

Contribution à l'étude des métabolismes en relation avec la biosynthèse du caoutchouc au sein de l'hévéa *brasiliensis*

Partie I

MM. J. d'AUZAC, S. PUJARNISCLE, INSTITUT DES RECHERCHES SUR LE CAOUTCHOUC AU VIÊT-NAM, LAI-KHÊ

MM. P. L. E. FOURNIER, TUONG CHI CUONG, INSTITUT FRANÇAIS DU CAOUTCHOUC, PARIS

Les réactions conduisant au cis-polyisoprène dans l'hévéa *brasiliensis* sont maintenant bien connues grâce aux travaux de BONNER (1), de TEAS (2), puis plus récemment de PARK et BONNER (3), de LYNEN (4) et de l'association anglaise : Natural Rubber Producers Research Association (5).

Il se dégage de l'ensemble de ces travaux que la biosynthèse du caoutchouc emprunte les mêmes voies que celles des terpènes (*) (schéma 1) jusqu'à la formation du pyrophosphate d'isopentényle que l'on peut considérer comme le dernier substrat commun avant une série de réactions différenciées aboutissant aux diverses familles de dérivés terpéniques. Le cis-polyisoprène, quant à lui, naît de la polycondensation directe du pyrophosphate d'isopentényle.

La connaissance des mécanismes réactionnels est, certes, capitale, mais elle ne laisse en rien présumer des systèmes qui, au sein de la plante, régularisent la formation du caoutchouc.

Il faut rappeler à ce propos que l'hévéa *brasiliensis* possède la faculté de recréer ses réserves de latex (émulsion de caoutchouc dans un sérum aqueux) lorsque ce dernier est récolté par saignée. La récolte du latex est assez fréquente puisqu'elle a lieu, en général, tous les deux ou trois jours. Or, lorsque l'on cesse la saignée pour une raison ou pour une autre, lors du repos annuel par exemple, l'arbre ne refait pas plus de latex qu'il n'en est besoin. Dans le même esprit, il faut noter que la teneur en caoutchouc du latex est relativement constante. On est amené à conclure qu'il existe donc un ou plusieurs mécanismes qui concourent à régulariser la production de l'hévéa

(*) La bibliographie correspondante a fait l'objet d'une publication séparée (6).

Il ne faut pas oublier, d'autre part, que le latex est une émulsion peu stable contenant, à côté des globules de caoutchouc, des particules fondamentales, tels les lutoïdes qui se désagrègent très facilement lorsqu'on fait varier l'isotonicité du milieu. Ce fait interdit pratiquement de diluer le latex ou d'y ajouter certaines substances en trop grande quantité, sans prendre de précautions. Enfin, comme toutes les incubations des substrats que nous avons utilisés ont été effectuées sur les lieux de plantation, c'est-à-dire en zone tropicale, il a été nécessaire de veiller à ce que les infections microbiennes ne viennent pas perturber les réactions enzymatiques propres au latex.

On voit donc que si l'on veut respecter l'intégrité du latex, il faut établir un protocole opératoire rigoureux de façon à ne pas créer de confusion possible lors de l'interprétation des résultats, et pour que la description de ces résultats ne souffre d'aucune ambiguïté, il apparaît nécessaire d'exposer, dans une première partie, les conditions opératoires et les méthodes d'analyse utilisées.

A. — DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES

I. — Récolte du latex destiné aux expériences.

Le protocole de récolte décrit ci-dessous a été guidé par le souci d'éviter le plus possible toute contamination microbienne du latex, car il est inconcevable d'étudier des métabolismes au sein d'un latex présentant une flore microbienne importante qui pourrait, soit dégrader les composants protidiques du latex, soit utiliser conjointement les substrats marqués ajoutés. Il en résulterait, d'une part, une chute du rendement de la transformation du substrat en caoutchouc et, d'autre part, l'apparition de substances radioactives provenant du métabolisme bactérien.

Usuellement, la saignée de l'hévéa s'effectue, en ravivant à l'aide d'une gouge, une encoche inclinée affectant surtout les tissus libériens et laticifères. Cette encoche, d'où s'écoule le latex, présente une infection importante mais qui ne pénètre pas profondément comme l'a montré TAYSUM (8). D'après cet auteur il suffit d'enlever quelques millimètres des tissus contaminés pour atteindre la zone stérile.

Compte tenu de ces remarques, la récolte du latex est conduite selon le protocole suivant :

L'écorce de l'hévéa sélectionné est grattée la veille de l'expérience sur une distance de un mètre de part et d'autre de l'endroit où s'effectuera la saignée (Fig. 1).

