

# CARACTÉRISTIQUES DE L'INCORPORATION D'ACIDES AMINÉS PAR LES POLYSOMES ISOLÉS DU LATEX D'*HEVEA BRASILIENSIS*

MICHEL COUPE et JEAN d'AUZAC

Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, B P 4322,  
Abidjan, République de Côte d'Ivoire

(Reçu le 21 juin 1973 Accepté le 14 août 1973)

**Key Word Index**—*Hevea brasiliensis*, Euphorbiaceae, protein synthesis, ribosomes, cell-free systems

**Abstract**—Amino acid incorporation by latex polysomes needs the presence of cofactors ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ), cytoplasmic serum and GTP. It is abolished by RNase but not by chloramphenicol. Poly U increases the incorporation rate.

**Résumé**—L'incorporation d'acides aminés par les polysomes du latex requiert la présence de cofacteurs ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ) de serum cytoplasmique et de GTP. Elle est abolie par la RNase mais non par le chloramphénicol.

## INTRODUCTION

L'INCORPORATION d'acides aminés par des systèmes acellulaires de plantes est connue depuis longtemps<sup>1,2</sup>. Néanmoins à part les résultats négatifs de Meissner<sup>3</sup> rien n'avait été fait concernant les systèmes issus de plantes à latex.

Après avoir mis en évidence,<sup>4</sup> dans le latex d'*Hevea brasiliensis* la présence de polysomes susceptibles d'incorporer de la L-leucine dans des protéines, nous avons étudié les caractéristiques biochimiques de cette synthèse. L'analyse de ce système revêt une importance particulière si l'on se rappelle que l'hévéa, en phase d'exploitation, est soumis à une saignée bihebdomadaire pouvant produire jusqu'à 500 ml de latex à chaque fois.

Il nous a donc paru intéressant de connaître les conditions optimales dans lesquelles se réalise le renouvellement du contenu de la cellule laticifère et en particulier la biosynthèse de ses protéines.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les polysomes obtenus par notre méthode ont les caractéristiques suivantes (moyenne de 10 préparations) Spectre d'absorption maximum 258 nm, minimum 236 nm

$$(DO_{258}/DO_{236} = 1,40, \text{ ARN/Protéines} = 1,04)$$

Une unité de densité optique correspond à une concentration en ribosomes de 0,1 mg/ml. La concentration en ribosomes est obtenue par le dosage de l'ARN et des protéines.

<sup>1</sup> STEPHENSON, M. L., THIMANN, K. V. et ZAMECNIK, P. C. (1956) *Arch Biochem Biophys* **65**, 194

<sup>2</sup> BOULTER, D. (1970) *Ann Rev Plant Physiol* **21**, 91

<sup>3</sup> MEISSNER, L. (1966) *Flora Abstr* **156A**, 634

<sup>4</sup> COUPE, M. et d'AUZAC, J. (1972) *Compt Rend* **274**, 1031

Des études antérieures<sup>5</sup> ayant montré l'existence d'une glycolyse importante au sein du latex de l'hévéa ainsi que la présence d'une fructokinase active,<sup>6</sup> nous avons comparé deux systèmes génératrices d'ATP l'un classique et l'autre utilisant la glycolyse du serum cytoplasmique. Les incorporations ont été respectivement 2.36 et 2.41 pmol de L-leucine/mg ribosomes/mn. Ces deux systèmes sont donc équivalents.

L'incorporation est linéaire en fonction du temps jusqu'à 12 mn pour une concentration en polysomes de 0.8 mg/ml avec une concentration plus faible (0.4 mg/ml) l'incorporation se poursuit linéairement pendant au moins 15 mn. Pour un temps d'incorporation de 12 mn on constate que l'incorporation est proportionnelle à la concentration en ribosomes. Dans la suite de notre étude nous avons adopté des temps d'incorporation allant de 10 à 15 mn et des concentrations en ribosomes jamais supérieures à 0.5 mg/ml. Le pH optimum de la réaction est de 7.8 en tampon tris et de 7.5 en tampon triéthanolamine. Les incorporations correspondantes sont respectivement de 2.82 et 2.96 pmol de L-leucine/mg ribosomes/mn.

