

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^{1,2}. Néanmoins à part les résultats négatifs de Meissner³ rien n'avait été fait concernant les systèmes issus de plantes à latex.

Après avoir mis en évidence,⁴ 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

$$(DO_{258}/DO_{235} = 1,40, \text{ ARN/Protéines} = 1,04)$$

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.

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

² BOULTER, D. (1970) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**, 91.

³ MEISSNER, L. (1966) *Flora Abstr.* **156A**, 634.

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

Des études antérieures⁵ ayant montré l'existence d'une glycolyse importante au sein du latex de l'hévéa ainsi que la présence d'une fructokinase active,⁶ nous avons comparé deux systèmes générateurs 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.

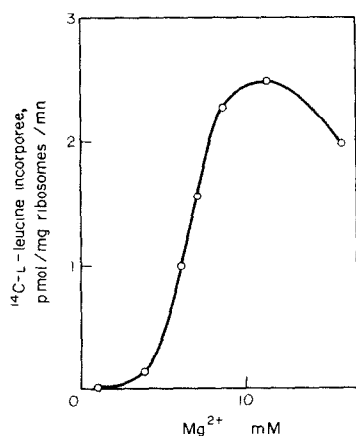


FIG 1 EFFET DE LA CONCENTRATION EN Mg^{2+} SUR L'INCORPORATION DE ^{14}C -L-LEUCINE PAR DES POLYSOMES ISOLÉS DU LATEX D'HÉVÉA

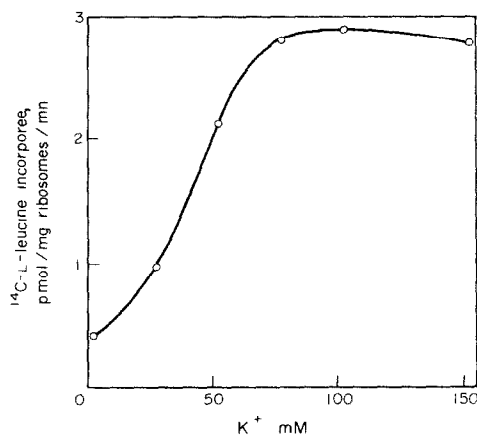


FIG 2 EFFET DE LA CONCENTRATION EN K^{+} SUR L'INCORPORATION DE ^{14}C -L-LEUCINE PAR DES POLYSOMES ISOLÉS DU LATEX D'HÉVÉA

Une telle incorporation de leucine par les ribosomes du latex nécessite la présence de cofacteurs (Mg^{2+} , K^{+}) de serum cytoplasmique (serum C) et d'énergie (Tableau 1). Mg^{2+} est strictement indispensable, son optimum de 12 mM est très aigu (Fig 1) et correspond aux chiffres ordinairement trouvés par d'autres auteurs,^{7,8} il est voisin de la concentration habituelle du magnésium dans le serum C. K^{+} 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 littérature⁹⁻¹¹. Elle diffère sensiblement de la concentration du potassium dans le serum C qui est de 30 mM.¹²

⁵ D'ALZAC J (1964) *Rev Gen Caout Plast* **41**, 1831

⁶ JACOB J-L et D'ALZAC J (1967) *Compt Rend* **265**, 260

⁷ PAYNE E S, BOUTER D, BROWNRIGG A, LONSDALE D, YARWOOD A et YARWOOD J N (1971) *Phytochemistry* **10**, 2293

⁸ MARFI N, GADALLAH A I et KILGORE W W (1972) *Phytochemistry* **11**, 529

⁹ APP, A A et GEROSA, M M (1966) *Plant Physiol* **41**, 1420

¹⁰ BEWLEY J D et MARCUS A (1970) *Phytochemistry* **9**, 1031

¹¹ MARCUS A (1970) *J Biol Chem* **245**, 955

¹² RIBAILLIER 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 pois¹³ 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 purifiés

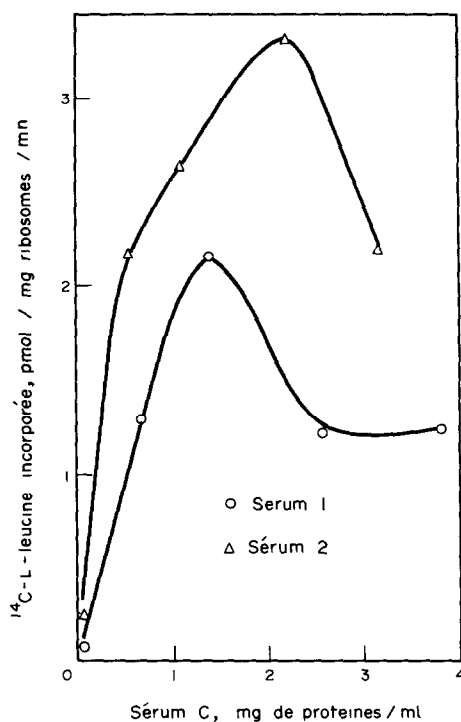


FIG 3 EFFET DE LA CONCENTRATION EN SÉRUM CYTOPLASMIQUE SUR L'INCORPORATION DE ¹⁴C-L-LEUCINE PAR DES POLYSOMES ISOLÉS DU LATEX D'HEVEA POUR 2 SÉRUMS DIFFÉRENTS

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.

TABEAU 1 CARACTÉRISTIQUES DE L'INCORPORATION DE ¹⁴C-L-LEUCINE PAR DES POLYSOMES ISOLÉS 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 ²⁺	2
- GTP	48	- K ⁺	15
+ chloramphenicol 1 mM	98	- sérum 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 ¹⁴C-L-phenylalanine qui passe de 1,5 à 7,1 pmol/mg de ribosomes/mn.

¹³ 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'Auzac⁴. Le milieu d'incorporation (0,5 ml) a la composition suivante (concentration en mM): Tris-HCl (pH 7,8) 50, MgCl₂ 10, KCl 90, mercapto-2-ethanol, 10, ATP 1, GTP 0,25, fructose 5, NAD 0,5, Na₂HPO₄ 5, 19 acides aminés (moins la leucine) 0,1 mM de chaque. On y ajoute 0,2 mg de ribosomes, 0,25 μ Ci de ¹⁴C-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.*¹⁴. Le lavage des protéines marquées est fait selon la méthode de Ching¹⁵ et leur radioactivité mesurée par scintillation en milieu liquide. L'ARN est dosé par la méthode de Schmidt et Thannhauser modifiée par Munro et Fleck¹⁶, les protéines par la méthode de Lowry *et al.*¹⁷.

Dans une expérience le système fructose, NAD, Na₂HPO₄, ATP, serum cytoplasmique a été remplacé par ATP 5 mM, pyruvate kinase 40 μ g/ml, phosphoenol pyruvate, 10 mM.

Remerciements—Nous remercions l'Institut de Recherche sur le Caoutchouc en Afrique (IRCA) qui a mis sa plantation à notre disposition et le Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) qui nous a fourni gracieusement les radioisotopes.

¹⁴ COUPE, M., PUJARNISLE, S. et D'AUZAC, J. (1972) *Physiol. Veg.* **10**, 459.

¹⁵ CHING, T. M. (1970) *Plant Physiol.* **46**, 475.

¹⁶ MUNRO, H. N. et FLECK, A. (1966) *Analyst* **91**, 78.

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