Cette surface est alors désinfectée par broissage avec une solution de formol à 1‰, puis avec de l'alcool. Le lendemain matin, après un nouveau broissage à l'alcool, l'arbre est entouré d'une enveloppe en matière plastique, elle-même, lavée à l'alcool. Cette enveloppe soudée sur place, est alors éventuellement gonflée par un courant d'azote si on désire effectuer une saignée sous azote (*). A l'extrémité de la gouttière, on dispose une allonge, débouchant dans un erlenmeyer, ce dernier étant plongé dans un récipient contenant soit de la glace, soit une saumure à -5° C. Tous les récipients ainsi que la gouge de saignée sont désinfectés au préalable.

(*) Pour étudier, par exemple, l'influence de l'atmosphère d'incubation, il a été jugé préférable de récolter le latex sous atmosphère d'azote de façon à éviter au maximum le contact avec l'oxygène de l'air.

L'enveloppe de matière plastique étant relevée, on effectue rapidement la saignée à dix centimètres de l'encoche normale et l'on réajuste l'enveloppe de protection. Lorsqu'une quantité suffisante de latex est obtenue, l'erlenmeyer est ramené au laboratoire toujours maintenu dans le mélange réfrigérant.

II. — Incubations.

Les incubations des divers substrats marqués, nécessitent une série de précautions imposées, non pas par le danger dû à la radioactivité, mais par la fragilité du milieu réactionnel. En particulier, il ressort des travaux antérieurs (3 et 5) que la dilution du latex, même minime, perturbe considérablement l'activité enzymatique.

Il faut donc introduire le substrat sous forme solide et, comme les doses utilisées sont en général très faibles, il est difficile de les ajuster avec précision par pesée. Aussi est-il préférable de préparer une solution de concentration connue et d'en prélever un volume adéquat. Ce volume de solution est transvasé dans un tube à essai et le solvant est chassé soit par lyophilisation lorsqu'il s'agit d'eau, soit par un courant d'azote pour les solvants organiques.

Lors de la lyophilisation, des pertes de substrat peuvent se produire, soit qu'elles sont dues à la relative volatilité de substrats tels l'acétate de sodium, soit par suite d'un entraînement mécanique du substrat sec dans le lyophilisateur. Afin de pallier ces inconvénients, les substrats sont lyophilisés dans des tubes pyrex de 17×170 mm, maintenus en position verticale. L'opération est arrêtée dès que la dessiccation est apparemment complète. Cette méthode utilisée avec de l'acétate non marqué s'est avérée quantitative.

III. — Séparation des éléments constitutifs du latex.

En fin d'incubation, le latex est coagulé en le faisant tomber goutte à goutte dans 30 ml d'un mélange bouillant Ethanol acide formique 2N (1 vol./1 vol.). On obtient ainsi un coagulum finement divisé dont on peut aisément extraire les constituants solubles par trois extractions successives dans le même solvant. Le caoutchouc est ensuite rassemblé, on en exprime le maximum de solution et il est finalement lavé par quelques ml. du mélange solvant.

L'ensemble des solutions est réuni, puis concentré à sec sous vide à une température inférieure à 50°C. Le résidu sera repris pour des séparations ultérieures.

Le coagulum est séché à 50-60°C et analysé de son côté.

IV. — Analyse des constituants du sérum.

Le résidu obtenu par concentration de l'extrait est repris par l'eau, puis centrifugé ; la partie insoluble, constituée essentiellement de protides, de lipides et éventuellement de quelques particules de caoutchouc, est traitée 2 fois suivant le même processus.

Le résidu insoluble est finalement écarté. La partie soluble est essentiellement constituée d'acides aminés, d'acides organiques et de glucides. Afin de séparer ces divers groupes et en même temps d'éliminer les sels minéraux nuisibles à une séparation chromatographique ultérieure, des résines échangeuses d'ions ont été utilisées.

a) Séparation sur échangeur d'ions.

Le sérum clair est ensuite passé à la vitesse de 1 ml/min. sur 2 colonnes d'échangeurs d'ions montées en série. La première contient environ 5 gr. d'un échangeur cationique fort (Permutite 50 ou Dowex 50), la seconde contient un échangeur anionique fort (Dowex 2 ou Amberlite IRA 400) sous forme formiate.

— Les glucides sont recueillis à la sortie de la colonne de Dowex.

— Les acides aminés sont élués de la colonne de Permutite, par l'ammoniaque 2 N.

— Les acides organiques sont élués de la colonne de Dowex par l'acide formique 10 N.

