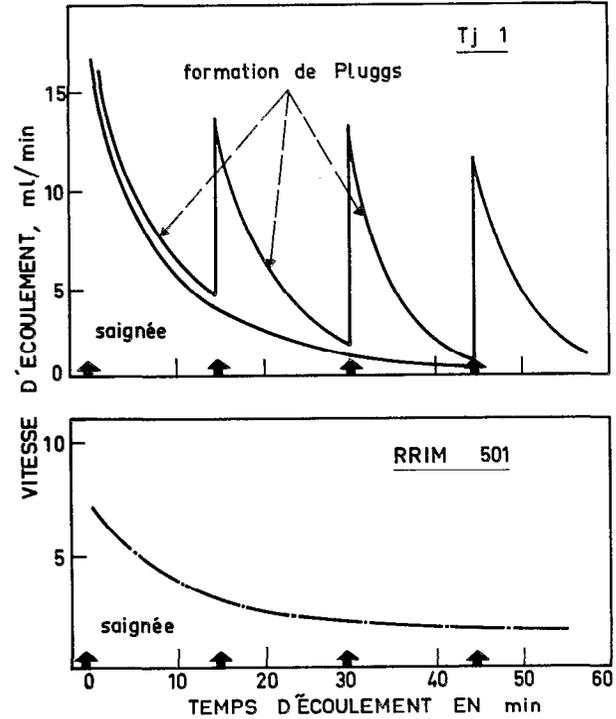


Figure 2

Influence de la saignée répétée sur la vitesse d'écoulement du latex

— Le problème est alors déplacé ... Quel est le mécanisme du Plugging ?

Southorn, en 1968, montre que le sérum intralutoïdique (sérum B) est susceptible d'induire la floculation du latex, par contre le sérum cytoplasmique (sérum C) contrebalance l'action du sérum B.

Le sérum B est acide (pH 5,4), il contient des cations divalents et des protéines dont certaines chargées « plus ». Il semble que les protéines soient les principaux responsables de l'action coagulante ou plus exactement de la formation de microfloculats dans le latex, et plus particulièrement les protéines cationiques.

La destabilisation **rapide** du latex résulterait essentiellement d'interactions électrostatiques entre le sérum B et ses protéines chargées positivement et les particules de caoutchouc chargées négativement.

Selon Southorn une action électrostatique rapide pourrait être suivie d'une action enzymatique lente consécutive à la mise en contact du contenu intralutoïdique du sérum C et des particules de caoutchouc.

NB - Des protéines cationiques à pH isoélectrique élevé tel le Cytochrome C induisent également le crémage rapide du latex. Il en est de même des savons cationiques (Chl. de Cetyl-Pyridinium).

On a parlé jusqu'à présent de floculation, visible en microscopie (formation de microfloculats et obturations des laticifères) et décelable également par crémage.

Lors de la coagulation en milieu acide, il vient, selon Southorn, s'ajouter un autre phénomène qui peut être enzymatique et qui serait déclenché par le pH acide.

l'explication électrostatique concerne donc essentiellement le Plugging.

On a encore déplacé le problème :

— Si l'éclatement des lutoïdes est responsable du Plugging, la question se pose alors de savoir **Pourquoi les lutoïdes éclatent *in situ* ?**

Southorn fournit une explication :

le laminage des lutoïdes à l'encoche de saignée détériore ces particules fragiles. Une pression initiale de 12 à 15 Atm. et une brusque décompression à l'extrémité ouverte des laticifères fonctionnent comme une presse de French.

Travaillant sur des microcapillaires, sous pression, Southorn a montré qu'en présence de lutoïdes l'écoulement s'arrêtait plus ou moins rapidement, alors qu'il se produisait indéfiniment en leur absence.

Les effets de laminage seraient localisés à proximité immédiate de l'extrémité sectionnée des laticifères ou les gradients de pression sont très élevés au moins à l'ouverture de la saignée.

Remarquons que l'effet destructif du laminage sur l'intégrité des lutoïdes est d'autant plus intense que le volume de laticifères sectionnés est réduit.

La spirale entière est donc plus favorable à l'écoulement long qu'une demi spirale, qu'une spirale réduite ou *a fortiori* qu'une microsaignée (il ne faut donc pas condamner forcément et définitivement la spirale entière).

Selon Pakianathan, l'agglomération des particules (floculation) est liée à l'éclatement des lutoïdes lui-même consécutif au choc osmotique provoqué par une diminution de l'osmolarité du latex lors de la saignée.

De fait, des dilutions progressives du latex par l'eau, ou le passage en milieu hypotonique entraîne bien une floculation (qui se traduit par une disparition des lutoïdes en ultracentrifugation ou une diminution du nombre de lutoïdes non endommagés examinés au microscope après coloration).

Remarquons que la chute d'osmolarité du latex durant l'écoulement est relativement faible ; différence 50 mOsm. Après stimulation, elle atteint au plus 100 mOsm.

En apparence contradiction est le fait que la stimulation au 2,4,5-T entraîne une augmentation marquée de la dégradation de la fraction lutoïdique au moins dans les premières fractions.

Par ailleurs, on peut se demander pourquoi le pompage de l'eau dans les laticifères après saignée ne serait efficace pour provoquer l'éclatement des lutoïdes qu'à proximité immédiate de l'encoche, car la microscopie électronique a montré qu'heureusement l'accumulation des «pluggs» ne se fait qu'au voisinage de l'encoche.

L'accord se fait, au cours d'une discussion générale, pour penser que l'hypothèse de Pakianathan n'est pas la plus vraisemblable.

En même temps qu'un critère permettant de caractériser la facilité de l'écoulement, on découvrirait le moyen de décongestionner les écoulements.

La stimulation, remède miracle de l'hévéaculture, levait partiellement le facteur limitant écoulement et permettait même des tours de force théoriquement interdits par la théorie de Southorn sur le laminage, à savoir la microsaignée.

Remarquons que si la stimulation apparaît jusqu'à un certain point comme une panacée, rien n'est clair quant à la façon dont elle réduit le plugging permettant par là une augmentation de la durée d'écoulement et donc de la production.

Dès qu'on parle de mode d'action hormonal, deux théories s'affrontent classiquement :

- action sur une augmentation de la perméabilité membranaire,
- action sur une activation de certains gènes et la biosynthèse de certaines enzymes, donc sur le métabolisme.

On peut penser que le mode d'action de la stimulation sur le plugging relève au moins en partie d'une action sur la perméabilité membranaire.

L'hormone favoriserait le rééquilibrage hydrique tout d'abord, puis en molécules osmoactives qui se produit lors de la saignée. La chute de la pression de turgescence entraînerait une augmentation de la force de succion donc une absorption d'eau et une dilution du latex.

Il se peut également qu'il existe une action au niveau de la perméabilité aux ions H^+ et donc une action sur le pH du latex.

Si l'on cherche à aller plus avant dans le mécanisme de la formation des pluggs, deux questions se posent :

- Es-ce que la théorie électrostatique suffit à rendre compte du phénomène ?
- Pourquoi la stimulation hormonale prolonge-t-elle la durée de l'écoulement ?
 - réduction des Pluggs ?
 - stabilisation des lutoïdes ?
 - meilleur rééquilibrage hydrique ?

★

1 - 2 Coagulation
1 - 2 - 1 Les processus de coagulation. Historique J. d'Auzac

Il faut distinguer :

- 1 - la coagulation conduisant à un gel (coagulation acide, coagulation par les savons)
- 2 - la coagulation conduisant à des floculats (microfloculats : crémage ; macrofloculats : SO^4Zn , + ...).

Il faut distinguer également :

- les coagulations : a - *in vivo*,
- b - *in vitro*.

Tout ceci pour montrer d'entrée qu'il existe plusieurs mécanismes de coagulation (voir figure 1).

Nous nous intéressons essentiellement ici à la coagulation **naturelle**.

Pourquoi un latex abandonné *in vitro* coagule-t-il ?

In vitro

Dans tous les manuels, on lit que si l'on amène le pH par acidification à 4 environ, on neutralise les charges négatives des protéines entourant les particules de caoutchouc et qu'il s'en suit la coagulation (cas classique des colloïdes chargés négativement).

Le résultat est identique avec des cations divalents ou trivalents en concentration élevée. Il s'agit donc là d'un phénomène électrostatique de neutralisation de charges.

Selon Van Gils : les particules de caoutchouc sont stabilisées par une double couche : Lipides et Protéines. Des savons peuvent se former par hydrolyse des lipides. Les acides gras vont déplacer les protéines des particules de caoutchouc ; celles-ci stabilisées par des savons seront très sensibles aux cations divalents (Ca - Mg) susceptibles de créer des ponts métalliques entre des molécules d'acides gras appartenant à deux particules différentes.

Le poids moléculaire du savon est très important (longueur de chaîne).

Laurate et ricinoléate sont, selon Pujarniscle, les plus efficaces ; en présence de Ca, ils conduisent à une coagulation quasi instantanée.

Taysum envisagea, à une époque, la coagulation par les bactéries. Le facteur pris en considération de l'action bactérienne était la production d'acides gras volatils (VFA) (formique, acétique, propionique).

Cette coagulation peut logiquement intervenir dans la coagulation naturelle de latex abandonnés plusieurs heures sinon plusieurs jours en milieu non stérile.

In vivo

Effets chimiques

Southorn fait l'hypothèse de substances chimiques coagulantes provenant des cellules endommagées par le couteau de la saignée. S'il paraît peu vraisemblable que ces substances puissent diffuser à l'intérieur des vaisseaux lors de la période d'écoulement rapide, une telle diffusion paraît plus vraisemblable lorsque l'écoulement est presque arrêté ; elle contribuerait à la formation de bouchons internes, ou à l'extrémité coupée des vaisseaux.

Intervention des lutoïdes

Théorie électrostatique de Southorn

C'est un mécanisme rapide entraînant la formation de flocculats lors de l'éclatement des lutoïdes : lequel se produit par laminage, ou choc osmotique.

Intervention d'une phospholipase

Elle s'attaquerait aux phospholipides protectrices des particules de caoutchouc.

Selon Southorn, l'adjonction de phospholipase du chou entraîne la coagulation du latex.

La phospholipase serait, soit lutoïdique, soit cytoplasmique.

Dans ce deuxième cas, les conditions optimales de son fonctionnement seraient créées soit par la libération du Ca intralutoïdique, soit par l'acidification consécutive à leur éclatement.

La coagulase de Woo

Woo a montré qu'à pH 4,5 en présence de 6 mM de Ca une suspension de particules de caoutchouc à 9 % ayant été bouillie restait stable pendant au moins une semaine.

L'adjonction de 10% de sérum C entraînait la coagulation du système en 30 mn. Il en conclut à l'existence d'une «coagulase» présente dans le sérum C.

Le Ca est indispensable, l'optimum de concentration en Ca se situe vers 30 mM, ce qui est extra physiologique.

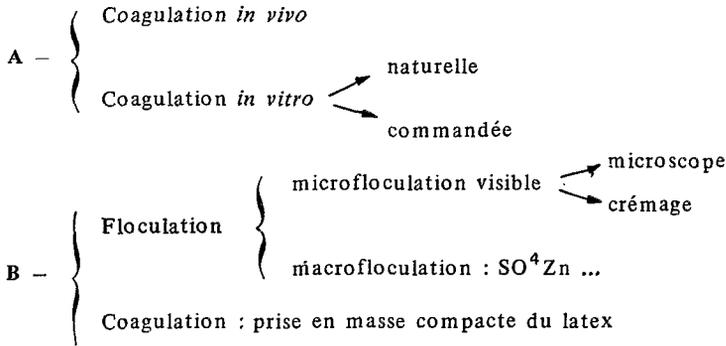
Woo remarque que la coagulation se fait en l'absence d'activité enzymatique libérant la choline, donc il n'y a pas apparemment de phospholipase active. Essayant

W.A. SOUTHORN - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, 4, 494-512 (1969).

C.H. WOO - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 23, 5, 323-31 (1973).

LES DIVERS MÉCANISMES DE LA COAGULATION

Il faut distinguer :



- 1 - Coagulation par neutralisation des charges négatives des protéines de la particule de caoutchouc (acides et cations divalents ou trivalents)
- 2 - Action des Acides Gras : formation de ponts Ca ou Mg entre deux particules de caoutchouc (Van GILS)
- 3 - Coagulation par les bactéries (bactéries formatrices d'acides forts volatils)
- 4 - Coagulation chimique *in vivo*, par des exudats de cellules lésées lors de la saignée ? (SOUTHORN)
- 5 - Intervention des Lutoïdes
 - théorie électrostatique de SOUTHORN (protéines intra lutoïdiques chargées +)
 - intervention d'une phospholipase
 - intervention de l'O₂, des phénols lutoïdiques et des PPOx.
- 6 - Intervention d'une Protéase
La coagulase de WOO.

Figure 1

diverses enzymes du commerce (Lipases et Protéases à forte dose), il constate que la Protéase de *B. subtilis* est la plus efficace car elle permet la coagulation de son système analytique en une vingtaine de minutes.

Selon lui, le Ca indispensable proviendrait de l'éclatement des lutoïdes susceptibles de libérer une concentration élevée en Ca. Or, le sérum B contient seulement 1,5 mM Ca et le sérum C 0,25 mM.

L'enzyme en question serait une protéase qui interviendrait dans la formation des pluggs *in vivo* (mais quelle est sa courbe de pH ?) et également dans la coagulation acide du latex *in vitro*.

Une majorité se rassemble pour contester l'expérimentation de Woo ; deux chercheurs n'ont pu la reproduire.

Intervention de O₂ et des polyphénols

Il y a quelques années, le Pr. Lioret s'étonnait que les «pluggs» se forment seulement à l'extrémité des laticifères, c'est-à-dire au contact de l'air. Il formule alors l'hypothèse de l'intervention de l'O₂ de l'air, laquelle a conduit au travail entrepris par M. Hanower et Mme Brzozowska.

★

1 - 2 - 2
 Les Phénol-oxydases et la Coagulation
 P. Hanower et J. Brzozowska

Phenol-oxidases and the coagulation of latex

Abstract

By using dilute suspensions of rubber at pH 6,5 and 4,5 and employing the Woo technique it has been confirmed that the S (lutoid) serum and the C (cytoplasmic) serum have respectively an activating and protective function with respect to the coagulation of latex. In addition, CaCl_2 (1 mM) is a powerful activator of coagulation.

Under the conditions adopted, coagulation took 5 to 6 h in air, but was accelerated in an atmosphere of oxygen (2 to 2½ h) and was retarded in nitrogen (24 to 30 h). Reducing agents such as mercaptoethanol, cysteine and dithionite retard coagulation whereas an addition of commercially available polyphenoloxidase (tyrosinase) accelerates it.

Of the various phenolic compounds tested with respect to coagulation, catechol and DOPA, both good substrates for the phenol oxidases, are the most effective activators of coagulation.

Various proteins, both enzymatic and otherwise, were added to the latex and their effect on coagulation noted. Trypsin was the most effective followed by phenoloxidase and phospholipase D. It should be noted that stimulation with Ethrel causes retardation of coagulation if the coagulability test used so far is considered.

The phenoloxidases in latex were studied after centrifuging on a density gradient and electrophoresis on a starch gel. It was confirmed that the main activity bears some relationship to the Frey-Wissling particles. However, from 4 to 5 anionic isozymes are found in the C serum whereas those in the S serum are cationic. Weaker phenoloxidase activity appears to be linked with a heavier fraction than that which corresponds to the Frey-Wissling particles.

The phenoloxidases in latex are activated by Ca, Mg and Cu, but inhibited by reducing agents, KCN, diethyldithiocarbamate and arsenate, their optimum pH being 6.0. Phenoloxidase activity is extremely variable depending on the clonal origin of the latex. Tj1 and Pb86 could be extreme cases because of their richness and deficiency respectively in phenoloxidases. This activity is greatly reduced by stimulation with Ethrel.

Analysis for total phenolic compounds reveals a wide variability associated with the clone, the season and influences such as those of stimulation. Latex from Pr107 contains from 200 to 750 µg of phenol/ml.

The breakdown of certain organised structures in latex as the result of the shock induced by tapping undoubtedly has an effect in various ways on micro-

coagulation processes and arrest of the flow. It can be presumed that the establishment of contact between the phenoloxidases and both phenolic substrates and atmospheric oxygen may, especially in the region of the tapping cut, be a factor in arresting the flow of latex.

★

La coagulation du latex, en provoquant l'arrêt de l'écoulement consécutif à la saignée, est un facteur limitant de la production.

De nombreuses hypothèses ont déjà été émises pour expliquer le mécanisme de cette coagulation, mais aucune d'elles ne semble être satisfaisante.

Nous avons abordé ce problème sous trois angles différents :

- recherche d'un système destabilisateur interne,
- étude des facteurs externes agissant sur la coagulation,
- recherche des systèmes enzymatiques impliqués dans le processus.

Pouvoir destabilisateur du sérum S (1) et du sérum C (2)

Les divergences de vues entre les auteurs attribuant les propriétés coagulantes, les uns au sérum lutoïdique (Southorn et Edwin, 1968 ; Yip et Southorn, 1968 ; Ribailier, 1972), les autres au sérum cytoplasmique (Woo, 1973), nous ont amenés à vérifier, en premier lieu, ce point important.

Les essais ont été conduits, soit avec des suspensions de caoutchouc à pH 4,5, selon la technique de Woo (1973), soit avec les latex entiers tamponnés à pH 4,5 et à pH 6,5 (tableau 1). Après l'adjonction ou non du sérum S ou du sérum C, seuls ou conjointement avec CaCl_2 , les étapes successives de destabilisation et de coagulation ont été suivies.

Dans tous les cas, le sérum S exerçait un pouvoir coagulant très net, alors que le phénomène inverse, un ralentissement du processus, survenait en présence du sérum C.

Il en est conclu que c'est bien le sérum S qui contient un système destabilisateur interne. Le sérum C serait siège d'un système antagoniste, il contiendrait

(1) Sérum S : sérum issu de la fraction sédimentable.

(2) Sérum C : surnageant clair, sérum cytoplasmique

W.A. SOUTHORN et E.E. ADWIN - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 20, 187, (1968).

E. YIP et W.A. SOUTHORN - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 20, 201, (1968).

D. RIBAILLIER - 1972 - Thèse Doctorat d'État, AO 7716, Abidjan.

C.H. WOO - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 23, 323, (1973).

Tableau 1

Action du sérum S, du sérum C et du CaCl_2 sur la coagulation du latex à pH 6,5

Motifs	Temps nécessaire pour atteindre les quatre étapes successives de coagulation			
	Destabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
Latex		30 h		
Latex + CaCl	4 mn	9 mn	12 mn	17 mn
Latex + sérum S	20 mn	25 mn	35 mn	140 mn
Latex + sérum S + CaCl_2	3 mn	8 mn	10 mn	12 mn
Latex + sérum C		38 h		
Latex + sérum C + CaCl_2	5 mn	10 mn	15 mn	20 mn

Milieu : Latex - 3 ml ; tampon cacodylate 0,5 M pH 6,5 - 1 ml ;
 CaCl_2 5 mM ; sérum S ou sérum C - 0,75 ml ; H_2O - q. s. p. 5 ml.

un ou des inhibiteurs du processus agissant, soit directement sur la coagulation, soit indirectement sur quelque agent impliqué dans le processus.

Action des cations bivalents Ca^{++} , Mg^{++} et Cu^{++}

Les mêmes essais (tableau 1) ont mis en évidence l'action spectaculaire du CaCl_2 en tant que facteur coagulant. Cette action a été confirmée par d'autres expériences qui, en même temps, ont démontré les propriétés coagulantes du MgCl_2 . Les deux cations entraînent une coagulation rapide du latex déjà à doses physiologiques, c'est-à-dire à des concentrations proches de celles trouvées dans le sérum «lutoïdique» (1 mM pour Ca^{++} et 20-50 mM pour Mg^{++}).

Le Cu^{++} exerce également une action favorable sur la coagulation, mais son effet est plus faible.

Rôle de l'oxygène atmosphérique

Le rôle important de l'oxygène atmosphérique dans le processus de coagulation du latex, suggéré par Lioret (1971), a pu être mis en évidence tant dans les essais *in vitro* que dans ceux *in vivo*, sur l'encoche (avec des arbres saignés à l'air libre et sous azote).

Dans le premier cas, la coagulation du latex conservé sous oxygène a été nettement accélérée et celle du latex conservé sous azote fortement ralentie par rapport au témoin laissé à l'air libre (tableau 2).

Tableau 2
Action de l'oxygène sur la coagulation du latex *in vitro*

Motifs	Temps nécessaire pour atteindre les trois étapes successives de coagulation		
	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
Sous N ₂	22 - 25 h	24 - 30 h	36 - 45 h
A l'air libre	4 - 4 ½ h	5 - 6 h	8 - 10 h
Sous O ₂	1 ½ - 2 h	2 - 2 ½ h	3 - 3 ½ h

Dans le deuxième cas, on a observé, sous l'azote, une prolongation de la durée d'écoulement d'environ 1 h ½, ce qui s'est traduit par un accroissement du volume du latex ainsi récolté de l'ordre de 15 à 20%.

Action des antioxydants

Les substances antioxydantes, telles que le mercanto-éthanol, la cystéine et le dithionite de sodium, ajoutées au latex tamponné à pH 6,5, retardent sa coagulation. Un retard est aussi observé en présence d'acide ascorbique.

Action d'une phénoloxydase exogène

Les réactions d'oxydation jouant un rôle important dans la coagulation du latex, il était logique de supposer que certaines oxydases, et plus particulièrement les phénoloxydases, pouvaient être impliquées dans le processus.

Nous avons testé l'effet des doses croissantes d'une phénoloxydase commerciale (Tyrosinase de champignons) sur la coagulation du latex tamponné à pH 6,5, et nous avons constaté que son adjonction au latex provoque une coagulation rapide. La vitesse de coagulation croît avec la quantité d'enzyme ajoutée. De plus, en présence de tyrosine exogène, l'action de l'enzyme sur la coagulation se trouve accentuée.

L'hypothèse suivant laquelle les phénoloxydases endogènes pourraient jouer un rôle dans la coagulation du latex s'est trouvée ainsi renforcée.

Action des quelques composés phénoliques

Les différents composés phénoliques, dont certains constituants naturels du latex (tyrosine, acide o-coumarique, scopolétine), ont été testés pour leur action sur la coagulation. La coagulation la plus rapide a été observée en présence de deux des meilleurs substrats de la polyphénoloxydase (o-diphénoloxydase) du latex :

catéchol et DOPA. L'action de la tyrosine, substrat de la monophénoloxydase, a été nettement plus faible. Le processus de coagulation a été, par contre, très lent en présence des coumarines et particulièrement de la scopolétine.

Ainsi, les composés phénoliques, suivant leur nature, peuvent avoir des effets très différents sur la coagulation, d'où leur rôle probable dans le système régulateur interne.

Pouvoir coagulant des quelques protéines enzymatiques ou non

Nous avons testé l'action sur la coagulation des quelques protéines (en majorité enzymatiques). En effet, l'action de la phénoloxydase exogène pourrait, en partie au moins, être attribuée à la protéine et non à l'enzyme.

Quatre, parmi les protéines enzymatiques testées (tableau 3) sont présentes dans le latex : phénoloxydase, peroxydase, catalase et phospholipase D ; cette dernière a été envisagée (Smith, 1953 ; rapport du R.R.I.M., 1966) comme enzyme responsable de la coagulation du latex.

La trypsine a été testée en tant que protéase ; ce type d'enzyme est susceptible de provoquer, selon Woo (1973), une destabilisation rapide de la suspension

Tableau 3

Pouvoir coagulant de quelques protéines enzymatiques ou non enzymatiques

Enzyme ou protéine testée	Temps (minutes) nécessaire pour atteindre les quatre étapes successives de coagulation			
	Destabilisation	Début de coagulation	Coagulation	Prise en masse
Trypsine	2	5	9	30
Polyphénol oxydase	5	25	30	65
Peroxydase	170	180	300	
Catalase	180	190	300	
Phospholipase C	80	100	120	180
Phospholipase D	240	260		
Héparine		300		
Albumine	180	190	300	

Milieu : 2 ml de latex 1 ml de tampon cacodylate 0,5 M pH 6,0 ; concentration en enzyme (ou protéine) : 1 mg/ml.

R.H. SMITH - *Biochem. J.*, 56, 240, (1953).

C.H. WOO - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 23, 323, (1973).

de caoutchouc. On a pu constater qu'au pH utilisé (6,0), la trypsine a le plus grand pouvoir coagulant. Elle est suivie de près par la phénoloxydase. La phospholipase C exerce également une action favorable sur la coagulation.

L'effet de la peroxydase, de la catalase et de la phospholipase D est comparable à celui de l'albumine et peut être attribué à l'apport des protéines.

Des résultats obtenus, il ressort que d'autres enzymes que la polyphénoloxydase, dont l'action se trouve une fois de plus confirmée, pourraient être impliquées dans le processus de coagulation du latex et notamment certaines protéases.

Action de la stimulation sur les propriétés coagulantes du latex

L'effet principal de la stimulation des arbres par l'Éthrel, générateur de l'éthylène, est *in vivo* la prolongation de la durée de l'écoulement du latex après la saignée, c'est-à-dire un retard dans sa coagulation sur l'encoche. La stimulation semble modifier les propriétés coagulantes du latex. Nous avons testé ce phénomène *in vitro*, soit sur les latex entiers, non dilués, soit sur les latex tamponnés à pH 6,5.

Dans les deux cas, on a constaté un retard net (allant jusqu'à plusieurs heures) dans la coagulation des latex provenant des arbres stimulés, par rapport à ceux des arbres témoins ; ceci indique un pouvoir coagulant réduit.

Phénoloxydases du latex

Partant de la constatation que la phénoloxydase et ses substrats exercent une action sur la coagulation, nous avons poursuivi les recherches sur les phénoloxydases du latex. La présence de deux systèmes phénoloxydasiques (ou, au moins, de deux fonctions phénoloxydasiques), a été mise en évidence : monophénoloxydase, opérant la transformation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA), et polyphénoloxydase (O-diphénoloxydase), dont l'activité est mesurée en utilisant la DOPA comme substrat. Aucune activité du type laccase n'a pu être, par contre, décelée dans le latex.

Le système polyphénoloxydasique (PPO), particulièrement actif dans les latex de certains clones, a fait l'objet d'études plus détaillées.

Localisation de l'enzyme au niveau subcellulaire

L'activité PPO est liée à la fraction particulaire. Le sérum C est pratiquement inactif ; ajouté au sédiment, il inhibe fortement son activité. Au départ, deux hypothèses ont été envisagées : 1- la PPO serait exclusivement particulaire ; 2- elle serait de double origine, particulaire et sérique, mais se trouverait dans le sérum cytoplasmique à l'état latent, totalement inhibée par certains de ses constituants naturels. C'est cette dernière hypothèse qui s'est avérée vraie. Déjà Coupé et coll. (1972) ont signalé la présence sur les électrophoregrammes du surnageant d'une bande PPO distincte de celle trouvée au sédiment. Nous avons mis en évidence, par

l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et sur plaques d'amidon, la présence dans le sérum cytoplasmique de toute une série d'isoenzymes, dont 4 à 5, à caractère anionique, sont propres à cette fraction. Les isoenzymes caractéristiques du sédiment sont, par contre, de nature cationique.

L'inhibiteur (ou les inhibiteurs) sérique (s) de PPO est thermostable ; ce n'est donc pas une protéine.

La localisation de la PPO sédimentable au niveau des particules de Frey-Wyssling, mise en évidence par Coupé et coll. (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 bien déterminées (durée d'action, concentration en digitonine), on obtient la lyse des particules riches en PPO avec la «solubilisation» de l'enzyme, qui passe dans le surnageant, alors que les lutoïdes, caractérisés par leur activité phosphatase acide (P-ase), restent intacts. Parallèlement à la «solubilisation» de la PPO, il y a la libération du β -carotène ; il s'agit donc bien des particules de Frey-Wyssling.

La deuxième technique emploie une centrifugation isopycnique. La distribution des protéines et des activités enzymatiques le long d'un gradient continu de saccharose (figure 1) montre que les protéines, la P-ase et la Perox (péroxydase), suivent la même distribution, distincte de celle de la PPO. Remarquons, en passant, le déplacement très caractéristique du pic des lutoïdes provenant des arbres stimulés vers les fractions plus légères du gradient.

La PPO, 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 considérées comme étant constituées, soit par une autre population de lutoïdes de densité plus forte, soit par des particules agglutinées. Ce qui frappe toutefois, c'est que l'on n'y décèle que très peu de protéines, de P-ase et de Perox.

Compte tenu de ce fait, ainsi que des autres observations réalisées au cours des centrifugations différentielles, nous avons suggéré qu'il pourrait s'agit là d'un type de particule riche en PPO, non encore identifié, distinct de celles de Frey-Wyssling, correspondant à la zone 1.1. de Moir (1959). Un examen au microscope électronique de la «fraction X» semble toutefois infirmer cette supposition.

Quelques caractéristiques de la PPO du latex

Le pH optimum pour l'activité PPO se situe aux environs de 6.

Activateurs - les cations bivalents Ca^{++} , Mg^{++} et Cu^{++} (les mêmes qui favorisent la coagulation du latex).

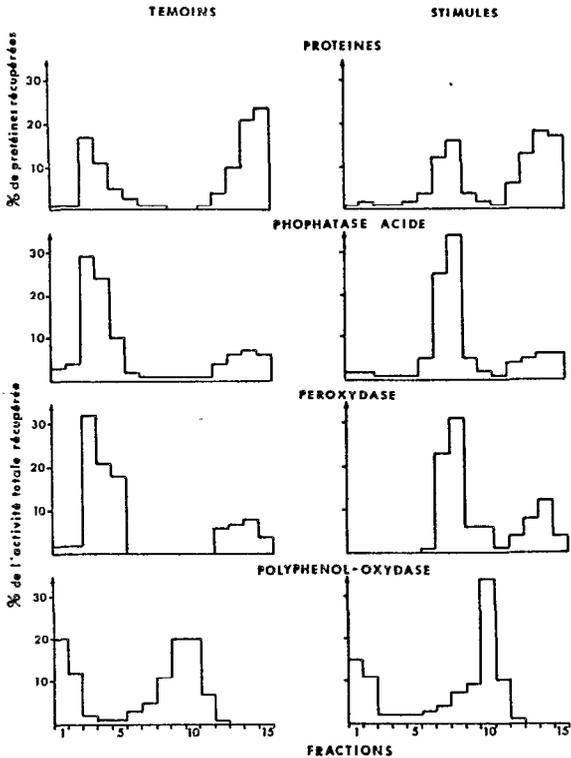


Figure 1

Histogramme représentant la distribution des protéines et des activités enzymatiques le long d'un gradient continu du saccharose

Inhibiteurs -

- a - les antioxydants - MSH, cystéine, acide ascorbique (tous retardateurs de la coagulation),
- b - les substances bloquant le cuivre (intramoléculaire) - KCN et Diethyldithio-carbamate,
- c - l'arséniate de Na.

L'affinité de l'enzyme aux différents substrats - dans l'ordre de l'affinité décroissante, on trouve le catéchol, la DOPA et l'acide chlorogénique.

Substrats naturels de phénoloxydases - Composés phénoliques du latex

La présence dans le latex des phénoloxydases actives nous a conduits à la recherche de leurs substrats naturels et, plus généralement, à l'étude des composés phénoliques du latex.

Nous avons constaté que, contrairement aux opinions répandues, le latex d'hévéa contient des quantités importantes de phénols. A titre d'exemple, dans le latex du clone PR 107, on trouve entre 200 et 750 μg de phénols totaux/ml latex, dont 150-400 μg dans le sérum cytoplasmique et 50-350 μg dans le sédiment.

Les teneurs en phénols totaux varient dans des larges limites au cours de l'année. Une forte augmentation est observée à la fin du cycle végétatif.

La stimulation des arbres par l'Ethrel fait augmenter les phénols du latex (jusqu'à 150% du témoin).

L'identification des composés phénoliques présents dans le latex est en cours.

PPO - Différences clonales

L'exceptionnelle variabilité de l'activité PPO de latex signalée par Coupé et coll. (1972) et la recherche d'un rapport entre cette activité et les propriétés coagulantes du latex nous ont amenés 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 (tableau 4). Les mesures d'activité PPO (sur un très grand nombre d'échantillons) ont mis en évidence des différences clonales spectaculaires. Dans l'ordre d'activité décroissante, il faut citer Tjir 1, PR 107, GT 1 et PB 86. Une corrélation positive semble exister entre l'indice d'obstruction et l'activité PPO.

Il est à noter que les valeurs inférieures de la rubrique «Variations» (tableau 4) se rapportent, en général, à la fin du cycle végétatif. Cette baisse de l'activité PPO coïncide avec la montée déjà mentionnée de la teneur du latex en composés phénoliques.

Tableau 4
Variations de l'activité polyphénoloxidasique du sédiment selon les clones

CLONE	Activité PPO moyenne en DO/ml latex/mn mesurée		Variations
	sans ions Ca^{++}	en présence des ions Ca^{++}	en présence des ions Ca^{++}
Tjir 1	0,772	2,145	1,250 - 5,760
PR 107	0,428	1,305	0,834 - 1,815
GT 1	0,068	0,320	0,225 - 0,412
PB 86	0,009	0,053	0,038 - 0,063

Action de la stimulation sur la PPO

Le fait que la stimulation des arbres par l'Ethrel se répercute sur les propriétés coagulantes du latex nous a amenés à étudier l'action d'un tel traitement sur l'activité PPO.

Nous avons constaté qu'après une phase stationnaire ou même, parfois, une légère augmentation de l'activité PPO observée immédiatement après le traitement stimulant, cette activité décroît rapidement et ne présente, vers la 4^e et la 5^e saignées, que 20 à 30% de la valeur des témoins. L'effet dépressif de la stimulation sur l'activité PPO se maintient pendant plusieurs semaines après le traitement.

Ces résultats confirment l'existence d'un rapport direct entre l'activité PPO et le pouvoir coagulant du latex.

Une corrélation inverse semble exister entre l'activité PPO et la teneur globale en phénols qui, elle, augmente après la stimulation.

★

En conclusion, la coagulation du latex est un processus très complexe et beaucoup de facteurs y sont impliqués, facteurs qui, parfois, agissent de façon antagoniste.

Un système interne de régulation semble fonctionner au sein du latex. Les éléments figurés contiennent les facteurs destabilisateurs ; les lutoïdes : bas pH (acidité), cations bivalents, protéines à point isoélectrique élevé ; les particules de Frey-Wyssling : la PPO.

L'éclatement des structures avec la libération de leur contenu provoquerait, localement au moins, la coagulation du latex :

- par l'abaissement du pH, les phénomènes électrostatiques et la libération des activateurs d'enzymes (Ca^{++} , Mg^{++}) dans le cas des lutoïdes,
- par la mise en contact de la PPO avec ses substrats phénoliques (formation des quinones et des mélanines) dans le cas des particules de Frey-Wyssling ; l'action de cette enzyme sur la coagulation est incontestable ; le rôle régulateur des différents constituants phénoliques du latex est à envisager.

Le sérum cytoplasmique représenterait un système antagoniste au système destabilisateur de particules. Il contiendrait des inhibiteurs de coagulation agissant soit directement sur le processus, soit indirectement sur quelque facteur de coagulation, comme c'est le cas pour la PPO.

L'oxygène atmosphérique et, plus généralement, les réactions d'oxydation, jouent un rôle important dans le processus de coagulation. Ceci pourrait expliquer le caractère superficiel de la coagulation du latex sur l'encoche.

Enfin, d'autres enzymes que la PPO pourraient être impliquées dans le processus, par exemple certaines protéases.

L'action de la stimulation s'exercerait, entre autres, au niveau de l'activité PPO ; la baisse de cette activité sous l'effet du traitement serait en rapport direct avec la moindre coagulabilité des latex des arbres stimulés.

★

1 - 2 - 3
Morphologie du système laticifère, Phloème, Cellules à tanin
 F. Halle

Morphology of the laticiferous system

Morphogenesis and cambium function of the hevea are both rhythmic. It appears, however, that the number of laticiferous mantles is less than the number of age rings of the wood or of the «sheaths» of tannin-bearing cells surrounding the laticiferous vessels. This phenomenon which therefore conditions the richness of a bark in laticigenic tissue must play an important part in the production potential of the hevea. It is therefore worthy of careful study especially the cytological aspect.

A reminder is given that the latex collected by tapping is in reality a mixture of components derived from cells of different ages and various origins.

★

La saignée des laticifères lèse dans le même temps de nombreuses cellules et les vaisseaux du liber. Qu'est-ce exactement que l'on baptise latex ?

*

La morphogénèse de l'hévéa est rythmique. La manifestation de ce rythme endogène (42 jours environ) peut se constater sur la croissance en hauteur et en diamètre, la ramification, etc..

Le cambium a lui aussi un fonctionnement rythmique facilement observable par l'intermédiaire des cerneaux du bois.

Si la disposition des manteaux concentriques des tubes à latex est classique, le lien de leur apparition avec le rythme endogène l'est moins. D'après des résultats obtenus en 1968, il apparaît qu'il y a en réalité des sortes de ratés. Le nombre n de manteaux laticifères est inférieur au nombre N de cerneaux de bois qui, lui, est en corrélation exacte avec le rythme. Prenons un exemple (figure 1) :

- soit un stade de croissance caractérisé par 6 cerneaux de bois ; dans le liber 4 manteaux laticifères (n° 1, 3, 4 et 6) seulement sont décelables ; mais si l'on examine la carte des cellules à tanin qui sont en général étroitement liées aux laticifères, les manteaux n° 4 et 5 sont visibles ; ceci amène à l'interprétation « provisoire » des ratés, signalée précédemment.

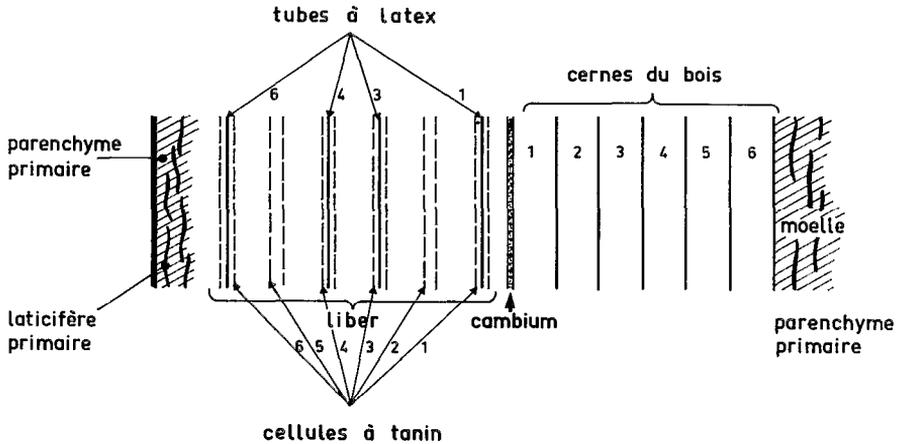


Figure 1
Coupe schématisique dans un rameau d'hévéa

- il semble que le manteau laticifère complet comporte des tubes à latex accompagnés d'une sorte de gaine de cellules à tanin, et que les structures incomplètes ne possèdent que des cellules à tanin (l'inverse n'a d'ailleurs jamais été observé).

L'amélioration du matériel végétal en hévéaculture devra donc tenir compte de ces observations, et faire en sorte que les manteaux laticifères des arbres soient toujours complets. Une recherche de variabilité à ce sujet entre des hévéas hauts producteurs et bas producteurs est souhaitable.

D'autre part, les cellules à tanin et les tubes à latex ne sont pas simplement juxtaposés : leur ontogénèse et leur évolution (jeunesse, maturité, senescence, dislocation) sont parallèles. Il en résulte que le latex obtenu par saignée est un mélange de constituants à des stades ontogéniques différents qui, par conséquent, ont des caractères histologiques et plus globalement biologiques très variés. Par ailleurs, le latex recueilli contient aussi des constituants d'origines cellulaires diverses : tanins, sève élaborée, etc.. Il ne faut donc en aucun cas oublier l'hétérogénéité de ce matériel végétal.

Enfin, de nombreux sujets de recherches se doivent d'être abordés :

- à quel moment du cycle cambial le tube se forme-t-il ?
- quel est le lien entre les tubes à latex et les tubes criblés ?
- comment peut-on envisager le rôle biologique du latex ?

Autant de questions dont les réponses sont nécessaires pour espérer progresser efficacement dans le domaine de la physiologie de l'hévéa et par extension celui de la productivité.

Au cours de la discussion, une remarque importante est faite, à la suite d'une question sur l'inclinaison des tissus laticifères par rapport à l'axe du tronc. Monsieur le Professeur Hallé, contrairement à ce qui est généralement cru, pense que les laticifères ne sont pas systématiquement inclinés du même côté, mais que cette inclinaison est répartie également dans un sens ou dans l'autre.