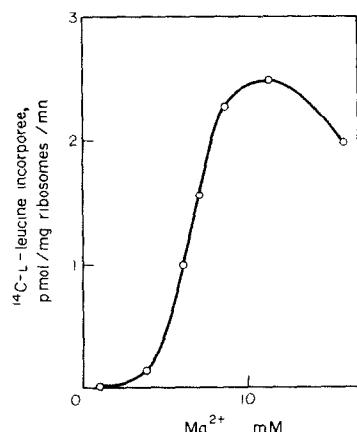


FIG. 1 EFFET DE LA CONCENTRATION EN Mg<sup>2+</sup> SUR L'INCORPORATION DE <sup>14</sup>C-L-LEUCINE PAR DES POLYSOMES ISOLÉS DE LA LATEX D'HEVÉA

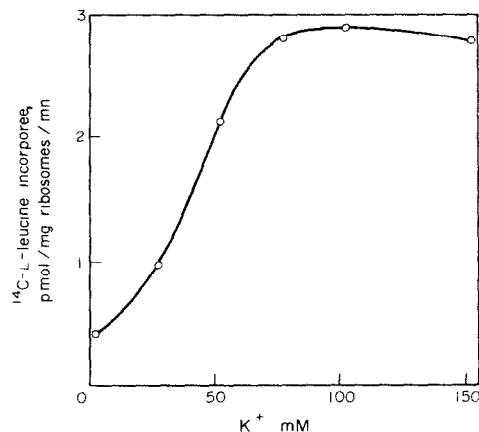


FIG. 2 EFFET DE LA CONCENTRATION EN K<sup>+</sup> SUR L'INCORPORATION DE <sup>14</sup>C-L-LEUCINE PAR DES POLYSOMES ISOLÉS DE LA LATEX D'HEVÉA

Une telle incorporation de leucine par les ribosomes du latex nécessite la présence de cofacteurs (Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) de serum cytoplasmique (serum C) et d'énergie (Tableau 1). Mg<sup>2+</sup> est strictement indispensable, son optimum de 12 mM est très aigu (Fig. 1) et correspond aux chiffres ordinairement trouvés par d'autres auteurs,<sup>7,8</sup> il est voisin de la concentration habituelle du magnésium dans le serum C. K<sup>+</sup> augmente fortement l'incorporation. La Fig. 2 montre un optimum assez large pour une concentration de 90 mM. Cette valeur est assez élevée par rapport aux données habituelles de la littérature.<sup>9-11</sup> Elle diffère sensiblement de la concentration du potassium dans le serum C qui est de 30 mM.<sup>12</sup>

<sup>7</sup> d'ALZAC J (1964) *Rev Gen Caout Plast* **41**, 1831

<sup>8</sup> JACOB J-L et d'ALZAC J (1967) *Compt Rend* **265**, 260

<sup>9</sup> PAYNE E S BOLITHR D BROWNREIGG A LONSDALE D YARWOOD A et YARWOOD J N (1971) *Phytochemistry* **10**, 2293

<sup>10</sup> MARCH N GADALLAH A I et KILGORI W W (1972) *Phytochemistry* **11**, 529

<sup>11</sup> APP A A et GEROSA M M (1966) *Plant Physiol* **41**, 1420

<sup>12</sup> BEWLEY J D et MARCUS A (1970) *Phytochemistry* **9**, 1031

<sup>11</sup> MARCUS A (1970) *J Biol Chem* **245**, 955

<sup>12</sup> RIBAILLER D JACOB J-L et d'ALZAC J (1971) *Physiol Veg* **9**, 423

Le sérum cytoplasmique est nécessaire à l'incorporation mais un excès est inhibiteur (Fig 3) Un tel effet a déjà été observé sur des polysomes issus de cotylédons de pois<sup>13</sup> Le GTP augmente sensiblement l'incorporation mais n'est pas strictement indispensable (Tableau 1) Cet effet est commun aux polysomes qui ne sont pas hautement purifiées