Les solutions sont ensuite concentrées jusqu'à siccité par distillation sous vide (acides aminés et glucides) ou par séchage sous infra-rouge dans une hotte fortement ventilée (acides organiques). Il importe que les acides organiques soient retirés de la hotte dès que le séchage est complet sous peine de pertes importantes.

Remarquons tout d'abord que cette méthode ne permet évidemment pas la récupération des acides volatils, et que le passage sur échangeur d'ions n'est pas sans entraîner la dégradation de certains acides particulièrement labiles, tels les acides alpha-cétoniques.

La reproductibilité de ces méthodes de coagulation et de séparation sur colonne a été vérifiée en effectuant 12 coagulations d'un même latex (Tableau I).

On a, par ailleurs, complété un latex par des quantités connues d'acides aminés, de glucides et d'acides organiques (Tableau II) et dosé, après séparation, ces trois groupes de composés de façon à évaluer les pertes au cours de la manipulation.

TABLEAU I

REPRODUCTIBILITE DE LA COAGULATION ET DE L'EXTRACTION

	Ac. aminés	Glucides	Ac. organ.
Ecart type : σ	$\pm 0,031$	$\pm 5,36$	$\pm 0,170$
Coefficient de variabilité $\frac{100 \sigma}{x}$	± 2	± 3	± 3

TABLEAU II

RECUPERATION D'UNE SOLUTION SYNTHETIQUE AJOUTEE A UN LATEX

	Ac. aminés	Glucides	Ac. organ.
Récupération	92 %	101 %	89 %

Ces 2 tableaux situent la valeur des méthodes. Si elles ne sont pas parfaites, elles ont le mérite de se prêter aisément à des analyses en série.

b) Séparation par chromatographie sur papier.

Les résidus secs correspondant aux acides aminés, aux glucides et aux acides organiques sont repris par 2 ml. d'alcool à 50 % ou d'acétone à 50 % et chromatographiés sur papier en utilisant les techniques décrites ci-dessous. Afin de déterminer la nature des spots, la technique des témoins externes et des témoins internes a été largement utilisée. Il a été cependant nécessaire de recourir plusieurs fois à l'emploi des réactifs spécifiques.

a') Chromatographie des glucides :

Dans ce domaine, la méthode (9) consiste en l'utilisation du solvant : Pyridine/Alcool isoamylique/Eau (7/7/2) sur papier Whatman n° 1 en employant la technique de développement multiple ascendante de JEANES, WISE, DIMLER (10). Les révélateurs les plus utilisés sont le nitrate d'argent selon TRAVEYLAN (11) et le phosphate de p. anisidine selon MUKHERJEE (12).

b') Chromatographie des acides aminés :

Ces chromatographies sont effectuées sur papier Arches 302 ou sur papier Whatman n° 1. Pour les chromatographies mono-dimensionnelles, on a utilisé soit le mélange solvant : n. butanol-acide acétique-eau (4-1-5), soit, selon la technique de Mac FARREN (13) une solution de phénol tamponné à divers pH, le papier étant lui aussi tamponné au même pH. Dans le cas des chromatographies bi-dimensionnelles, nous avons utilisé la méthode décrite par LEVY et CHUNG (14) qui consiste, après un premier développement n. butanol-acide acétique-eau (4-1-5), à vaporiser le papier avec un tampon de pH 9,3 et à effectuer le 2° développement en solvant m. crésol, phénol saturé de tampon pH 9,3 (1-1).

La technique de l'électrophorèse sur papier a été quelquefois utilisée, elle permet une bonne séparation des acides aminés en neutres, acides et basiques.

Mis à part quelques révélateurs spécifiques, la ninhydrine a été très généralement employée.

c') Chromatographie des acides organiques :

Les séparations d'acides organiques ont été effectuées en chromatographies mono- ou bi-dimensionnelles en utilisant les mélanges solvants suivants :

Mélanges solvant acide		Mélanges solvant basique	
Isopropanol	: 40	Ethanol absolu	: 80
Eucalyptol	: 60	Ammoniaque RP	: 15
Acide formique	: 20	Eau	: 15
Eau	: 10	n. Propanol	: 60
n. Propanol	: 50	Ammoniaque RP	: 40
Eucalyptol	: 50		
Acide formique	: 10		
Eau : quantité suffisante pour trouble persistant			

Le papier Whatman n° 4 utilisé est systématiquement lavé avec le solvant basique. Les acides organiques sont révélés par le vert de bromocrésol (40 mg. dans 100 ml. d'alcool à 95°) tamponné à pH 7-8.

c) *Cas particulier des incubations d'acide mévalonique.*

Lorsque l'acide mévalonique est utilisé comme substrat, les chromatographies ont été effectuées sur le sérum déprotéiné, sans déionisation. En effet, les produits du métabolisme de ce promoteur que l'on peut s'attendre à trouver sont vraisemblablement des composés phosphorés dont la stabilité est médiocre. Pour les mettre en évidence, il faut éviter de les hydrolyser, ce qui implique de ne pas les traiter par des résines échangeuses d'ions.