★

1 - 2 - 4
Stabilisation des lutoïdes
Influence de la stimulation
J. L. Jacob

Stabilisation of lutoïds - Stimulation

The stability of latex is undoubtedly linked with the membranes of its constituent particles and especially the lutoïds.

When freshly-collected latex is centrifuged at 50,000 g on a discontinuous saccharose gradient it is found that the relative density of its lutoïds is extremely heterogeneous. The quantitative distribution of the lutoïds in all the density zones is very variable depending on the origin or the state of the latex studied. Upon storage, the lutoïds appear to become lighter, which prevents them from penetrating through the gradient.

Stimulation modifies the distribution of lutoïds on a continuous saccharose gradient. Better homogeneity is achieved throughout, which is made manifest by grouping together of the particles in certain zones. These results militate in favour of the theory that stimulants act on the lutoïd membranes thus giving increased stability.

★

La stabilité des lutoïdes est un facteur important de la stabilité du latex lui-même.

Elle est mesurée généralement par le relargage d'enzymes intralutoïdiques telles que la phosphatase acide.

Cette stabilité est vraisemblablement liée à l'état des membranes de ces particules.

L'évolution de ces structures membranaires sous l'effet de facteurs divers, qui aboutit à la destabilisation du lutoïde, a pu être mise en évidence lors d'expériences de centrifugations en gradient de densité.

Hétérogénéité de la densité apparente des lutoïdes

La centrifugation à 50.000 xg durant 120 minutes, de latex fraîchement récolté, sur gradient discontinu de saccharose, a permis de constater la très grande hétérogénéité de la densité apparente des lutoïdes, mise en évidence par l'activité phosphatase acide qui leur est associée.

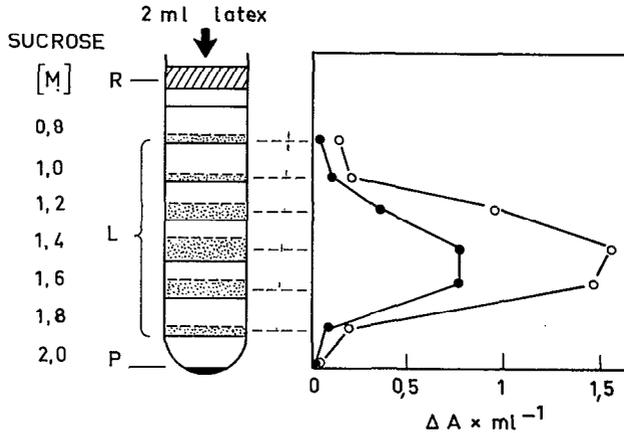


Figure 1

Centrifugation de latex en gradient discontinu de saccharose
 Activité NADH cytochrome C reductase ●—●
 Activité phosphatasique acide ○—○

La figure 1 montre le schéma d'une centrifugation de latex issu de PB 86. Des lutoïdes se sont accumulés à chaque frontière séparant les couches de densité différente. Un culot particulaire se retrouve même dans la zone inférieure contenant 2 M de saccharose ($d : 1,25$).

La répartition quantitative des lutoïdes dans les zones de densité différente est très variable, selon l'origine ou l'état du latex étudié.

Par ailleurs, si un échantillon de latex est conservé 24 heures à 4°C, avant d'être centrifugé sur un gradient (discontinu ou non) de saccharose, aucune pénétration particulaire et plus particulièrement lutoïdique n'est possible dans les couches de densité supérieure à 1,03 (0,3 M de saccharose). Il y a eu diminution de la densité apparente des lutoïdes qui, toutefois, peuvent encore très bien être recueillis par centrifugation différentielle à 20.000 xg durant quelques minutes.

Il est probable que ces phénomènes ont des causes diverses et certainement complexes. D'une part, le latex récolté provient de laticifères appartenant à des manneaux d'âge très différent ; par conséquent, ils possèdent des organites dont l'état physiologique est éloigné et dont les caractéristiques peuvent être très dissemblables. D'autre part, la saignée provoque un stress qui n'est pas sans avoir des répercussions sur les particules subcellulaires et notamment les lutoïdes. L'évolution rapide pendant le stockage du latex, de la densité apparente de ces organites, en est une preuve.

La diminution des charges électro-négatives membranaires des particules extrêmement nombreuses du latex, à la suite de phénomènes dont quelques uns ont été évoqués par Southorn, doit faciliter l'agglomération particulaire. Ainsi, l'agrégation de lutoïdes entre eux peut expliquer le culot très dense observé dans des zones de densité supérieure à 1,25. Au contraire, l'adsorption de particules de caoutchouc sur les lutoïdes pourrait expliquer leur diminution apparente de densité et l'hétérogénéité

constatée après centrifugation sur gradient de densité. La dégradation des propriétés des surfaces membranaires et, par suite, de leur charge électro négative, s'accroît vraisemblablement lors du stockage du latex ; l'agrégation particulaire, caoutchouc-lutoïde, doit donc s'accroître rendant impossible assez rapidement toute migration dans un gradient de densité.

Influence de la stimulation

D'après les remarques précédentes, il semble donc que plus les structures membranaires se seront dégradées ou auront évolué, plus les phénomènes d'agrégation avec les particules de caoutchouc seront fréquents et, par conséquent, plus la densité apparente des lutoïdes sera hétérogène et faible.

La stimulation ayant un effet positif sur la stabilité du latex, il est logique de penser qu'elle intervient sur la stabilité des lutoïdes eux-mêmes, et, de ce fait, sur l'état de leur structure membranaire. Compte tenu des résultats déjà cités, ce phénomène doit se traduire par une variation de leur densité apparente, pouvant être mise en évidence sur gradient de densité.

Ribaillier a réalisé des expériences qui confirment parfaitement cette hypothèse. Il a noté en premier lieu après stimulation de l'hévéa :

- une diminution de l'indice d'éclatement des lutoïdes du latex ;
- une augmentation de la quantité de sédiment recueilli après centrifugation différentielle ;
- une modification de l'aspect de ce sédiment devenu plus visqueux.

Ces trois constatations sont en faveur d'une évolution de l'état des membranes lutoïdiques.

Les centrifugations sur gradient de densité (figure 2) montrent que :

- avant stimulation la densité apparente des particules est très hétérogène et que la majorité de celles-ci sont légères puisqu'elles pénètrent à peine dans le gradient.
- la stimulation provoque très rapidement une variation extrêmement nette de la répartition particulaire sur le gradient. La population lutoïdique est **beaucoup plus homogène**, sa densité apparente moyenne s'accroît. La stabilité de ces phytolysosomes est donc augmentée.
- en fonction du temps, le phénomène précédent s'estompe ; l'hétérogénéité de densité des particules réapparaît ainsi que la diminution moyenne de cette densité.

La stimulation a donc bien un effet sur la structure membranaire des lutoïdes ; il est difficile d'en préciser la nature exacte, mais il ne fait aucun doute qu'il favorise la stabilité de ces particules.

Il faut souligner que cet effet est **transitoire** à l'image de la surproduction obtenue après stimulation, et que ces deux phénomènes sont sans aucun doute en étroite corrélation.

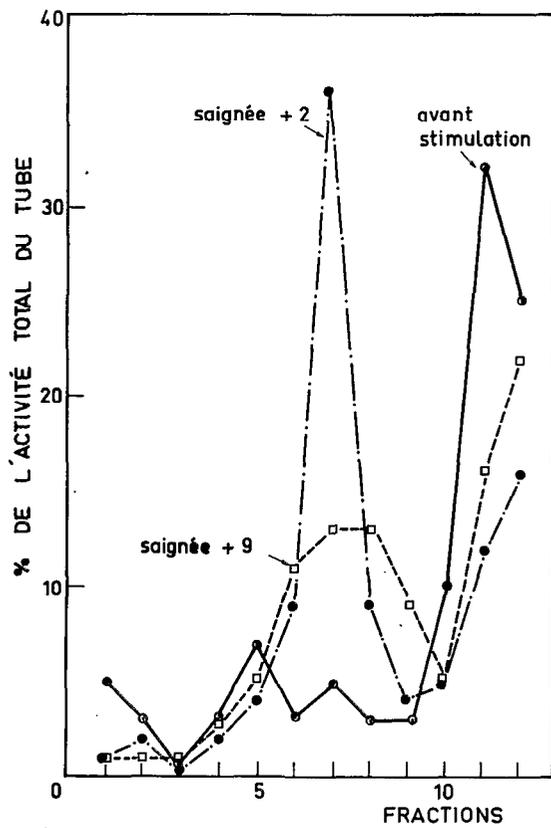


Figure 2

Action de la stimulation sur la répartition des lutoïdes le long d'un gradient de saccharose

N.B. - La fraction 1 correspond au fond du tube de centrifugation.

★

1 - 2 - 5
**Phospholipides et acides gras de la membrane des lutoïdes du latex
 d'*Hevea brasiliensis***

J. Dupont

Laboratoire de Biologie végétale IV, Université Pierre et Marie Curie

Lutoid membrane

Lutoids were separated by centrifuging on a discontinuous saccharose gradient. The phospholipids in their membranes were analysed. They consist essentially of phosphatidic acid, about 80%, and of two other unidentified phospholipids. No traces could be found in this planting material of phosphatidyl ethanolamine or phosphatidyl choline, which, however, are present in the membranes surrounding the particles of rubber in the same samples of latex.

The nature of the fatty acids which esterify the phosphatide acid was investigated. The absence of linolenic acid was noted (C 18:3).

★

L'étude de la nature des complexes lipoprotéiques des membranes cellulaires constitue un préalable nécessaire à la connaissance de leur rôle dans la cellule. Cette remarque s'applique parfaitement bien au cas des lutoïdes, particules monomembranaires du latex, comparables aux lysosomes, dont le rôle dans la cellule laticifère et, plus particulièrement, dans la synthèse isoprénique, est encore loin d'être élucidé (1).

Nous avons utilisé pour cette étude le latex d'*Hevea* provenant du clone PR 107. Les lutoïdes ont été séparés du latex par centrifugation en gradient de densité de saccharose. Celui-ci est constitué de trois couches de saccharose de densité 1,10, 1,15 et 1,23. Après centrifugation à 35.000 g durant 180 minutes, deux fractions de lutoïdes sont obtenues aux interfaces 1,10/1,15 et 1,15/1,23. La fraction arrêtée par la couche de saccharose de densité 1,23, plus riche en lutoïdes que la fraction arrêtée par la couche de saccharose de densité 1,15, est prélevée et analysée. Les membranes des lutoïdes sont obtenues en soumettant ceux-ci à un choc osmotique. Les phospholipides sont extraits des membranes après fixation du matériel par l'éthanol bouillant.

Les membranes des lutoïdes présentent des teneurs en phospholipides comparables à celles rencontrées dans d'autres membranes sub-cellulaires du règne végétal (370 µg/mg protéines) (2). Néanmoins, la teneur en phospholipides des lutoïdes

(1) S. PUJARNISCLE - *Mémoire ORSTOM*, 48, (1971).

(2) F. MOREAU, J. DUPONT et C. LANCE - *Biochim. Biophys. Acta*, 345, 294-304, (1974).

arrêtés par le saccharose de densité 1,15 est plus faible que celle mesurée au niveau des lutoïdes arrêtés par la couche de saccharose de densité 1,23. Ces différentes teneurs illustrent sur le plan biochimique l'hétérogénéité des lutoïdes, hétérogénéité peut-être due à différents stades d'évolution de ces particules. Une telle observation a par ailleurs récemment été rapportée par Hallé (3) lors de ses études cytologiques.

Quantitativement, la membrane lutoïdique se révèle très riche en acide phosphatidique (80% de la masse totale des phospholipides). Les 20% restant sont représentés par deux phospholipides qui n'ont pu être identifiés par suite de leurs trop faibles teneurs (figure 1). En outre, la membrane lutoïdique est totalement dépourvue de phosphatidyl choline et de phosphatidyl éthanolamine, phospholipides azotés généralement bien représentés dans le règne végétal.

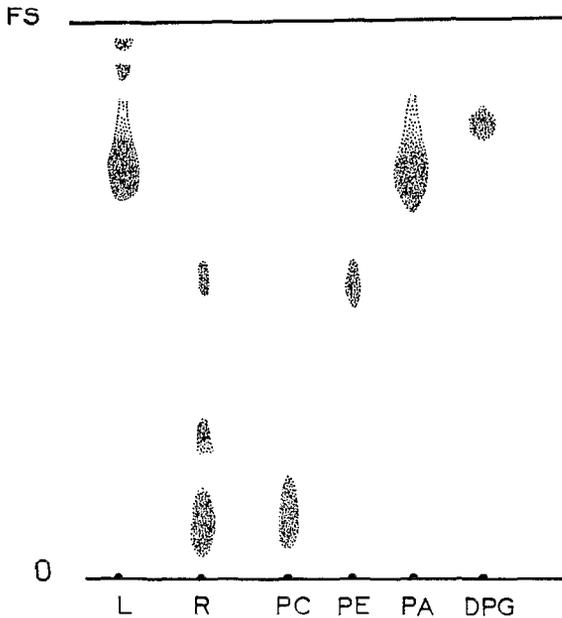


Figure 1

Chromatographie sur couche mince de gel de silice (Silica gel 60, Merck)
des phospholipides extraits des membranes de lutoïdes et de particules de caoutchouc du latex
d'*Hevea brasiliensis*

Solvant : chloroforme-méthanol-eau (65:25:4 ; v/v/v)

O: origine ; FS : front du solvant ; L : lutoïdes ; R : membranes des particules de caoutchouc ;

PC : témoin de phosphatidyl choline ; PE : témoin de phosphatidyl éthanolamine ;

PA : témoin d'acide phosphatidique ; DPG : témoin de diphosphatidyl glycérol

La présence d'acide phosphatidique en quantités importantes est souvent l'indice de l'action d'une phospholipase de type D qui hydrolyse les phospholipides membranaires. Pour lever cet obstacle, la plus grande rapidité et le plus grand

(3) F. HALLÉ - Communication personnelle, (1975).

soin ont été apportés à la collection du latex, à l'isolement des lutoïdes, à la fixation des membranes et à l'extraction des phospholipides. Toutes ces opérations ont été réalisées en Afrique, sur les lieux de collection du latex, à l'exception des dosages de lipides.

L'éventualité d'un tel artefact semble être écartée à l'examen de la figure 1 où nous avons comparativement chromatographié les phospholipides extraits de la membrane périphérique des particules de caoutchouc préparées dans les mêmes conditions que les lutoïdes. L'examen de cette figure montre que la phosphatidyl choline et la phosphatidyl éthanolamine sont bien représentées dans ces membranes, alors que l'acide phosphatidique en est absent. Il paraît donc possible d'affirmer que l'acide phosphatidique présent dans la membrane du lutoïde ne peut provenir de la dégradation éventuelle de ces phospholipides azotés par la phospholipase D, car les deux types de particules baignent dans le même sérum cytoplasmique du latex.

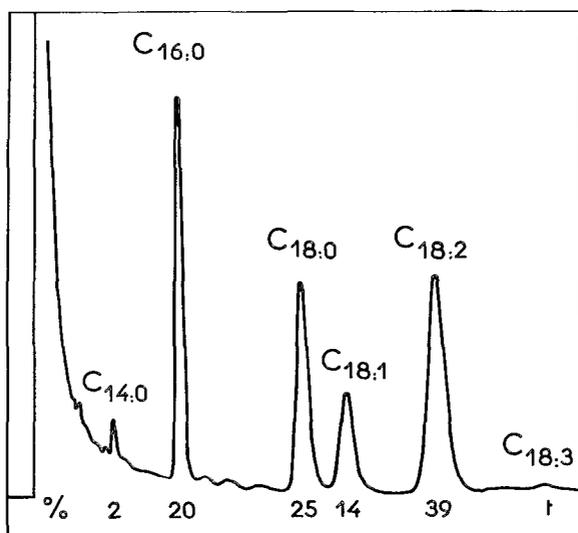


Figure 2

Chromatographie en phase gazeuse

des acides gras de l'acide phosphatidique extrait des membranes de lutoïdes.

Les % de chaque acide gras sont exprimés par rapport aux acides gras totaux. t : traces (< 1%). Les esters méthyliques des acides gras sont obtenus par méthanolyse dans le mélange acide sulfurique-méthanol (2,5:100 ; v/v) durant 90 minutes à 83°C. Les esters méthyliques sont ensuite extraits par l'éther de pétrole et analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Varian Aerograph (série 1700) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les caractéristiques de la colonne sont les suivantes : 1,50 m de longueur et 3 mm de diamètre. Le support de la colonne est du Varaport 30 imprégné de 15% de diéthylène glycolsuccinate. La température de la colonne est de 180°C. La vitesse du gaz vecteur (azote) est de 12 ml/mn. Les temps de rétention des différents acides gras sont comparés à ceux obtenus à partir de témoins purs provenant du commerce (Sigma).

La nature des acides gras estérifiant l'acide phosphatidique présent dans la membrane lutoïdique a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (figure 2). On peut noter que les acides gras saturés (palmitique $C_{16:0}$ et stéarique $C_{18:0}$) et insaturés (oléique $C_{18:1}$ et linoléique $C_{18:2}$) sont présents en proportions analogues. On note l'absence d'acide linoléique ($C_{18:3}$).

Il est possible de replacer les résultats obtenus en fonction du contexte physiologique dans lequel se trouvent les lutoïdes. La richesse des membranes lutoïdiques en acide phosphatidique permet, en effet, de rendre compte d'un certain nombre de propriétés connues.

D'une part, la grande teneur en acide phosphatidique confère aux membranes lutoïdiques une charge électro-négative très élevée qui permet ainsi aux lutoïdes de rester en suspension dans le latex à l'intérieur des vaisseaux laticifères. La neutralisation partielle de cette charge est peut-être à l'origine du processus de coagulation du latex.

D'autre part, l'accumulation de certains cations dans le sérum lutoïdique peut être facilitée par la présence de ce phospholipide acide, comme cela a été suggéré par ailleurs (4).

Enfin, la teneur relativement élevée en acides gras saturés (palmitique et stéarique) de la membrane lutoïdique semble comparable à celle des membranes externes de mitochondries végétales ou des enveloppes de chloroplastes (5). Ce fait peut expliquer la relative rigidité de la membrane des lutoïdes observée par Gomez et Southorn (6) lors de leurs observations en microscopie électronique. D'autre part, la grande fragilité des lutoïdes lorsqu'ils sont placés en milieu hypotonique trouve peut-être aussi son explication dans un manque de fluidité de la membrane, dû à une trop grande richesse en acides gras saturés.

★

-
- (4) L. SHLATZ et G.V. MARINETTI - *Biochim. Biophys. Acta*, 290, 70-83, (1972).
 (5) R. DOUCE, R.B. HOLTZ et A.A. BENSON - *J. Biol. Chem.*, 248, 7215-7222, (1973).
 (6) J.B. GOMEZ et W.A. SOUTHORN - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, 513-523, (1969).

1 - 2 - 6
Les phospholipases du latex
 J.-L. Jacob

The phospholipases in latex

Only one type of phospholipase activity has been shown to exist in the latex of Hevea brasiliensis. It is of type D (E.C. 3.1.4.4) and is concentrated mainly in the cytoplasmic serum.

★

L'activité phospholipasique a comme résultat de dégrader les lipides ou les phospholipides. Elle peut donc jouer un rôle considérable dans l'évolution structurale des membranes limitant les organites subcellulaires. Dans le cas du latex, cette influence éventuelle est d'autant plus intéressante que l'intégrité membranaire de toutes les particules (lutoïdes, caoutchouc, Frey-Wyssling ..) est essentielle à la stabilité colloïdale de l'ensemble. En effet, une modification de la structure de ces membranes entraînant notamment des diminutions de charges électro-négatives peut aboutir très rapidement au phénomène de coagulation.

Il existe trois sortes de phospholipases : les phospholipases A qui scindent la lécithine en lysolécithine et en acides gras, les phospholipases C qui transforment cette lécithine en I-2 diglycérides et en phosphate de choline : les phospholipases D qui, toujours à partir de lécithine, libèrent de l'acide phosphatidique et de la choline.

Il était intéressant de préciser quelle sorte de phospholipase est effectivement présente dans le latex et d'en déterminer la localisation. Pour cela, il a été possible de bénéficier d'une méthode de dosage très évoluée utilisant la lécithine marquée au 32P, mise au point par Mlle Clermont et M. de Virville (Université Pierre et Marie Curie, Paris VI).

Des résultats obtenus (cf. tableau), un certain nombre de conclusions ont pu être tirées :

- aucune trace d'activité phospholipase A n'a pu être mise en évidence quel que soit le compartiment étudié ;
- contrairement à certaines hypothèses, il n'a pas été possible de mettre en évidence de façon certaine une activité phospholipase C, ni dans les lutoïdes, ni dans le sérum cytoplasmique ;
- il existe, par contre une activité phospholipase D assez forte (ce qui confirme certains travaux antérieurs*). Cette enzyme est essentiellement localisée dans le sérum

* PUJARNISCLE - *Mémoire O.R.S.T.O.M.*, 48, (1971).

cytoplasmique. Les faibles quantités trouvées dans le sérum lutoïdique correspondent peut-être à une contamination par le sérum cytoplasmique. Le fonctionnement de cette hydrolase est certainement responsable des phénomènes de transphosphatidylolation observés lors des expériences d'incubation de lécithine marquée avec des sérums de latex.

Sérum	Lécithine utilisée en 10 minutes %	Ac. phosphatidique apparu en % de la lécithine utilisée	Bilan de l'expérience (récupération en c.p.m.% de la radio-activité introduite)	Rapport des activités phospholipasiqes
C	74	85	90	C/L 8,70
L	8,5	85	96	L/C 0,11

Activité phospholipase dans le latex d'*Hevea brasiliensis*

Tampon Tris maléate pH 6,1. Lécithine* 3mM dodecylsulfate de Na. Cl_2Ca 50 mM \neq 0,6 mg de protéine/mL \ominus ambiante.

N.B. - Sérum C : sérum cytoplasmique

Sérum L : sérum de la fraction sédimentable.

★

1 - 3
Saignée, microsaignée et productivité
L. Primot

Le système de saignée en spirale entière (S J-3 J-4) est bien adapté à la production des principaux clones dans la péninsule indochinoise. Un tel système a cependant donné des déboires en Côte d'Ivoire où, eu égard aux conditions climatiques locales, il a conduit à un pourcentage parfois élevé d'arbres secs plus ou moins lié à une décroissance marquée de la teneur en saccharose du latex.

La définition de nouveaux systèmes d'exploitation de l'hévéa est donc actuellement un problème fondamental.

Il paraît nécessaire de rassembler les données récentes établissant des relations entre longueur d'encoche, fréquence de saignée, croissance de l'arbre, teneur en saccharose du latex et productivité de l'hévéa.

1 - 3 - 1
Longueur de saignée, teneur en saccharose et productivité
L. Primot

The system of tapping, latex saccharose and productivity

Relationships exist between the saccharose content of the latex, the system of tapping employed and the productivity of the hevea.

Several types of variation have been found to exist in the concentration of sugar present in latex. They are :

1 - Annual variations ; there being a minimum in July, August and September corresponding to the period of least sunshine ; whereas a maximum is observed in the period end of February beginning of March which coincides with a sharp drop off in production.

2 - Variations associated with the system of tapping : long cuts and high rates have a depressive effect.

3 - Variations associated with stimulation which nearly always tend to reduce the saccharose content of the latex. It appears that trees with sugar-rich latex have a better chance of responding well to stimulation. If, however, stimulation is too vigorous or unsuitable for the planting material used, it may serve no purpose or may even harm production.

A study of the effect of the length of the cut has shown that the half spiral system of tapping as opposed to the complete spiral system using the same frequency, i.e. J/3-J/4 enabled and appreciable improvement in production to be rapidly achieved.

Similarly, using and identical length of full spiral cut, a drop in frequency from J/3-J/4 to J/7, when it is accompanied by twice yearly stimulation, results in a marked increase in production per tapping and per tree, and also in the dry solids content of the latex. Cumulative production remains virtually the same in both these cases.

The importance of feeding the laticiferous zones is distinctly apparent. Because of the increased damage to the phloem, the use of long cuts results in an increase in the regeneration period of the latex in the drained areas of the hevea.

Stimulation always accelerates glucide catabolism but not always to the advantage of isoprene synthesis.

Investigation of the factors discussed should give some help in deciding which systems of tapping are the most attuned to the production potential of the trees.

★

Après trois années d'étude, il devient possible de bien cerner les relations existant entre teneur en saccharose, longueur d'encoche et productivité.

Le dosage du saccharose contenu dans les laticifères permet une meilleure connaissance des réactions de l'arbre à la saignée et apporte une donnée supplémentaire quant au choix de méthodes d'exploitation permettant de tirer le meilleur parti des potentialités de l'hévéa.

Nous allons passer en revue les points importants se dégageant de cette étude.

1 - Variations annuelles de la teneur en saccharose

Cette étude a été entreprise sur trois clones : PR 107, PB 86 et GT 1, tous trois plantés en 1962. Les prélèvements de latex ont été effectués régulièrement tout au long de l'année. La figure 1 montre l'évolution annuelle de la teneur en saccharose sur les clones PR 107 et GT 1.

L'étude de ces deux courbes montre :

- 1 - un minimum en juillet, août et septembre ;
- 2 - un maximum très prononcé au début de la période de refoliation fin février, début mars. Si l'on suit pendant cette période de défoliation et refoliation l'évolution de la production (figure 2), on peut noter la chute spectaculaire de production au moment de la refoliation.

Ces résultats ont aussi été obtenus avec les autres clones tels que PR 107 et PB 86. L'apparition du maximum de saccharose se place toujours en tout début de la période de refoliation.

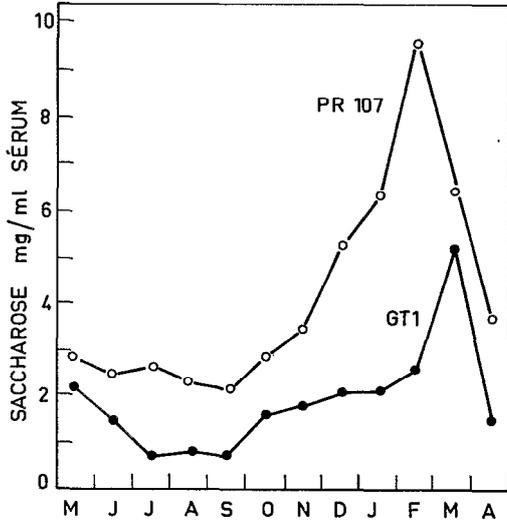


Figure 1
Variation annuelle de la teneur en saccharose du latex dans des cultures de PR 107 et GT 1. Plantation 1962 - Saignées en S J/3 J/4.

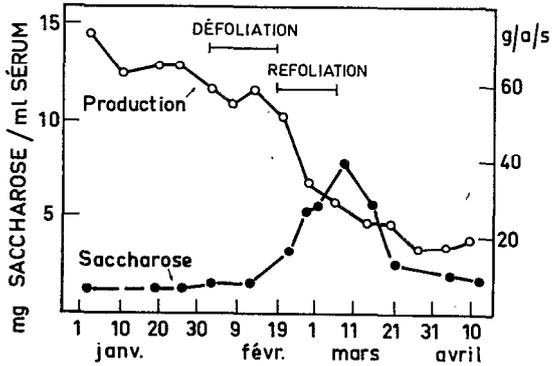


Figure 2
Variation de la teneur en saccharose du latex et de la production pendant l'hivernage sur une culture de GT 1 de 1962 - Saignée en S J/3 J/4.

Sur un plan pratique, il faut donc éviter les prélèvements de latex pour le dosage de saccharose pendant cette période où les teneurs sont directement sous l'influence de facteurs endogènes et ne reflètent pas les effets de l'exploitation.

2 - Variations clonales de la teneur en saccharose

La figure 1 montre que pour des clones de même âge les teneurs en saccharose du latex sont différentes dans un même système de saignée (S J/3 J/4). Ces différences sont spécifiquement clonales et ont été observées dans de très nombreux prélèvements effectués aussi bien à l'I.R.C.A. qu'à la S.A.P.H. Parmi les clones principaux (GT 1 - PR 107 - PB 86), on note toujours le classement suivant: PR 107, PB 86, GT 1, ceci dans des conditions écologiques et des systèmes d'exploitation strictement comparables et à un moment donné. Ces différences clonales sont importantes à connaître pour éviter des erreurs d'interprétation en comparant les réactions clonales à différents systèmes d'exploitation.

3 - Variations de la teneur en saccharose en fonction des systèmes de saignée

C'est dans cette partie que l'on a pu obtenir des renseignements intéressants à partir des dosages de saccharose dans le latex. On sait en effet que le saccharose est la matière première indispensable dans la biosynthèse du polyisoprène. On sait aussi que l'exploitation de l'hévéa par enlèvement de l'écorce provoque un traumatisme important qui se fait sentir principalement au niveau de la zone productrice de latex. Ce phénomène est provoqué :

- 1 - par l'enlèvement de l'écorce, donc d'une partie du système conducteur (phloème) ;
- 2 - par l'écoulement du latex qui doit, par la suite, être régénéré.

L'enlèvement de l'écorce conduit à une certaine gêne dans la migration des assimilats nécessaires à la régénération ultérieure du latex. D'autre part, la région productrice de latex se trouve essentiellement sous l'encoche (aire drainée).

C'est dans cette région de l'écorce que la demande en matière première est la plus importante. Il est donc intéressant de suivre les variations de la teneur en saccharose en fonction des systèmes de saignée.

a - influence de la stimulation

L'apparition des produits générateurs d'éthylène et en particulier de l'acide chloro-2-éthyl-phosphonique a rendu possible la stimulation sur jeunes arbres sans danger de prolifération cellulaire anarchique.

La stimulation provoque dans un premier temps une augmentation importante et passagère de la teneur en saccharose du latex, ceci vraisemblablement du fait d'une perméabilité cellulaire accrue.

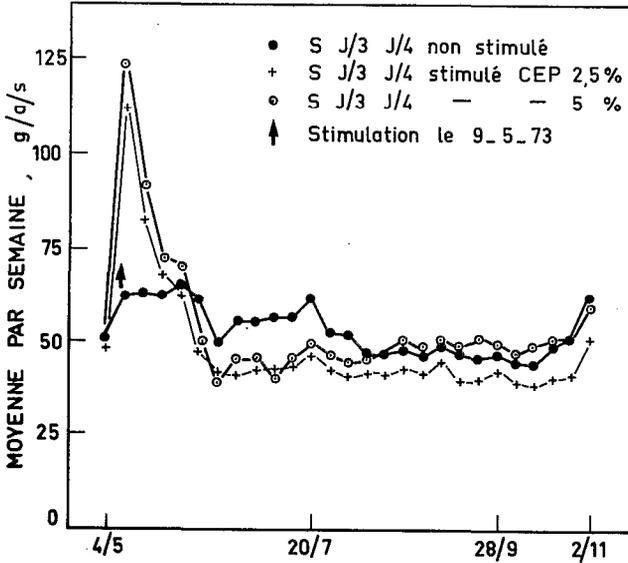


Figure 3

Évolution de la production sur une culture de PR 107.
Plantation 1962 exploitée en S J/3 J/4 avec ou sans stimulation

Tableau 1

Effets de la stimulation à l'Ethrel sur la teneur en saccharose et la production sur une culture de PR 107 - Plantation 1962

Traitements	Saccharose mg/ml				Productivité 8.5 - 9.11: g/arbre
	4.5.73	29.6.73	24.8.73	9.11.73	
S J/3 J/4 non stimulé	1,31	1,42	1,61	2,88	2818
S J/3 J/4 stimulations CEP 2,5 %	1,37	0,80	0,88	1,90	2711
S J/3 J/4 stimulations CEP 5 %	1,27	0,50	0,60	0,95	2782

Stimulation le 5.5.73 sur une bande grattée de 2 cm sous encoche

La stimulation favorise aussi l'utilisation de ces sucres dans les vaisseaux laticifères, qui se traduit par une production accrue mais surtout, à long terme, par une diminution sensible de la teneur en sucre du latex. Ceci est important, car une bonne réponse à une première stimulation ne signifie nullement que, par la suite, les autres stimulations auront d'aussi bons effets.

Nous avons étudié sur des PR 107 l'effet de la stimulation sur la production et la teneur en saccharose (tableau 1).

On voit nettement l'effet dépressif de la stimulation sur la teneur en saccharose. Dans cette expérience en outre, la stimulation n'a pas eu d'effets significatifs sur la production. On peut en effet noter (figure 3) que si les motifs stimulés ont répondu à la stimulation, la production devient ensuite inférieure à celle du témoin non stimulé.

On trouve des résultats semblables dans les essais IRCA-SAPH (tableaux 2 et 3), où les spirales entières stimulées présentent une teneur en saccharose inférieure à la S non stimulée sans pour autant que l'on obtienne une surproduction.

Ces résultats indiquent que la stimulation doit être appliquée dans le cas de la spirale entière avec beaucoup de ménagement. L'effet bénéfique de la stimulation (surproduction) ne se fera sentir que si les disponibilités de l'arbre sont suffisantes. En effet, la stimulation provoque une consommation importante de sucre et, comme nous le verrons par la suite, l'exploitation en spirale entière est dans la majorité des cas mal adaptée, car elle limite l'alimentation de la zone d'écorce productrice du latex.

Dans certains cas cependant, l'exploitation en spirale entière peut s'accommoder de la stimulation sans baisse préjudiciable de la teneur en saccharose dans le latex.

C'est en particulier le cas du clone PR 107 qui peut supporter la stimulation dans la mesure où l'on réduit la fréquence de saignée. Dans ce cas, d'ailleurs, la stimulation permet, non pas d'obtenir une surproduction, mais simplement d'atteindre la production du témoin J/3 J/4 non stimulé (tableau 6).

Les relations entre la quantité de produit stimulant appliquée à l'arbre et la production ont aussi été abordées. On a déjà vu (tableau 1) que la teneur en saccharose du latex baisse d'autant plus que la quantité de produit appliquée est importante et ceci sans gain de production.

Une autre expérience effectuée par le Service Agronomique sur des GT 1 montre très nettement (figure 4) les effets négatifs des stimulations à trop fortes doses. On rejoint ici ce qui a été dit plus haut concernant la stimulation sur la spirale entière. En conclusion, on peut donc dire que l'application de la stimulation dans les cas favorables fait baisser la teneur en saccharose du latex et augmente la production, dans les cas défavorables elle fait baisser la teneur en saccharose sans gain de production. Ce déficit en saccharose se répercute sur la vitalité de laticifères donc sur la production future.

Tableau 2

Résultats d'une exploitation en S, S stimulée et S/2 stimulée sur une culture de PR 107 de 1960

Expérience mise en place en mai 1972

Stimulations : S stimulée 2 fois par an au CEP 1 % ; S/2 stimulée 3 fois par an au CEP 2,5 %.

Traitements	Saccharose et extrait sec le :						Production g/a/s	
	2.7.73		15.2.74		3.7.74		72/73	73/74
S J/3 J/4 Témoin non stimulé	1,57	36,6	3,25	39,6	2,56	33,9	60,9	56,0
S J/3 J/4 stimulé 2 fois/an CEP 1 %	1,05	33,3	2,30	37,6	1,57	30,2	61,1	56,5
S/2 J/3 J/4 stimulé 4 fois/an CEP 2,5 %	2,00	40,5	3,28	40,1	2,58	37,6	54,6	61,4

Tableau 3

Clone PB 86 - Expérience identique à celle figurant dans le tableau 2.

Traitements	Saccharose et extrait sec le :						Production g/a/s campagne	
	2.7.73		15.2.74		4.7.74		72/73	73/74
S J/3 J/4 Témoin non stimulé	1,55	34,8	2,38	29,7	2,31	30,9	50,9	43,9
S J/3 J/4 stimulé 2 fois/an CEP 1 %	1,37	33,8	2,07	29,1	0,96	28,0	48,5	42,5
S/2 J/3 J/4 stimulé 4 fois/an CEP 2,5 %	2,03	40,9	4,17	40,9	2,10	28,9	45,4	48,6

b - influence de la longueur de l'encoche

Nous avons vu plus haut les dangers que comportait l'application de la stimulation sur des systèmes de saignée intensifs et mal adaptés (S J/3 J/4).

Le problème est différent lorsque l'on applique des systèmes de saignée à encoches plus courtes. Dans ce cas, en effet, on préserve intacte une partie de l'écorce, ce qui, sur le plan physiologique, est beaucoup moins drastique.

Les résultats obtenus concernent en réalité les variations de la teneur en saccharose en fonction de la longueur d'encoche et de la stimulation. En effet, le passage de la spirale entière à une encoche plus courte s'accompagne d'un déficit de production qui doit être rattrapé par la stimulation.

De nombreuses observations ont été effectuées dans ce domaine, aussi bien à l'IRCA que sur les plantations de la SAPH à Toupah. L'examen des tableaux 4 et 5 montre nettement l'effet favorable du passage de la spirale entière à la demi-spirale sur la teneur en saccharose du latex, qui se maintient toujours à un niveau supérieur à la spirale entière non stimulée. On voit aussi que la production, inférieure au témoin la première année, a dépassé la deuxième année celle de la spirale entière. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'avant la mise en place de l'expérience tous les arbres étaient exploités en S alors que par la suite les arbres exploités en S/2 ayant une teneur en saccharose plus élevée ont mieux répondu à la stimulation.

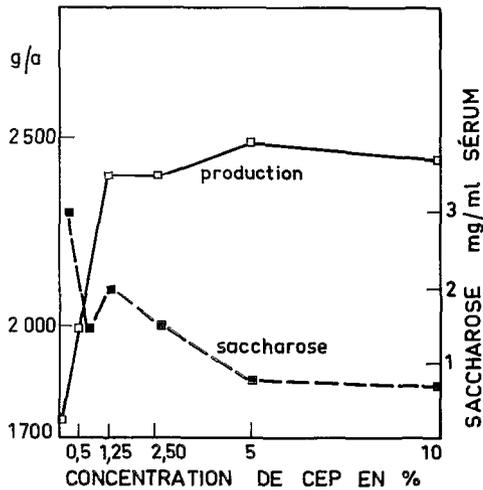


Figure 4

Effet de la stimulation à différentes concentrations d'ethrel sur la production et la teneur en saccharose du latex

Dans cet exemple, on observe des réactions identiques des clones PR 107 et PB 86 aux différents traitements.

Une autre expérience, menée à l'IRCA par le Service Agronomique sur GT 1, donne des résultats intéressants aussi bien en ce qui concerne la production que la croissance et la teneur en saccharose (tableau 4).

Tableau 4

Résultats comparés d'une exploitation en S J/3 J/4 et S/2 J/3 J/4 stimulé sur GT 1 en troisième année de saignée.
Stimulation du traitement S/2 J/3 J/4 4 fois par an au CEP 2,5 % sur une bande grattée de 3 cm sous encoche

Traitements	Production 73/74	Saccharose mg/ml le 27.5.75	Extrait sec % le 27.5.74
S J/3 J/4	3740	0,93	29,8
S/2 J/3 J/4	4670	1,89	33,3

On peut constater dans cet exemple :

- 1 - que le passage à la demi-spirale augmente considérablement la teneur en saccharose du latex, ceci malgré les quatre stimulations ;
- 2 - que le gain de production est important (+ 25 %).

Après trois années d'exploitation sur ces GT 1, on peut dresser un bilan, tant sur le plan de la production que de la croissance (tableau 5).

Tableau 5

Bilan de l'expérience figurant au tableau 4 sur trois années d'exploitation

Traitements	Production g/a			Saccharose mg/ml			Croissance 71 - 74
	1ère année	2ème année	3ème année	3.7.72	4.6.73	27.5.74	
S J/3 J/4	3069	3427	3740	0,66	0,93	0,93	6,6
S/2 J/3 J/4	2549	3942	4670	1,74	1,69	1,89	9,7

On constate, pour la production, un démarrage plus lent de la demi-spirale très vite compensé par des gains importants de production en deuxième et troisième années. On voit aussi que la teneur en saccharose reste toujours à un niveau très supérieur à celui de la spirale entière. Enfin, l'effet sur l'accroissement de circonférence du tronc est aussi très important.

Ces résultats montrent que le clone GT 1 est sensible à une exploitation en spirale entière.

c - influence de la fréquence de saignée

En règle générale, tous les clones principaux réagissent de manière favorable à une diminution de la fréquence de saignée, tout au moins en ce qui concerne la teneur en saccharose du latex. Cependant, tout comme dans le cas d'une réduction de la longueur d'encoche, la réduction de fréquence doit être accompagnée de la stimulation pour éviter un déficit de production.

Le tableau 6 donne des résultats obtenus sur le clone PR 107 saigné en S J/7 avec deux stimulations dans l'année.