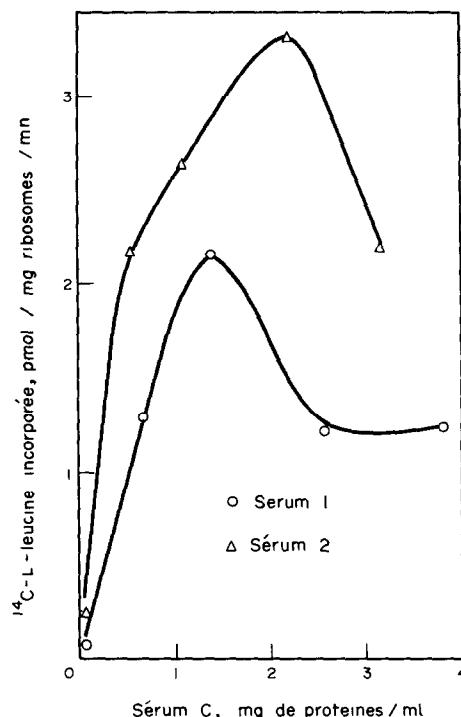


FIG 3 EFFET DE LA CONCENTRATION EN SERUM CYTOPLASMIQUE SUR L'INCORPORATION DE <sup>14</sup>C-L-LEUCINE PAR DES POLYSOMES ISOLES DU LATEX D'HEVEA POUR 2 SERUMS DIFFENTS

Le Tableau 1 montre que le chloramphenicol à concentration élevée (1 mM) n'a pas d'action sur l'incorporation La présence des 19 acides aminés non marqués n'est pas nécessaire Le sérum cytoplasmique ou les ribosomes doivent en contenir suffisamment

TABLEAU 1 CARACTÉRISTIQUES DE L'INCORPORATION DE <sup>14</sup>C-L-LEUCINE PAR DES POLYSOMES ISOLES DU LATEX D'HEVEA

Additions ou omissions	Activité (%)	Additions ou omissions	Activité (%)
Milieu complet	100	+ RNase 4 µg/ml	6
- 19 acides aminés	99	- Mg <sup>2+</sup>	2
- GTP	48	- K <sup>+</sup>	15
+ chloramphenicol 1 mM	98	- serum cytoplasmique	10
- ribosomes	1		

L'addition d'acide polyuridylique (40 µg/ml) à notre système augmente considérablement son activité vis-à-vis de l'incorporation de <sup>14</sup>C-L-phenylalanine qui passe de 1,5 à 7,1 pmol/mg de ribosomes/mn

<sup>13</sup> SWAIN, R R et DEKKER E E (1969) *Plant Physiol* **44**, 319

Il est intéressant de noter que les polysomes isolés du latex d'hevea ont des caractéristiques voisines de ceux issus d'autres plantes. L'action stimulante du poly-U sur l'incorporation montre que dans nos conditions expérimentales la disponibilité en ARN messager est le facteur limitant principal de l'incorporation.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

Après la saignée le latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Mull Arg est recueilli dans un récipient refroidi par de la glace. Les polysomes sont isolés selon la méthode décrite par Coupe et d'Auzac.<sup>4</sup> Le milieu d'incorporation (0,5 ml) a la composition suivante (concentration en mM) Tris-HCl (pH 7,8) 50, MgCl<sub>2</sub> 10, KCl 90, mercapto-2-éthanol, 10, ATP 1, GTP 0,25, fructose 5, NAD 0,5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5, 19 acide amines (moins la leucine) 0,1 mM de chaque. On y ajoute 0,2 mg de ribosomes, 0,25 µCi de <sup>14</sup>C-L leucine (150 mCi/mmol) et 0,6 mg de serum cytoplasmique introduit sous forme d'une poudre acetonique réalisée par la méthode de Coupe *et al*.<sup>14</sup> Le lavage des protéines marquées est fait selon la méthode de Ching<sup>15</sup> et leur radioactivité mesurée par scintillation en milieu liquide. L'ARN est dose par la méthode de Schmidt et Thannhauser modifiée par Munro et Fleck<sup>16</sup> les protéines par la méthode de Lowry *et al*.<sup>17</sup>

Dans une expérience le système fructose, NAD, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ATP, serum cytoplasmique a été remplacé par ATP 5 mM, pyruvate kinase 40 µg/ml, phosphoenol pyruvate, 10 mM.

*Remerciements*—Nous remercions l'Institut de Recherche sur le Caoutchouc en Afrique (I.R.C.A.) qui a mis sa plantation à notre disposition et le Commissariat à l'Energie Atomique (C.E.A.) qui nous a fourni gracieusement les radioisotopes.

<sup>14</sup> COUPE, M., PUJARNISCLE, S. et d'AUZAC, J. (1972) *Physiol. Veg.* **10**, 459

<sup>15</sup> CHING T M (1970) *Plant Physiol.* **46**, 475

<sup>16</sup> MUNRO H N et FLECK A (1966) *Analyst* **91**, 78

<sup>17</sup> LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L et RANDALL R J (1961) *J. Biol. Chem.* **193**, 265