Les meilleures séparations de ces intermédiaires sont obtenues soit par chromatographie sur papier Whatman n° 1 (solvant : alcool amylique tertiaire-acide acétique-eau (40-10-20), soit par électrophorèse sur papier Whatman n° 3 (1.500 volts, tampon : acide acétique-pyridine à pH 6).

d) *Repérage des spots.*

Le repérage des spots est basé sur la concordance des spots identifiés par les méthodes colorimétriques classiques et des spots radioactifs révélés par autoradiographie. Chaque chromatogramme comprend une ou plusieurs substances de référence utilisées comme témoin interne ou externe.

Les autoradiographies sont obtenues en appliquant chaque chromatogramme sur une plaque sensible aux rayons X. Nous avons utilisé des films Kodirex, X Ray : Blue Brand ou Curix Rapide de 30 × 40 cm. L'exposition demande 4 semaines.

Il est possible de mesurer directement sur le chromatogramme la radioactivité d'un spot, après avoir repéré sa position à l'aide de l'autoradiographie. Cette mesure peut être effectuée avec un tube de Geiger Müller placé dans un château de plomb approprié. Elle est suffisamment précise pour chiffrer d'une expérience à l'autre des variations qui ne peuvent qu'être évaluées qualitativement à l'œil nu sur les autoradiographies.

V. — Evaluation de la radioactivité du Caoutchouc.

Avant d'évaluer la radioactivité des échantillons de caoutchouc après incubation avec un promoteur marqué, il faut d'abord le purifier soigneusement, car le coagulum, même après les lavages qu'il a subi, contient des substances radioactives qui ne sont pas du polyisoprène.

Pour effectuer cette purification, nous avons adopté la méthode décrite par KEKWICK et coll. (5) en la modifiant toutefois.

Cette méthode consiste à dissoudre dans du chloroforme l'échantillon de caoutchouc placé dans un tube spécial (Fig. 2) puis à le sécher sous forme de film très mince le long des parois de ce tube. L'ensemble est ensuite soumis à une extraction acétonique, puis est redissous dans du chloroforme à 3 % d'éthanol. La partie inférieure du tube porte une plaque de verre fritté, tandis qu'une ouverture est prévue à l'extrémité supérieure. Un simple agitateur magnétique suffit à faire circuler lentement le liquide du haut vers le bas lorsque l'ensemble du tube est plongé dans le solvant contenant dans l'enveloppe. Les substances comme les protéines sont retenues sur le verre

fritté. A la suite de ce traitement, KEKWICK préconise une dialyse de la solution chloroformique.

Ayant ajouté à du latex un mélange d'isoprénoïdes marqués préparés en injectant de l'acétate de sodium 2^{14}C dans une tomate selon la méthode de ZABIN (15), l'extraction acétonique suffit en quelques heures à faire disparaître toute trace de radioactivité de l'échantillon de caoutchouc : la dialyse ultérieure ne s'impose donc pas.

Certains échantillons de caoutchouc renferment une proportion importante de caoutchouc gel peu soluble ; aussi pour uniformiser les caractères de solubilité des échantillons, est-il nécessaire de leur faire subir un traitement de deux heures à 120° , pour détruire ce gel.

Le schéma de cette purification est donné à la page suivante.

La solution chloroformique est concentrée puis le caoutchouc est déposé sur des coupelles d'aluminium préalablement tarées. Le bilan pondéral de chaque purification est effectué pour évaluer les pertes.

La radioactivité des échantillons est déterminée à l'aide d'un tube de Geiger Müller. Les résultats sont corrigés à finesse infinie en se basant sur la mesure de pastille de polyméthacrylate de méthyle étalon marqué au C 14 et sont exprimés en coups par minute par mg. de substance (*).

Nous avons pu vérifier que nos mesures concordent avec celles effectuées par scintillation ou par comptage en phase gazeuse. Les mesures effectuées à l'aide d'un tube de Geiger Müller sont d'autre part beaucoup plus rapides qu'en utilisant les autres techniques.