Tableau 6

Résultats comparés d'une exploitation en S J/3 J/4 et S J/7 sur des PR 107 plantation 1962
Période du 7.5.73 au 24.5.74. Stimulations le 5.5.73 et le 9.11.73

Traitements	Nombre de saign.	g/a/s	g/a	Saccharose et extrait sec le			
				9.11.73		8.3.74	
S J/3 J/4 Témoin	106	48 (100)	5088 (100)	2,28	33,1	2,40	30,0
S J/7 2 stimul. CEP 2,5 %	53	94 (196)	4982 (98)	2,32	39,2	3,47	40,1

On peut noter la production importante obtenue à chaque saignée en J/7. Ceci est dû à une bonne réponse à chacune des deux stimulations effectuées en mai et novembre 1973. On voit aussi que la teneur en saccharose se maintient au même niveau que celle du témoin et ceci malgré les deux stimulations. Dans ce cas, on n'observe pas l'effet dépressif de la stimulation sur la teneur en saccharose, comme c'est le cas lorsqu'elle est appliquée sur la fréquence J/3 J/4 (tableau 1).

Enfin, on peut noter les valeurs élevées de l'extrait sec en fréquence J/7, ceci étant le signe d'une bonne activité biosynthétique.

De plus, sur la période novembre 1972-mai 1974, nous avons dénombré 14 % d'arbres secs dans l'exploitation en S J/3 J/4 et aucun arbre sec en S J/7.

Sur un plan économique, la saignée en S J/7 permet en outre une économie appréciable de main d'œuvre.

4 - Relations entre teneur en saccharose et extrait sec

Il est intéressant de noter que si la teneur en saccharose reflète les disponibilités de l'arbre, l'extrait sec du latex indique, quant à lui, les capacités des laticifères à

à régénérer le caoutchouc. C'est donc une indication sur l'activité biosynthétique au sein des laticifères. On peut noter qu'en règle générale, lorsque la teneur en saccharose est élevée, l'extrait sec est également élevé. Cependant, ceci n'est valable qu'en valeur relative, c'est-à-dire en comparant différents traitements d'une même expérience sur le même clone à un instant donné.

En effet, l'extrait sec du latex ne varie pas de la même manière que le saccharose durant l'année. De plus, les différences clonales concernant le saccharose ne se répercutent pas sur l'extrait sec du latex.

Conclusion -

Cette étude a permis de préciser de nombreux points concernant l'utilisation de la mesure de la teneur en saccharose dans la recherche de systèmes de saignée permettant de tirer un maximum physiologique et économique des potentialités de l'hévéa.

Tout d'abord, l'étude des variations annuelles de la teneur en saccharose montre qu'on a intérêt à effectuer le dosage en fin d'année (décembre), période où les différences sont les plus marquées entre les traitements.

La période mai-juin est également intéressante pour l'analyse du saccharose.

Il faut éviter les dosages pendant la période de défoliation, refoliation, ainsi que le montre la figure 2.

De même, il est préférable d'attendre au moins deux mois après une stimulation avant d'effectuer un dosage de sucre, la stimulation provoquant une chute de saccharose importante.

Lors de la période de repos, la teneur en saccharose décroît par suite d'une activité ralentie des laticifères. A la fin de la période de repos, les différences deviennent plus faibles entre traitements. Il est donc préférable de faire l'analyse de sucre, pendant une période d'exploitation normale.

Le dosage du saccharose contenu dans les laticifères apporte, comme nous l'avons vu, une donnée supplémentaire dans l'expérimentation de méthodes de saignée bien adaptées aux clones.

On voit en particulier très nettement dans les résultats l'effet négatif important de la spirale entière sur l'alimentation glucidique de la zone productrice de latex.

Cette observation est à la base de l'expérimentation d'une méthode de saignée entièrement nouvelle, la microsaignée, qui est pratiquée non plus par enlèvement de l'écorce mais simplement en piquant l'écorce, auparavant stimulée, à l'aide d'une aiguille. Dans ce type d'exploitation, beaucoup moins drastique, on peut noter des teneurs en saccharose dans le latex de cinq à dix fois supérieures à celles des spirales entières.

1 - 3 - 2
La microsaignée
 L. Primot

Microtapping

Stimulation, which improves the stability of latex and retards its coagulation, has made its collection possible by microtapping.

Microtapping has been carried out on the virgin bark above the panel undergoing regeneration.

The system using two opposite bands, tapped simultaneously, gives the best result, but it consumes much of the bark. It is, however, possible to reduce the width of the stimulated bands to 1 cm, their length to 60 or even 40 cm, and the number of punctures to not more than 3 or 4.

The sugar content of the latex thus obtained and its dry solids content are distinctly higher than those of latex collected by conventional tapping.

By studying variations in production, pH, sugar content and dry solids content of the latex respectively, it was found that stimulation every 5 weeks was reasonable and corresponded a certain rhythmic pattern of the tree.

The results obtained are encouraging, notwithstanding the existence of certain as yet unknown factors and especially the productivity of the regenerated bark after microtapping.

★

Partant du principe que le cerclage de l'arbre par l'encoche de saignée entraînait le sectionnement du phloème, Tupy fit l'hypothèse qu'il pouvait s'ensuivre une limitation de l'alimentation glucidique des laticifères.

Ceci le conduisit à expérimenter la saignée par piqures qui s'avéra fort intéressante particulièrement dans une période où les systèmes de saignée classique sont plus ou moins remis en question.

Nous venons de voir les effets de l'exploitation sur la teneur en saccharose du latex. La suite logique de cette étude nous a amené à expérimenter la microsaignée.

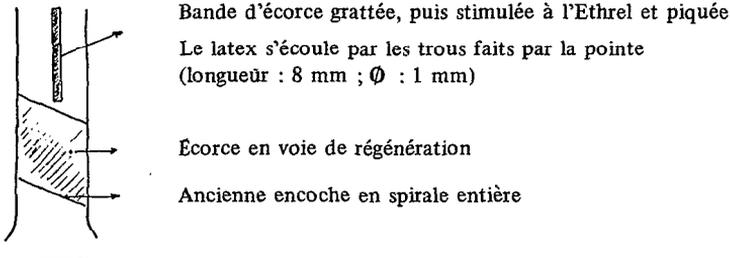
Le Service de Physiologie de l'I.R.C.A. travaille essentiellement sur le clone GT 1. Toutes les expériences décrites dans ce rapport ont été effectuées sur une culture de GT1 plantée en 1962 et exploitée auparavant en spirale entière.

La microsaignée ou saignée par piqûre avait déjà été employée au Cambodge, mais sans application de produits stimulants.

L'application d'Ethrel permet une production intéressante.

Dans un premier temps, nous avons testé de façon empirique la microsaignée sur une bande de 2 x 100 cm placée sur écorce vierge au-dessus de l'écorce en voie de régénération. Cette bande était saignée par 15 ou 10 piqûres.

Schéma de l'exploitation par microsaignée sur un arbre exploité auparavant en spirale entière



Au vu de la bonne production obtenue (figures 1 et 2), nous avons cherché à préciser quelques paramètres de ce type d'exploitation.

1 - Intensité d'exploitation

On peut noter en particulier qu'un système comportant deux bandes diamétralement opposées sur le tronc donne une excellente production. Cependant, la teneur en saccharose dans le traitement exploité sur deux bandes accuse une baisse sensible par rapport au traitement comportant une seule bande (figure 2).

Le passage à un système à trois bandes simultanées n'améliore par la production et fait baisser très fortement la teneur en saccharose du latex (tableau 1).

Tableau 1

Nombre de bandes	C/c sec g/a/s	$\frac{\text{mg sacch.}}{\text{ml sérum}}$	Extrait sec %
1	56	12,3	35,5
2	88	9,2	31,1
3	76	4,8	29,3

Les bandes stimulées sont saignées simultanément (10 piqûres par bande). Le latex a été analysé à la fin du dernier cycle de stimulation. Résultats sur 40 saignées - 10 arbres par traitement
Fréquence J/3 J/4.

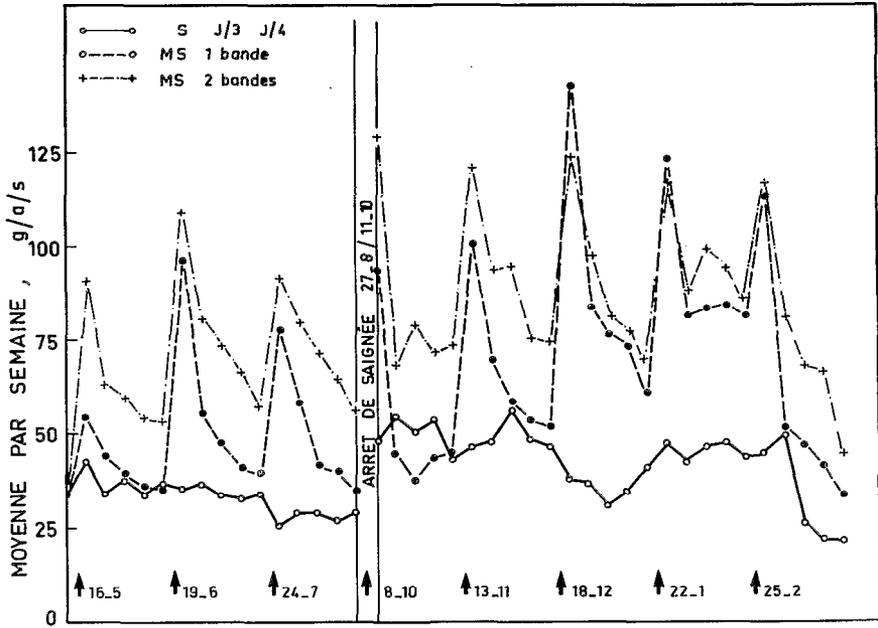


Figure 1

Evolution de la production dans une exploitation par microsaignées sur GT 1 (culture 1962)

Le système le plus intéressant sur le plan production est donc un système comportant deux bandes diamétralement opposées et saignées simultanément.

Un tel système coûte cependant très cher et consomme beaucoup d'écorce. On va donc se limiter à préciser les paramètres de l'exploitation sur une bande en essayant de réduire au maximum le coût d'exploitation sans préjudice pour la production.

2 - Largeur de bande

On peut noter une consommation importante d'écorce. En diminuant la largeur de bande de 2 cm à 1 cm on peut réduire de moitié cette consommation en conservant toujours la même production.

3 - Nombre de piqûres

A la suite d'une exploitation par microsaignée, l'aspect de l'écorce est peu engageant. En effet, quelques mois après l'exploitation l'écorce se dessèche superficiellement puis se desquame, laissant apparaître des crevasses plus ou moins profondes, la rendant très irrégulière.

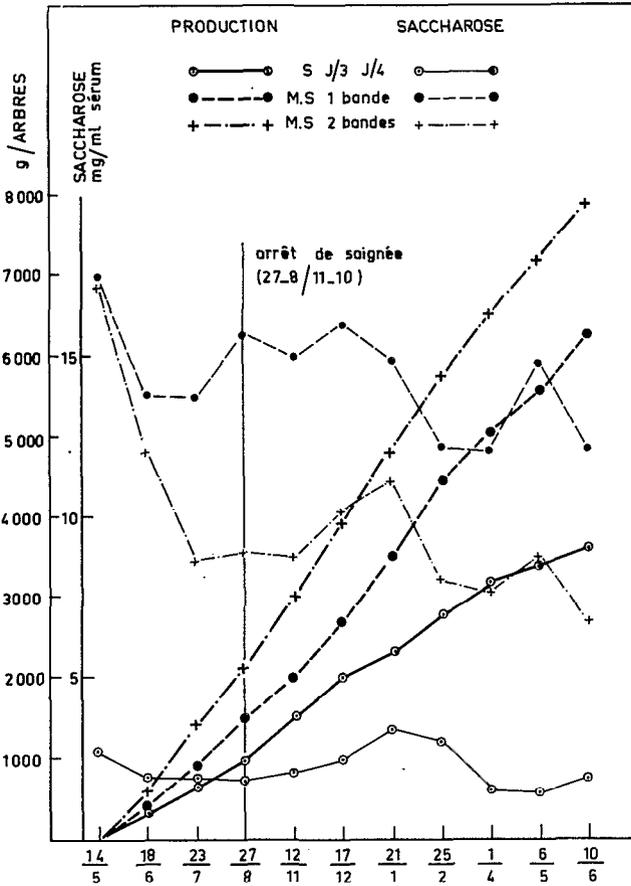


Figure 2

Résultats d'une exploitation par microsaignées sur GT 1 Culture 1962

Afin d'atténuer ce phénomène, nous avons cherché à réduire le nombre de piqûres effectuées sur une bande de 1 cm de large et 100 cm de haut.

On peut noter (tableau 2) que la production reste au même niveau lorsque les arbres sont exploités par 4, 6, 8 et 10 piqûres. Avec 2 piqûres on observe une légère baisse, mais la production est loin d'être ridicule.

On peut donc réduire le nombre de piqûres (4 ou 5) diminuant ainsi considérablement le nombre de blessures infligées à l'écorce.

4 - Fréquence de stimulation

De manière toujours empirique, on a choisi de changer de bande toutes les cinq semaines. Un allongement de la fréquence permettrait une moindre consommation d'écorce et diminuerait le coût d'exploitation.

Tableau 2
Production et nombre de piqûres

Traitements	Production de C/c sec en g/a (40 saignées)
2 piqûres/bande	2480
4 piqûres/bande	2600
6 piqûres/bande	2620
8 piqûres/bande	2600
10 piqûres/bande	2600

Stimulation toutes les cinq semaines d'une nouvelle bande grattée de 100 cm de haut et 1 cm de large par de l'Ethrel en mélange dans l'huile de palme (75 mg de m.a./arbre/stimulation 11 arbres par traitement).

Afin de trouver une fréquence bien adaptée, nous avons suivi différentes caractéristiques du latex à chaque saignée pendant deux cycles de stimulation.

La figure 3 montre l'évolution de la production de l'extrait sec de la teneur en saccharose et du pH du latex.

On voit que la teneur en saccharose du latex varie considérablement au cours d'un cycle de stimulation, passant d'une valeur maximale à la première saignée après stimulation à un minima à la troisième saignée puis remontant constamment jusqu'à atteindre ou dépasser la valeur de départ à la dixième saignée. Ce retour rapide à une valeur élevée permet une bonne réponse à la stimulation suivante.

Dans le cas d'une stimulation appliquée sur un système d'exploitation en S J/3 J/4, la teneur en saccharose du latex ne revient à sa valeur initiale que deux à trois mois après dans le meilleur des cas. On a donc ici un comportement tout à fait différent des arbres.

Le pH varie aussi très brusquement après stimulation, mais revient très vite à sa valeur initiale.

La production est à son maximum à la première saignée après stimulation et décroît ensuite régulièrement (la stimulation a été effectuée 48 heures avant la saignée).

L'extrait sec varie dans le même sens que le saccharose, excepté le fait qu'il décroît dès la première saignée après stimulation. Ceci signifie que la stimulation permet une production importante grâce à :

- une bonne utilisation du saccharose présent (la chute importante de saccharose a lieu au moment où la production est forte) ;
- un bon écoulement du latex qui peut être dû, soit à une pression de turgescence plus importante, soit à une perméabilité cellulaire accrue.

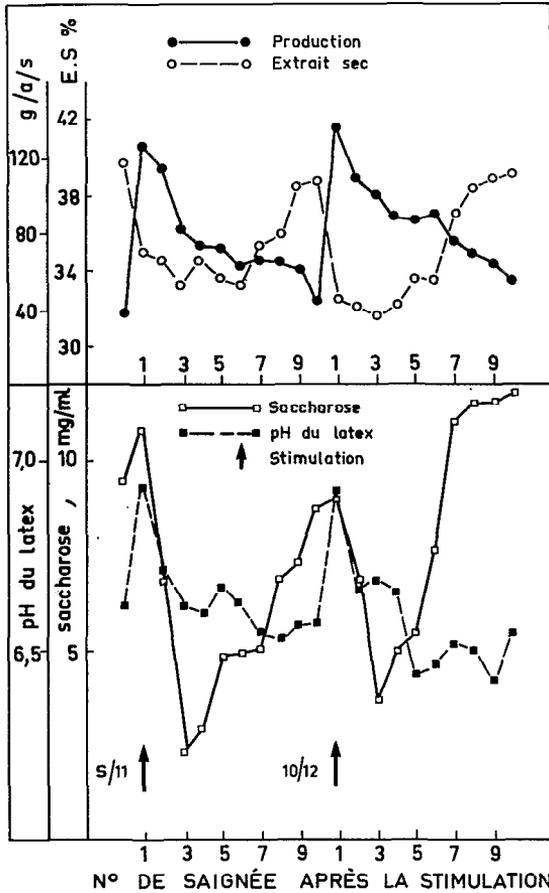


Figure 3

Évolution de quelques paramètres du latex après la stimulation sur microsaignées

Dans cette hypothèse, l'écoulement rapide au début s'expliquerait par la pression importante. Cet écoulement se poursuit longtemps juste après stimulation (huit heures), ceci par suite d'un rééquilibrage rapide des pressions. Il en résulte une dilution importante du latex avec baisse de l'extrait sec. Nous avons relevé dans cette expérience des extraits secs passant de 43% (première fraction) à 31% (dernière fraction) au cours de l'écoulement.

La chute importante de saccharose s'expliquerait par une consommation massive des disponibilités immédiatement utilisables par suite d'une forte demande (écoulement important). Le stock de saccharose se reconstitue ensuite assez rapidement. Ceci est rendu possible grâce au bon état de l'écorce peu dégradée par l'exploitation.

Il semble donc que cinq semaines soient un intervalle de temps raisonnable entre deux stimulations et correspondent à un certain «rythme» de l'arbre.

5 - Longueur de bande

Toujours dans le but de réduire la consommation d'écorce, nous avons cherché à diminuer la longueur de la bande grattée en gardant cette fois un nombre de piqûres constant (4) et la même quantité de matière active quelle que soit la longueur de bande.

Les résultats de cet essai (figure 4) montrent qu'à partir d'une longueur de 60 cm, on obtient des productions équivalentes. A noter également que même avec des bandes de 20 ou 40 cm la production est loin d'être négligeable.

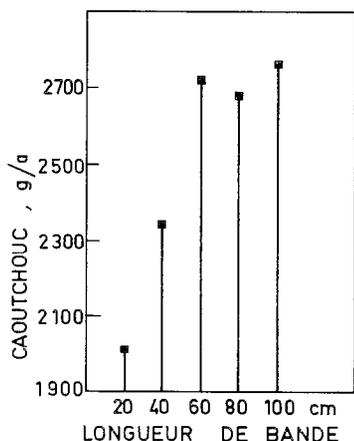


Figure 4

Production et longueur de bande en micro-saignée.

Culture GT 1 1962 - Stimulation toutes les cinq semaines - 75 mg de matière active par arbre - exploitation par 4 piqûres - résultats sur 48 saignées.

De nombreux autres paramètres restent encore à préciser :

- quantité de stimulant par bande,
- influence de la profondeur des piqûres, etc..

En outre, une inconnue subsiste toujours, à savoir la productivité de l'écorce régénérée après micro-saignée.

*

De la discussion suivant cet exposé, il faut noter quelques remarques importantes.

La micro-saignée

- la micro-saignée est, selon les théories de Southorn, rédhibitoire compte tenu du laminage des lutoïdes et donc du plugging ;

De fait, il faut une stimulation pour arriver à des productions normales sinon, dans le cas du GT 1, remarquables.

Cependant, la micro-saignée semble donner des résultats inégaux en fonction des clones. Pourquoi ?

Il serait temps maintenant de se poser notamment les questions suivantes :

- *Est-ce que la stimulation est toujours capable de lever le plugging intense qui doit normalement résulter de la microsaignée ?*
- *Si la microsaignée est une réussite remarquable sur le plan du maintien du niveau élevé de saccharose dans le latex, que peut-on penser de sa bonne utilisation métabolique ? Pourquoi ?*
- *Est-ce que le non sectionnement des vaisseaux du phloème, résultant de l'absence de cerclage, suffit à expliquer le niveau élevé de saccharose constaté dans les latex ?*
- *la microsaignée est un outil de recherche remarquable dans les problèmes de plugging et d'écoulement.*

Remarquons que les indices de Plugging, les vitesses d'écoulement et la variation de pression de turgescence qui ont permis d'éclairer fortement la compréhension du facteur limitant l'écoulement sont presque tombés en désuétude aujourd'hui. Il en est de même pour les mesures d'aire drainée.

A ces outils qui sont des mesures physiques, il convient d'ajouter des mesures plus biochimiques telle la mesure de l'état des lutoïdes (indice d'éclatement, situation des lutoïdes sur un gradient de densité, etc..).

L'utilisation de tels outils permettrait de comprendre les raisons des très bonnes productions souvent obtenues par microsaignée dans des conditions non épuisantes pour l'arbre et également de comprendre les raisons des échecs limités que l'on rencontre parfois avec ce système.

1 - 4
**La coagulation naturelle en saignée cumulée
 et les problèmes qu'elle pose**
 J. Lévêque

Natural coagulation in cumulative tapping

The collection of latex by cumulative tapping in plastic bags makes it possible to counteract certain economic pressures especially those concerning labour. It does, however, run into problems, which, if they are not solved, may well have harmful repercussions on the marketing of the rubber obtained in this way. The first arises from the repulsive odour given off by the rubber especially during processing at elevated temperatures. The second only occurs with some clones, e.g. PR 107. It is associated with varying degrees of blackening of the coagulums in the bags. The third, also specific to certain clones, e.g. GT 1, is the result of the sometimes considerable reduction in the plasticity index of the polymer below the accepted norms.

The technology department of the IRCA has made a special study of these effects with the object of remedying them. A number of processes have already been discovered and are giving encouraging results. Other possible solutions are open to discussion.

★

Des impératifs économiques, et la recherche de méthodes permettant de rationaliser la collecte du caoutchouc, ont conduit à imaginer un nouveau mode de récolte. Le ramassage à chaque saignée a été remplacé par la collecte mensuelle du latex provenant de saignées cumulées en sac de plastique. La coagulation est alors naturelle et se produit *in situ*.

Cette méthode a des avantages notamment sur le plan de la main d'œuvre. Le saigneur se consacre uniquement à la saignée et sa tâche journalière passe de 300 à 700 arbres.

Elle a aussi des désavantages qui, sur le plan économique, peuvent avoir des répercussions très fâcheuses se traduisant par un déclassement dans les spécifications techniques du caoutchouc provenant des saignées cumulées. En effet, on constate un noircissement de ce caoutchouc, son odeur putride est très désagréable, son indice de plasticité (PRI) diminue souvent au-dessous des normes satisfaisantes.

Le service de technologie de l'I.R.C.A. s'est attaché à étudier et à tenter de résoudre ces trois problèmes avec ses moyens propres et limités.

Problème de l'odeur

La phase aqueuse dans laquelle se coagule naturellement le caoutchouc, est un véritable bouillon de culture, où les processus de putréfaction et de fermentation se multiplient pendant le mois où le sac en plastique reste sur champ.

Il en résulte une odeur extrêmement désagréable à l'ouverture du sac, au sortir du séchoir et, surtout, à l'usine de transformation lors de la mastication de la gomme en mélangeur interne à 165° C. Dans le dernier cas, ce désagrément peut même être rédhibitoire à l'emploi de caoutchouc de saignée cumulée.

Il semble que ce phénomène peut être réduit par le trempage des granulés de caoutchouc avant séchage dans l'eau de Javel ou par l'utilisation d'alamasks. Il n'y a malheureusement pas de confirmation industrielle à ces traitements et des suggestions à ce sujet sont très souhaitables.

Problème de la couleur

La couleur du caoutchouc de saignées cumulées évolue. Elle peut être très foncée. Il est vraisemblable que ce phénomène est dû à des oxydases et des composés phénoliques et aminés (du latex lui-même) en présence d'oxygène.

L'influence clonale est extrêmement nette.

Les traitements suivants résolvent ce problème mais ne sont pas applicables pratiquement ni économiquement :

- coagulation du latex par acidification *in situ* ;
- stérilisation à 100 ° C ;
- maturation en milieu tamponné à pH 9,0 ;
- maturation en présence de bisulfite de sodium ;
- addition de bactéricide puissant ;
- maturation en tube fermé.

Il apparaît que le pH du milieu de coagulation joue un rôle essentiel ; l'acidité accentue le brunissement, l'alcalinisation tend à s'y opposer.

Dans ce cas encore, toutes les suggestions tant sur le plan théorique pour éclairer le phénomène que sur le plan pratique pour tenter d'y pallier seront bien accueillies.

Problème du PRI

L'essai de mesure du PRI consiste en la détermination des indices de plasticité des éprouvettes de caoutchouc brut avant et après chauffage dans des conditions déterminées (30 minutes dans une étuve à 140° C).

Les propriétés des caoutchoucs bruts provenant soit de latex coagulés à l'usine, soit de saignées cumulées, sont semblables à l'exception du PRI qui est plus faible dans le second cas. Conjointement, on note une diminution du taux d'azote peut-être en rapport avec ce phénomène.

L'influence clonale est très nette, le latex de certains clones étant beaucoup plus sensible que d'autres à l'évolution de ce processus.

Des essais ont été mis en place pour tenter de :

- préciser le rôle éventuel joué par le milieu bactérien ;
- mettre en évidence le caractère enzymatique du phénomène ;
- préciser parmi les constituants du latex ceux qui interviennent principalement.

De l'ensemble des résultats obtenus un certain nombre sont à retenir :

- un autoclavage à 100° C pendant 1 heure, fixe le PRI à un bon niveau même après une maturation de quatre semaines ;
- un raitement aux rayons X a le même effet ;
- l'addition d'antiseptiques et de fongicides n'améliore pas le PRI ;
- des bactéricides très puissants, tels que la pénicilline, améliorent le PRI ;
- la conservation du latex à 0° C stoppe l'évolution du PRI, qui continue à se dégrader si la température redevient normale ;
- l'augmentation du pH du milieu de maturation conduit à une diminution du PRI dont le niveau est variable selon les clones (haut pour le PR 107, bas pour le GT 1 et le PB 86) (cf. figure 1).

Le mélangeage de caoutchouc à haut et bas PRI donne des résultats satisfaisants (cf. figure 2).

Toutefois, aucune conclusion très précise n'a pu être tirée pour éclairer les causes du phénomène.

L'hypothèse que la maturation en phase aqueuse accroît peut-être l'activité nocive des «métaux poisons» (Cu et Mn) en modifiant leur forme pour en faire des sels d'acides gras, a été avancée. L'action protectrice de l'EDTA, agent chélatant puissant, serait en faveur de cette idée

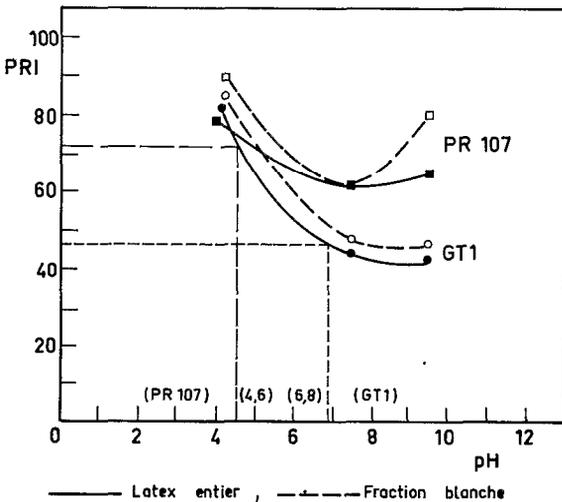


Figure 1

Influence du pH de maturation sur le PRI du caoutchouc de saignée cumulative.

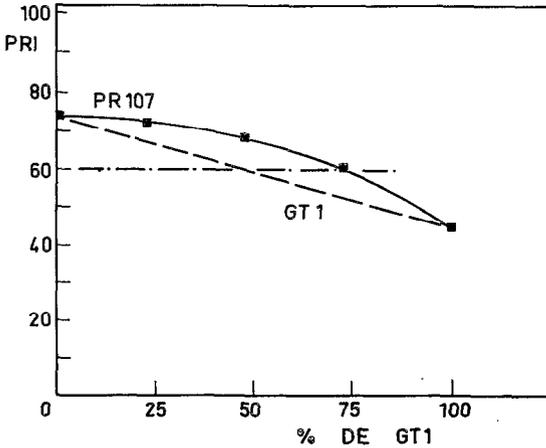


Figure 2

Mélange de caoutchoucs à haut et bas PRI provenant respectivement de PR 107 et de GT 1.

Compte tenu des connaissances actuelles, les technologistes se sentent mal assurés pour discuter des mécanismes conduisant à l'altération du caoutchouc et responsable de l'abaissement du PRI. Ils ont pourtant, sur le plan pratique, trouvé des moyens assez satisfaisants pour résoudre en partie ce problème. :

- Mélangeage du caoutchouc de clones à bas et à haut PRI à la réception à l'usine, au cours de l'usinage, particulièrement par crépage ;
- Trempage des granules, soit dans l'acide phosphorique ou oxalique, soit dans des suspensions d'antioxygène ou de complexants tels que l'EDTA ;
- Séchage à température modérée (pas plus de 110° C) ce facteur semblant intervenir sur la thermosensibilisation du caoutchouc en relation avec son PRI.

Il est possible d'ailleurs de combiner ces trois méthodes.

Cependant, une meilleure connaissance du phénomène est souhaitable pour trouver des solutions encore plus efficaces parce que mieux adaptées au problème. L'aide des biochimistes est demandée car l'enjeu pratique est d'une grande importance.

*

Lors de la discussion, un certain nombre de remarques ont été faites :

- *Les problèmes de couleur sont très vraisemblablement le fait d'oxydases du latex lui-même. Ces phénomènes ont été constatés lors de fractionnements de protéines lutoïdiques.*

Les peroxydases seraient peut-être les principales responsables du noircissement plutôt que les polyphénuloxydases. Ces enzymes fonctionnent bien à pH acide, ce qui correspond aux observations faites, à savoir l'évolution rapide de la couleur à bas pH.

Il faudrait, pour bien comprendre le problème, identifier les substrats enzymatiques et leur localisation au sein du latex.

Sur un plan pratique, l'emploi d'hypochlorite de soude ou de calcium, mais aussi d'agents réducteurs, doit donner des résultats. Mais leur utilisation pose le difficile problème de la mise en œuvre d'une méthode efficace.

Si l'addition de produit ou d'un cocktail de produits à chaque saignée peut paraître peu pratique, c'est cependant la seule méthode qui puisse conduire à des effets certains. En effet, seule une telle méthode doit permettre une diffusion suffisante du produit actif dans le latex s'écoulant lors d'une saignée. Par ailleurs, sur le plan pratique, une telle addition à chaque saignée a parfois été employée régulièrement dans les cas de latex instables ou de latex destinés à la centrifugation (il s'agissait alors d'additions d'ammoniaque).

L'emploi de sacs préalablement imprégnés de substances chimiques adéquates est peu pratique et certainement cher. Il est cependant à essayer.

- *L'odeur résultat surtout de putréfactions et de fermentations diverses serait éventuellement diminuée par adjonction de bactéricide puissant, tels que le formol qu'il conviendrait sans doute d'ajouter presque à chaque saignée.*
- *le PRI et son évolution mettent en jeu des processus excessivement complexes. Les mécanismes n'apparaissent pas clairement, ce qui empêche de formuler des propositions précises sur un plan scientifique. Une recherche pragmatique et assez systématique doit donc être poursuivie pour progresser sur le plan pratique, but final en lui-même.*

Sur un plan plus fondamental, l'étude du phénomène semble être, en premier lieu, du ressort de la physico-chimie et de l'analyse organo-minérale. La détermination de ses causes, et des facteurs intervenant, est un point essentiel à résoudre si l'on veut progresser dans ce domaine.

Compte tenu de certaines hypothèses et des résultats déjà obtenus, l'αα'-di-pyridil, la triéthanolamine, les tocophérols, la dithionite, le bisulfite et les agents complexants ou chélatants divers peuvent avoir un rôle protecteur contre la dégradation du PRI. Le fait que la chute du PRI soit une caractéristique clonale laisse à penser à la présence ou à l'absence clonale d'un agent activant ou inhibant la chute du PRI. Parmi les composants variant avec le clone, des métaux tels que Cu, Mn et Fe pourraient être, sous une forme plus ou moins solubilisée par des acides gras, les agents de la dégradation du PRI. A l'opposé, des acides aminés, des amines ou des phénols pourraient avoir un effet protecteur. On peut songer à un screening des produits les plus actifs vis-à-vis du PRI dans des coagulations expérimentales à pH 5,5 environ (type Michelin), puis à leur application à chaque saignée dans le sac de coagulation.

La diversité des problèmes évoqués ainsi que leur grande complexité ne permettent pas de proposer ex abrupto des solutions immédiatement efficaces. Cependant, en plus des quelques suggestions émises plus haut, les chercheurs présents, maintenant informés, seront à même de réfléchir à ce sujet dont l'importance économique ne leur a pas échappée.

- II -

PHYSIOLOGIE DE LA RÉGÉNÉRATION

2 - 1

Introduction

J. d'Auzac

En simplifiant sans doute à l'extrême on est en droit de penser que le facteur limitant «écoulement» est en passe d'être levé par les techniques de stimulation combinées à des systèmes de saignée *ad hoc* ; soit que l'on fasse appel aux deux ou trois stimulations annuelles classiques ou aux stimulations répétées avec de faibles doses d'Ethrel (groove stimulation).

Rapidement un deuxième facteur limitant vient ainsi à découvert : la RÉGÉNÉRATION du contenu des laticifères.

Ce facteur limitant se traduit par l'apparition d'arbres secs selon un mécanisme fort peu connu.

La sécheresse de l'encoche est un phénomène limité au système laticifère et à l'écorce. Il peut se manifester de plusieurs façons. Des études descriptives très sérieuses ont été réalisées dans le passé. Des études plus récentes visent à comprendre les mécanismes impliqués.

LE DESSECHEMENT DE L'ENCOCHE DE SAIGNÉE
(BROWN-BAST)

RECHERCHE DES CAUSES POSSIBLES

Le Brown-Bast se traduisant par un brunissement de l'encoche est précédé d'une chute importante de la teneur en caoutchouc du latex.

Cette non régénération du contenu normal des laticifères peut résulter de plusieurs causes :

- 1 - dérèglement de la régulation de la synthèse isoprénique ;
- 2 - dérèglement dans les synthèses protéiques et enzymatiques ;
- 3 - intervention des lutoïdes en tant que lysosomes et «suicide bag» ;
- 4 - alimentation insuffisante en éléments minéraux, glucides et composés azotés :
 - perméabilité membranaire devenue insuffisante des laticifères,
 - disponibilité insuffisante en aliments au niveau du phloème et des tissus de l'écorce ;
- 5 - Le traumatisme dû aux saignées répétées : moteur du Brown-Bast.

L'importance économique des phénomènes d'encoche sèche est grande dans l'état actuel des choses. Le problème est extrêmement complexe. Avant de tenter de l'aborder, nous allons essayer de définir en termes physiologiques et biochimiques ce que peut être la non régénération du latex *in situ* et l'apparition d'encoches sèches.

Le tableau 1 peut fournir une base de discussion pour l'étude de ce problème fondamental.

Il est évident que pour savoir dans quelle mesure les différents facteurs énumérés sont impliqués dans la sécheresse de l'encoche, il est strictement indispensable de connaître le maximum de choses sur ces différents facteurs.

Nous allons tout d'abord tenter de faire le point des connaissances acquises dans ces différents domaines.

Dans une dernière discussion, nous essaierons ensuite d'intégrer ces connaissances pour les appliquer à l'étude de la régénération du contenu des laticifères, de la sécheresse de l'encoche et de la détection de la fatigue du système laticifère, afin d'en tirer une ligne de conduite dans ce domaine.

★

2 - 2
Régulation de la synthèse isoprénique

Voilà près de quinze ans que des travaux sont poursuivis sur la régulation du métabolisme de la cellule laticifère.

Des résultats remarquables ont été obtenus. Ils ont confirmé les connaissances acquises par ailleurs. Ils ont permis d'établir des possibilités nouvelles de régulation. Ils ont parfois permis la découverte d'enzymes nouvelles.

2 - 2 - 1
L'invertase
L. Primot

Invertase

Invertase is an enzyme which plays an important part in the metabolism of isoprene and its regulation. It has been possible to isolate it and partly purify it. Its molecular weight is very high and lies in the region of 800,000. Its K_m for saccharose at pH 7.2 is of the order of 15 mM. The inhibiting effect of magnesium varies with pH and is greater at pH 6.5 than at pH 7.2, for physiological concentrations of between 5 and 10 mM.

★

Les travaux de Tupy ont montré que l'invertase était une enzyme clef du métabolisme isoprénique. De son activité semble dépendre le bon fonctionnement de la régénération du caoutchouc et, partant, la production de l'hévéa lors de la saignée.

Il était donc important d'entreprendre l'étude de cette enzyme afin d'en apprécier les propriétés.

1 - Isolement et purification de l'enzyme

L'invertase du latex est localisée exclusivement dans le sérum cytoplasmique. Les opérations de purification sont donc faites à partir du sérum cytoplasmique clair obtenu par centrifugation à 55 000 xg. Le dosage de l'enzyme est

effectué par la mesure de sucres réducteurs obtenus par hydrolyse du saccharose sous l'action de l'invertase. La première étape de purification est une centrifugation à 220 000 xg, qui permet de sédimenter l'enzyme et de la concentrer. Cette étape permet en outre une purification non négligeable (tableau 1). Le culot de sédimentation repris dans un tampon phosphate pH 7,3 est ensuite chromatographié sur du Sepharose 6B. Le choix de cette méthode nous a été dicté par le fait que l'enzyme a un poids moléculaire élevé. En effet, d'une part elle sédimente très bien par ultra-centrifugation, d'autre part des essais de purification sur Sephadex G 200 nous ont montré que son poids moléculaire devait être supérieur à 200 000.

Tableau 1
Évolution de l'activité spécifique de l'invertase
au cours des différentes étapes de purification

Étapes	Protéine mg/ml	Invertase Activité/ml	Activité/mg de protéine	Purification
Sérum cytoplasmique	20	200	10	-
Culot de centrifugation	68	3 200	47	4,7
Filtration sur Sepharose 6B	2,25	620	276	27,6
Chromatographie sur DEAE cellulose	0,154	100	649	64,9

La séparation sur colonne de Sépharose 6B permet une purification intéressante. En outre, un étalonnage de la colonne nous a permis d'évaluer son poids moléculaire aux environs de 800 000. L'invertase est donc une très grosse protéine.

La purification est poursuivie par passage sur une colonne de DEAE Cellulose permettant une séparation de l'enzyme, non plus en fonction de son poids moléculaire, mais en fonction de ses propriétés électriques. L'enzyme est éluée de la colonne par NaCl 0,3 M.

A ce stade de purification, l'enzyme est encore contaminée par d'autres protéines, mais nous pensons que la purification est suffisante pour l'étude de ses propriétés.

2 - Propriétés de l'invertase partiellement purifiée

Influence de la température

La figure 1 montre la variation d'activité de l'enzyme en fonction de la température d'incubation. On peut constater que l'invertase est particulièrement sensible à l'augmentation de température entre 20° et 40° C.

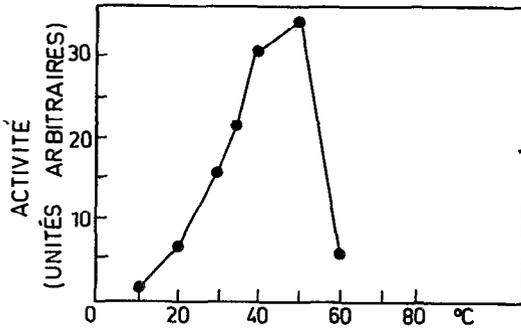


Figure 1

Activité de l'invertase du latex en fonction de la température
Milieu d'incubation :
tampon phosphate 0,02 M ; citrate : 0,01 M pH 7,2 ; saccharose : 0,6 M ; incubation : 10 min. aux différentes températures.

Influence de la concentration en saccharose

Le K_m de l'enzyme a été déterminé à pH 7,2, c'est-à-dire dans les conditions d'activité optimum de l'enzyme. La valeur du K_m est de 0,015 M.

Influence du magnésium et du pH

L'effet inhibiteur du magnésium sur l'invertase a déjà été montré sur le sérum cytoplasmique. Nous avons étudié ce phénomène à deux pH différents : 6,5 et 7,2. La figure 2 montre que la sensibilité au magnésium varie d'une façon importante selon le pH du milieu réactionnel.

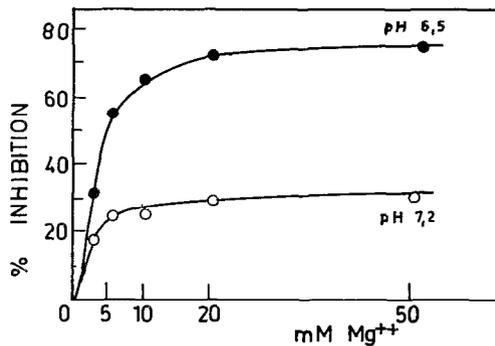


Figure 2

Inhibition de l'invertase du latex par le magnésium à pH 6,5 et 7,2.
Milieu d'incubation : tampon phosphate 0,02 M ; citrate 0,01 M pH 6,5 et 7,2 ; Mg^{++} 2,5, 5, 10, 20 et 50 mM ; incubation 30 min. à 30° C.

Ce résultat appelle quelques commentaires sur le rôle très important du pH sur l'activité métabolique au sein des laticifères.

Tout d'abord, l'activité invertasique est multipliée par 4 lorsque l'on passe du pH 6,5 au pH 7,2. Ensuite, à pH élevé (7,2), la sensibilité au magnésium

diminue. L'inhibition par 10 mM de magnésium n'est que de 25% à pH 7,2 alors qu'elle atteint 70% à pH 6,5. Les déterminations de pH et de concentration en magnésium effectuées sur différents latex montrent que les valeurs de pH, allant de 6,5 à 7,2, sont parfaitement physiologiques, de même que les concentrations en magnésium de 5 à 10 mM. On comprend dès lors l'importance du pH dans le métabolisme de la cellule laticifère. La stimulation, dont une des actions est l'augmentation du pH, diminue donc dans le même temps l'effet inhibiteur du magnésium présent, vis-à-vis de cette enzyme.

★

2 - 2 - 2
 La PEP-carboxylase
 J.-C. Prévôt

PEP-carboxylase

The phosphoenolpyruvate-carboxylase activity of latex is localised in the cytoplasmic serum. It is only catalysed by a single enzyme (E.C. 4.1.1.31) which converts the phosphoenol pyruvate irreversibly into oxaloacetic acid in presence of CO₂ and magnesium.

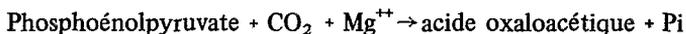
In order to be able to study it without being subject to interference by certain dehydrogenases and enzymes capable of also using phosphoenol-pyruvate, a purification procedure has been devised.

★

La PEP carboxylase joue vraisemblablement un rôle considérable dans l'orientation du métabolisme des laticifères vers la synthèse du caoutchouc. Il était donc important de l'étudier. Ce travail est en cours.

L'activité de la PEP carboxylase (PEPC) du latex est localisée uniquement dans le sérum C.

Elle n'est apparemment catalysée que par une seule enzyme (EC 4.1.1.31) :



Avant d'analyser ses caractéristiques, il était nécessaire de la purifier, afin d'éliminer les enzymes susceptibles d'utiliser le même substrat et d'éviter ainsi toutes interférences pouvant fausser les résultats.

La figure 1 montre en effet que l'énolase, mais aussi la pyruvate kinase (PK) et la phosphatase acide (PA) peuvent utiliser le phosphoénolpyruvate pour le transformer, soit en acide 2 phosphoglycérique (enolase), soit en pyruvate (PA et PK).

Le protocole de purification (tableau 1) mis au point a donné des résultats satisfaisants.

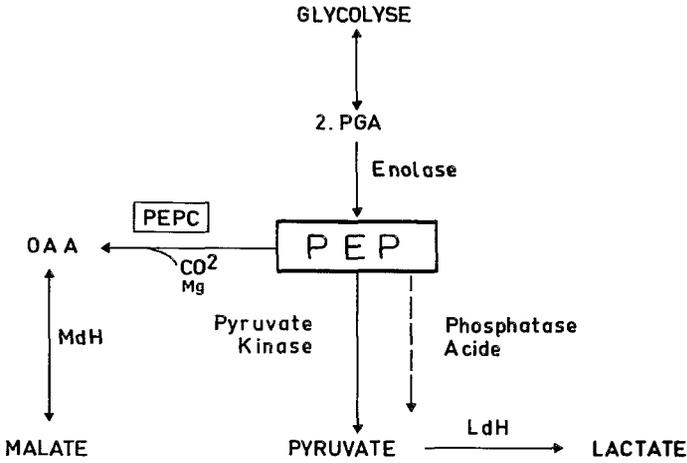


Figure 1
Schéma du carrefour phosphoénol-pyruvique

Tableau 1
Schéma de purification de la phosphoénolpyruvate carboxylase

Étapes	Protéines totales	PEPC U. totales	UI	Récupération %	Purification
Centrifugation 25.000 g - 30'	338	64	0,19	100	00
G. 200					
Tris HCl 0,1 M pH 8,2 1 M ClNa	49	46	0,95	71,8	x 5
SO ₄ (NH ₄) ₂ 0 - 45 %	45	36,9	0,82	57,6	x 4,3
DEAE - A.50					
Tris HCl 0,05 M pH 8,2 ClNa 0,1 M	10	29	2,97	45,0	x 15,6
ClNa 0,1 M → 0,8 M					
SO ₄ (NH ₄) ₂ 0 - 45 %	7	11,8	1,68	18,4	x 8,8
G. 100					
Tris 0,05 M pH 8,2 ClNa 0,1 M	3	9,1	3,00	14,2	x 15,8
DEAE A. 50					
Tris HCl 0,05 M pH 8,2	0,8	5,5	6,90	8,6	x 36,3

2 - 2 - 3
Les phosphatases

Elles interviennent dans le métabolisme des laticifères en hydrolysant, soit des substrats, soit des cofacteurs présentant des groupements esterphosphates. Leur nombre et leur localisation sont divers.

On en trouve dans le sérum C et dans le sérum L. Leur spécificité également est variable.

Déjà certaines ont été étudiées qui semble devoir jouer un rôle non négligeable dans la biologie du latex.

Parmi elles, nous avons pu mettre en évidence une enzyme «nouvelle» non encore répertoriée dans la classification internationale : une 2'nucléotidase.

Par ailleurs, l'importance de l'activité phosphatase acide au sein des lutoïdes nous a conduit à étudier plus particulièrement la monoestérase qualitativement et quantitativement la plus représentative de ces particules, et que nous avons désignée sous le nom général de phosphatase acide lutoïdique.

Enfin, on a étudié une phosphatase cytoplasmique activée par le magnésium et dont l'optimum de pH est proche de la neutralité.

2 - 2 - 3 - 1
La 2'nucléotidase du latex d'*Hevea brasiliensis*
J.-L. Jacob

2'nucléotidase in latex

A new enzyme, 2'nucleotidase has been shown to exist in the cytoplasmic serum of hevea latex. It has been isolated and purified. It possesses fairly narrow specificity with respect to the ester-phosphate bonds situated in the 2' position on the ribose of the nucleotides. Its preferred substrate is NADP(H), the cofactor which is moreover necessary for the synthesis of rubber. It must therefore act as part of the isoprene metabolism regulation system. The copper ion is a powerful non-competitive inhibitor of this enzyme, perhaps even in the physiological sphere.

★

Sa purification et l'étude de ses caractéristiques ont donné lieu à une publication (J.L. Jacob et N. Sontag, *Eur. J. Biochem.*, 1973, 40, 207-214).

Le tableau récapitule l'ensemble de ses caractéristiques.

Tableau
Caractéristiques de la 2'nucléotidase du latex d'*Hevea brasiliensis*

Localisation	Sérum C du latex d' <i>Hevea</i>	
Spécificité	Seuls substrats utilisés	Activité relative en %
	NADP	100
	NADPH	63
	Adenosine 2',5' di P	62
	Adenosine 3',5' di P	5
	Coenzyme A (nucleotide 3'5'P)	13
	Guanosine 2',5' di P	24
	Guanosine 3',5' di P	2
Optimum de pH	5,5	
Km (mM)	pH 5,5	pH 7,0
NADP	0,7	1,8
- Inhibiteurs (mM)		
- Compétitifs		
Pi	5,2	#
ATP	0,9	#
ADP	3,7	
- Incompétitifs		
FNa	0,70	0,550
Zinc	3,500	0,020
Molybdène	0,035	
Cuivre	0,017	0,001

L'enzyme est assez étroitement spécifique des nucléotides 2'phosphates (figure 1) et surtout du NADP(H) dont la présence est nécessaire à l'anabolisme isoprénique.

Toutefois, il faut remarquer que la 2'nucléotidase est également capable d'attaquer, bien que beaucoup plus faiblement, le coenzyme A, indispensable lui aussi à la synthèse terpénique. Elle est donc susceptible de provoquer une carence de ces cofacteurs pouvant freiner cette synthèse.

Quels sont les facteurs physiologiques qui peuvent influencer le fonctionnement de cette enzyme ? Il ressort des résultats que si les variations de pH ne

semblent pas devoir jouer un rôle important, d'autres paramètres sont certainement plus efficaces. Ainsi, la faible teneur en NADP, compte tenu de l'affinité de la 2'nucléotidase pour son substrat, implique une faible activité de cette phosphatase. Par ailleurs, le phosphate et l'ATP sont, dans le sérum cytoplasmique, en quantité suffisante pour jouer effectivement leur rôle d'inhibiteurs compétitifs, leur constante d'inhibition étant du même ordre de grandeur que leur concentration physiologique. Il faut enfin évoquer l'influence des cations. Il apparaît notamment que le cuivre est un inhibiteur extrêmement puissant au pH du sérum dans lequel est localisée l'enzyme. La valeur de son K_i dans ce cas ($17 \mu M$) est de l'ordre de grandeur de la concentration cuprique du latex. Or, cette dernière peut varier énormément ; elle augmente beaucoup, par exemple à la suite de traitements hévéicoles utilisés pour stimuler la production ; on peut supposer que cette augmentation freine effectivement le fonctionnement de la 2'nucléotidase et, par conséquent, favorise la régénération isoprénique. Il faut rapporter également un effet analogue du molybdate employé en tant qu'agent stimulant la production.

Des travaux antérieurs* ont d'ailleurs permis de montrer *in vitro* l'action positive du cuivre et du molybdate dans certaines limites de concentration, sur l'activité de la biosynthèse du caoutchouc au sein du latex.

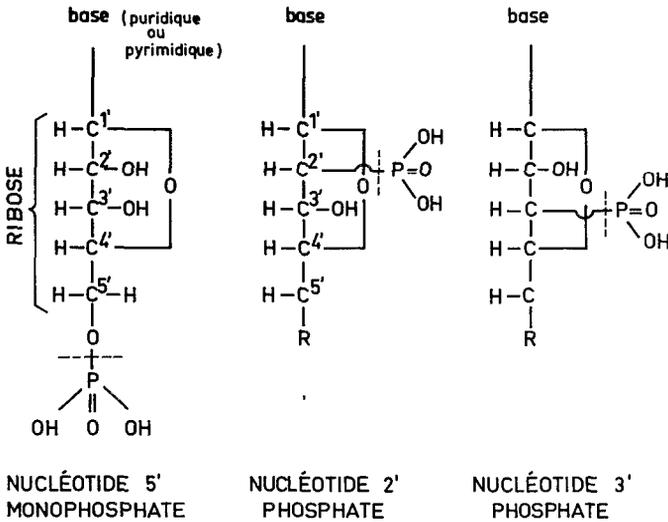


Figure 1

Différentes formes de nucléotides phosphates

NADP : nucléotide 2' phosphate, base : adénine, R : pyrophosphate de nicotinamide

COENZYME A : nucléotide 3' phosphate, base : adénine, R : pyrophosphate de panté-théine.

* J.L. JACOB, D.RIBAILLIER et J. d'AUZAC - *Physiol. vég.*, 8, 247-262, (1970).

La régulation de la production du cis-polyisoprène dans les laticifères est, bien sûr, sous la dépendance de mécanismes complexes et divers, dont l'ensemble est encore très mal connu. Toutefois, la présence de la 2'nucléotidase dans le sérum du latex constitue vraisemblablement un élément non négligeable du système susceptible de moduler la synthèse du caoutchouc.

★

2 - 2 - 3 - 2
**La phosphatase acide lutoïdique
 du latex d'*Hevea brasiliensis***
 J.-L. Jacob

Lutoïd acid phosphatase

Acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2.) in the latex lutoïd serum has been isolated and purified.

This monoesterase is not very specific. Phosphoenolpyruvate, NADP, adenosine phosphates and co-enzyme A are very well hydrolysed by it. However, magnesium effectively inhibits the use of ATP, which may be important from the physiological point of view. Inorganic phosphorus is a very powerful competitive inhibitor of the enzyme. Of the other effectors of this phosphatase, molybdenum and tungsten are extremely effective non-competitive inhibitors.

★

L'enzyme étudiée (EC. 3.1.3.2.) a été purifiée très soigneusement (Jacob J.L. et Sontag N. - *Biochimie*, 1974, 56, 1315-1321). Le tableau résume quelques unes de ses caractéristiques.

Les résultats obtenus permettent de mieux apprécier l'action négative que la phosphatase acide lutoïdique peut avoir sur l'anabolisme isoprénique. Des cofacteurs tels que l'ATP, la coenzyme A, le NADP, des substrats tels que le phosphoenolpyruvate, sont susceptibles d'être très aisément hydrolysés par cette enzyme ; or, la carence de ces molécules indispensables à la synthèse du caoutchouc freine automatiquement l'élaboration des chaînes de polyisoprène. On comprend l'importance de la localisation intralutoïdique d'une telle hydrolase, dont la libération dans le compartiment cytoplasmique peut perturber efficacement le métabolisme des laticifères, orienté essentiellement vers la production de caoutchouc. Cette libération de la phosphatase acide, provoquée par la rupture ou la dégradation des membranes lutoïdiques, se produit surtout lors de la saignée de l'hévéa ; mais il est possible qu'elle puisse aussi résulter de phénomènes plus ponctuels et de nature physiologique, tels que des accidents tissulaires locaux, des états physiologiques particuliers ou le vieillissement cellulaire lui-même, qui entraîne une modification, puis une dénaturation des membranes subcellulaires. Dans la mesure où les quantités de phosphatase acide lutoïdique déchargées au sein du cytoplasme du laticifère ne sont pas trop importantes, un certain nombre de facteurs peuvent *in situ* s'opposer à son fonctionnement. Le pH du sérum cytoplasmique proche de la neutralité est assez éloigné du pH du sérum lutoïdique, pH 5,5, qui correspond à

Substrats 3 mM	Vitesse relative	Substrats 3 mM			Vitesse relative
Para-nitrophénylphosphate	100	Adénosine-2'-monophosphate			11
Fructose-1,6-diphosphate	12	Adénosine-3'-monophosphate			7
Fructose-6-phosphate	2	Adénosine-5'-monophosphate			7
Glucose-6-phosphate	5	Adénosine-5'-diphosphate			15,5
6-phosphogluconate	27	Adénosine-5'-triphosphate			42
Ribose-5-phosphate	10,5	Adénosine-2',5'-diphosphate			19
Erythrose-4-phosphate	0	Adénosine-3',5'-diphosphate			14
Acide 2-phosphoglycérique	27	Adénosine-3',5'-monophosphate			0
Acide 3-phosphoglycérique	38	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate			39
Phosphoénolpyruvate	81	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit			18
DL glycéraldéhyde phosphate	15,5	Coenzyme A			40
β glycérophosphate	11,5	Guanosine-3'-monophosphate			4
Acide 2,3-diphosphoglycérique	25	Guanosine-5'-monophosphate			0
Acide phosphoglycolique	8,5	Guanosine-2',5'-diphosphate			17
Phosphoserine	15,5	Guanosine-3',5'-diphosphate			21
Thiamine pyrophosphate	0	Guanosine-5'-triphosphate			46
Uridine diphosphoglucose	0	Cytidine-3'-monophosphate			18,5
Pyridoxal-5'-monophosphate	19	Uridine-5'-monophosphate			2
Bis-paranitrophénylphosphate	0	Uridine-5'-triphosphate			20
rapport ATP/Mg	0,05	0,2	0,5	1	5
% inhibition de l'hydrolyse de l'ATP par rapport à l'activité d'un témoin sans Mg	88	66	48	37	14
Km PNPP = $0,11 \times 10^{-3}$ M à pH 5,5 $1,00 \times 10^{-3}$ M à pH 7,0					
Ki Tungstate $1,8 \times 10^{-7}$ M ; molybdate $2,1 \times 10^{-7}$ M ; Zn $0,62 \times 10^{-3}$ M ; Cuivre $0,45 \times 10^{-3}$ M ; Pi (compétitif) $0,45 \times 10^{-3}$ M					

l'optimum de fonctionnement de la phosphatase acide. Il s'ensuit que l'activité potentielle de l'enzyme, d'une part, mais aussi son affinité pour ses substrats, sont bien diminuées. D'autre part, le phosphore minéral est en concentration suffisante, 10 mM en moyenne au sein du sérum cytoplasmique, pour que son pouvoir inhibiteur compétitif soit très efficace, compte tenu de la concentration respective des substrats que l'enzyme peut utiliser.

Il faut enfin souligner la protection de l'ATP par le magnésium. Les concentrations d'ATP par rapport à celle du cation impliquent presque sûrement que le cofacteur se trouve essentiellement sous forme de chélat ATP-Mg dans le latex ;

chélat peu, sinon pas, sensible à l'action de la phosphatase acide lutoïdique. La preuve en est, d'ailleurs, que l'on retrouve toujours de l'ATP dans les échantillons de latex, même si un grand nombre de leurs lutoïdes a été détruit, alors que le NADP, le coenzyme A ou le phosphoénolpyruvate sont souvent très difficiles, sinon impossibles, à doser. La signification physiologique de ce phénomène n'est pas très claire encore mais elle est peut-être à rapprocher de la présence d'une ATPase membranaire des lutoïdes. Cette ATPase aurait un rôle à jouer dans la perméabilité lutoïdique active et il est difficile d'imaginer que cette enzyme puisse fonctionner normalement si la compétition avec la phosphatase acide lutoïdique n'était pas très atténuée par la présence du magnésium.

L'influence de la phosphatase acide lutoïdique sur le métabolisme isoprénique peut sans conteste être importante. Toutefois, un certain nombre des propriétés de cette hydrolase, ainsi que la composition des divers compartiments du latex, poussent à croire que son influence doit être très modulée.

★

2 - 2 - 3 - 3
La phosphatase cytoplasmique dépendant du Mg^{++}
 G. Souciet

Mg-dependent serum phosphatase

It has been shown that a phosphatase insensitive to molybdenum, but which function slowly without magnesium is present, and whose optimum pH is in the region of 7.0, exists in the latex cytoplasmic serum. By partially purifying it, it has been possible to show that it has a particular tendency to use substrates with aromatic nuclei. Its molecular weight lies between, 35,000 and 40,000. It is relatively thermally stable up to 50° C. Its activation energy is of the order of 6300 cal. mol.⁻¹.

★

Si la phosphatase acide lutoïdique est quantitativement la plus importante des phosphatases du latex, il est apparu cependant que le sérum cytoplasmique contenant une NADP-phosphatase et une phosphatase dépendante du Mg (Ribaillier et coll., 1971).

Par suite du relativement grand nombre de phosphatases présentes dans un sérum de latex, seule l'électrophorèse a permis de déceler cette enzyme et de mettre en évidence son besoin en Mg^{++} , son insensibilité au molybdate et son inactivation par le p.chloromercuribenzoate. Ces trois caractéristiques permettent de la distinguer aisément des phosphatases acides lutoïdiques et des autres phosphatases présentes.

Étant donné la complexité du milieu, il n'a pas été possible de caractériser clairement cette enzyme par son pH optimum sur un milieu non purifié comme le montre la figure 1.

Un processus de séparation et de purification partielle de l'enzyme est en cours de développement afin de pouvoir déterminer les caractéristiques principales de cette enzyme et d'en déduire autant que possible son rôle physiologique dans le métabolisme de la cellule laticifère.

Les premiers résultats obtenus sur enzyme partiellement purifiée conduisent notamment aux résultats suivants :

- le pH optimum de l'enzyme est très voisin de 7 (figure 2) ;
- le besoin de Mg^{++} est absolu au moins lorsque l'on utilise le substrat PNPP ;

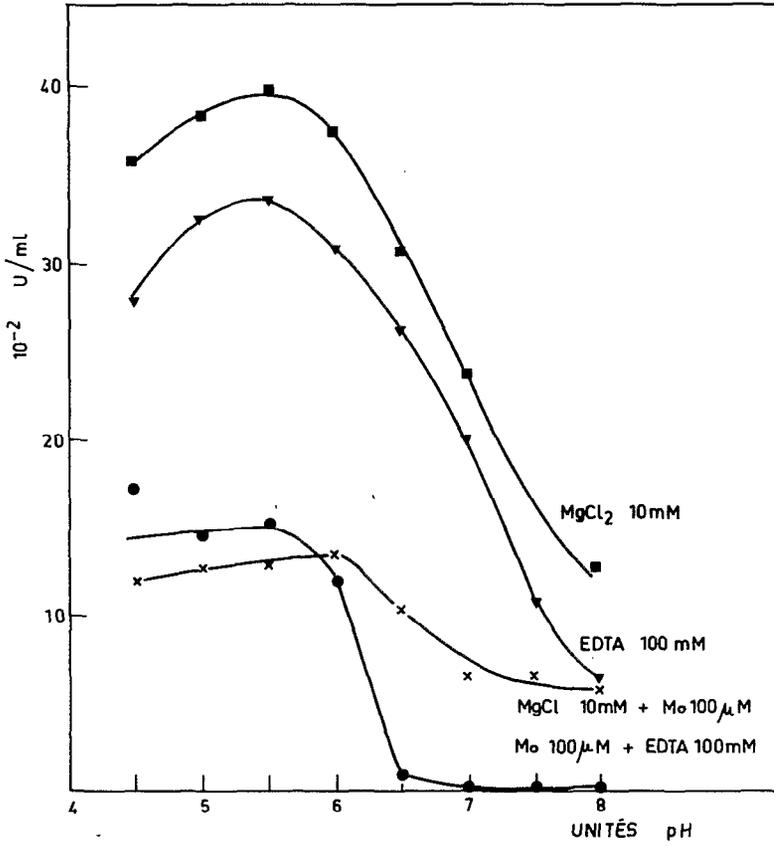
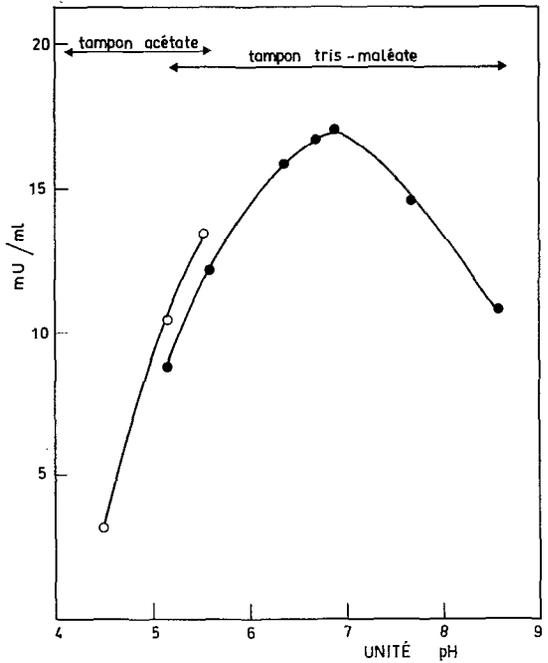


Figure 1
Utilisation du PNPP
en présence de certains effecteurs et en fonction du pH, par un sérum cytoplasmique dialysé.

Figure 2
pH optimum de la phosphatase
Mg dépendante



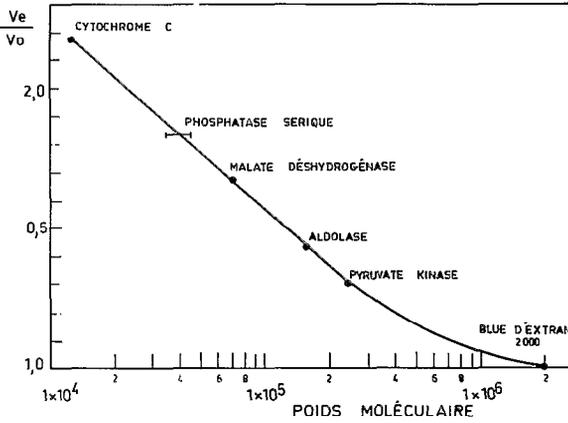
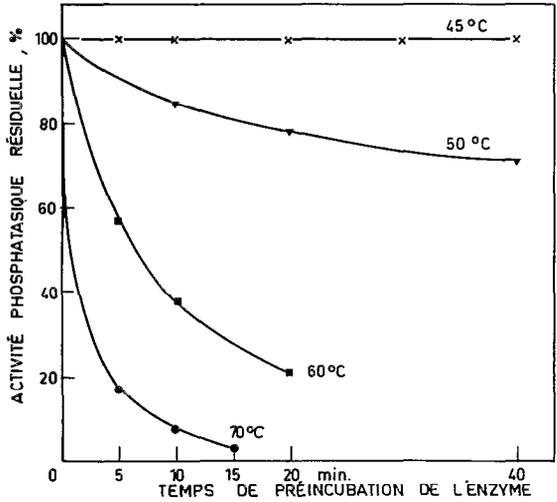


Figure 3

Détermination du poids moléculaire de la phosphatase sérique par filtration sur gel de Séphadex G 200

Figure 4

Stabilité thermique de la phosphatase sérique



- l'enzyme n'utilise pas la totalité des substrats phosphorylés et semble fonctionner plus spécialement avec des substrats à noyau aromatique (p. nitrophénylphosphate, α et β Naphthylphosphate, phénol-phtaléine phosphate, etc.);
- le poids moléculaire de l'enzyme estimé sur Sephadex G 200 est de l'ordre de 35 à 40 000 (Figure 3);
- l'enzyme est stable à 45°. A 60° elle est inactivée à 50% en 5 min. (Figure 4);
- l'énergie d'activation de la phosphatase est de l'ordre de 6300 cal. mol.⁻¹.

2 - 2 - 4
 Du pyruvate à l'acétyl-coenzyme A
 J.-L. Jacob

From pyruvate to acetyl coenzyme A

The conversion of pyruvate to acetate or to acetyl coenzyme A is a key step in the isoprene metabolism of latex. Very little is known about it. The various biochemical means likely to reveal how it functions are reviewed. The results already obtained are briefly recalled, namely : the existence of a decarboxylase pyruvate (E.C. 4.1.1.1), the obtaining of an acetyl coenzyme A from carbon-14 acetaldehyde, demonstration of the existence of an acetyl-thiokinase (E.C. 6.2.1.1.) and the functioning of a citrate-lyase (E.C. 4.1.3.8.).

★

L'acétylcoenzyme A est le précurseur initial de l'anabolisme isoprénique.

Il provient de la transformation du pyruvate produit par la glycolyse. Cette transformation représente certainement une étape clef dans la synthèse isoprénique. Elle doit probablement être impliquée dans le système de régulation de l'ensemble.

Ce passage pyruvate → acétylcoenzyme A est toutefois encore mal connu au sein du latex. Des expériences ont montré qu'il fonctionnait *in vitro* (obtention de citrate ^{14}C à partir d'incubation de fructose U^{14}C) mais que son activité pour des raisons non encore précisées était très faible (l'incorporation de pyruvate U^{14}C dans le caoutchouc est beaucoup plus faible que celle d'acétate U^{14}C , dans des conditions analogues.

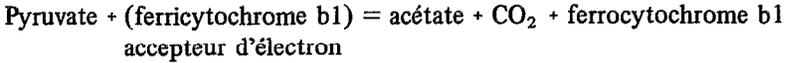
Quelles sont les possibilités diverses qui rendent compte de cette transformation biochimique et à quoi correspondent les résultats obtenus jusqu'à ce jour ?

Le schéma général (Figure 1) montre que les voies susceptibles de fonctionner sont nombreuses dans le règne vivant et qu'elles peuvent, soit aboutir directement à l'acétyl-CoA, soit passer par l'acétate et l'acétaldéhyde.

A - Le passage pyruvate → acétyl-CoA est en réalité très complexe, et fait intervenir des étapes transitoires dans lesquelles l'acide lipoïque, le Coenzyme A, le NAD ont un rôle à jouer. L'enzyme, une pyruvate décarboxylase oxydative (E.C. 1.2.4.1.) est en général particulière (notamment mitochondriale), rien n'indique si elle est présente ou non dans le latex. On peut envisager que certains organites (Frey-Wyssling par exemple) en soient pourvus.

Toutefois, il faut rappeler que l'acétyl-Coenzyme A ne traverse pas les membranes ; il doit donc, pour être utilisé dans la synthèse isoprénique, être produit dans la phase cytoplasmique du latex.

B - Lynen, en 1969, évoque la possibilité d'une pyruvate déshydrogénase fonctionnelle dans le sérum C (E.C. 1.2.2.2.). Ce serait une flavoprotéine rendant compte de la réaction suivante :



Aucun travail n'a, jusqu'à présent, confirmé son activité réelle dans le latex, mais son existence n'est pas impossible.

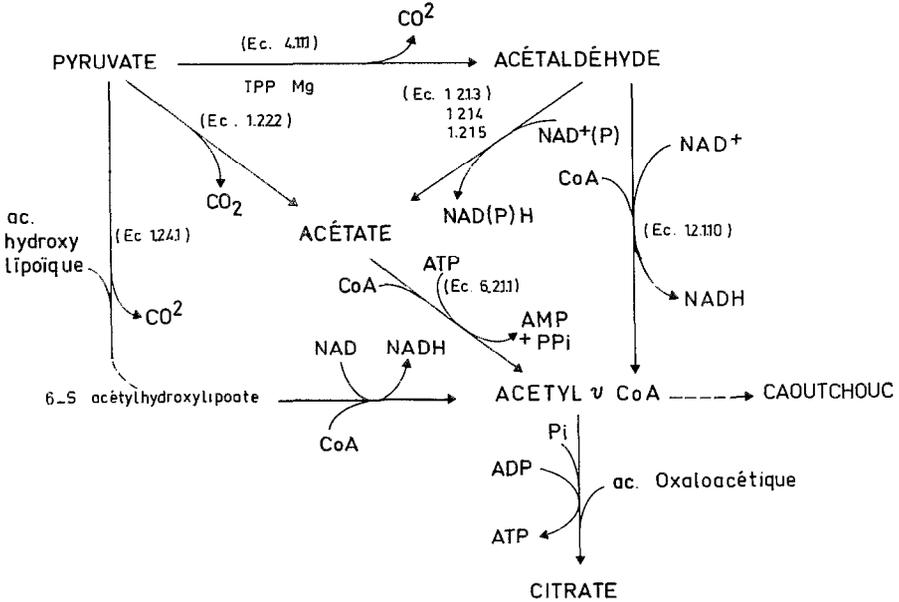


Figure 1
Schéma du carrefour pyruvique

C - La pyruvate décarboxylase (E.C. 4.1.1.1.) produisant de l'acétaldéhyde a été mise en évidence dans le sérum C (cf. d'Auzac et Jacob, Tupy, Primot).

Son optimum de pH est acide et se situe vers 5,5-6,0 à pH 7,0, son activité est presque nulle. Son fonctionnement nécessite de la thiamine pyrophosphate (TPP) et du Mg^{++} . Son activité potentielle est très faible (moins de 0,010 U.I.) *in vitro*.

D - Plusieurs voies conduisent de l'acétaldéhyde à l'acétylCoenzyme A.

La voie directe fait intervenir l'aldéhyde déshydrogénase (E.C. 1.2.1.1.0.) et utilise le NAD et le Coenzyme A.

J.L. JACOB et J. d'AUZAC - Rapport de recherches n° 66. I.F.C. (1968).

J. TUPY - Rapport n° 861, A.I.E.A. Physiologie de l'hévéa, (1975).

L. PRIMOT - cf. chapitre 2-2-5.

Acétaldéhyde + Coenzyme A + NAD⁺ — acétyl-Coenzyme A + NADH

La voie indirecte donne en premier lieu de l'acétate. L'enzyme impliquée peut être plus ou moins spécifique du NAD ou du NADP (E.C. 1.2.1.3., 1.2.1.4., 1.2.1.5.).

Au sein du latex, si l'on sait que l'acétaldéhyde U¹⁴C peut être transformé en acétyl-CoA (¹⁴C) pour donner ultérieurement du citrate marqué, aucun résultat ne permet de dire quelle est ou quelles sont les réactions mises en jeu.

E - Le fonctionnement de l'acétylthiokinase (E.C. 6.2.1.1.) par contre a été clairement démontré au sein du latex (Lynen ; d'Auzac et Jacob), soit par l'utilisation d'hydroxamate piégeant l'acétyl-coenzyme A formé, soit en incubant de l'acétate ²¹⁴C qui donne dans des conditions appropriées du citrate marqué.

Cette enzyme du latex n'a pas été étudiée, mais (*in vitro* au moins) son activité potentielle très faible semble être un facteur limitant du passage pyruvate → acétyl-Coenzyme A dans la mesure où cette voie est réellement empruntée.

Ce peut être une enzyme très labile qu'il faudrait étudier immédiatement après la récolte du latex.

F - Il faut parler, presque en annexe, de la synthèse du citrate. Elle a été montrée *in vitro* dans le latex. L'enzyme responsable de cette production semble être la citrate lyase (E.C. 4.1.3.8.)

Acétyl-Coenzyme A + ac. oxaloacétique + Pi + ADP → ATP + Citrate + Coenzyme A

L'ADP semble en effet nécessaire au bon fonctionnement de la réaction.

Il faut noter que cette synthèse s'accompagnerait également d'une régénération d'ATP, ce qui, sur le plan énergétique, est très important au sein des laticifères où le cycle de Krebs notamment semble peu actif.

En conclusion, le passage pyruvate acétyl-Coenzyme A apparaît comme une étape cruciale et peu connue du métabolisme isoprénique dans le latex. Les informations partielles actuellement disponibles sont insuffisantes pour éclairer ce problème. Il semble nécessaire de faire un effort pour préciser les mécanismes réels mis en jeu, si l'on veut parvenir à comprendre la régulation globale de la synthèse du caoutchouc.

2 - 2 - 5
Pyruvate décarboxylase
 L. Primot

Decarboxylase pyruvate

When carbon-14 pyruvate is incubated in fresh latex at pH 6.0, it is shown to possess intense decarboxylase activity. This decreases as the pH increases and disappears at pH 7.0.

This result raises the question whether or not decarboxylase pyruvate participates in the synthesis of isoprene.

★

Les résultats trouvés par Jacob et Tupy montrent une décarboxylation maximale du pyruvate à pH voisin de 6 et pratiquement nulle à pH 7,0.

Nous avons voulu vérifier ces résultats sur latex frais dans des conditions aussi proches que possible des conditions *in vivo*. Le latex prélevé est centrifugé sur champ. La fraction blanche est aussitôt incubée avec du pyruvate 1 C^{14} .

La figure 1 montre que le pH optimum de la décarboxylation est situé aux environs de 6 (vraisemblablement inférieur à 6). Nous n'avons pas testé l'activité en dessous de pH 6 car le milieu est alors difficile à tamponner et le latex devient instable.

Nous pouvons donc penser qu'à pH 7,0, la transformation pyruvate-acétate est très faible. Or, c'est à ce pH que la production est importante comme on a pu le voir précédemment. Il y a donc là une contradiction apparente. On peut penser que la stimulation qui augmente le pH agit plus au niveau de l'écoulement que de la biosynthèse du caoutchouc. On peut en effet noter qu'après stimulation l'extrait sec du latex décroît.

Il faut enfin comparer ces résultats à ceux trouvés par Jacob sur d'autres systèmes enzymatiques tels que la phosphoénol-pyruvate carboxylase. L'intégration de l'ensemble de ces travaux permet d'entrevoir un système régulateur au niveau du pyruvate.

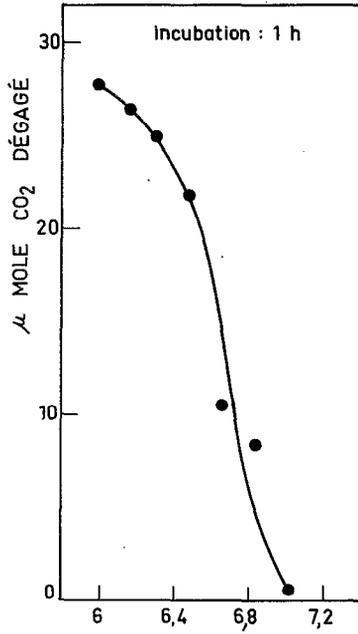


Figure 1

Décarboxylation du pyruvate en fonction du pH

Les incubations ont été faites sur latex frais débarrassé des lutoïdes et tamponné aux différents pH par un tampon phosphate.

Milieu d'incubation : 0,9 ml de latex tamponné ; 0,1 ml de pyruvate (0,1 mM/0,25 μCi).

★

2 - 2 - 6
Importance du pH dans la production du latex
 L. Primot

The pH of latex

A close positive relationship has been shown to exist between the pH of latex and the production of the tree from which it is obtained.

★

Nous avons déjà vu, dans l'étude de la microsaignée, des variations de pH du latex provoquées par la stimulation. Nous avons voulu préciser les relations existant entre pH et production.

La figure 1 montre l'effet de la stimulation à l'Ethrel sur le pH et la production en fonction de l'intervalle de temps séparant la stimulation de la saignée.

On peut noter qu'il existe une relation étroite entre pH et production. On obtient la production maximale lorsque le pH atteint sa valeur maximale.

Tupy avait déjà montré qu'en fin d'écoulement, le pH du latex baisse sensiblement. Enfin, les clones connus pour coaguler rapidement ont un latex à pH faible. Il y a donc une liaison étroite entre pH et écoulement.

Il faut aussi noter que certaines activités enzymatiques sont très sensibles aux variations de pH dans la zone comprise entre pH 6 et pH 7.

C'est le cas en particulier de l'invertase et de la pyruvate décarboxylase.

Enfin, tous les traitements connus pour augmenter la production augmentent aussi le pH du latex.

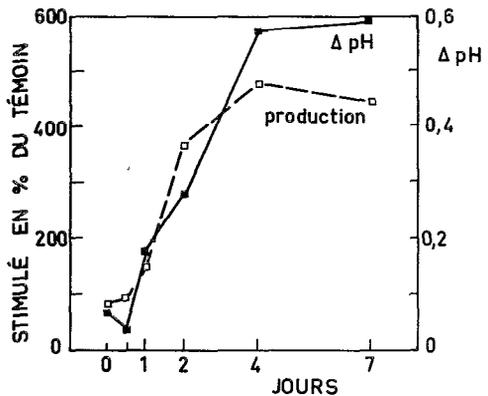


Figure 1 -
 Évolution du pH du latex et de la production en fonction du nombre de jours séparant la stimulation de la saignée

J. Tupy - *J. Exp. Bot.*, 24, 516-524, (1973).

★

2 - 2 - 7
**Schéma général des problèmes de régulation de la
 synthèse isoprénique**
 J.-L. Jacob

Isoprene synthesis regulation

A study of the synthesis of isoprene in latex has revealed the existence of a number of stages or reactions which play a part in the regulation process.

The first corresponds to the functioning of invertase. The second concerns the conversion of pyruvate into acetyl-coenzyme A. The third which accounts for the reduction of hydroxy methyl glutaryl coenzyme A to mevalonic acid, raises the problem of the metabolism of NADPH (synthesis, reduction and hydrolysis) which is necessary for it to function. The fourth raises the major problem of the production and regeneration of energy essential to the synthesis as a whole, especially via the metabolism of the phosphate nucleotides.

A mechanism is proposed for the regulation of the metabolism of isoprene, its prime object being to show the importance of pH variations within the latex and to clarify one of the possible roles of citric trapping by the lutoids.:

★

Le schéma général de la synthèse isoprénique est maintenant connu (figure 1). Il implique trois problèmes fondamentaux :

- un problème d'approvisionnement et de transformation des matières premières, en l'occurrence les sucres ;
- un problème d'ordre énergétique, la synthèse nécessitant de l'ATP ;
- un problème de pouvoir réducteur, le NADPH étant nécessaire à l'anabolisme isoprénique.

Les travaux réalisés à ce jour tant par les équipes anglophones que franco-phones ont permis de préciser les étapes susceptibles d'intervenir dans la régulation du fonctionnement d'ensemble de ce vaste processus métabolique.

Il est possible d'en désigner quatre principales :

- la première correspond au clivage du saccharose en glucose et fructose par l'invertase ;
- la seconde rend compte du passage pyruvate → acétyl-coenzyme A ;
- la troisième se situe à la transformation du HMG-CoA en acide mévalonique par l'intermédiaire de la HMG-CoA-réductase ;
- le quatrième groupe, les réactions de phosphorylation catalysées par la mévalonate kinase, la phosphomévalonate-kinase, et la pyrophosphomévalonate décarboxylase.

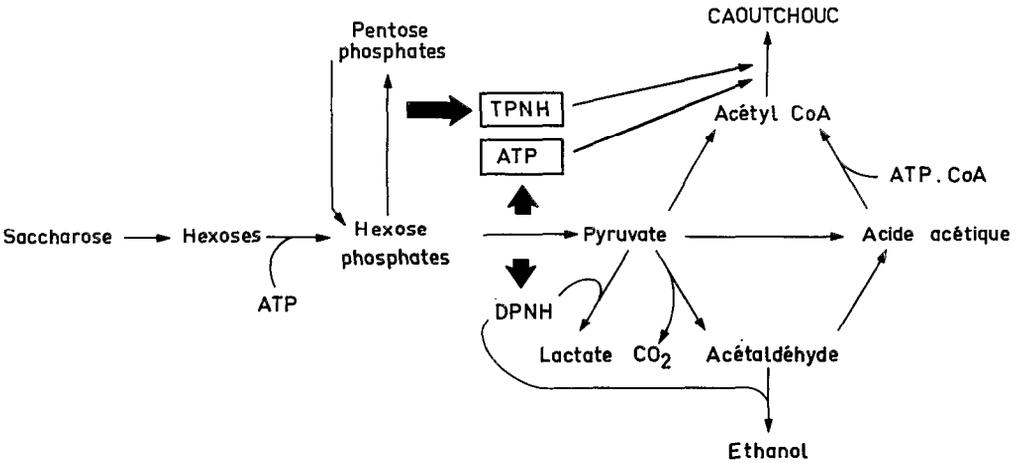


Figure 1

Les relations entre la glycolyse et la synthèse du caoutchouc

Quels sont les facteurs capables d'influencer l'activité de chacune de ces étapes et, par conséquent, la synthèse du caoutchouc ?

a - L'invertase

Il ne fait plus de doute que l'invertase catalyse une étape limitante et, par conséquent, régulatrice de la glycolyse (cf. travaux de Tupy*).

Le fonctionnement de cette enzyme est lié en premier lieu à la concentration en saccharose du latex. Cette concentration est elle-même dépendante non seulement de la synthèse chlorophyllienne, mais aussi du transport phloémique de ce sucre et de son passage au sein des laticifères.

En deuxième lieu, Tupy** a clairement montré que le pH joue un grand rôle dans l'activité invertase. L'enzyme fonctionne très bien à un pH faiblement basique (7,2 - 7,3) mais une légère modification du milieu entraîne une forte variation de son activité.

Enfin, Tupy et Primot ont mis en évidence l'inhibition de l'invertase par le magnésium. Cette inhibition est relativement beaucoup plus importante à pH 6,5 (80%) qu'à pH 7,2 (30%) dans des conditions analogues.

Soulignons, dès maintenant, la grande influence que semble avoir le facteur pH du milieu en ce qui concerne cette étape.

J. TUPY* - *Physiol. vég.*, 11, 633-641, (1973).

J. TUPY** - *J. Exp. Bot.*, 24, 516-524, (1973).

J. TUPY et L. PRIMOT - Rapport annuel I.R.C.A., (1973).

b - Le passage pyruvate → acétyl coenzyme A

Il est encore mal connu ; selon les résultats obtenus à ce jour (cf. paragraphe 2.2.4), la pyruvate-décarboxylase, présente au sein du latex, transformerait le pyruvate en acétaldéhyde qui, ultérieurement, donnerait soit de l'acétate, soit de l'acétyl-CoA comme l'ont montré certaines expériences *in vitro*.

Il faut noter au passage que la pyruvate-décarboxylase a un optimum de pH acide (pH 5,5 - 6,0) et que son activité, contrairement à celle de l'invertase, diminue considérablement lorsque le pH atteint la neutralité.

Par ailleurs, l'existence d'une lactate déshydrogénase et d'une alcool-déshydrogénase actives dans le sérum cytoplasmique, implique une compétition très sérieuse entre la production de lactate et d'éthanol d'une part et celle d'acétyl-coenzyme A précurseur du polyisoprène d'autre part, à partir de pyruvate et d'acétaldéhyde. Cette compétition mise en évidence dans des expériences *in vitro*, doit absolument être évitée *in situ* (Jacob). Deux possibilités sont envisageables :

- une carence de NADH nécessaire au fonctionnement de la lactate et de l'alcool déshydrogénase par l'intermédiaire de mécanismes utilisant le cofacteur réduit ;
- une inhibition de ces réactions par un facteur déterminé, dans certaines conditions.

L'analyse du carrefour phosphoénolpyruvique (figure 2) a permis d'éclairer ce problème. En effet, l'existence dans le latex d'une phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) (EC 4.1.1.31) enzyme active surtout à pH basique ($\neq 7,5$), rend compte de la synthèse ac. oxaloacétique (AOA). L'ion HCO_3^{3--} nécessaire à la réaction est produit abondamment, soit lors du passage pyruvate-acétate, soit lors de la production du maillon isopenténylpyrophosphate. L'AOA formé, en présence de NADH est réduit immédiatement en malate grâce à une malate déshydrogénase. L'activité potentielle de cette enzyme est telle qu'elle peut jouer le rôle de pompe à NADH aux dépens de la lactate et de l'alcool déshydrogénase dont l'activité est bien plus faible, à condition bien sûr que la quantité d'AOA produit soit suffisante pour épuiser le cofacteur réduit disponible.

On peut imaginer qu'il existe d'autres processus de «détoxification du NADH» susceptibles d'éviter une dérivation métabolique vers le lactate et l'éthanol, tels que le système cytochrome c deshydrogénase mis en évidence dans les membranes lutoïdiques*.

Par ailleurs, il faut noter qu'une diminution de pH, résultant par exemple d'une accumulation de malate, provoque consécutivement une diminution de l'activité PEPC. Cette acidification va entraîner une inhibition de la lactate-deshydrogénase et de l'alcool-deshydrogénase par des teneurs physiologiques d'ATP (d'Auzac,

J.L. JACOB - *Physiol. vég.*, 8, 395-411, (1970).

* F. MOREAU, J.L. JACOB, J. DUPONT et C. LANCE - *Biochim. Biophys. Acta*, 396, 116-124, (1975).

J. d'AUZAC et J.L. JACOB - *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 80, 143-156, (1968).

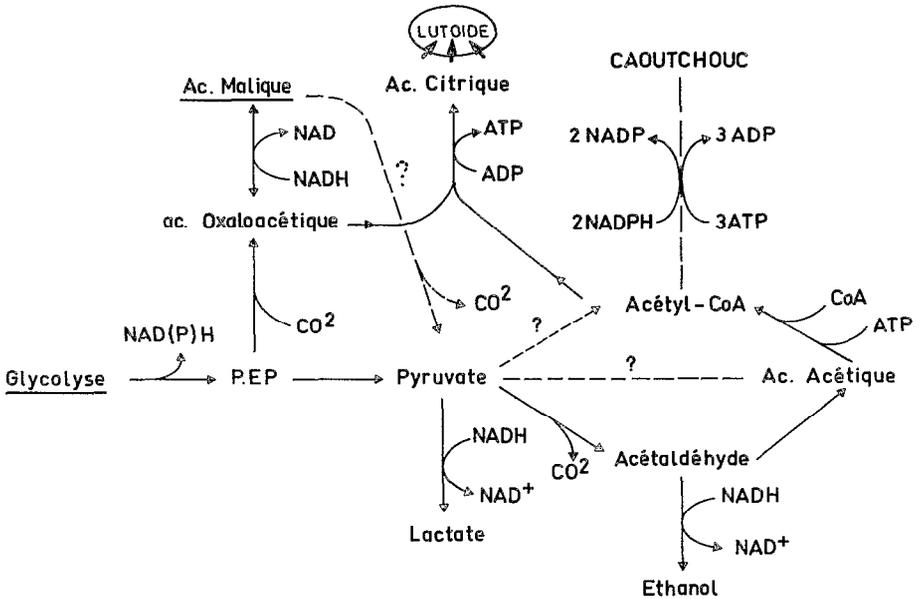


Figure 2

Schéma général du métabolisme dans le latex

Jacob). Là encore, le fonctionnement pyruvate \rightarrow acétyl-coenzyme A doit être favorisé, d'autant que la pyruvate-décarboxylase est activée.

L'importance du facteur pH apparaît aussi nettement que dans le paragraphe précédent.

c - L'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase

La très faible activité potentielle de cette enzyme est déjà un facteur limitant dans l'enchaînement de l'anabolisme isoprénique (Hepper).

Comme elle ne fonctionne bien qu'en présence de NADPH, la quantité de ce cofacteur réduit sera aussi un facteur important susceptible d'influencer l'activité de cette étape essentielle dans la synthèse du caoutchouc.

Trois problèmes sont à considérer :

- la synthèse du NADP (H) ,
- la régénération du cofacteur réduit ;
- sa destruction par des phosphatases spécifiques ou non.

- synthèse du NADP(H)

Aucun travail n'a été fait à ce jour pour approfondir ce processus et il serait souhaitable que ce sujet soit abordé.

- régénération du NADPH

Deux voies métaboliques sont capables de réaliser cette régénération au sein du latex (Figure 3) :

- la voie oxydative des pentoses par l'intermédiaire de la glucose-6-phosphate deshydrogénase (Arreguin) ;
- la régénération du NADPH se fait alors aux dépens d'une molécule d'hexose ;

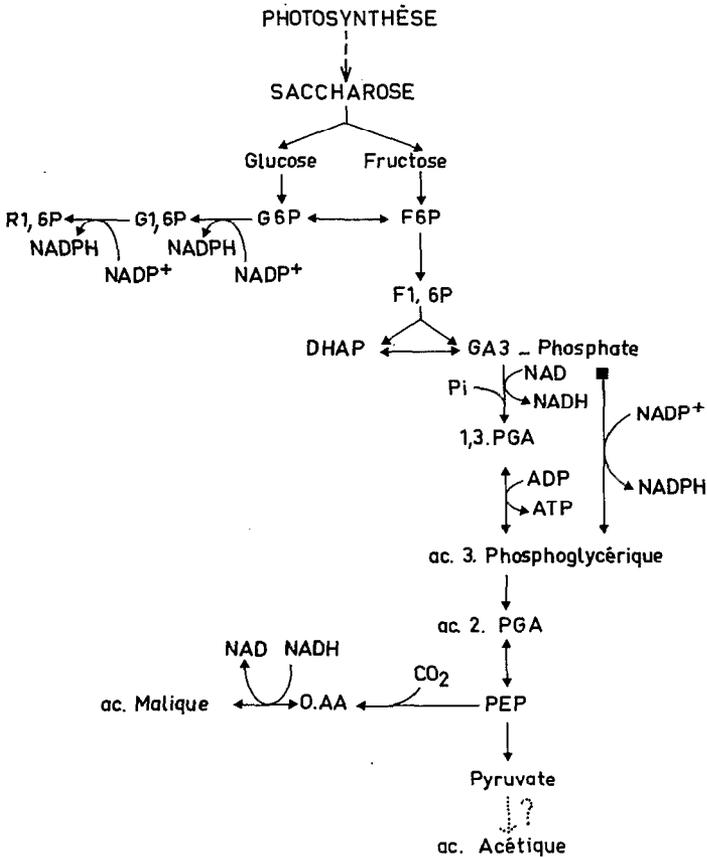


Figure 3

Schéma du catabolisme glucidique dans le latex

- la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (E.C. 1.2.1.9.) non phosphorylante qui donne de l'acide 3-phosphoglycérique (Jacob - d'Auzac) ; la régénération du NADPH se fait alors aux dépens de la régénération d'une molécule d'ATP puisque, contrairement à son homologue phosphorylante d'ailleurs fonctionnelle dans le latex, elle court-circuite l'étape catalysée par la phosphoglycérate kinase, génératrice d'ATP.

Il est difficile de dire actuellement quelle est la voie la plus utilisée. Il est probable qu'elles fonctionnent toutes les deux et différemment selon les conditions à un moment donné.

- la dégradation du NADP (H)

Compte tenu des très faibles quantités de NADP trouvées au sein du latex, ce processus peut avoir un rôle important dans la limitation de la synthèse isoprénique.

Toutefois, il faut tenir compte des stress provoqués notamment lors de la saignée et qui se traduisent par la libération de phosphatases acides lutoïdiques capables d'hydrolyser le NADP (H).

Néanmoins, une enzyme nouvelle, étroitement spécifique du cofacteur : une 2'nucléotidase (Jacob - Sontag) a été mise en évidence récemment dans le sérum cytoplasmique du latex. Elle s'oppose donc à la synthèse du caoutchouc par destruction du cofacteur. Son inhibition doit être un facteur favorable à l'élaboration du polyisoprène ; ceci a pu être vérifié *in vitro* en utilisant du cuivre qui est, même à très faible concentration, un inhibiteur extrêmement puissant de la 2'nucléotidase.

d - Les étapes ATP dépendantes

Le problème majeur est, dans ce cas, la régénération de l'ATP. Elle est surtout réalisée par la glycolyse. Mais cette somme d'énergie n'est probablement pas la seule, d'autres processus dont il est difficile d'apprécier actuellement l'activité réelle doivent intervenir, telle que la synthèse de citrate par l'intermédiaire de la citrate lyase (E.C. 4.1.3.3.).

Ce sujet semble important et mérite d'attirer l'attention.

Un deuxième aspect à considérer est la dégradation de l'ATP par des phosphatases acides. En réalité, seules les enzymes lutoïdiques sont capables d'hydrolyser efficacement le cofacteur, et leur localisation réduit certainement beaucoup leur rôle *in situ*. Par ailleurs, il faut noter que l'ATP est toujours sous forme ATP-Mg au sein du latex, compte tenu de la concentration respective, de ces deux produits, or ce chélat est difficilement attaqué par les monostéarases lutoïdiques.

J.L. JACOB et J. d'AUZAC - *Eur. J. Biochem.*, 31, 255-265, (1972).

J.L. JACOB et N. SONTAG - *Eur. J. Biochem.*, 40, 207-214, (1973).

Examinons, pour terminer, un schéma de régulation partielle du métabolisme isoprénique au vu de certains résultats évoqués précédemment.

— l'augmentation du pH au sein du latex :

- active le fonctionnement de l'invertase et par conséquent de la glycolyse ;
- active le fonctionnement de la PEPC, qui a pour effet :
 - d'accélérer la synthèse d'AOA et de malate,
 - d'épuiser conjointement le NADH du milieu, tout en évitant la formation de lactate et d'éthanol.

— l'accumulation de malate consécutive au processus précédent va entraîner une diminution du pH, qui pourra se traduire par :

- une diminution de l'activité invertasique et PEPC entraînant une diminution de la synthèse de malate,
- une inhibition de la lactate deshydrogénase et de l'alcool deshydrogénase par l'ATP,
- une activation de la pyruvate décarboxylase et par conséquent de la production d'acétyl-Co A.

Or, en présence d'acétyl-Co A, l'AOA peut donner aisément du citrate, lequel peut être piégé par les lutoïdes d'autant plus facilement que la citrate lyase mise en jeu produit de l'ATP susceptible d'activer ce piégeage. Il en résulte que la quantité de malate du sérum cytoplasmique transformé en citrate via l'AOA, diminue.

Le fonctionnement d'une enzyme malique évoqué par d'Auzac qui produirait du pyruvate à partir du malate, transformant ainsi un acide fort en acide faible peut également intervenir.

Dans tous les cas, il s'ensuit une augmentation de pH qui nous ramène aux conditions du début.

Cette hypothèse ne se veut en aucun cas définitive, car beaucoup de paramètres ne sont pas encore connus qui doivent entrer en ligne de compte. Toutefois, elle permet d'envisager une esquisse de la régulation générale conduisant à l'idée que la synthèse du caoutchouc est peut-être sous l'influence d'un certain rythme, notion de plus en plus répandue en physiologie et qui ouvre des horizons nouveaux à la compréhension des phénomènes biologiques.

Elle aide enfin à percevoir plus nettement l'importance du piégeage citrique par les lutoïdes, dans un cadre métabolique non plus ponctuel mais beaucoup plus global.

J. d'AUZAC et C. LIORET - *Physiol. vég.*, 12, 617-635, (1974).

J. d'AUZAC - Thèse de Doctorat d'État, 5447, Paris, 1965.

Il faut souligner que de ces travaux assez fondamentaux, de ces résultats souvent spécifiques, a pris naissance une notion de fatigue des tissus laticifères qui, sur le plan pratique, est de la plus grande importance. Ainsi, l'étude de la teneur en saccharose du latex, qui traduit l'approvisionnement et l'utilisation des sucres, peut être utilisée comme critère de réponse à la stimulation mais oriente également l'exploitation vers des méthodes nouvelles telles que la microsaignée, mieux adaptées à la physiologie de l'hévéa.

★

2 - 3
Protéines et leur métabolisme

Certes, la biologie moléculaire est à la mode, ce n'est pas cependant la raison suffisante qui a poussé à entreprendre des études dans ce domaine.

Deux types d'études sont en cours :

- 1 - l'alimentation en acides aminés du latex et leur répartition dans ses différents compartiments (Hanower-Brzozowska) ;
- 2 - la protéinogénèse dans le latex et ses variations en liaison avec la fatigue et la stimulation (Coupé).

Ces deux types d'études sont complémentaires.

Certes, l'alimentation en saccharose et le catabolisme glucidique sont à la base de la genèse du polyisoprène. Il n'en reste pas moins que l'alimentation azotée et la biosynthèse protéique sont à la base du bon fonctionnement de la machinerie enzymatique.

2 - 3 - 1
La protéinogénèse
M. Coupé

Proteinogenesis

It has been previously shown that stimulation with Ethrel increases the production of the hevea and at the same time increases the degree of polymerisation of the ribosomes and the ribosome RNA content of the latex.

It has been found here that scratching of the suberified part of the panel induces overproduction, an increase in polymerisation of the ribosomes and a decrease in the burst index of the lutoids.

In addition, compounds as diverse as Ethrel naphtalene acetic acid and 2,4 D on the one hand, and H_3BO_3 , $CuSO_4$, and $HgCl_2$ on the other, have identical and similar effects to those produced by scratching (i.e., increase in production and polymerisation of the ribosomes, of the pH of the latex, and a decrease in the burst index of the lutoids).

The result of intensifying tapping is to momentarily give rise to overproduction and to produce the same changes in the latex.

If the number of days which elapse (from 0.5 to 7) between application of a stimulating paste (Ethrel) and the first tapping is considered, it appears that the ribosome polymerisation index increases very rapidly (0.5 day), production and the pH of the latex increase after 1 day, whereas the effect on the burst index and on the acid phosphatase only appear after 4 days.

An increase in productivity would be automatically accompanied by the variations mentioned above. The ethylene produced as the result of the various treatments used could act, like all the hormones, either by derepressing certain genes (polymerisation of ribosomes), or by modifying permeability of the membranes (rise in pH).

★

Il a été montré, dans une publication antérieure (Coupé, d'Auzac, 1974-1) que l'application d'Ethrel sur le panneau de saignée de l'hévéa en même temps qu'elle augmente la production de latex a pour effet d'augmenter le degré de polymérisation des ribosomes et le taux de RNA ribosomique du latex.

Nous avons, par la suite, comparé l'action de l'Ethrel à celle d'autres produits augmentant la production en latex et nous avons par ailleurs examiné les latex d'arbres stimulés 0.5, 1, 2, 4 et 7 jours avant la récolte afin d'étudier la cinétique d'action de l'Ethrel sur l'indice de polymérisation des ribosomes. Divers paramètres ont été considérés car ils sont susceptibles d'intervenir dans la surproduction de latex résultant de la stimulation :

- l'indice d'éclatement des lutoïdes (IE) a été particulièrement examiné par Ribailhier (1972). Il a montré notamment qu'un traitement à l'Ethrel conduit à une meilleure intégrité des lutoïdes. En conséquence, la moindre libération d'hydrolases qui en résulte favorise logiquement l'anabolisme de la cellule laticifère et, dans notre cas particulier, une moindre libération de RN-ase est favorable au maintien de l'intégrité des polyribosomes.
- le pH du latex a été pris sérieusement en considération par Tupy (1973) et Primot. Il est apparu que le pH augmente après stimulation. De ce fait l'activité de l'invertase qui dépend fortement du pH est exaltée. Il en résulte une disponibilité accrue en matière première et en énergie pour la cellule laticifère, ce qui est favorable à une exaltation de la biosynthèse du caoutchouc.
- l'indice de polymérisation des ribosomes reflète l'activité de biosynthèse des protéines qui s'effectue au sein du latex (Coupé, d'Auzac, 1972 et 1974.2) et, par

M. COUPÉ et J. d'AUZAC - 1972 - *C. R. Acad. Sci.*, D, 274, 1031-1034.

M. COUPÉ et J. d'AUZAC - 1974.1 - *Physiol. vég.*, 12, (1), 1-11.

M. COUPÉ et J. d'AUZAC - 1974.2 - *Phytochemistry*, 13, 85-88.

D. RIBAILLIER - 1972 - Thèse Doctorat d'État, Abidjan.

J. TUPY - 1973 - *Physiol. vég.*, 11, (4), 633-641.

conséquent est une mesure de sa régénération. Il a été précédemment mis en évidence une augmentation de l'indice de polymérisation (Coupé, d'Auzac, 1974.1) ce qui permet de penser que la stimulation de la production est liée à une augmentation de la synthèse des protéines.

1 - Comparaison des stimulations par grattage du panneau de saignée et sous l'action de produits chimiques tels H_3BO_3 , $CuSO_4$, $HgCl_2$, ANA, 2,4-D et Ethrel.

Il apparaît que le grattage de la partie subérimifiée du panneau de saignée induit dans le même temps une augmentation de la production et de l'indice de polymérisation (Figure 1) tandis que chute l'activité phosphatasique libre (Pal) et l'indice d'éclatement des lutoïdes.

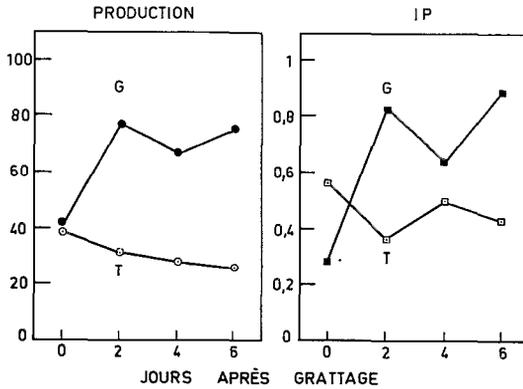


Figure 1

Effets du grattage du panneau de saignée
(2 bandes de 15 cm de large de part et d'autre de l'encoche)
sur la production (g/arbre/saignée) et l'indice de polymérisation des polysomes (IP)

Les traitements hormonaux (Ethrel, ANA, 2,4-D) et des traitements minéraux (H_3BO_3 , $CuSO_4$, $HgCl_2$) ont des effets identiques et par ailleurs analogues à ceux du grattage : augmentation de la production et de l'indice de polymérisation, chute de l'activité phosphatase libre et de l'indice d'éclatement (Figure 2).

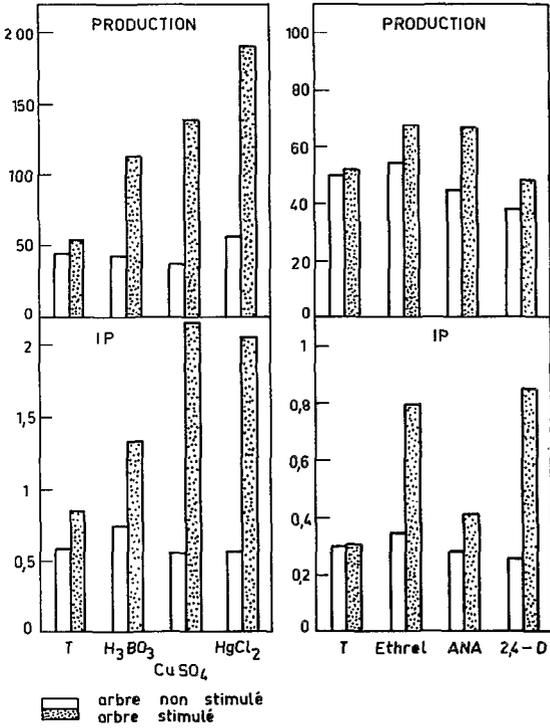
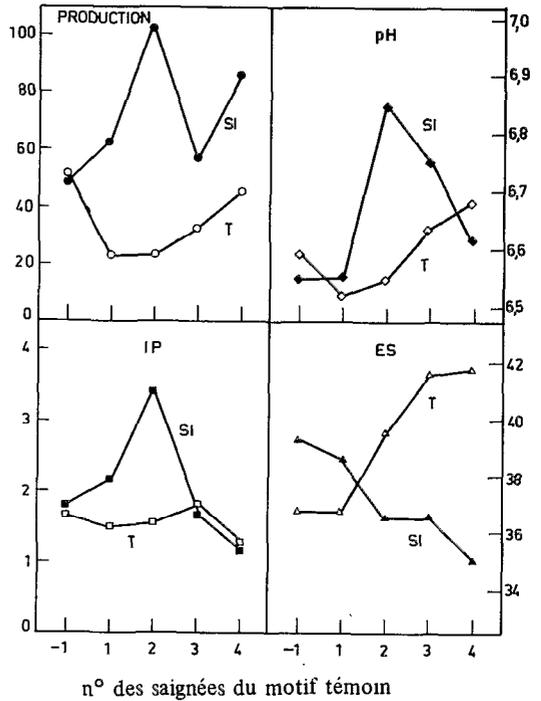


Figure 2
Effets de composés à action stimulante sur la production et l'indice de polymérisation des ribosomes (IP)

Figure 3
Action de la saignée intensive (SI) : (5' saignées par semaine) sur la production, l'indice de polymérisation des ribosomes, le pH et l'extrait sec du latex



2 - Comparaison des effets de la saignée intensive et de la stimulation à l'Éthrel

Sous l'action d'une intensification de la saignée, il apparaît une augmentation de la production s'accompagnant d'une élévation transitoire de l'indice de polymérisation. Le pH du latex augmente de même, temporairement (Figure 3).

La stimulation par l'Éthrel a pour effet une très nette augmentation de la production perceptible jusqu'à la sixième saignée après traitement. L'indice de polymérisation des ribosomes augmente fortement dès la première saignée après stimulation puis a tendance à décroître. Le pH du latex augmente sensiblement surtout à la deuxième saignée après stimulation et se maintient au dessus du témoin jusqu'à la sixième saignée. D'une façon générale, dès la onzième saignée, tous ces paramètres tendent à revenir au niveau des valeurs du témoin. Remarquons que la quatrième saignée après stimulation a été précédée de 24 heures par une saignée non prévue. Celle-ci s'est traduite par une augmentation de la production et de l'indice de polymérisation à la quatrième saignée (Figure 4).

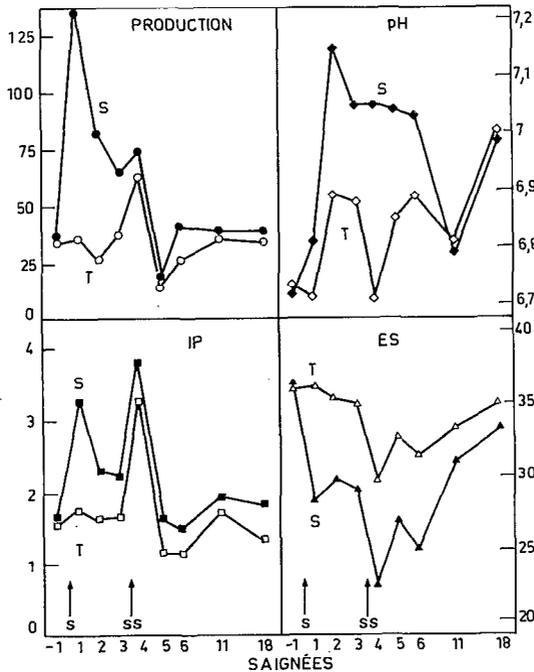


Figure 4

Effet de la stimulation à l'Éthrel (S) sur la production (g/arbre/saignée), le pH, l'indice de polymérisation (IP) et l'extrait sec (ES)

s : stimulation, ss : saignée supplémentaire

3 - Cinétique de l'action de l'Ethrel sur le latex

On a considéré la variation de plusieurs paramètres du latex en fonction du nombre de jours (de 0,5 à 7) qui se sont écoulés entre l'application du stimulant et de la première saignée.

Il apparaît que la production en latex et son pH augmentent sensiblement dès 24 heures après le traitement. Alors que l'effet sur la Pat et l'indice d'éclatement des lutoïdes n'est très net qu'après quatre jours, il faut remarquer par contre que l'augmentation de l'indice de polymérisation des polysomes est sensible douze heures après le traitement à l'Ethrel. (Figure 5).

La stimulation a, par ailleurs, un effet sensible sur les ARN du latex : on constate une baisse de l'ARN soluble et une augmentation des ARN ribosomaux et totaux. Cet effet est décelable deux jours après stimulation pour l'ARN ribosomal, il est plus tardif pour l'ARN total.

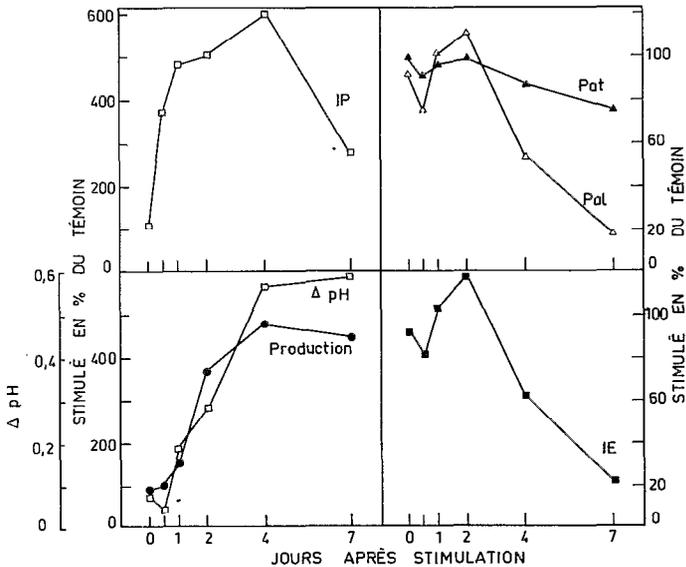


Figure 5

Variation de quelques paramètres du latex

en fonction du temps écoulé entre l'application d'ethrel et la saignée de l'arbre

IP : indice de polymérisation des polysomes

Pat, Pal : activité phosphatase totale et libre

IE : indice d'éclatement des lutoïdes

Conclusions

Nous avons constaté que des procédés très variés utilisés en hévéaculture pour stimuler la production de latex ont en commun les réponses biochimiques suivantes : augmentation de l'indice de polymérisation des polysomes, baisse de l'activité phosphatasique libre et de l'indice d'éclatement des lutoïdes.

Il apparaît donc que l'élévation du niveau de production s'accompagne généralement de l'augmentation des polysomes du latex et de son pH ; que la surproduction soit obtenue par un procédé mécanique (grattage de l'écorce, surintensité de saignée), par un procédé chimique (HgCl_2 , H_3BO_3 , CuSO_4) ou hormonal (ANA, Ethrel)

Nous constatons que le taux de polysomes et le pH du latex sont parmi les premiers paramètres touchés par la stimulation puisque ceux-ci sont affectés 12 ou 24 heures après l'application d'Ethrel sur le panneau de saignée. L'activité phosphatasique et la stabilité des lutoïdes sont modifiés plus tardivement par la stimulation (4 jours) ; on peut en conclure que l'élévation de l'indice de polymérisation que l'on observe n'est pas due à une libération de RNase lutoïdique et est donc bien significative d'une biosynthèse protéique accrue.

L'élévation du taux de ribosomes présent sous forme de polysomes suggère fortement que l'Ethrel agit en déréprimant certains gènes. Des observations semblables ont été réalisées par divers auteurs avec l'AIA et l'acide gibbérélique.

L'augmentation du pH du latex pourrait refléter une modification de l'équilibre ionique du latex et serait attribuable à l'action de l'éthylène sur la perméabilité des membranes.

★

2 - 3 - 2
Les acides aminés libres du latex
J. Brzozowska et P. Hanower

The free amino acids in latex

The free amino acids in latex were studied using a «Technicon» automatic analyser. About thirty compounds which reacted with ninhydrin were listed, including some rare amino acids. Some of these were not identified.

Although the C serum contains 80% of the free amino acids in latex, if the contents are expressed as concentrations, values of the same order are obtained for the two main fractions of the latex (30 μ moles/ml of cytoplasmic or lutoid serum).

The distribution of the different classes of amino acids is very different between the C serum and the S (lutoid) serum. 57% of the amino acids in the C serum are acid amino acids, whereas 56% of the amino acids in the S serum are basic amino acids.

The overall free amino acid content of latex varies considerably during the course of the year. The figures are at their highest between August and September. Although some amino acids (e.g. glycine, serine and valine) vary very little, tyrosine fluctuates considerably. It is at a maximum in the lutoids between the end of November and February.

Stimulation with 10% Ethrel causes a rapid and substantial increase in the overall amino acid content (+ 150% after two tappings, 2.5 to 5% Ethrel giving an increase of 25%).

Proline, glutamic acid and tyrosine are especially sensitive to stimulation.

Considerable differences exist between clones if one considers the overall content, the composition and the compartmentalising of the amino acids.

Considerable variations in amino acids are found if one considers successive fractions of latex collected during the flow which occurs after a tapping has taken place.

★

Très peu de recherches ont été consacrées aux acides aminés libres du latex. Jusqu'à ces tout derniers temps, les seules données quantitatives dont on disposait concernaient la teneur globale en aminoacides et la somme des acides aspartique et glutamique (d'Auzac, 1965 ; Chai Kim Chum et coll., 1969). Il importait de

J. d'AUZAC - Thèse d'État (1965), n° AO 5447, Paris.

CHAI KIM CHUM - Rapport annuel I.R.C.C. (1969).

comblent cette lacune, d'autant plus que la disponibilité en acides aminés libres pour les réactions de biosynthèse, notamment pour la synthèse protéique, pourrait être un des facteurs limitant la régénération du latex prélevé par la saignée.

Les étapes successives de l'étude que nous avons entreprise à l'aide d'un auto-analyseur d'amino-acides (Technicon) ont été les suivantes :

- inventaire des acides aminés libres du latex (PR 107) ;
- répartition entre les deux principaux compartiments du latex, le sérum cytoplasmique et les lutoïdes (Brzozowska et coll., 1974).
- variations en fonction des divers facteurs (arbre, saison, stimulation, clone, écoulement).

Inventaire

Une trentaine de composés positifs à la ninhydrine ont été inventoriés (Figures 1 et 2). La grande majorité a été identifiée parmi lesquels des acides aminés rares, comme les acides $\alpha\gamma$ -diaminobutyrique et ϵ -amino-n-caproïque ; leur signification dans le métabolisme du latex reste à définir.

Les amino-acides majeurs du latex sont : acide aspartique, acide glutamique, glutamine et alanine.

La teneur globale en acides aminés libres oscille autour de 20 μ moles/ml latex.

Compartimentation

Le sérum cytoplasmique contient 80% d'acides aminés libres (teneur globale) du latex. Toutefois, exprimées par rapport au volume de sérum correspondant, les concentrations sont du même ordre dans les deux compartiments, lutoïdique et cytoplasmique : environ 30 μ moles/ml sérum.

Les différences essentielles entre les lutoïdes et le cytoplasme apparaissent au niveau des acides aminés individuels (Figures 1 et 2). Alors que le contenu amino-acide du sérum cytoplasmique est largement dominé par l'acide aspartique, l'acide glutamique et son amide et l'alanine, les lutoïdes se distinguent par une forte proportion d'acides aminés basiques (tableau 1) - plus de 50% de la teneur globale -. Un gradient de concentration important existe entre les deux compartiments au niveau des composés basiques, leur concentration dans les lutoïdes étant de 5 fois (lysine) à 20 fois (acide $\alpha\gamma$ -diaminobutyrique) supérieure à celles trouvées dans le cytoplasme.

Les différences constatées dans la distribution des acides aminés entre les lutoïdes et le cytoplasme posent, d'une part le problème des sites de leur formation et, d'autre part celui de la perméabilité sélective de la membrane lutoïdique vis-à-vis de ces composés.

SÉRUM CYTOPLASMIQUE

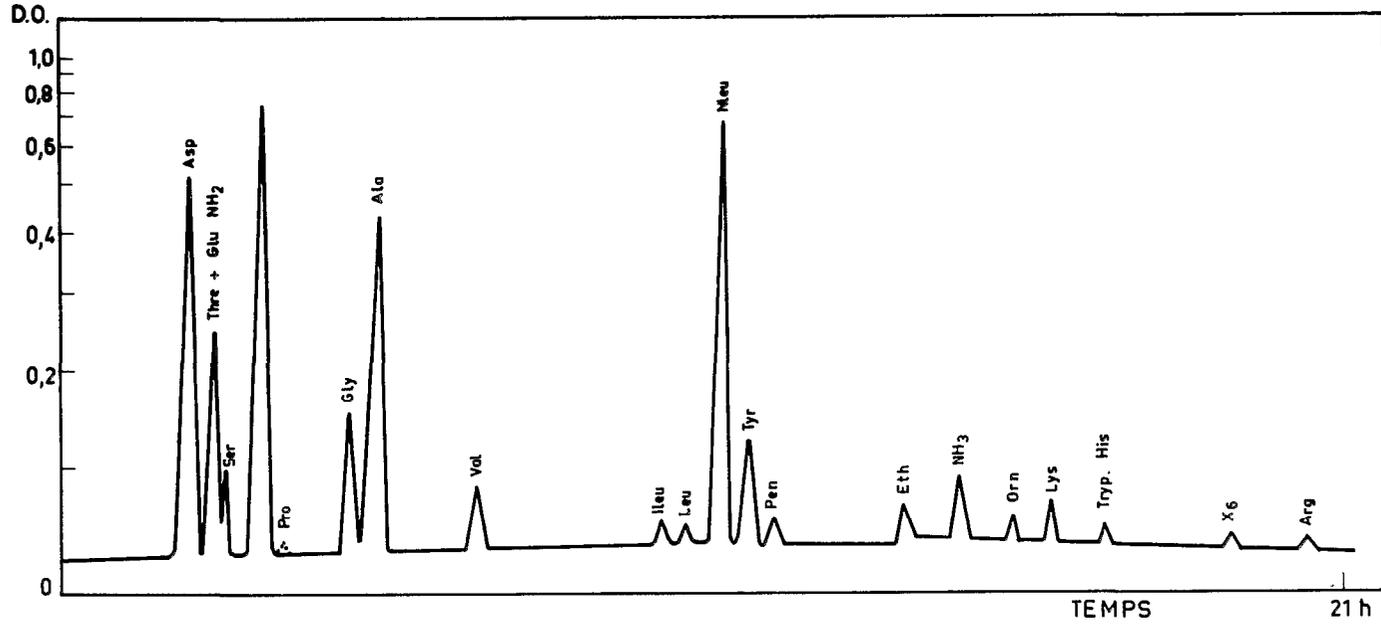


Figure 1

Acides aminés libres et autres composés positifs à la ninhydrine du sérum cytoplasmique du latex d'*Hevea brasiliensis* ; clone PR 107

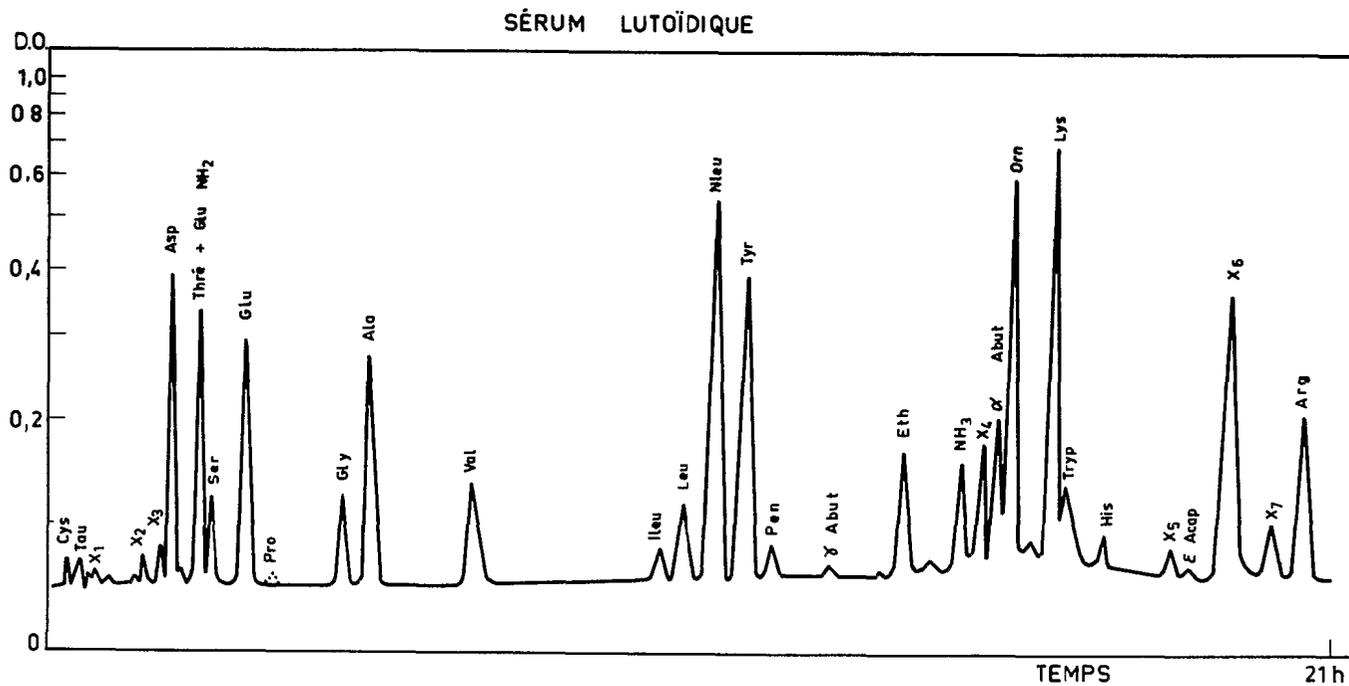


Figure 2
 Acides aminés libres et autres composés positifs à la ninhydrine du sérum lutoïdique
 du latex d'*Hevea brasiliensis* ; clone PR 107
 $X_1 - X_7$ = composés non identifiés (X_6 = dérivé guanidique)

Tableau 1

Distribution des acides aminés, acides, neutres et basiques dans les sérums cytoplasmique et lutoïdique

Groupe d'acides aminés	% du contenu amino-acide libre	
	Sérum C	Sérum L
Acide	56,9	22,9
Neutre	36,4	21,1
Basique	6,6	56,0

Variations saisonnières

Les teneurs globales en acides aminés du latex varient dans de larges limites au cours de l'année, entre la reprise des saignées (début avril) et la défoliation des arbres (janvier-février). Ces variations concernent principalement les amino-acides du sérum cytoplasmique (Figure 3).

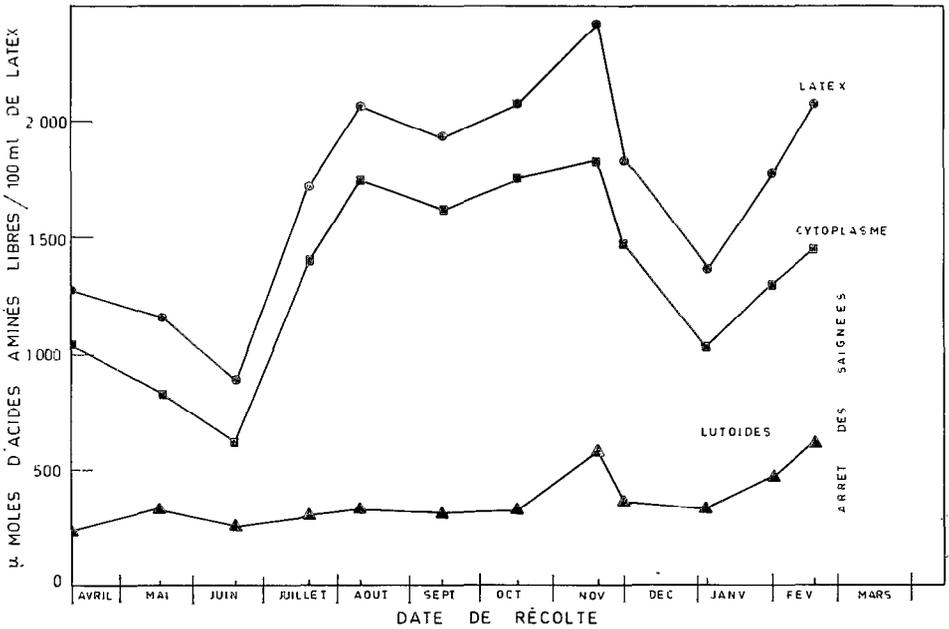


Figure 3

Variations des teneurs globales en acides aminés libres en fonction de la saison

Les valeurs maximales sont observées pendant la période allant du mois d'août au mois de novembre.

Les acides aminés individuels suivent une évolution plus ou moins importante selon le composé. Certains, comme glycine, sérine ou valine, montrent une tendance plutôt stationnaire ; d'autres, tels les quatre principaux constituants du cytoplasme, subissent au cours de l'année de larges variations. Le cas de la tyrosine mérite d'être évoqué. Cet amino-acide phénolique accuse une brusque et importante augmentation vers la fin du mois de novembre, surtout dans les lutoïdes. La forte teneur en tyrosine se maintient durant toute la période de la défoliation et ne chute qu'en février. Rappelons que c'est au cours de la même période que l'on enregistre les activités PPO les plus faibles et les teneurs globales en phénols élevées.

Action de la stimulation

Le traitement stimulant par de fortes doses d'Ethrel (10%) entraîne une augmentation rapide et importante des teneurs globales en acides aminés. L'effet maximum - 150% des témoins - est observé à la deuxième récolte après la stimulation. Les teneurs élevées en amino-acides se maintiennent pendant trois semaines ; elles diminuent ensuite et demeurent toujours légèrement supérieures à celles des témoins un mois et demi après le traitement.

Toutefois, à long terme, un effet résiduel négatif semble se manifester et les acides aminés des motifs stimulés tombent en dessous des valeurs témoins.

Il est à noter que c'est dans ce lot d'arbres stimulés à forte dose d'Ethrel que l'on a observé, par la suite, l'apparition d'un certain nombre d'encoques sèches.

Après l'application des doses plus faibles de l'Ethrel (2,5 - 5%), l'accroissement des teneurs globales en acides aminés est moindre, de l'ordre de 25%, mais on n'observe ni d'effet négatif, ni d'encoche sèche.

L'effet de la stimulation sur les acides aminés individuels est très variable selon le composé. Les traits les plus caractéristiques sont :

- apparition de la proline, pratiquement absente du latex témoin (quantité - trace),
- augmentation très importante de l'acide glutamique et, moindre, de l'alanine, principalement dans le sérum cytoplasmique,
- accroissement de la tyrosine, surtout dans les lutoïdes (à mettre en rapport avec une baisse sensible de l'activité PPO sous l'effet de la stimulation),
- baisse passagère de l'acide aspartique.

Notons que l'Éthylène pourrait entraîner une augmentation des acides aminés, entre autres, par l'intermédiaire de la glutamate déshydrogénase qui se trouve activée. Cette enzyme catalyse l'amination réductive de l'acétoglutarate pour donner de l'acide glutamique.

Différences clonales

Toutes les études citées ci-dessus ont été réalisées sur PR 107.

Afin de voir si, et dans quelle mesure, les teneurs et la composition en acides aminés libres du latex varient selon le clone, les latex des trois autres clones - Tjir 1, PB 86 et GT 1 - ont été analysés et les résultats comparés à ceux obtenus avec PR 107.

Compartimentation

Tjir 1 se distingue des autres clones par la valeur particulièrement faible du rapport acides aminés lutoïdiques/acides aminés cytoplasmiques (1/6 contre 1/4 - 1/3 pour PR 107).

Composition en acides aminés

- Tjir 1 - dans l'ensemble, assez comparable à PR 107, mais moins de tyrosine.
- PB 86 - teneur particulièrement élevée en glutamine qui, à elle seule, représente 50% du contenu amino-acide ; moins d'alanine ; nettement plus de glycine.
- GT 1 - très peu d'acide aspartique ; teneur élevée en glycine.

Ces différences doivent avoir leur signification métabolique et se répercuter sur les propriétés d'un latex donné (telles, par exemple, les propriétés coagulantes, l'aptitude au noircissement, le pouvoir oxydant ou réducteur).

Variation au cours de l'écoulement du latex

Les acides aminés ont été dosés sur chacune des fractions de 20 ml prélevées depuis le début jusqu'à l'arrêt de l'écoulement.

Les variations importantes ont été constatées tant en ce qui concerne les teneurs globales que celles en acides aminés particuliers.

Ces variations sont-elles à l'image de ce qui se passe *in vivo* ?

Le fait que les acides aminés des fractions successives proviennent des régions de plus en plus éloignées de l'encoche peut expliquer, en partie du moins, les variations observées ; il aurait été intéressant d'étudier les teneurs en amino-acides le long du tronc.

Toutefois, on ne peut pas non plus exclure la possibilité des transformations survenues sur l'encoche, durant un écoulement devenu très lent, surtout pour les dernières fractions.

☆

En guise de conclusion :

L'étude des acides aminés du latex, telle qu'elle a été conçue, couvre un programme très vaste. Elle est aussi extrêmement complexe, car on est en présence

d'un très grand nombre de variables, en plus de variabilité propre au matériel végétal lui-même. Tout en étant laborieuse et ingrate, cette étude ne nous semble pas inutile. Elle apporte un certain nombre de renseignements indispensables à la meilleure compréhension des phénomènes liés à la physiologie et à la biochimie du latex. Il y aurait lieu d'intégrer ses résultats et de les étendre dans le cas des études à entreprendre sur les arbres dont l'écorce est en voie de dessèchement sous l'influence d'une saignée trop intensive.

★

2 - 4
Les lutoïdes

2 - 4 - 1
Introduction
J. d'Auzac

On ne saurait trop insister sur le fait que les travaux, d'abord de Pujarniscle puis de Ribaillier, ont ouvert la voie à un chapitre nouveau des connaissances.

S'il apparaît clairement combien les chercheurs travaillant sur le latex bénéficient de la chance extraordinaire de pouvoir disposer en quantité illimitée de microvacuoles lysosomales, on se perd en conjectures sur le rôle des lutoïdes dans le latex d'Hévéa.

Il n'y a vraisemblablement pas d'explication simple et unique ; leur rôle est certainement complexe.

Si l'on considère l'aspect vacuole, le plus simple :

- les lutoïdes seraient un lieu de stockage des déchets du métabolisme, ou de poisons divers.

On peut l'admettre aisément pour l'ergothionéine excrétée par des champignons du sol et qui vient s'accumuler dans les lutoïdes (Archer et coll.).

Faut-il cependant considérer le citrate, la lysine et les acides aminés comme des déchets du métabolisme ?

Il en est de même pour Pm et Mg, alors qu'à la rigueur Ca, Cu, Mn peuvent être considérés comme des produits toxiques.

- les lutoïdes seraient le lieu de stockage de molécules utiles recyclables.

Est-ce que le citrate et les acides aminés basiques accumulés dans les lutoïdes peuvent être remis en circulation dans le cytoplasme pour servir à son métabolisme ?

Si l'on considère l'aspect lysosome des lutoïdes :

- les lutoïdes seraient une usine de récupération pour le démontage des molécules et plus particulièrement des macromolécules usées, ceci grâce au stock d'hydrolases intralutoïdiques.

Aucune preuve cependant :

1 - de l'absorption de macromolécules usées ou d'organites par endocytose,

2 - d'un fonctionnement des hydrolases *in situ* peut-être sont-elles inhibées ?

Le rôle des lutoïdes dans la cellule laticifère :

- *Arrêt de l'écoulement du latex*

Les lutoïdes ne seraient pas tellement les « valises suicides » des laticifères que le dispositif naturel destiné à fabriquer des « pluggs » et à arrêter l'écoulement en cas d'hémorragie.

(ce serait plus particulièrement les protéines lutoïdiques chargées positivement qui interviendraient).

- *Régulateurs du métabolisme*

Les lutoïdes pourraient intervenir en absorbant ou en libérant dans le cytoplasme des molécules diverses.

- ainsi, le citrate pourrait être exporté en tant que fournisseur d'acétyl-CoA : matière première dans la synthèse du caoutchouc. Par ailleurs, le citrate est un effecteur classique de certaines enzymes de la glycolyse (Jacob).

- la NADH-Cytochrome c-oxdoréductase membranaire pourrait intervenir dans la consommation du NADH glycolytique excédentaire (Moreau et coll.).

- l'ATP-ase membranaire lutoïdique pourrait, en tant que pompe à protons, commander tout ou partie de l'équilibre acido-basique entre les compartiments cytoplasmiques et lutoïdiques.

- *Arbres secs*

Les lutoïdes « valise suicide » interviendraient dans le déclenchement de la sécheresse sur encoche et la dégénérescence du système laticifère.

☆

Bien que l'on dispose d'un certain nombre de données expérimentales et d'hypothèses sur les lutoïdes, on est loin de pouvoir leur assigner à ce jour un rôle déterminé dans la physiologie du laticifère.

A l'éventail enzymatique lutoïdique proposé par Pujarnisclé, on a cependant pu ajouter une Peroxydase inattendue.

Partant de zéro, la connaissance de la composition enzymatique des membranes s'est notablement développée.

Il reste qu'il y a beaucoup à faire dans le « screening » des enzymes intralutoïdiques et membranaires pour avoir plus de chance de comprendre leur rôle réel dans la physiologie du laticifère et plus particulièrement dans les problèmes d'encoche sèche.

★

J.L. JACOB - *Physiol. vég.*, 8, 3, 395, (1970).

F. MOREAU, J.L. JACOB, J. DUPONT, C. LANCE - *Bioch. Biophys. Acta*, 396, 116, (1975).

2 - 4 - 2
 L'ATP-ase membranaire lutoïdique
 J. d'Auzac

Lutoid membrane ATP-ase

Membrane fractions obtained from lyophilised lutoids possess an acid phosphatase activity and an ATP-ase activity.

It is possible to characterise the ATP-ase and to study it either by inhibiting the acid phosphatase (molybdate or phosphate) or by desorbing it from the membrane using alkaline buffers in presence of EDTA and desoxycholate.

ATP-ase possesses an optimum at pH 7,5 in a cationic buffer such as Tris. In a phosphate buffer it optimum occurs at pH 6.5. This enzyme is strictly dependent on a divalent cation ; Mg is the physiological activator. The Km for ATP varies between 0.5 and 2 mM depending on the operating conditions.

Since this ATP-ase belongs to a tonoplast type membrane, it is distinguished from plasmic ATP-ases in the sense that it is not activated by monovalent cations (e.g. K and Na) but by anions. The Cl⁻ anion is effective and so also are bicarbonate and organic ions such as malate, aspartate and tartrate).

ATP is a better substrate than the other triphosphate nucleotides, ADP being a powerful non-competitive inhibitor.

ATP-ase functions at up to about 40° C without loss of activity. The Arrhenius plot shows a break in the log V-1/T curve characteristic of membrane type enzymes.

Inhibitors of SH groups and decoupling agents have an inhibiting effect on relatively high concentrations.

A theory has been formulated according to which membrane type ATP-ase. plays some part in the acidification of the lutoid fraction.

★

Travaillant sur des lutoïdes lyophilisés venus de Côte d'Ivoire grâce à de nombreuses bonnes volontés, il a été possible de mettre en évidence sur les sédiments membranaires une activité ATP-ase.

La difficulté majeure était de distinguer une telle ATP-ase d'une importante activité phosphatase acide résiduelle adsorbée sur le sédiment membranaire.

L'utilisation de molybdate ou de Pm s'est avérée efficace pour inhiber totalement la phosphatase acide résiduelle sans toucher à l'activité ATP-ase (Figure 1) (d'Auzac).

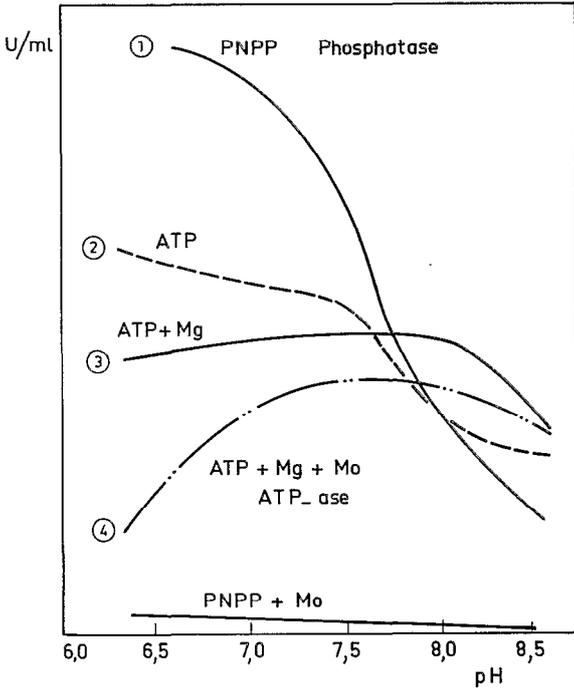


Figure 1
Mise en évidence d'une
ATP-ase sur un sédiment
de membranes lutoïdiques

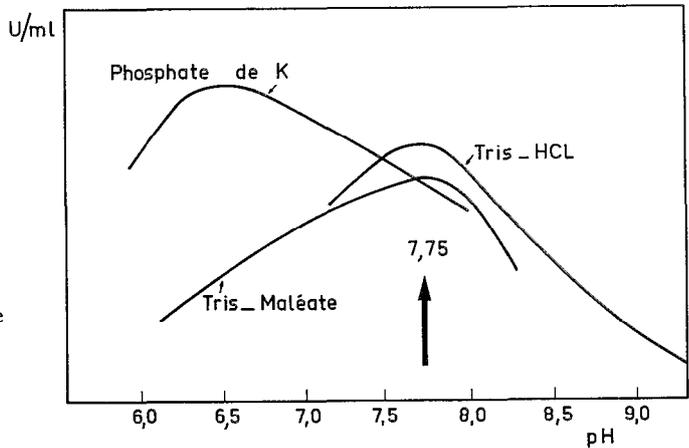


Figure 2
Activité de l'ATP-ase
en fonction du pH

- Divers traitements ont été utilisés pour éliminer du sédiment membranaire la phosphatase adsorbée. Ces traitements ont permis de faire passer le rapport ATP-ase/P ase de 0,5 - 2,0 à plus de 50. La méthode usuellement employée consiste à laver le sédiment membranaire plusieurs fois dans un tampon Glycine-NaOH (20 mM pH 7,5) - EDTA : 10 mM et MSH : 5 mM. L'adjonction de DOC à 2% du poids du lyophilisat de lutoïdes s'avère particulièrement efficace.

- L'ATP-ase présente un optimum d'activité à pH 7,75 dans la plupart des tampons alcalins, tandis que son optimum se situe à pH 6,5 en tampon phosphate (Figure 2).

- Le K_m pour l'ATP présente une valeur oscillant entre 0,5 et 2 mM selon les conditions opératoires et, notamment, la valeur du rapport ATP-Mg.

- Mn, Mg et Ca sont dans l'ordre d'efficacités décroissantes indispensables au fonctionnement de l'ATP-ase. Il est hors de doute que Mg est l'activateur physiologique. Le rapport optimum pour l'activation est classique : $ATP/Mg = 1$ (Figure 3).

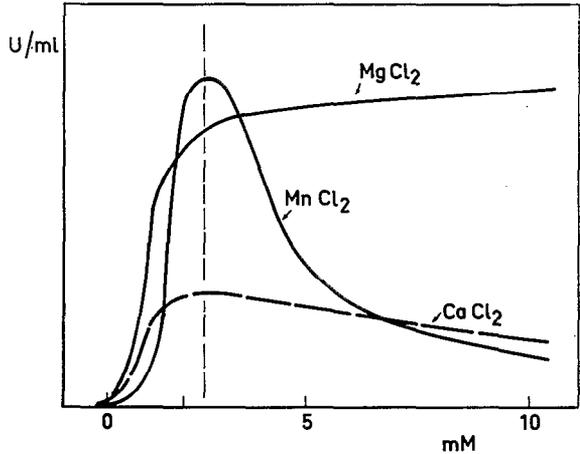


Figure 3
Activation de l'ATP-ase par
trois cations divalents

$$\frac{ATP}{\text{cations divers}} = 1$$

- Comme cela avait été montré par ailleurs, il n'a pas été possible de mettre en évidence une activation par les cations monovalents. La molarité du tampon intervient faiblement sur l'activité de l'enzyme lorsqu'il s'agit d'un tampon purement organique tel Hepes-Tris. Il est apparu par contre que l'ion Cl^- présentait un optimum d'activation vers 75 mM. Il n'y a pas d'action synergique $Na + K$ (Figures 4, 5 et 6).

Alors que divers anions ont une action positive marquée (Malate, Tartrate, Aspartate, Bicarbonate), Iodure et Nitrate sont fortement inhibiteurs. L'attention est retenue par CO_3H^- présent dans le latex en quantité importante et qui active fortement l'ATP-ase. On ne peut pas ne pas faire l'analogie avec des ATP-ases présentes sur la muqueuse gastrique du chien ou sur les lysosomes du foie de rat qui, toutes deux, concourent vraisemblablement à l'acidification d'un compartiment. Remarquons que l'activation de certaines ATP-ases membranaires serait, selon quelques auteurs, caractéristiques des ATP-ases tonoplastiques.

- L'ATP-ase présente une spécificité assez marquée pour l'ATP et elle fonctionne mieux avec les nucléotides adenyliques que pyrimidiniques (Figure 7).

- L'ATP-ase est fortement inhibée par l'ADP (I 50% = 0,5 mM ADP) (Figure 8).

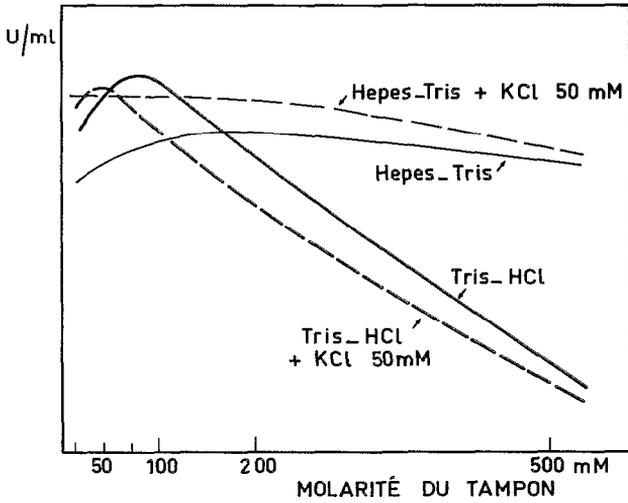


Figure 4

Influence de la molarité et de la nature du tampon (\pm KCl) sur l'activité de l'ATP-ase

ATP = 2 mM, $MgCl_2$ = 4 mM, pH : 7,75

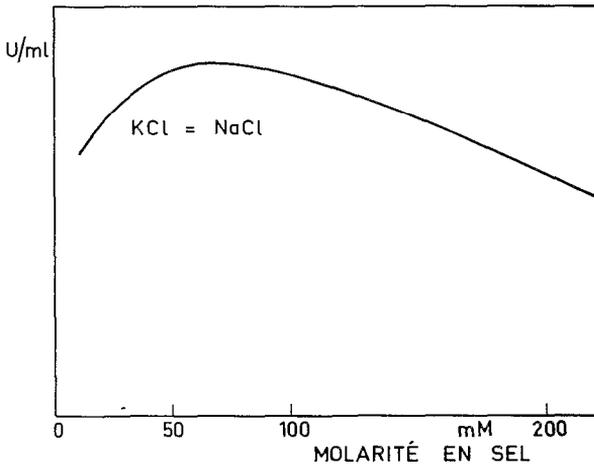


Figure 5

Activation de l'ATP-ase par KCl et NaCl

Tampon Hepes-Tris 25 mM - pH : 7,75

ATP = 2 mM, $MgCl_2$ = 4 mM

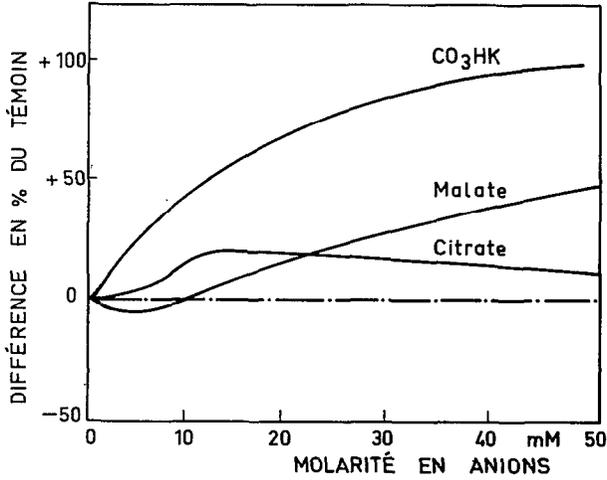


Figure 6

Activation de l'ATP-ase par trois anions différents
en fonction de leur concentration
Hepes-Tris : 25 mM, pH : 7,75 ± 0,02

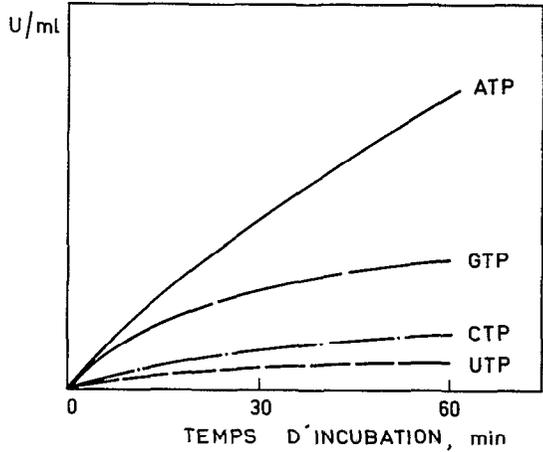


Figure 7
Spécificité de l'ATP-ase vis-à-vis
des nucléotides TriP

- La courbe d'action de la température fait apparaître une cassure correspondant à un changement d'état de la membrane, lequel se traduit par un changement d'énergie d'activation de l'enzyme (Figure 9).

- Les inhibiteurs des groupes SH (NEM, Mersalyl, PCMB) et les découpleurs (2,4 DNP, CCCP) possèdent une action dépressive sur l'ATP-ase ; les concentrations efficaces restent à préciser.

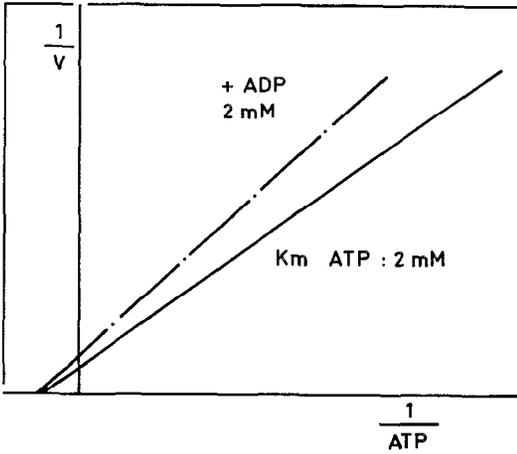
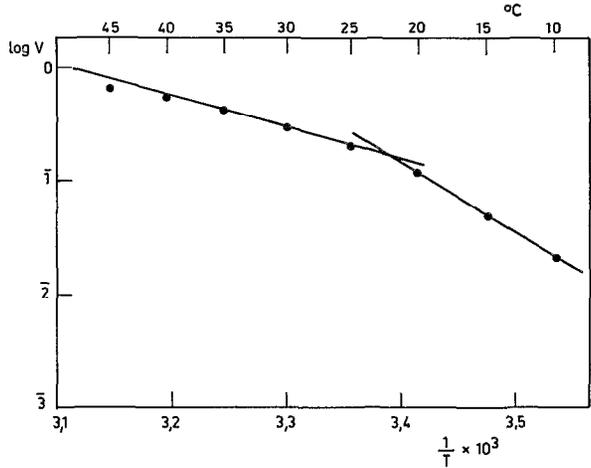


Figure 8
Inhibition de l'ATP-ase par
l'ADP

Figure 9
Représentation, selon
Arrhenius, de l'action de
la température sur l'activité
de l'ATP-ase membranaire
lutoïque.



Il paraît important de réaliser sur des lutoïdes frais toutes expérimentations souhaitables pour acquérir une certitude quant au fonctionnement de cette ATP-ase membranaire en tant que pompe à protons.

L'examen de la littérature, comme des contacts divers, montre clairement, alors que les hypothèses sont nombreuses, combien une démonstration péremptoire serait bienvenue.

2 - 4 - 3
**Transfert d'électrons dans la membrane des lutoïdes
 du latex d'*Hevea brasiliensis***
 F. Moreau

Electron transfer in the lutoïd membrane

*An NADH-cytochrome c oxydoreductase (E.C. 1.6.99.3.) has been shown to exist inside the lutoïd membranes of the latex of *Hevea brasiliensis*. It is not sensitive to antimyicine and cannot function with NADPH. Potassium ferricyanide can replace cytochrome c as an acceptor of electrons.*

It has been possible, by means of differential absorption spectrophotometry, to characterise at least two type b cytochrome in the same membranes. One, known as cytochrome b 563 is partially reduced by NADH but not by NADPH. The other, known as cytochrome b 561 is only reduced by hydrosulphite. No traces of cytochrome P 450 were detected.

The part played by these molecules in their biological context is discussed.

★

Le latex d'*Hevea brasiliensis* peut être considéré comme un véritable cytoplasme (1). Il contient notamment, outre des particules de caoutchouc, différents organites cellulaires parmi lesquels les lutoïdes sont les éléments les plus importants. Ces lutoïdes montrent de grandes analogies de propriétés enzymatiques avec les lysosomes animaux, de sorte qu'actuellement ils sont généralement considérés comme de véritables phytolyosomes (2). Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur la membrane propre de ces organites dont le rôle dans la biochimie des cellules laticifères ou la biosynthèse des constituants isopréniques n'a pas encore été clairement établi.

Dans ce bref rapport, nous résumons un certain nombre de résultats concernant la mise en évidence dans la membrane des lutoïdes d'une NADH deshydrogénase (NADH-cytochrome c oxydoréductase) (E.C. 1.6.99.3.) associée à un système de transport d'électron comprenant des cytochromes de type b (3).

Les lutoïdes ont été préparés à partir du latex par centrifugation sur gradient discontinu de densité de saccharose. Le profil obtenu est illustré dans la figure 1.

(1) A. I. Mc MULLEN - *Biochem. J.*, 85, 491-495, (1962).

(2) S. PUJARNISCLE - *C. R. Acad. Sci. Paris* série D, 261, 2127-2130, (1966).

(3) F. MOREAU, J.L. JACOB, J. DUPONT et C. LANCE - *Biochim., Biophys. Acta*, 396, 116-124, (1975).

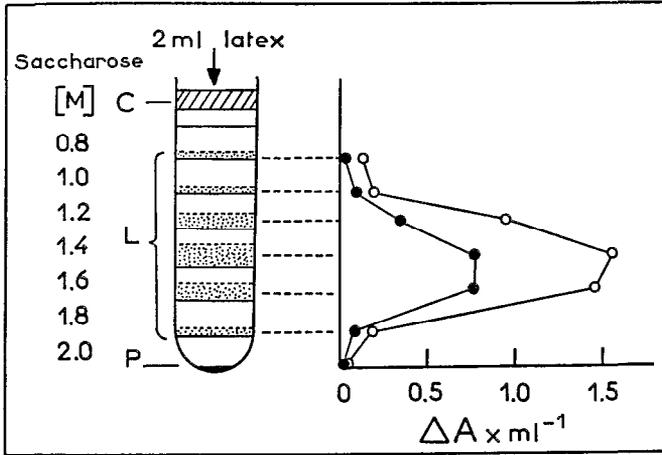


Figure 1

Distribution des lutoïdes et de différentes activités enzymatiques après centrifugation du latex d'*Hevea brasiliensis* (clone PR 107) sur gradient de densité de saccharose (80 000 g x 120 minutes)

○—○ : phosphatase acide - ●—● : NADH-cytochrome c oxydoréductase - C : couche de caoutchouc au sommet du gradient de densité après centrifugation - L : lutoïdes ; les diverses fractions sont récupérées et diluées dans un volume identique - P : précipité de débris cellulaires - ΔA : accroissement d'absorption, mesuré pour chaque activité enzymatique et rapporté à 1 ml de suspension diluée de lutoïdes. La phosphatase acide est mesurée par l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate à 400 nm (4). La NADH-cytochrome c réductase est mesurée par la réduction du cytochrome c à 550 nm (3).

Cette distribution, fortement dépendante de l'origine clonale du latex, indique ainsi une très grande variation dans la densité de ces organites. Cependant, les fractions les plus importantes se trouvent au sommet des couches de saccharose ; 1,4 ; 1,6 ; 1,8 M, comme le montre la distribution de l'activité phosphatase acide, utilisée comme marqueur enzymatique de ces organites.

La distribution de l'activité NADH-cytochrome c réductase est rigoureusement parallèle à celle de la phosphatase acide, ce qui implique que cette activité d'oxydoréduction se trouve étroitement associée avec les particules de lutoïdes. En outre, la séparation de la membrane des lutoïdes et du sérum lutoïdique, obtenue en soumettant des organites intacts à un choc osmotique hypotonique qui les fait éclater, a permis de préciser que l'activité NADH-cytochrome c réductase est exclusivement membranaire. D'autre part, cette activité est insensible à l'antimycine. Elle est spécifique pour le NADH, le NADPH n'étant rigoureusement pas oxydé. Par contre, le ferricyanure de potassium peut être substitué au cytochrome c comme accepteur d'électrons.

(4) J.L. JACOB - *Physiol. vég.*, 8, 395-411, (1970).

La spectrophotométrie d'absorption différentielle à température ambiante (25°C) ou à celle de l'azote liquide (-196°C), a permis de préciser la nature des transporteurs d'électrons qui se trouvent impliqués dans l'activité NADH-cytochrome c réductase de la membrane des lutoïdes.

La figure 2 illustre les types de spectres obtenus qui permettent de caractériser au moins deux cytochromes de type b. Ces cytochromes ont été définis d'après leurs maximums d'absorption dans la région *a*, sur les spectres réalisés à la température ordinaire. Le cytochrome b_{563} est partiellement réduit par le NADH, mais non par le NADPH, et présente une bande *a* dédoublée (555 + 561 nm) à basse température (Figure 2b). Ce cytochrome participe au transfert d'électrons du NADH au cytochrome c exogène. Un second cytochrome

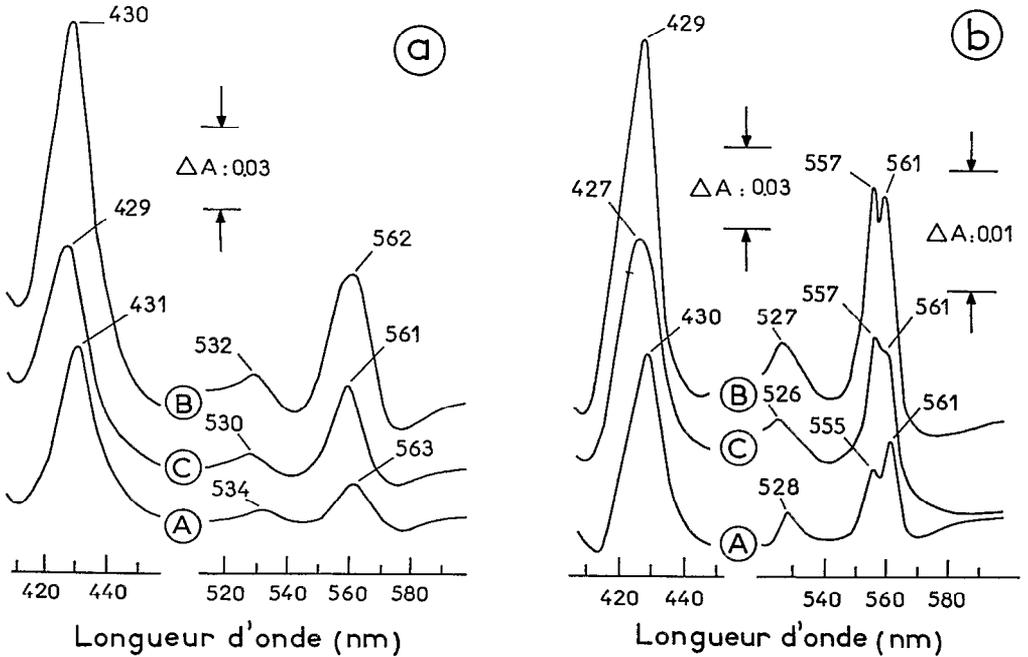


Figure 2

Spectres d'absorption différentielle (réduit moins oxydé) à température ambiante (25°C) et à basse température (-196°C) de membranes lutoïdiques du latex d'*H. brasiliensis*

Les membranes des lutoïdes sont préparées par addition aux organites intacts de 10 fois leur volume de tampon phosphate 3 mM (pH 7,2), agitation à 4°C durant 30 minutes et centrifugation à 90000 g pendant 30 minutes. Les culots de membranes sont lavés et centrifugés de la même façon.

a - Spectres à température ordinaire : 3 mg/ml de membranes dans un tampon phosphate

10 mM (pH 7,2) sont placés dans des cuves de 3 ml et de 10 mm de trajet optique. L'état oxydé est obtenu par barbotage de O₂ durant 1 minute. L'état réduit est obtenu par addition d'un excès de NADH ou de quelques cristaux d'hydrosulfite. A : NADH moins O₂ ; B : hydrosulfite moins O₂ ; C : Hydrosulfite moins NADH.

b - Spectres à basse température : mêmes conditions que précédemment sauf que des cellules en plexiglas de 1 ml et de 2mm de trajet optique sont utilisées.

appelé b_{561} (bande a à 557 nm avec un épaulement à 561 nm à basse température) est réduit seulement par l'hydrosulfite. De ce fait, son rôle reste quelque peu mystérieux. Enfin, à l'état réduit, ces cytochromes ne se combinent pas avec le CO. En conséquence, l'existence de cytochrome P_{450} ne peut être démontrée.

En conclusion, un système de transports d'électrons : NADH + cytochrome b_{563} réductase, est présent dans les membranes des lutoïdes, ainsi qu'un autre cytochrome b , réductible seulement par l'hydrosulfite. Un tel système peut être rapproché du complexe NADH + cytochrome b_5 réductase des microsomes animaux et végétaux (5) (6). De plus, chez ces derniers, des cytochromes b , réductibles par l'hydrosulfite seulement, ont été décrits. En revanche, les membranes lutoïdiques semblent se distinguer radicalement des membranes microsomales par l'absence de système NADPH + cytochrome P_{450} réductase qui, très généralement, est associé au complexe NADH + cytochrome b_5 .

Enfin, la grande spécificité vis-à-vis du NADH du système de transport d'électrons de la membrane des lutoïdes suggère que ce système puisse jouer un rôle dans l'équilibre des pyridines nucléotides à l'intérieur des laticifères, notamment en éliminant l'excès de NADH, condition indispensable à la synthèse des constituants polyisopréniques.

★

(5) STRITTMATTER, P. et VELICK, S.F. - *J. Biol. Chem.*, 228, 785-799, (1957).

(6) RICH, R.P. et BENDALL, D.S. - *Eur. J. Biochem.*, 55, 333-341, (1975).

2 - 4 - 4
L'ARN intra et extra-lutoïdique
 B. Marin

Intra- and extra- lutoïd RNA

It is possible to state categorically that RNA is present in the intra-lutoïd fraction of latex. This is so because :

- 1 - Thorough washing of a lutoïd sediment (EDTA) is insufficient to eliminate RNA from the sediment.*
- 2 - When lutoïds are treated with an antistabilising agent, RNA is liberated simultaneously with acid phosphatase.*
- 3 - Analysis by centrifuging on a saccharose gradient shows that a close relationship exists between the positions occupied by RNA and acid phosphatase respectively.*
- 4 - Lutoïd RNA cannot be hydrolysed by a ribonuclease except insofar as the lutoïds have lost their stability.*

Lutoïd RNA is heterogeneous. 50 to 60% of the total may consist of low molecular weight RNA which migrates rapidly during electrophoresis. However, a varying proportion of ribosomal RNA has definitely been shown to exist. Its electrophoretic mobility has enabled it to be unambiguously identified as a cytoplasmic ribosomal RNA.

In addition, ribosomes are present in the lutoïd fraction and possess the same sedimentation and mobility characteristics as the cytoplasmic ribosomes.

Although the presence of RNA in the lutoïd fraction is quite definite, the meaning of its presence there remains unclear. It has been impossible to demonstrate the existence of lutoïd associated protein synthesis, but it does, however, seem quite probable that the heterogeneity of the intra-lutoïd RNA population is the result of a degradation process which actually takes place within this fraction of which it might be a function.

★

La présence d'acides ribonucléiques dans le latex d'*Hevea brasiliensis* Müll.-Arg. (Kunth) a été soulignée depuis longtemps par maints auteurs, notamment par A.I. McMullen (1959 et 1962) et J. Tupy (1969) entre autres. Cet ARN est essentiellement présent dans le sérum mais il existe aussi associé aux particules de

A.I. McMULLEN - *Biochem. J.*, 72, 545-549, (1959).

A.I. McMULLEN - *Biochem. J.*, 85, 191-195, (1962).

J. TUPY - *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21, 468-475, (1969).

caoutchouc et dans la fraction jaune (B. Marin, 1974 ; B. Marin et P. Trouslot, 1975). A.I. McMullen (1959) a expliqué en partie la présence d'ARN dans la couche de caoutchouc : l'ARN du latex posséderait une certaine affinité pour les particules polyisopréniques, ce qui laisserait supposer que cet ARN n'est en rien constitutif de ces particulés. Quant à la présence d'ARN dans les lutoïdes, la plupart des auteurs s'accordent à indiquer qu'il s'agit là d'une contamination inhérente à la préparation même de cette fraction cellulaire. Mais, en fin de compte, ce ne sont que des hypothèses qu'aucun fait expérimental ne vient étayer, d'autant plus que des travaux récents (B. Marin, 1974 ; B. Marin, P. Trouslot et S. Pujarniscle, 1974 ; B. Marin et P. Trouslot, 1975) tendent au contraire à démontrer l'existence d'ARN dans cette fraction jaune et plus particulièrement dans les lutoïdes.

Un certain nombre d'expériences faites sur ce sédiment lutoïdique permettent de conclure à la présence d'ARN dans le compartiment lysosomal du latex d'*Hevea brasiliensis* :

- il ne suffit pas de laver intensément le sédiment lutoïdique pour en éliminer l'ARN même en présence d'EDTA, ce qui infirme l'hypothèse d'une adsorption totale de l'ARN trouvé dans le sédiment lutoïdique ;
- que le sédiment lutoïdique soit traité ou non par un agent destabilisant donné (traitements mécaniques ou chimiques) connu pour labiliser les organites qu'il contient, l'ARN n'est libéré que dans la mesure où l'activité phosphatase acide est solubilisée ;
- on observe une relation étroite entre l'ARN du sédiment lutoïdique et l'activité phosphatase acide (elle serait même linéaire) et cela quelle que soit la densité des lutoïdes analysés par centrifugation en gradient de concentration de saccharose, ce qui suppose la présence d'ARN dans les lutoïdes de cette fraction jaune ;
- on peut ajouter encore que l'ARN de la fraction lutoïdique ne peut être hydrolysé par la ribonucléase pancréatique que dans la mesure où les lutoïdes de ce sédiment ont été destabilisés, l'ARN se trouvant alors accessible à la ribonucléase pancréatique.

Tous ces résultats permettent d'affirmer sans ambiguïté l'existence d'ARN dans le compartiment lysosomal du latex d'*Hevea brasiliensis*.

Les conditions expérimentales sont particulièrement favorables pour isoler l'ARN de ce compartiment cellulaire et en analyser la nature, ce qui jusqu'à présent n'avait jamais été fait.

L'ARN a donc été extrait de ce compartiment cellulaire en utilisant des méthodes d'isolement jugées satisfaisantes pour le préparer sous sa forme native (B. Marin, 1969 ; B. Marin, 1974 ; B. Marin et J.B. Vieira da Silva, en préparation).

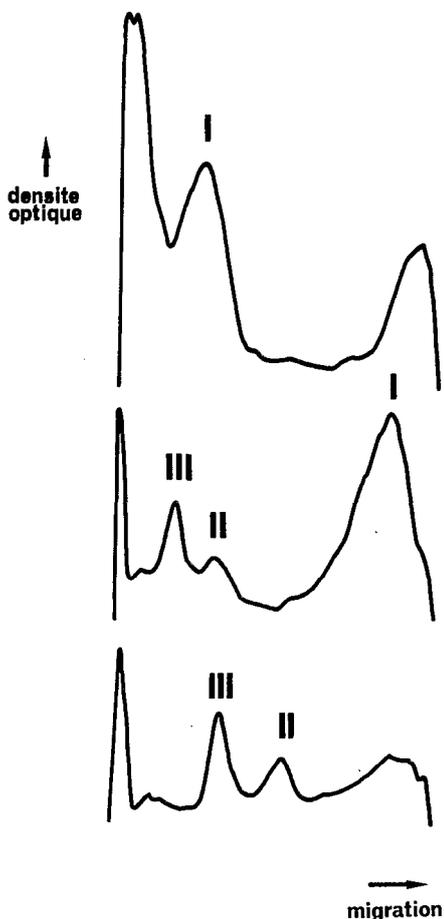
B. MARIN - Thèse spécialité, mention Biologie végétale, U.S.T.L., 113 p., (1974).

B. MARIN et P. TROUSLOT - *Planta*, 124, 31-41, (1975).

B. MARIN, P. TROUSLOT et S. PUJARNISCLE - *Biochem. J.*, 143, 479-481, (1974).

B. MARIN - *Mémoire O.R.S.T.O.M.*, 65 p., (1969).

B. MARIN et J.B. VIEIRA DA SILVA - en préparation.



Du sodium-dodecyl-sulfate a été employé à une concentration suffisamment élevée, de 1 à 2%, pour inhiber toute activité ribonucléasique lysosomale (B. Marin, 1975b). L'ARN obtenu a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 2,4%, faite en milieu Tris-acétate, en présence d'EDTA 1 mM et de SDS à une concentration finale de 0,1%, selon la technique de U.E.Loening (U.E.Loening, 1967, 1968 a et b) modifiée par B. Marin (1974).

L'ARN isolé est hétérogène (Figure 1), il est constitué essentiellement par une population de molécules de faible poids moléculaire migrant très rapidement (B. Marin, 1974). Toutefois, la présence d'ARN ribosomal a été notée.

Figure 1

Séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide de l'ARN lutoïdique

L'électrophorèse de l'ARN lutoïdique est réalisée sur un gel de polyacrylamide préparé à 2,4% (voir B. Marin, 1974). La quantité d'ARN déposée à la surface du gel correspond à 20 μ l

de tampon d'électrophorèse contenant 20% de saccharose. La lecture du gel est faite en ultraviolet au bout d'un temps d'électrophorèse de 40 mn (A), de 100 mn (B) et de 200 mn (C).

Cette figure souligne l'hétérogénéité de l'ARN extrait de la fraction lutoïdique : l'essentiel de cet ARN est constitué par une population de molécules de faible poids moléculaire (pic I). Les pics II et III représentent les deux composantes de l'ARN ribosomal trouvé dans ce compartiment cellulaire.

B. MARIN - Rapport d'activité O.R.S.T.O.M., 35 p., (1975 b).

U.E. LOENING - *Biochem. J.*, 102, 251-257, (1967).

U.E. LOENING - A Joyce-Loebl reprint, (1968 a).

U.E. LOENING - *Chromatographic and electrophoretic techniques*, 2, p. 437-442, W. Heilmann. Med. Books Ltd, London, (1968 b).

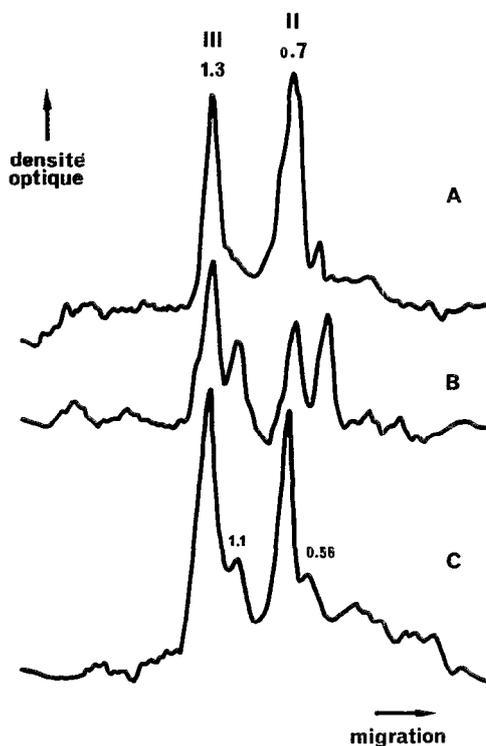


Figure 2

Caractérisation des deux composantes de l'ARN ribosomal lutoïdique

L'ARN ribosomal lutoïdique est comparé aux ARN ribosomaux présents dans une graction enrichie en chloroplastes isolée de feuilles de plantules de *Raphanus sativus* (B. Marin, 1974). Il s'identifie aux composantes 0,7 M et 1,3 M caractéristiques des ARN cytoplasmiques. (A) - ARN isolé de ribosomes lutoïdiques ; (B) - ARN isolé des ribosomes présents dans une graction enrichie en chloroplastes préparé à partir de jeunes plantules de *Raphanus sativus*. ; (C) - Mélange des ARN ribosomaux lutoïdique et chloroplastique.

Ce qui peut surprendre, c'est le caractère relativement dégradé de cet ARN lutoïdique : les ARN de faible poids moléculaire peuvent représenter de 60 à 90% de l'ARN total. Cette proportion est éminemment variable. L'incubation de cette fraction cellulaire dans un bain-marie thermostaté à 37° C pendant quatre à dix heures contribue à l'augmenter considérablement. Il ne faut pas oublier que ces lutoïdes contiennent tout un ensemble d'enzymes propres à dégrader ces macromolécules notamment une ribonucléase et une phosphodiesterase acide qui ne demandent qu'à être activées pour fonctionner (B. Marin, 1975.b). Ceci expliquerait la composition nucléotidique de cet ARN lutoïdique qui se rapproche de celle d'un ARN ribosomal, voire d'une population d'acides nucléiques riches en ARN ribosomal, le contenu en G + C étant de 60,1% (B. Marin, 1974). Ainsi, l'hétérogénéité observée dans cette population de macromolécules pourrait résulter de la fonction même de ces lutoïdes. Mais il est difficile de l'affirmer : les méthodes de préparation des fractions cellulaires et d'extraction de leur ARN pour aussi bonnes qu'elles soient entraîneront inévitablement une dégradation plus ou moins accentuée de ces macromolécules. C'est une observation maintes fois rapportée dans la littérature (voir U.E. Loening et J. Ingle, 1967, ou F. Vedel et M. d'Aoust, 1970 par exemple).

U.E. LOENING et J. INGLE - *Nature*, 215, 363-367, (1967).

F. VEDEL et M. D'AOUST - *Plant Physiol.*, 46, 81-85, (1970).

D'autre part, tant par sa composition nucléotidique globale que par sa motilité électrophorétique (Figure 2), l'ARN ribosomal trouvé dans le compartiment lutoïdique s'identifie à un ARN ribosomal cytoplasmique (B. Marin, 1974 ; B. Marin, en préparation). Bien que des études plus approfondies sur l'homologie entre les composantes respectivement présentes dans les compartiments sérique et lutoïdique n'aient pas encore été faites, notamment l'analyse comparative des hydrolysats obtenus avec différentes ribonucléases, tout permet de penser que cet ARN ribosomal provient du sérum.

Les ribosomes du compartiment lutoïdique (Figure 3) et leurs sous-unités obtenues en les dissociant en présence de chlorure de magnésium, de chlorure de potassium ou d'EDTA sédimentent de la même façon que leurs équivalents sériques (B. Marin, en préparation). Des analyses faites par centrifugation en gradient de

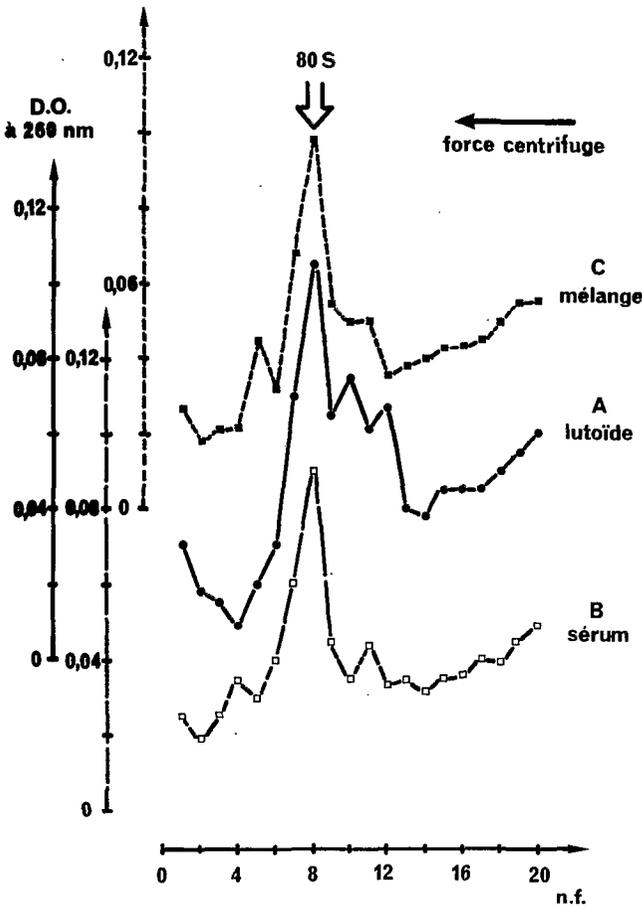


Figure 3

Analyse comparative des ribosomes présents dans les compartiments lutoïdique et sérique du latex d'*Hevea brasiliensis*

La fraction ribosomale isolée, soit des lutoïdes, soit du sérum, reprise dans 0,1 à 0,5 ml de tampon adéquat, est déposée sur un gradient de concentration de saccharose 10-34%, puis centrifugée pendant trois heures dans un rotor Spinco SW-25.1 à 12 500 tr/mn à 40°C.

(A) - Fraction ribosomale lutoïdique ;

(B) - Fraction ribosomale sérique ;

(C) - Mélange équiparti de ces deux fractions ribosomales.

Les ribosomes extraits de ces deux compartiments sédimentent de la même façon (C).

concentration de saccharose selon la méthode de P.I. Payne et D. Boulter (1969) ou en présence de chlorure de lithium selon celle de T. Scott-Burden et A.O. Hawtrey (1969) indiquent que tous ces ribosomes s'avèrent liés à une structure membranaire (B. Marin, en préparation). Or, la seule membrane présente dans ce compartiment, c'est la membrane lutoïdique. L'existence de ribosomes dans le compartiment lysosomal pourrait donc résulter d'une interaction entre les ribosomes sériques et la membrane lysosomale. L'affinité de la membrane lutoïdique pour ces ribosomes selon une technique aussi sophistiquée que celle de L. Schiaffonati et al. (1975) n'est pas connue. Il est indispensable de la définir. Les observations faites en présence d'EDTA ou de ribonucléase pancréatique restent alors, dans le cadre de cette hypothèse, à expliquer. Une ébauche de réponse peut être apportée en faisant remarquer que l'ARN présent dans une structure ribosomale intacte n'est pas dégradé, ce qui confirmerait en partie l'idée que les ribosomes de ce compartiment ne sont pas dissociés dans les conditions expérimentales utilisées. Toutefois, la mise en évidence d'une synthèse protéique propre à ce compartiment lutoïdique n'a pas encore pu être démontrée (S. Pujarnisclé, 1973).

Si la présence d'ARN dans un compartiment lysosomal est certaine à la suite des travaux effectués sur les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, la signification de son existence dans ce compartiment nous échappe encore et demeure obscure. Il est difficile de faire la part des choses. Tout comme P.I. Payne et D. Boulter (1974), nous pensons qu'un processus de dégradation se déroule au niveau de ce compartiment. Les lysosomes constitueraient le lieu privilégié de la dégradation des ARN cellulaires. Seul, un matériel comme le latex d'*Hevea brasiliensis* permet de mener à bien une telle étude (P. Matile, 1975 ; P.I. Payne, 1975). La plupart des lysosomologistes éminents s'accordent à penser que sa continuation est fondamentale pour une meilleure compréhension du phénomène.

★

P.I. PAYNE et D. BOULTER - *Planta*, 84, 263-271, (1969).

T. SCOTT-BURDEN et A.O. HAWTREY - *Biochem. J.*, 115, 1063-1069, (1969).

L. SCHIAFFONATI, F. CAJONE et A. BERNELLI-ZAZZERA - *J. Membrane Biol.*, 21, 11-24, (1975).

S. PUJARNISCLE - Communication personnelle (1973).

P.I. PAYNE et D. BOULTER - *Planta*, 117, 251-258, (1974).

P. MATILE - Communication personnelle, (1975).

P.I. PAYNE - Communication personnelle, (1975).

2 - 4 - 5
Les absorptions par les lutoïdes

2 - 4 - 5 - 1
Introduction
J. d'Auzac

Après qu'il ait été constaté que les lutoïdes se comportaient comme des vacuoles en accumulant certaines molécules cytoplasmiques, Ribailier a réalisé les premières études de l'absorption de citrate radioactif.

Ces travaux ont été repris par d'Auzac. Il a été montré :

- une accumulation linéaire de citrate en fonction du temps, contre un gradient de concentration et suivant une cinétique de type michaelien. Ce dernier aspect laissait donc présager la présence d'un transporteur membranaire ;
- l'absorption du citrate est fortement dépendante de la température selon un $Q_{10} > 2$;
- l'accumulation se fait normalement dans un milieu isotonique non énergétique. Elle est cependant doublée en présence d'ATP ;
- le 2,4 DNP inhibe l'absorption mais pour des concentrations élevées ;
- un inhibiteur des groupes SH (NEM) réduit fortement le transport.

Ces résultats conduisirent à formuler l'hypothèse d'un transport actif. Des objections peuvent être formulées cependant :

- l'irréversibilité de l'absorption n'a pas été démontrée ;
- la preuve absolue que le citrate n'est pas immobilisé à l'intérieur sous une forme différente n'est pas donnée ;
- bien que l'ATP intervienne (apparemment au second degré), le mécanisme d'énergisation du phénomène reste obscur ;
- la spécificité vis-à-vis du substrat citrate doit exister (à des degrés divers) s'il existe un transporteur membranaire.

Les travaux ont été poursuivis par C. Lambert.

★

J. d'AUZAC et C. LIORET - *Physiol. vég.*, 12, 4, 617, (1974).

D. RIBAILLIER - Thèse Doct. État, Abidjan, (1972).

2 - 4 - 5 - 2
 L'absorption des acides organiques par les lutoïdes
 C. Lambert

The absorption of organic acids by the lutoïds

It is known that lutoïds isolated in vitro are capable of accumulating radioactive citric acid linearly as a function of time, the kinetics involved being michaelian and the process very thermodependent. Accumulation occurs in an energyless isotonic system and is doubled in presence of ATP.

It has been shown that preincubation of lutoïds in presence of ATP, followed by elimination of the latter, enables absorption of the citrate to be increased. ATP is the most effective of the triphosphate nucleotides. Whilst oligomycin has no effect on the absorption of citrate in presence of ATP, 2,4 DNP is effective in decreasing absorption.

It has been found, by determining the pH of the intralutoïd serum, that ATP (5 mM) causes a drop in pH of the intralutoïd serum of the order of 0,5 pH units in 30 minutes. This observation has given rise to a hypothesis according to which ATP may control the operation of a proton pump.

A comparison of the absorption of citrate, malate and succinate respectively has shown that the kinetics are linear for one hour and that the amounts absorbed are very similar. A study of the kinetics involved gives similar apparent Km values and there is a temptation to postulate a common mediator. ATP and 2,4 DNP have an identical effect on the absorption as does the temperature.

After absorption of the tagged molecules, taking back into suspension in a fresh medium indicates an 80% retention of the substrates concerned.

However, a number of observations cast doubt on the existence of a single carrier. Although citrate competitively inhibits the absorption of succinate, there is no evidence of the reverse process. The optimum pH for the absorption of succinate is different from that for the absorption of citrate and malate. As compared with the triethanolamine hydrochloride buffer normally used, the cacodylate buffer doubles the absorption of citrate and has no effect on that of malate and succinate.

★

J'ai abordé les problèmes concernant les mécanismes de transport du citrate par les membranes lutoïdiques sur la base des résultats de Ribaillier (1972), d'Auzac et Lioret (1974). Le sérum lutoïdique est très riche en citrate (50 mM) alors que

D. RIBAILLIER - Thèse d'État, 1972, A.O. 7716, Abidjan.

J. d'AUZAC et C. LORET - *Physiol. vég.*, 12, 617-635, (1974).

dans le sérum cytoplasmique celui-ci se trouve à la concentration 5 mM. Il y a donc accumulation de ce substrat dans les lutoïdes. Les lutoïdes, placés dans un milieu artificiel non énergétique, contenant du citrate, peuvent l'absorber selon une cinétique linéaire. L'absorption qui est thermodépendante, peut être doublée en présence d'ATP et peut être inhibée par le 2,4 DNP, le NEM. Tous ces résultats sont en faveur de l'existence d'un «transport médiat» pour le citrate. Il convenait d'apporter des résultats complémentaires afin de pouvoir définir plus précisément les mécanismes de transport. J'ai réalisé deux approches différentes du problème :

- l'étude du mécanisme par la recherche du mode d'action de l'ATP ;
- l'étude comparée de l'absorption du citrate, malate, succinate. Ces absorptions devraient avoir des caractéristiques différentes si l'on tient compte du fait que la concentration intralutoïdique du citrate est très élevée (gradient de l'ordre de 10 par rapport au sérum cytoplasmique) que le malate est présent dans les lutoïdes et dans le sérum cytoplasmique à des concentrations très voisines, et que la présence de succinate n'a jamais été signalée dans les sérums cytoplasmique et lutoïdique.

En ce qui concerne l'influence de l'ATP on peut supposer qu'il fournit au niveau de la membrane lutoïdique des liaisons riches en énergie qui favorisent l'absorption. Dans ces conditions, en préincubant les lutoïdes en présence d'ATP, puis en éliminant cet ATP, l'absorption du citrate devrait être également favorisée. Les résultats obtenus montrent que l'ATP modifie effectivement les lutoïdes en leur apportant de l'énergie, favorisant ainsi l'absorption du citrate (Figure 1). J'ai étudié l'influence d'autres nucléotides sur cette même absorption. A des concentrations équivalentes à celles de l'ATP, le CTP, l'UTP et le GTP ont une action positive mais moindre que celle de l'ATP (Tableau 1).

Tableau 1
Comparaison de l'action de divers nucléotides triphosphates (5 mM)
sur l'absorption intralutoïdique du citrate *in vitro*

	témoin	ATP	CTP	GTP	UTP
nanomoles de citrate absorbé/mg de protéines/30 mn	20	38,8	26,0	27,1	27,2

Ceci peut correspondre à une affinité plus faible de l'ATP-ase membranaire des lutoïdes pour ces substrats. Pour confirmer l'hypothèse de l'existence de liaisons riches en énergie au niveau de la membrane, j'ai étudié l'influence de l'oligomycine et du 2,4 DNP. L'oligomycine intervient en empêchant la formation de liaisons énergétiques. Donc utilisée en présence d'ATP, elle devrait inhiber l'augmentation de l'absorption du citrate : sa présence n'a pas modifié l'influence de l'ATP (Figure 1). Selon Chance, le 2,4 DNP provoque l'hydrolyse des liaisons énergétiques. Utilisé seul, il diminue l'absorption du citrate et, en présence d'ATP,

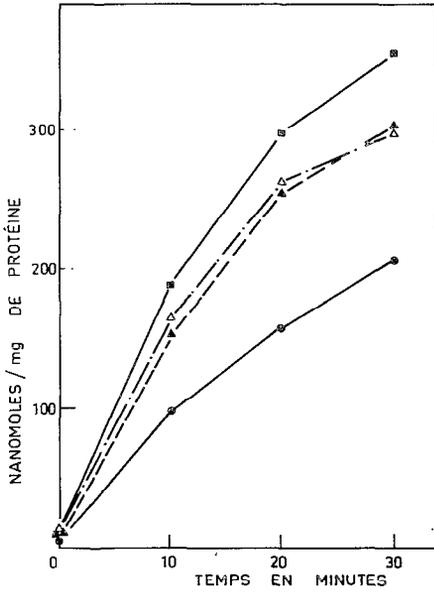


Figure 1

Cinétique d'absorption du citrate par les lutoïdes réalisé en milieu d'incubation complet TEA 0,1 M pH 7

- témoin
- absorption en présence d'ATP 5 mM
- △—△ absorption sans ATP par des lutoïdes préincubés durant 30 mn en présence d'ATP 5 mM
- ▲—▲ absorption sans ATP par des lutoïdes préincubés durant 30 mn en présence d'ATP 5 mM + oligomycine 30 µg/ml.

Figure 2

Influence de l'ATP et du 2,4 DNP sur l'absorption du citrate en milieu complet TEA 0,1 M pH 7

- ▲—▲ Citrate 5 mM
- Citrate 5 mM + ATP 5 mM
- Citrate 5 mM + 2,4 DNP 5 mM
- Citrate 5 mM + ATP 5 mM + 2,4 DNP 5 mM

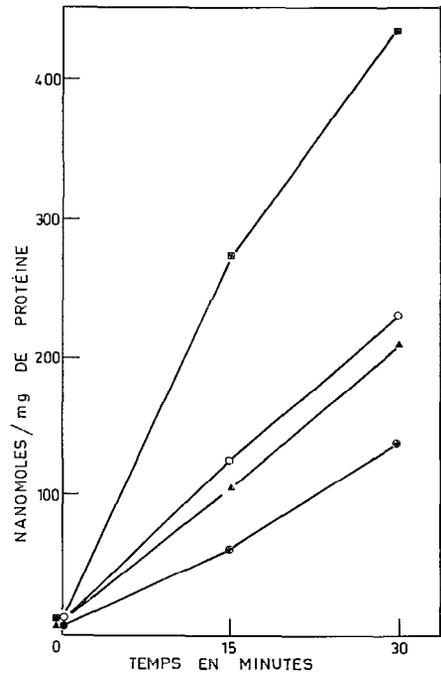


Tableau 2
Influence de l'ATP (5 mM) sur la variation du pH intralutoïdique
in vitro en fonction du temps de contact

	Durée de la mise en présence avec l'ATP				
	0	5 mn	10 mn	20 mn	30 mn
pH intralutoïdique	6,18	6,08	6,04	5,84	5,81

Tableau 3
Expérience de désorption de citrate, de malate et de succinate radioactifs
préalablement absorbés par des lutoïdes *in vitro*
Au temps 0, les substrats ont été préalablement absorbés pendant 30 mn par les
lutoïdes puis ceux-ci sont remis 45 mn en suspension dans un tampon sans substrat.

	Nanomoles de substrat/mg de protéines		
	Citrate	Malate	Succinate
Nanomoles de substrat exogène présent dans les lutoïdes au temps 0	34,46	72,74	119,53
Nanomoles de substrat exogène restant dans les lutoïdes après 45 minutes	26,08	64,16	93,77
Pourcentage de substrat au temps 45 mn par rapport au temps 0	76 %	89 %	78 %

il annule l'effet stimulant de ce facteur (Figure 2). J'ai également observé que l'ATP avait une influence sur le pH interne des lutoïdes. A la concentration 5 mM, l'ATP provoque en 30 minutes une diminution de pH de l'ordre de 0,5 unité (Tableau 2). Ce résultat me semble très important car, d'une part on n'a pas démontré, à ma connaissance, aussi directement le fonctionnement d'une pompe à proton commandé par l'ATP, d'autre part cette influence de l'ATP sur le pH intralutoïdique permet d'interpréter l'ensemble des résultats obtenus. L'ATP fournit l'énergie nécessaire à une pompe à protons qui peut agir de deux manières différentes. Si elle est électrogénique, elle peut induire des flux passifs d'ions, dont le citrate. Si elle n'est pas électrogénique, elle peut transmettre une partie de l'énergie qu'elle reçoit au système de transport.

L'étude comparée de l'absorption du citrate, du malate et du succinate a pour but essentiel de déterminer la spécificité d'un système de transport unique ou de mettre en évidence l'existence de plusieurs médiateurs. Dans un premier temps, j'ai montré que les trois acides organiques sont absorbés par les lutoïdes dans des proportions très voisines (Figure 3). J'ai obtenu certaines caractéristiques

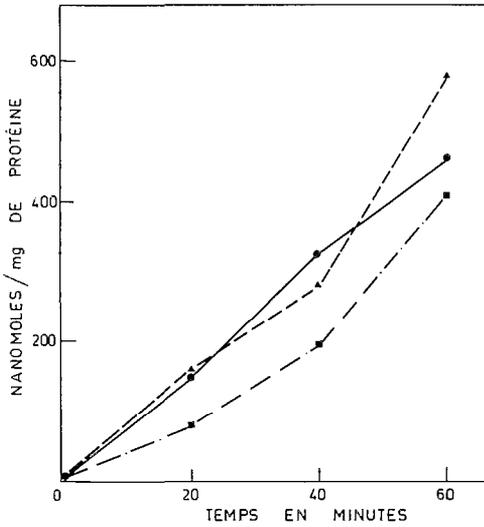


Figure 3

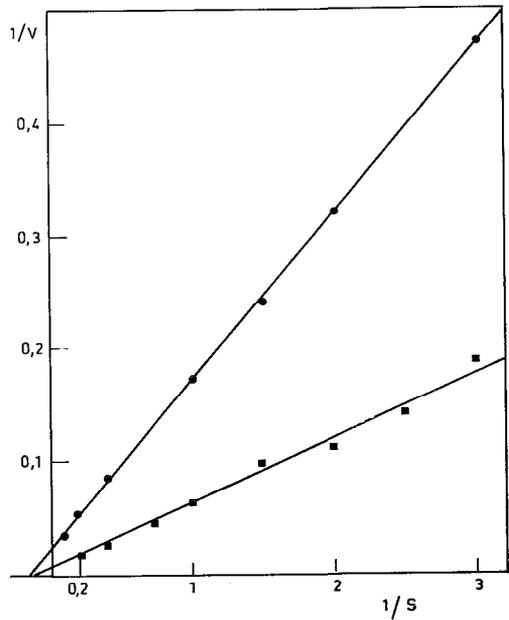
Courbes des cinétiques d'absorption du succinate, du malate et du citrate par les lutoïdes *in vitro*

--▲-- Succinate
 —●— Citrate
 --■-- Malate

Figure 4

Cinétique d'incorporation dans les lutoïdes du succinate et du malate en fonction de leur concentration dans le milieu

—■— Succinate
 —●— Malate



des transports qui sont en faveur de l'existence d'un médiateur unique. Les cinétiques sont linéaires durant au moins une heure. On obtient dans les trois cas une saturation de la vitesse d'absorption en fonction de la concentration en substrat. Ceci permet de déterminer un « K_m d'affinité apparent» : les valeurs obtenues sont très voisines (Figure 4). Les trois transports sont sensibles à la température. De plus, ils sont irréversibles puisque la remise en suspension sur milieu frais durant

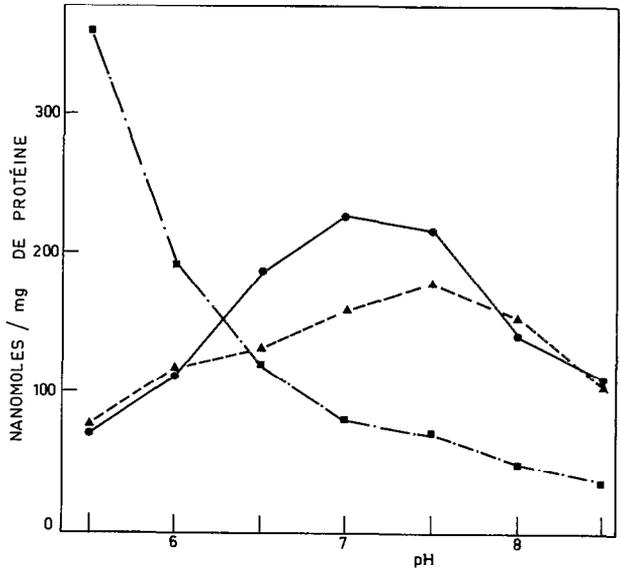
une heure des lutoïdes ayant absorbé les trois substrats, indique une rétention de ces substrats de 80% (tableau 3). L'ATP double pratiquement l'absorption des trois composés alors que le 2,4 DNP inhibe ces absorptions.

J'ai montré que le citrate inhibe compétitivement l'absorption du succinate. Par contre, le succinate n'inhibe pas l'absorption du citrate. Il pourrait y avoir un système de transport unique présentant une spécificité plus importante pour le triacide qu'est le citrate que pour les diacides que sont le malate et le succinate. Par contre certains résultats conduisent à une interprétation faisant intervenir plusieurs transporteurs. En effet, l'optimum de pH pour l'absorption du citrate et du malate est de 7 alors que pour le succinate il est de 5,2 (Figure 5). De même, on observe dans le cas du citrate que le tampon cacodylate double l'absorption obtenue en tampon TEA alors que c'est l'inverse dans le cas du succinate et du malate.

Les travaux en cours actuellement devraient permettre de préciser les mécanismes qui permettent les échanges au travers de la membrane lutoïdique.

Figure 5
Variation de l'absorption
du Citrate, Malate, Succinate
en fonction du pH
en tampon Tris-Maléate
0,1 M

- Citrate
- -▲- - Malate
- -■- - Succinate



2 - 4 - 5 - 3
 Pénétration des acides aminés dans les lutoïdes
 P. Hanower et J. Brzozowska

Penetration of amino acids into the lutoïds

A study has been undertaken of the absorption of glutamic acid, alanine and radioactive lysine by lutoïds in vitro. A special study was made of lysine since it is the only one of these three amino acids to be absorbed against the concentration gradient (5/1).

Lysine is the most strongly absorbed of the three acids studied (2.4% of lysine present). The absorption of amino acids is thermally dependent and its kinetics are michaelian, which means that it is possible to determine the apparent Km values (12 mM for lysine).

Although 90% of the radioactive lysine absorbed by the lutoïds cannot be desorbed during an hour's incubation, the possibility of an exchange of isotopes cannot be excluded.

The pH of the incubation medium affects the rate of absorption of lysine. The rate reaches a maximum at between pH 8.0 and 8.5 and drops sharply at pH 6.0. It was then postulated that the proton gradient existing between the S serum and the C serum could control the absorption of lysine.

ATP increases this absorption, but less markedly than in the case of citrate.

If the specificity of the transport of lysine is considered, it is found that alanine has no effect whereas arginine is an inhibitor.

The stimulation of trees with Ethrel leads to an increase (+ 80%) in the absorption of lysine, which could be due to the increase in the pH gradient between serums C and S.

In fact, it was found that ATP, which lowers the intralutoïd pH, increases the absorption of lysine, whereas 2,4 DNP and NH_4Cl have the reverse effect on both pH and absorption.

★

La compartimentation des acides aminés libres du latex - prédominance des composés acides dans le sérum cytoplasmique et prédominance des composés à caractère basique dans des lutoïdes - nous a conduits à étudier la perméabilité de la membrane lutoïdique aux acides aminés.

Dans la réalisation de ce travail nous nous sommes inspirés des études analogues concernant l'accumulation du citrate dans les lutoïdes réalisées par d'Auzac et Lioret (1974).

La pénétration des acides aminés acide (acide glutamique), neutre (alanine) et basique (lysine) dans les lutoïdes, a été suivie à l'aide des molécules marquées au ^{14}C .

Les lutoïdes ont été placés dans un milieu isotonique (mannitol 0,3 M), dépourvu du matériel métabolique énergétique à pH 7,0 (tampon phosphate 0,1 M), proche du pH du sérum cytoplasmique et à 25°C . Les gradients naturels de concentration en acides aminés testés ayant été respectés, l'absorption se faisait dans le sens du gradient pour l'acide glutamique et l'alanine ($\approx 3/1$) et contre le gradient de concentration pour la lysine ($\approx 5/1$). C'est pourquoi l'accent a été mis sur l'étude de l'absorption de ce dernier composé.

Dans la plupart des cas, les résultats ont été rapportés aux protéines lutoïdiques restantes.

Caractéristiques générales de l'absorption des acides aminés par les lutoïdes

1 - Cinétique de la pénétration

L'absorption de l'acide glutamique, de l'alanine et de la lysine, est parfaitement linéaire en fonction du temps pendant au moins trente minutes (Figure 1). Dans les conditions expérimentales utilisées, proches des conditions physiologiques, la lysine est plus intensément absorbée après trente minutes (environ 2,4%) que l'alanine (1,7%) ou que l'acide glutamique (0,2% seulement).

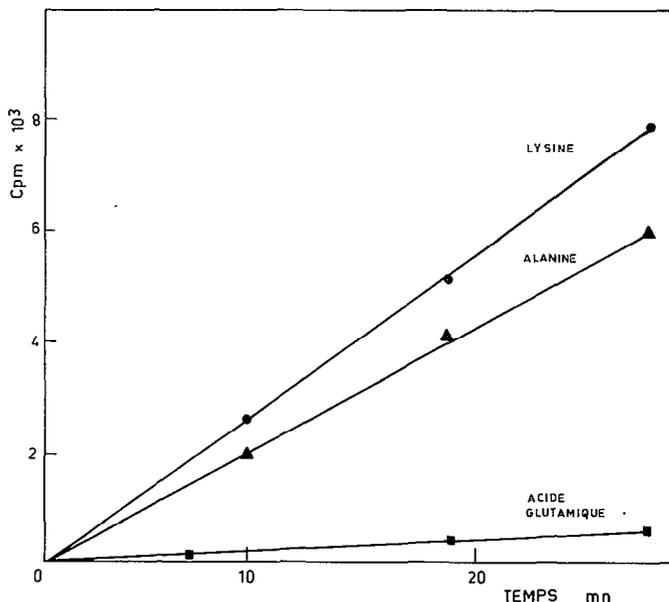


Figure 1
Cinétique de la pénétration des acides aminés dans les lutoïdes

2 - Influence de la température

L'absorption des acides aminés est thermodépendante. Les valeurs élevées de Q_{10} (4,2 entre 0° et 10° , 2,5 entre 10° et 20° et 2,2 entre 20° et 30° , dans le cas de la lysine) impliquent le franchissement de la membrane ; elles pourraient indiquer que le phénomène ne correspond pas à une simple diffusion, mais à un transport actif. Toutefois, cette thermodépendance peut également être expliquée par un nombre croissant de sites de passage transitoires dus à l'écartement temporaire des molécules lipidiques constitutives de la membrane, constant pour une température donnée, et n'exclut pas un échange isotopique.

3 - Influence de la concentration externe en acide aminé

En suivant l'absorption en fonction de la concentration, on obtient une cinétique de type michaelien. La courbe vitesse-concentration en substrat est d'allure hyperbolique. La représentation des inverses permet d'obtenir une droite conduisant à un K_m apparent d'environ 12 mM pour la lysine et 30 mM pour l'alanine.

La cinétique michaelienne laisserait supposer que l'influx est lié à l'existence d'un transporteur pouvant être saturé en substrat. Mais ici également l'interprétation évoquée ci-dessus, basée sur la formation des sites de passages en nombre constant et limité par unité de temps, peut, *a priori*, rendre compte du phénomène observé.

4 - Exsorption de la lysine

Les essais d'exsorption tels qu'ils ont été réalisés (exsorption pendant une heure dans un milieu sans lysine, contrôle de l'intégrité des lutoïdes par le dosage des protéines) ne permettent pas, malgré une forte rétention de la radioactivité absorbée par les lutoïdes (plus de 90%) de conclure à l'absence d'un échange isotopique. Des techniques plus fines devront être imaginées.

Influence du pH du milieu extérieur

Entre 5,5 et 8,5.

Le pH du milieu d'incubation influe d'une manière très nette sur la vitesse de pénétration de la lysine. Cette vitesse est optimale à pH 8,0-8,5 et baisse fortement à pH 6.

Compte tenu du pH proche de la neutralité du sérum cytoplasmique et de l'acidité du sérum intralutoïdique - $pH \approx 5,6$ - l'hypothèse a été émise, suivant laquelle le gradient de pH pourrait être une des sources d'énergie permettant l'absorption par les lutoïdes de la lysine et, plus généralement, des acides aminés basiques, contre le gradient de concentration. Les résultats des expériences relatives à la pénétration de la lysine en fonction du pH du milieu corroborent une telle hypothèse.

Effecteurs de la pénétration

1 - Action du NH_4Cl

Nous avons testé l'action du NH_4Cl (connu comme substance qui décharge le gradient de protons intrachloroplastique), sur la pénétration de la lysine. Contrairement à ce qui a été noté pour le citrate, le NH_4Cl inhibe fortement (50% d'inhibition à la concentration ≈ 7 mM) l'absorption de la lysine. Le gradient de H^+ semble donc jouer un rôle dans le transport des acides aminés basiques (Figure 1).

2 - Action de l'ATP

L'ATP exalte la pénétration de la lysine. L'effet maximal - la vitesse de l'absorption multipliée par un facteur 1,4 - est observé à concentration entre 1 et 2,5 mM.

Deux modes d'action sont attribués à l'ATP :

- chargement du gradient des protons ;
- création des liaisons à haut potentiel énergétique ($\text{X}\sim\text{I}$).

3 - Action du 2,4 DNP (Figure 2)

Le 2,4 DNP inhibe l'absorption de la lysine par les lutoïdes. Son action, en tant que découpleur des phosphorylations, peut avoir une double explication :

- soit qu'il décharge la liaison à haute énergie $\text{X}\sim\text{I}$;
- soit qu'il décharge le gradient de protons à l'origine de la formation d'ATP.

4 - Action de la NEM (Figure 2)

La NEM exerce un effet inhibiteur net sur l'absorption de la lysine. La NEM étant un inhibiteur des groupes SH, ceci semble indiquer que ces groupes sont liés à la pénétration de la lysine.

Spécificité du transport de la lysine

1 - L'effet de l'alanine

L'alanine n'inhibe pas la pénétration de la lysine. Il en résulte que les sites de pénétration ne sont pas les mêmes pour les deux amino acides, ou bien que les transporteurs sont différents et spécifiques.

2 - L'effet de l'arginine

Contrairement à l'alanine, l'arginine exerce un effet inhibiteur net sur l'absorption de la lysine. Nous avons cherché à préciser s'il s'agit là d'une inhibition de type compétitif, mais les résultats de ces expériences n'ont pas encore été dépouillés. S'il en était ainsi, cela prouverait que les deux acides aminés basiques utilisent le même système transporteur ou, au moins, les mêmes sites de passage à travers la membrane lutoïdique.

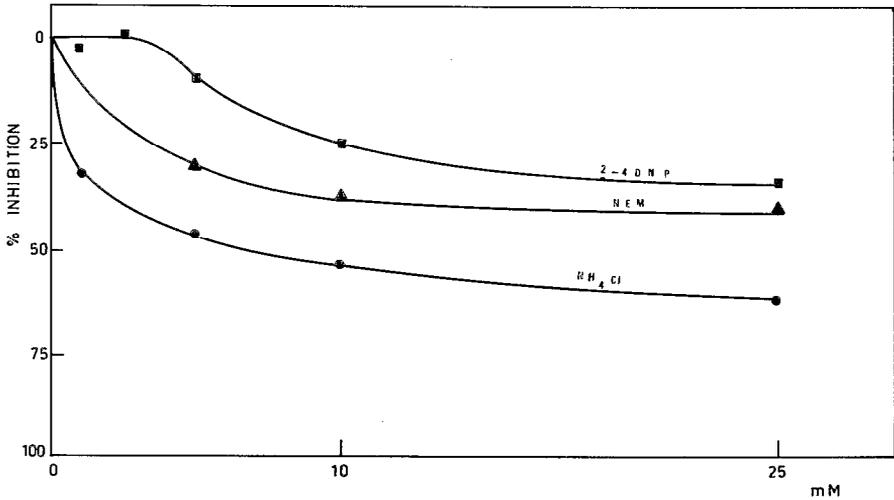


Figure 2

Inhibition de l'incorporation de la lysine dans les lutoïdes par NH_4Cl , 2,4 DNP et NEM

Spécificité du transport de l'alanine

A défaut de D-lysine, nous avons testé l'effet d'un isomère D sur la pénétration d'un isomère L de l'alanine.

Il s'avère que la D-alanine est sans influence sur l'absorption de la L-alanine ou, du moins, que la forme L est absorbée préférentiellement. Vu le peu de différence structurale entre la forme L et D, ce fait indiquerait une haute stéréospécificité du transport de l'alanine à travers la membrane lutoïdique et laisserait penser à l'existence d'un transporteur enzymatique.

Influence d'un traitement stimulant sur la perméabilité de la membrane lutoïdique

La stimulation des arbres par l'Ethrel, générateur de l'éthylène, se traduit par une augmentation importante de la pénétration de la lysine (allant jusqu'à 80%).

Une des explications possibles de ce phénomène pourrait être la montée du pH du sérum cytoplasmique observée après le traitement stimulant, montée qui peut atteindre 0,5 unité de pH (Primot, 1974) et qui, à son tour, augmenterait le gradient de pH entre le milieu extralutoïdique et le sérum intralutoïdique.

Tableau 1
Valeurs du pH intralutoïdique après divers traitements des lutoïdes (Moyennes de deux essais)

Milieu extra-lutoïdique naturel ou artificiel							Sérum intra-lutoïdique					
Sérum cytoplasmique	Milieu de base : Mannitol 0,3 M Tampon phosphate 0,1 M	Lysine 0,5 mM	A.T.P. 2,5 mM	NH ₄ Cl 25 mM	2,4 -DNP 20 mM	pH	Traitement des lutoïdes				pH	
							Centrifugation	Trois lavages avec milieu de base	Incubation 30mn à 25°C et centrifugation	Ultra-sons		
+	+					6,83	+				+	5,60
	"					7,00		+			"	6,02
	"					7,00		"		+	"	6,10
	"	+				7,00		"		"	"	6,11
	"			+		7,00		"		"	"	5,93
	"				+	7,00		"		"	"	6,45
	"					7,00		"		"	"	6,29

Gradient du pH entre le milieu externe et le sérum lutoïdique

Afin de vérifier si le gradient de pH contrôle la pénétration de la lysine dans les lutoïdes contre le gradient de concentration, une série de mesures du pH intralutoïdique ont été réalisées après les différents traitements (centrifugation, lavages, incorporation de la lysine en présence ou non des divers effecteurs de la pénétration (Tableau 1).

Les résultats obtenus plaident en faveur de cette hypothèse. Une corrélation positive semble exister entre l'intensité de pénétration de la lysine et la valeur du gradient de pH milieu externe/sérum lutoïdique :

- l'ATP entraîne une baisse du pH intralutoïdique, c'est-à-dire fait augmenter le gradient de pH et stimule l'absorption de la lysine ;
- le 2,4 DNP et surtout le NH_4Cl , font monter le pH intralutoïdique, donc diminuent le gradient du pH et inhibent la pénétration de la lysine.

Il est intéressant de noter (Tableau 1) que l'utilisation du tampon phosphate 0,1 M pour tamponner le milieu d'incubation entraîne une augmentation sensible du pH intralutoïdique ; de ce fait, le gradient de pH milieu extralutoïdique/milieu intralutoïdique, dans nos conditions expérimentales, est inférieur au gradient existant dans les conditions physiologiques naturelles (Δ pH 0,98 contre Δ pH 1,23), ce qui agirait dans le sens de diminution de la pénétration de la lysine dans les lutoïdes.

Il serait souhaitable, à l'avenir, d'employer un tampon plus faible.

★

2 - 4 - 5 - 4
 «Énergisation» de l'accumulation intralutoïdique
 J. d'Auzac

Energy sources for intralutoid accumulation

As we have seen, certain of the cytoplasmic serum components such as citric acid and lysine are capable of accumulating in vitro against a concentration gradient in the lutoid fraction. Although this accumulation is activated by ATP, it can also take place in the absence of a source of energy.

We cannot yet be absolutely certain that the absorption which has been shown to occur in vitro is the result of active transfer. It is, however, highly likely that an active effect of this type occurs in vivo. The problem then arises as to the source of energy necessary for this transfer to occur.

A number of hypotheses have been put forward to account for this accumulation. These are as follows :

- 1 - on the lutoid membrane there are pumps of varying specificity which use cytoplasmic ATP ;*
- 2 - if a membrane ATPase or an oxidation-reduction reaction associated, for example, with NADH cytochrome c, oxidase was involved, this would give rise to an energised state of the membrane or to a conformational modification. One or other of these states would energise the pumps ;*
- 3 - oxidation of respiratory substrates, or more simply the hydrolysis of ATP, is coupled with an intralutoid accumulation of protons. This gradient would be the source of energy for the various systems of active transfer.*

The results as they stand at present favour the last of these hypothesis.

★

Posons clairement le problème :

- D'une façon générale, le mécanisme susceptible d'énergiser l'accumulation active dans les vacuoles *in vivo* est peu ou pas connu.
- On parle en terme de potentiel de NERNST, de flux, etc.. mais on ignore la source d'énergie qui assure en dernier ressort le transport actif.

La solution simple est de supposer que le métabolisme cytoplasmique est le fournisseur d'énergie. Il n'en reste pas moins que les médiateurs impliqués dans la transformation de l'énergie chimique en gradient de concentration sont inconnus.

On parle, bien sûr, d'une ATP-ase. D'une façon générale le système enzymatique du tonoplasme est pratiquement inconnu, dans l'impossibilité où sont la plupart des chercheurs de disposer en quantité suffisante d'une fraction membranaire dont on puisse être sûr qu'il s'agisse d'un tonoplasme.

- L'équipe francophone, qui travaille sur le latex, a la chance certaine de posséder en grande quantité du matériel végétal bien adapté à une telle étude ; il serait extrêmement regrettable de ne pas utiliser une telle chance.
- Il se trouve par ailleurs que des vacuoles isolés *in vitro* dans un milieu isotonique **mais non énergétique** sont susceptibles d'accumuler citrate et acides aminés basiques contre un gradient de concentration d'une façon qui semble active.

Quel peut donc être le mécanisme susceptible d'«énergiser» une telle accumulation ?

La solution simple impliquant l'existence de pompes plus ou moins spécifiques utilisant l'ATP peut, semble-t-il, être écartée. En effet, sans ATP, l'absorption du citrate représente 50% et celle des acides aminés basiques au moins les deux-tiers de celle obtenue avec ATP.

La plupart des connaissances acquises dans l'activation des transports membranaires découlent de l'école de Kaback et concernent des vésicules reconstitués à partir de bactéries ou de levures privées de leur paroi cellulaire. Il s'agit donc de vésicules possédant des membranes de type mitochondrial, donc énergétiques.

Le processus le plus général mis en évidence par Kaback est le suivant : des électrons dérivés du lactate ou de donneurs artificiels sont transférés à O_2 par une chaîne respiratoire membranaire et la respiration est couplée au transport actif à travers un fragment de cette chaîne. Dans la majorité des cas, la formation et l'hydrolyse de l'ATP n'est pas impliquée.

En anaérobiose le fumarate ou le nitrate peuvent remplacer O_2 comme accepteurs d'électrons.

A ce schéma général, sans doute le plus courant, mais que nous n'avons pas réussi à faire fonctionner, s'ajoute un schéma plus particulier mais peut-être plus intéressant mis en évidence par Berger sur des *E. coli* affamés (Figure 1). Le transport de la proline est activé directement par un état riche en énergie de la membrane lequel peut être produit, soit par un transport d'électrons le long de la chaîne respiratoire, soit par l'hydrolyse de l'ATP.

L'absorption de la glutamine est commandée par l'énergie des liaisons phosphates formées par des phosphorylations, oxydatives ou au niveau du substrat.

Travaillant sur des vacuoles lysosomales, nous sommes dans un domaine quasiment vierge si l'on considère l'«énergisation» des accumulations.

Il faut donc faire des hypothèses heuristiques. On peut en proposer trois :
- la première implique le couplage direct de pompes spécifiques à l'hydrolyse de l'ATP (Figure 2) ;

H.R. KABACK - *Science*, 186, 882, (1974).

E.A. BERGER - *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 74, 5, 1514, (1973).

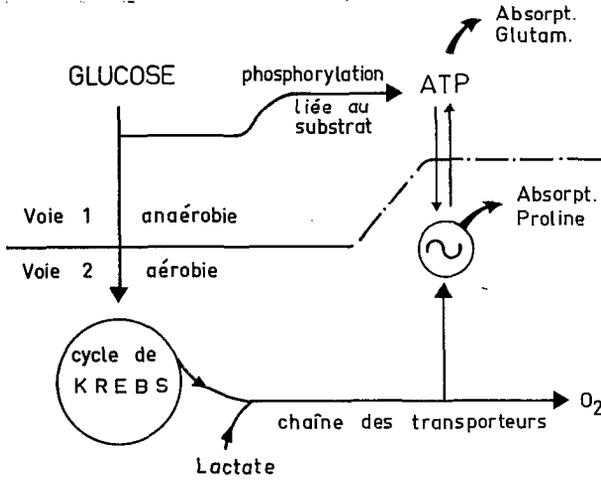


Figure 1

Différents mécanismes de couplage énergétique du transport actif chez *E. coli*
 E.A. BERGER - *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 70, 5, 1514, (1973)

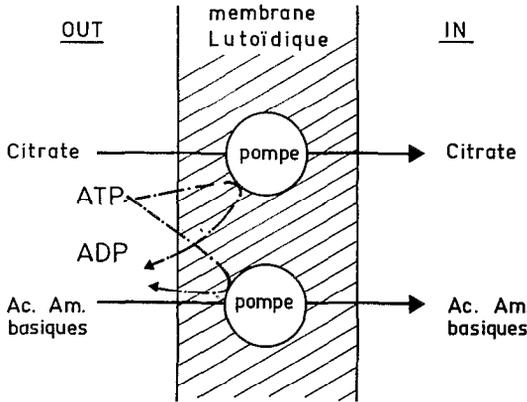


Figure 2

Energisation du transport actif - Hypothèse I

Pompes spécifiques utilisant l'ATP

Hypothèse peu vraisemblable car les transports fonctionnent sans ATP

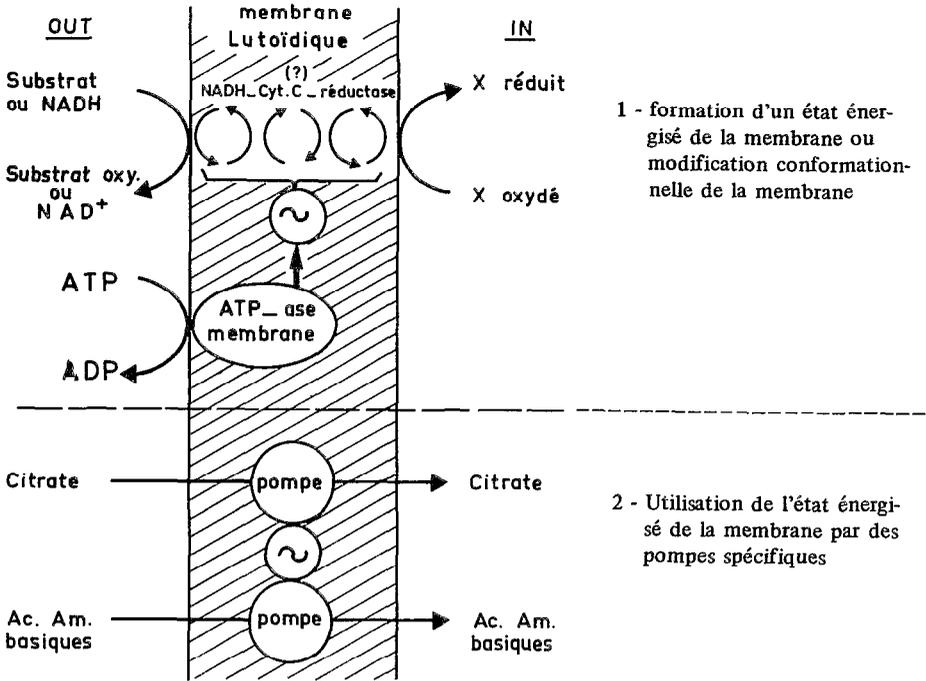


Figure 1

Énergisation du transport actif - Hypothèse I

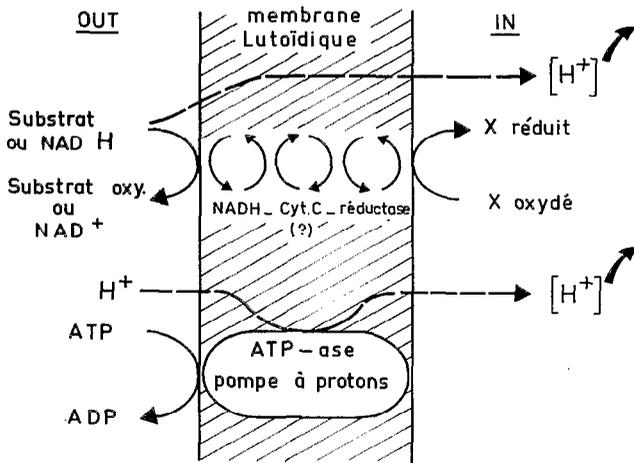
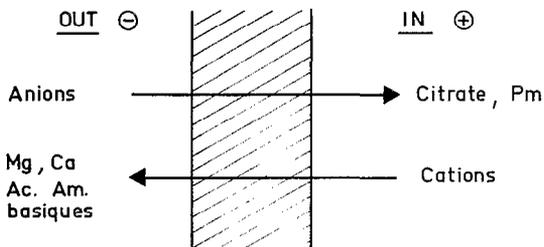


Figure 4

Énergisation du transport actif - Hypothèse III

Constitution *in vivo* d'un gradient d'H⁺ intralutoïdique grâce au métabolisme cytoplasmique
 Le gradient d'H⁺ régulièrement entretenu *in vivo* et entretenu *in vitro* grâce à l'ATP exogène serait le moteur de certaines absorptions.

- 1 - le gradient d' H^+ serait responsable d'un transport passif dans le sens du gradient électrique (si transporteur, on a une diffusion facilitée)



- 2 - la décharge du gradient de protons énérgise *in vitro* diverses pompes

L'entrée des ions pourrait s'accompagner de la sortie de charges de même signe pour conserver l'équilibre électrique.

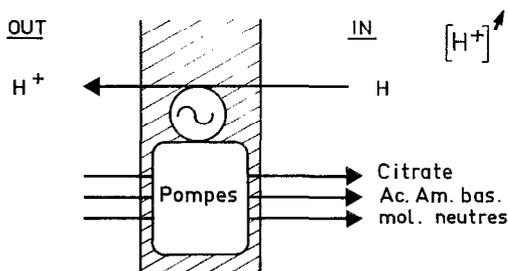


Figure 5

Energisation du transport actif - Hypothèse III (suite)

- la seconde implique la formation d'un état énérgisé de la membrane ou une modification conformationnelle. L'un ou l'autre de ces états énérgisant les pompes (Figure 3) ;
- alors que cette seconde hypothèse relève de la théorie de Chance, la troisième découle de Mitchell : l'oxydation de substrats respiratoires (ou de NADH), ou l'hydrolyse de l'ATP sont couplés avec une accumulation intralutoïdique de protons. C'est le gradient intralutoïdique de protons qui «énérgise» les différentes pompes (Figures 4 et 5).

☆

De la discussion générale qui s'instaure à ce moment, on peut extraire les principales idées suivantes :

- des diverses hypothèses plausibles, la troisième concernant le rôle majeur du pH dans l'absorption pourrait être la plus vraisemblable et mérite que l'on s'y arrête sur le plan expérimental ;
- les différences de pH intralutoïdique constatées par l'IRCA d'une part, l'ORSTOM et la Faculté d'Abidjan d'autre part, pourraient résulter de la préservation par un tampon dans ces deux derniers cas ;

- ceci pose le problème de la perméabilité aux tampons utilisés (phosphate - TEA - cacodylate - Tris-maléate) de la membrane lutoïdique. Il y aurait lieu de vérifier comment la conservation des lutoïdes dans ces différents tampons modifie le pH intralutoïdique ;
- la différence de comportement des tampons TEA et cacodylate vis-à-vis de divers acides organiques pourraient être considérée en fonction du point précédent ;
- il serait souhaitable de considérer l'influence des différents inhibiteurs, notamment des découpleurs CCCP et 2,4 DNP sur le pH intralutoïdique en même temps que sur l'absorption ;
- il est a priori deux façons d'étudier les relations entre l'action de molécules diverses et le pH intralutoïdique :
 - la première est de considérer la variation du pH intralutoïdique en fin et en cours d'incubation,
 - la deuxième est de suivre en cinétique l'évolution du pH du milieu d'incubation dans des conditions à définir très soigneusement ;
- si l'ATP-ase membranaire fonctionne pour abaisser le pH intralutoïdique, on peut se demander s'il est possible de la faire fonctionner à l'envers en fournissant un excès d'ADP et de Pm ?

*

D'une façon générale, le facteur pH est apparu d'extrême importance tout au long de la réunion. Rappelons :

- le pH élevé lié à une forte production,
- la régulation par le pH de l'invertase et de la pyruvate décarboxylase,
- l'hypothèse générale de régulation acido-basique du métabolisme latifère présentée par Jacob,
- le rôle du pH dans l'absorption intralutoïdique des différentes molécules organiques testées.

Il peut paraître important dans cette dernière (?) année du contrat DGRST sur les membranes lutoïdiques de s'attacher à approfondir les résultats encourageants obtenus à ce jour quant à l'«énergisation» de l'accumulation dans un compartiment vacuolaire-lysosomal.

Il est envisagé, à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, d'entreprendre l'étude de l'absorption «active» et de ses mécanismes sur des vésicules membranaires lutoïdiques reconstitués. Il serait alors possible, connaissant le contenu intralutoïdique, d'avoir une meilleure approche du problème.

★

2 - 5
La fatigue

2 - 5 - 1
Introduction
J. d'Auzac

La saignée trop intense conduit au dessèchement de l'encoche qu'est le Brown-Bast (car souvent accompagné d'un brunissement de l'encoche), celui-ci est le plus souvent quasiment irréversible : il faut, au mieux, attendre la régénération d'un nouveau système laticifère à partir du cambium, ce qui peut demander plusieurs années.

Il apparaît donc tout à fait nécessaire de trouver des critères permettant de déceler la fatigue du système laticifère avant que n'apparaisse la dégénérescence des laticifères.

- le problème est de très grande importance et extrêmement complexe ;
- divers chercheurs se sont déjà penchés sur ce problème ;
- la Côte d'Ivoire, dans la dernière commission de programme de l'IRCA, a décidé d'y consacrer un jeune chercheur ivoirien.

Je rappellerai les résultats majeurs d'un volumineux travail de Bealing et Chua (1972) qui ont utilisé des intensités de saignée croissante de S/2 J3 à S J4 pour faire apparaître la sécheresse de l'encoche. Il aura fallu trois ans pour arriver à 40% d'arbres secs et la production mensuelle des arbres en S J1 était au bout de ce temps égale ou supérieure à celle des S/2 J3 ; les DRC étaient environ de 20% inférieurs.

- L'analyse montre que les réserves glucidiques et minérales de l'écorce ne sont pas touchées.
- L'interprétation de l'expérience indique que le brown-bast ne résulterait pas des exportations plus importantes de matériel, mais d'une réponse de l'écorce au traumatisme causé par les saignées répétées.
- Si la teneur en saccharose du latex diminue considérablement, cette différence n'est pas attribuée par les auteurs à une possible dérivation de son métabolisme mais à une diminution de la perméabilité des membranes vis-à-vis du saccharose.
- La teneur en éléments minéraux du latex n'est que peu modifiée pour N et P ; (-28% N, -27% P) ; elle est plus affectée pour Mg (-57%), Ca (-68%), K (+41%).

- La teneur en québrachitol diminue dans le latex et non pas dans l'écorce.
- Il n'y aurait pas de différences sensibles dans la transformation du fructose* en éthanol* et de l'acétate* ou du MVA* en caoutchouc* entre latex témoins et latex issus d'arbres sursaignés.

On conclut du fait qu'il n'a pas été possible de relier la chute du DRC à une modification du métabolisme que la production de caoutchouc n'est pas limitée par un potentiel enzymatique mais par une fourniture limitante en molécule de base.

- Bealing ne croit toujours pas que le saccharose constitue la molécule de base pour la synthèse du caoutchouc, mais que celui-ci dérive d'un précurseur spécifique venant de l'extérieur des vaisseaux.
- L'idée fondamentale de Bealing est que les diminutions de N - P - Mg - Ca - saccharose, québrachitol et caoutchouc dans le latex résultent d'une baisse de la perméabilité des vaisseaux laticifères sous l'influence du traumatisme de la saignée.

La forte activité métabolique régnant dans les écorces sous saignée intensive conduirait à la synthèse d'un facteur de perméabilité qui pourrait être un stérol. La coloration jaunâtre de l'écorce, caractéristique du brown-bast est probablement due à l'accumulation d'une gomme jaunâtre dans les espaces intercellulaires à proximité des laticifères. Cette formation de gomme serait responsable, ou au moins contribuerait, à la non-alimentation des laticifères. Il s'en suivrait une chute rapide du métabolisme laticifère suivie d'une coagulation du latex *in situ*.

Les formations de «Patches» et, en général, les déformations du tronc de l'arbre, pourraient être dues à un déséquilibre hormonal et à une synthèse accrue de gibbérélines.

Donc, il apparaît une hypothèse dans laquelle essentiellement une modification de la perméabilité des laticifères est le facteur limitant d'une réduction du métabolisme isoprénique *in situ* alors qu'*in vitro* le métabolisme du latex serait peu touché.

Dans cette hypothèse, ni la régulation enzymatique de la synthèse du caoutchouc, ni la machinerie enzymatique ne seraient responsables.

*

- 1 - Est-ce que cette hypothèse s'accorde avec nos résultats ?
- 2 - Quelle ligne de conduite adopter pour une recherche sur la fatigue du système laticifère et l'apparition des encoches sèches ?

★

2 - 5 - 2
Importance actuelle des encoches sèches
 L. Primot

Importance du problème

Le problème des encoches sèches en hévéaculture en Côte d'Ivoire est actuellement grave sur certaines plantations.

Il convient de trouver rapidement :

- les causes du phénomène,
- les remèdes applicables à brève échéance,
- les moyens d'éviter ce type d'accident.

Définition du phénomène

Pour aborder ce problème, nous avons fait une étude bibliographique complétée par quelques observations faites à l'I.R.C.A.

Le point important à souligner qui ressort de cette étude est que le phénomène semble plus provoqué par l'intensité de la blessure que par la trop grande perte de latex.

Cette remarque est importante car, d'une part il ne s'agit pas de limiter la production pour diminuer le phénomène, d'autre part la façon d'obtenir le latex paraît être le point essentiel dans le problème des encoches sèches.

On peut d'ailleurs noter qu'en ce qui concerne l'expérimentation agronomique à l'I.R.C.A., l'exploitation en encoches courtes avec stimulation donne de bonnes productions sans que le phénomène d'encoches sèches apparaisse.

Dans le cas de la microsaignée expérimentée au Service de Physiologie, nous n'avons jamais obtenu d'arbres secs bien que la production ait été multipliée par deux.

Si nous examinons maintenant ce qui est dit sur l'origine du phénomène, plusieurs hypothèses sont avancées :

- 1 - Déséquilibre minéral provoqué par la perte de latex.;
- 2 - Déséquilibre dans le système croissance-production avec accumulation dans l'écorce ou le bois superficiel d'éléments (Ca^{++}) qui seraient normalement fixés dans le bois correspondant au latex produit.
- 3 - Modification de la perméabilité de la membrane cellulaire des vaisseaux laticifères, modifications entraînant des difficultés à l'entrée des matières premières dans les laticifères.

- 4 - Réactions à la blessure provoquée par la saignée avec nécrose des tissus et dépôt de gomme qui peut obstruer les laticifères donnant une coloration brunnâtre à l'écorce.
- 5 - Défaut dans l'alimentation glucidique des laticifères conduisant à une fatigue excessive puis à une dégénérescence des tissus laticifères.

Les travaux exposés par le Professeur Hallé amènent à poser la question du rôle des cellules à tanin qui sont toujours présentes autour des laticifères et sur lesquelles on connaît peu de choses.

Une étude du phénomène d'encoche sèche au niveau de l'écorce, c'est-à-dire une étude cytologique permettrait selon toute vraisemblance de mieux connaître l'origine du phénomène. Malheureusement, l'I.R.C.A. ne peut actuellement entreprendre une telle étude et nous souhaitons vivement que ce sujet intéresse un laboratoire de Montpellier.

★

2 - 5 - 3

Recherches de critères de fatigue au niveau du latex

On peut penser qu'une des façons d'aborder le problème de l'apparition des encoches sèches est de disposer de critères qui, au niveau du latex, laisseraient apparaître un état de fatigue préluant à l'apparition du phénomène.

Dans l'état actuel des connaissances, on peut songer d'ores et déjà à diverses caractéristiques du latex :

- le DRC du latex,
- la teneur en saccharose,
- la teneur et la nature des acides aminés présents,
- l'intensité de protéinogénèse,
- une variation marquée de la composition minérale,
- une modification des propriétés des lutoïdes,
- le pH du latex.

★

2 - 5 - 4
**Propositions pour un plan d'étude du phénomène
 des encoches sèches**

Le schéma suivant illustre une possibilité d'approche du phénomène :

FATIGUE ET BROWN-BAST

Objectifs

- 1 - comprendre le mécanisme physiologique de l'apparition du Brown-Bast ou de l'encoche sèche
- 2 - Déceler la fatigue avant l'établissement du Brown-Bast
- 3 - Trouver des systèmes d'exploitation limitant au maximum le Brown-Bast (micro-saignées)

Expérimentations suggérées

Hypothèse perméabilité : Y a-t-il parallélisme entre la formation de plages sèches sur l'encoche et la formation de gommages dans l'écorce décelables par microscopie ? (étude anatomique)

Hypothèse traumatique : Est-ce bien l'intensité des traumatismes plus que l'exportation intensive de latex qui déclenche le Brown-Bast ?

Comparez : saignées nombreuses non stimulées à faible production (sur latex de IP élevés)
 et saignées peu nombreuses stimulées à forte production (micro-saignée)

Critère fatigue : Y a-t-il dans le latex un composant organique ou minéral dont une variation importante peut signaler la fatigue avant le Brown Bast ?

Comparez : S/2 - J/2 et S J/1 en notant le pourcentage de sécheresse de l'encoche

etc..

Il entraîne un échange d'idées, lequel conduit aux remarques fondamentales suivantes :

– *La nécessité s'impose d'une recherche bibliographique préalable, extrêmement poussée, incluant les plus anciens travaux sur le problème (travaux qui sont le plus souvent très documentés et pleins d'intérêt). Une telle recherche sera utilement complétée par des études d'archives de l'I.R.C.A. – I.R.C.C. – I.R.C.V. visant à rechercher l'influence des facteurs tels la longueur d'encoche, l'intensité, le traumatisme, la profondeur de saignée ...*

– Dans ce type de recherche, il est apparu que les saignées stimulées qui, dans la pratique, entraînent une moindre consommation d'écorce, conduiraient à un nombre plus réduit d'encoques sèches.

Il a également été rappelé que les seringueros de l'Amazonie ne ravivent jamais la blessure de la saignée mais qu'ils ouvrent une nouvelle encoche à quelques centimètres sous la précédente. Dans le cas contraire, ils obtiendraient un latex trop fluide (donc à faible DRC) pour constituer les boules de caoutchouc par séchage à la fumée.

– Est-ce que le traumatisme répété et entretenu que constitue la saignée sur une même encoche ne conduit pas à une augmentation sensible du taux de phénols, notamment dans les premiers millilitres de la récolte qui correspond à la mise à nu d'un certain nombre de cellules à tanins ?

– Si l'hypothèse «traumatisme» apparaît particulièrement attrayante, il conviendra sans doute de la préciser avec soin. Il pourra notamment être retenu la notion d'intensité du traumatisme qui ferait appel à un rapport tel que : importance des traumatismes/fréquence de traumatisation.

– On peut penser que le problème des encoques sèches, indéniablement d'importance majeure, requiert la constitution d'un groupe de recherche comprenant un agronome, un anatomiste et un physiologiste tant il est vrai que les aspects du phénomène sont complexes. Il y a là, matière à une recherche pluridisciplinaire typique.

– On ne peut à ce sujet que regretter vivement que les études sur l'anatomie et la morphogenèse du système laticifère de l'hévéa par microscopie optique soient si peu développées dans les pays francophones. Il en résulte qu'actuellement les connaissances acquises en physiologie et biochimie manquent d'une base anatomique approfondie.

Dans ce domaine, il est également très regrettable qu'un projet envisageant d'employer un jeune chercheur sous la direction du Professeur Hallé et en collaboration avec l'I.R.C.A. n'ait pas pu aboutir. Il n'a, semble-t-il, pas encore été possible de trouver les fonds limités nécessaires pour assurer le fonctionnement d'une telle recherche.

– Les membres de cette réunion ont estimé regrettable que le Laboratoire de Physiologie végétale de l'I.R.C.A., par ailleurs convenablement équipé, ne soit animé que par un seul chercheur de haut-niveau eu égard à la complexité et à l'ampleur des problèmes dont l'importance économique est évidente.

CONCLUSIONS

L'ensemble des travaux présentés montre clairement que les centres d'intérêt qui caractérisent l'étude du latex sont étroitement liés.

D'une part, les résultats obtenus apportent des données nouvelles qui servent sans conteste à améliorer la connaissance du règne végétal. Ce matériel particulier a des avantages très rarement rencontrés ; ainsi, son obtention n'implique aucun broyage et, par conséquent, une dénaturation minimale ; ses lutoïdes assimilables à des vacuoles lysosomales peuvent être isolés en grande quantité et leurs membranes facilement purifiées sont un matériel de choix pour le physiologiste ou le biochimiste.

D'autre part, sur le plan pratique, l'examen des processus de la saignée et de la régénération du latex, examen qui prend en compte les résultats des recherches de base évoquées précédemment, conduit à la mise au point de méthodes d'exploitation nouvelles, mieux adaptées tant sur le plan biologique que sur le plan économique, et, par conséquent, plus rentables.

La pluridisciplinarité qui caractérise l'ensemble des équipes travaillant dans le domaine du latex ressort nettement des différents exposés. Elle souligne combien est vaste l'effort entrepris. Il est significatif de voir comment des frontières, sinon des barrières qui, *a priori*, peuvent séparer des spécialistes, s'estompent lorsqu'une concertation globale et bien menée permet une synthèse des résultats qui s'intègrent alors dans un contexte de mieux en mieux compris. La notion de collaboration scientifique prend ici tout le relief qu'elle mérite.

Toutefois, malgré la diversité des recherches entreprises, certaines disciplines sont pratiquement absentes et cette absence est extrêmement regrettable. C'est le cas, dans le cadre général de la morphologie, de l'histologie et de la cytologie. Il est en effet absolument nécessaire d'éclairer des problèmes aussi importants que l'ontogenèse et l'évolution cellulaire des laticifères, de leurs rapports avec les tissus voisins, notamment le phloème, les cellules à tanin, les cellules radiales.

Tant sur le plan de l'amélioration du matériel végétal que sur celui de l'étude de la physiologie de la saignée ou de la régénération du latex, un effort dans cette voie est indispensable. Il fallait le souligner dans ces conclusions.

La richesse en tissu laticifère fonctionnel, l'approvisionnement en matière première initiatrice du caoutchouc, le bon rééquilibrage hydrostatique des tubes à latex lors de la saignée, sont autant de facteurs en relation directe avec la productivité de l'hévéa ; la compréhension de leur influence respective ne peut se concevoir entièrement sans l'appui d'études histologiques et cytologiques.



Un autre effort doit, lui aussi, être repris avec le concours de toutes les disciplines. Il concerne une «maladie» qui peut avoir, si elle se développe, de graves conséquences en hévéaculture. Il s'agit en l'occurrence de la sécheresse des panneaux de saignée ou brown-bast. En Côte d'Ivoire, il devient nécessaire de se pencher sur ce problème qui tend à se développer d'une façon inquiétante. Un physiologiste à temps plein serait extrêmement souhaitable à l'I.R.C.A. pour aborder ce sujet difficile et qu'il faut étudier sans retard. Un programme cohérent et complet doit être envisagé. Déjà les conclusions qui ressortent de ce séminaire laissent deviner une des causes importantes de ce phénomène. Le traumatisme induit par la saignée pourrait être en effet un des facteurs principaux du brown-bast, plus que l'exportation du latex lui-même, c'est-à-dire l'effort de régénération demandé à l'arbre. Il est donc possible dès maintenant de réaliser des expériences pragmatiques sur ce thème afin de confirmer cette hypothèse et d'envisager les solutions susceptibles de résoudre ce problème. Mais un approfondissement de cette étude à l'aide des méthodologies déjà mises au point dans l'ensemble des recherches évoquées et notamment en histologie doit se poursuivre parallèlement. Ce processus doit permettre de préciser la phénologie de ce phénomène dont la manifestation et l'évolution semble encore mal connues, et d'en déterminer les causes le plus précisément, afin de trouver des critères de détection précoce et d'y porter remède de façon efficace. Des progrès décisifs ne seront certainement accomplis qu'à ce prix.



En ce qui concerne l'exploitation, la récolte par microsaignées semble pleine de promesses. Malgré les difficultés nombreuses et parfois graves que rencontre cette méthode, une recherche approfondie dans ce domaine s'impose plus que jamais étant donné l'intérêt de ce système, tant sur le plan théorique compte tenu des connaissances actuelles que sur le plan pratique et économique. Là aussi, toutes les techniques et les spécialités doivent apporter leur concours. La voie qui s'ouvre à ces recherches peut être extrêmement bénéfique.

L'apport des différentes équipes est vaste, mais leurs publications sont dispersées. Elles forment pourtant un tout dans le cadre bien défini d'une seule plante : l'*Hevea brasiliensis*. Il serait souhaitable de pouvoir donner à cet ensemble la

place qu'il mérite par la réalisation d'un ouvrage de synthèse dont l'impact peut être important au plan international tant en ce qui concerne la physiologie végétale que les conclusions pratiques qui en résultent.

Il faut par ailleurs regretter le manque de rapports entre les chercheurs anglophones et les chercheurs francophones, et surtout le manque d'informations toujours dommageable qui en découle et qu'il est très difficile de pallier. Il est plus que souhaitable que des contacts puissent s'établir réellement avec des équipes étrangères et, notamment, celles du R.R.I.M. qui travaillent sur le même matériel.

☆

Une remarque s'impose enfin ; des groupes très différents tant par leur localisation que par leur spécialisation ou que par leur appartenance à des organismes divers, ont apporté des résultats qui, loin d'être disparates, s'articulent dans un cadre commun et permettent d'éclairer la compréhension globale de phénomènes extrêmement complexes tels que ceux qui concourent à la productivité de l'hévéa.

L'effort de synthèse qui a été tenté et qui doit aboutir à la rencontre toujours importante et féconde du fondamental et de l'appliqué a été l'un des buts essentiels de ces « Journées Latex ». Tous les participants en ont été conscients. Cet effort doit être poursuivi et il faut espérer que cette réunion, loin d'être une tentative isolée, soit le point de départ d'une série de contacts de ce genre dont l'efficacité ne fait aucun doute.

★

Remerciements —

Ces travaux ont bénéficié de l'aide de la D.G.R.S.T. (Membrane biologique, structure et fonction ; contrats n° 72 7029 et 74 70396) et de l'antenne C.E.A. de l'O.R.S.T.O.M. à Adiopodoumé pour la fourniture d'éléments radioactifs.

★

Les Editions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer tendent à constituer une documentation scientifique de base sur les zones intertropicales et méditerranéennes, les pays qui en font partie et sur les problèmes posés par leur développement.

CAHIERS ORSTOM (séries périodiques)

- **biologie** : études consacrées à diverses branches de la biologie végétale et animale : agronomie, biologie et amélioration des plantes utiles, entomologie agricole, nématologie.
- **entomologie médicale et parasitologie** : systématique et biologie des arthropodes d'intérêt médical et vétérinaire, parasitologie, épidémiologie des grandes endémies tropicales, méthodes de lutte contre les vecteurs et les nuisances.
- **géologie** : pétrologie et cycles des éléments (géochimie) - hydrogéologie - altération et érosion - sédimentologie - stratigraphie - orogénèse continentale - métallogénèse - paléogéographie - structure et évolution des îonds océaniques.
- **hydrologie** : études, méthodes d'observation et d'exploitation des données concernant les cours d'eau intertropicaux et leurs régimes.
- **océanographie** : hydrologie, physico-chimie, hydrodynamique, écologie, caractérisation des chaînes alimentaires, niveaux de production, dynamique des stocks, prospection faunistique (Sud-ouest Pacifique, Canal de Mozambique et environs, Atlantique Tropical Est).
- **hydrobiologie** : physico-chimie, écologie, caractérisation des chaînes alimentaires, dynamique des stocks, action des insecticides sur la faune (Bassin Tchadien, Côte d'Ivoire).
- **pédologie** : problèmes soulevés par l'étude des sols : morphologie, caractérisation physico-chimique et minéralogique, classification, relations entre sols et géomorphologie, problèmes liés aux sels, à l'eau, à l'érosion, à la fertilité.
- **sciences humaines** : études géographiques, sociologiques, économiques, démographiques et ethnologiques.

MÉMOIRES ORSTOM : consacrés aux études approfondies (synthèses régionales, thèses...) dans les diverses disciplines scientifiques (82 titres parus).

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

FAUNE TROPICALE : collection d'ouvrages principalement de systématique, pouvant couvrir tous les domaines géographiques où l'ORSTOM exerce ses activités (19 titres parus).

INITIATIONS/DOCUMENTATIONS TECHNIQUES : mises au point et synthèses au niveau, soit de l'enseignement supérieur, soit d'une vulgarisation scientifiquement sûre (27 titres parus).

TRAVAUX ET DOCUMENTS DE L'ORSTOM : cette collection, diverse dans ses aspects et ses possibilités de diffusion, a été conçue pour s'adapter à des textes scientifiques ou techniques très variés quant à leur origine, leur nature, leur portée dans le temps ou l'espace, ou par leur degré de spécialisation (48 titres parus).

Les études en matière de géophysique (gravimétrie, sismologie, magnétisme...) sont publiées, ainsi que certaines données (magnétisme) dans des séries spéciales : **GÉOPHYSIQUE** et **OBSERVATIONS MAGNÉTIQUES**.

L'HOMME D'OUTRE-MER : cette collection, exclusivement consacrée aux sciences de l'homme, est réservée à des textes d'auteurs n'appartenant pas à l'ORSTOM, mais dont celui-ci assure la valeur scientifique (co-édition Berger-Levrault) (10 ouvrages parus).

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

BULLETIN ANALYTIQUE D'ENTOMOLOGIE MÉDICALE ET VÉTÉRINAIRE (périodicité mensuelle, ancienne dénomination jusqu'en 1970 : Bulletin signalétique d'entomologie médicale et vétérinaire) (XXIII^e année).

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

Direction générale :

24, rue Bayard - 75008 PARIS

Service des Publications :

70-74, route d'Aulnay - 93140 BONDY

Imp. S.S.C. Bondy

ORSTOM Éditeur

Dépôt légal : 2e trim. 1977

I.S.B.N. : 2-7099-0458-6