TABLEAU III

N° de l'essai	Radioactivité en cpm/mg	
	Geiger-Müller	Scintillation
1	7.500	7.440
2	4.000	4.030
3	5.300	5.960
4	3.200	3.500

Après correction, la mesure de la radioactivité des échantillons de caoutchouc permet de calculer le rendement de la transformation du substrat en polyisoprène à l'aide de la formule :

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{R} \times \text{P} \times \text{D}}{\text{X} \times 2,22 \times 10^6}$$

où :

R = radioactivité de l'échantillon en cpm/mg

P = poids du latex mis en jeu

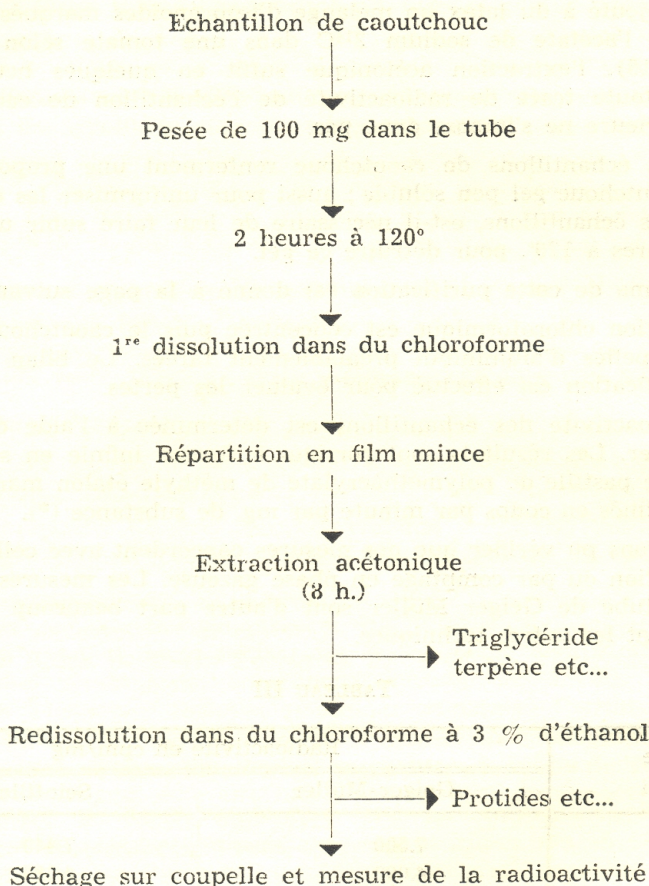
D = DRC du latex

X = nombre de μC de substrat mis en jeu.

(*) Depuis peu, les laboratoires de l'IRCV sont équipés d'un compteur à flux gazeux dont le rendement est plus élevé que celui des tubes de Geiger-Müller, tout en étant de maniement très simple.

Dans ce cas encore, les radioactivités sont corrigées par rapport à celles du polyméthacrylate de méthyle ^{14}C et sont en accord avec celles qui sont évaluées avec un Geiger-Müller.

SCHEMA DE LA PURIFICATION DU CAOUTCHOUC



Une autre expression significative est le nombre de μ moles transformées au cours d'une incubation. Il est donné par la formule :

$$\mu \text{ moles transformées : } \frac{R \% \times X}{A}$$

X = nombre de μ C de substrat mis en jeu

A = Activité spécifique du substrat en mC/mmoles.

B. -- ETUDE DES FACTEURS SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LE RENDEMENT DES INCUBATIONS.

On sait que le rendement de toute réaction enzymatique dépend étroitement des conditions choisies pour l'incubation telles que le temps, la température, la concentration du substrat, le pH etc... Le latex n'échappe pas à cette règle et il nous a fallu, avant d'aborder l'étude du métabolisme du carbone, déterminer les conditions opératoires conduisant à une meilleure

transformation du substrat en caoutchouc. Pour cela, l'acétate ^{214}C a été choisi comme promoteur, d'abord parce qu'il peut être considéré comme une plaque tournante dans la biochimie cellulaire et, ensuite, parce que la mesure du rendement de sa transformation revient à évaluer les rendements de toute une série de réactions intermédiaires. Chacune de ces réactions requiert peut-être des conditions spéciales, mais comme elles ont lieu simultanément, il est préférable de déterminer dans quels cas leur résultante est la meilleure.

Au cours de ces expériences, nous avons noté systématiquement la radioactivité des caoutchoucs des diverses incubations, ainsi que la nature et l'intensité des spots marqués sur les chromatogrammes correspondants. Mais pour déterminer les meilleures conditions de travail, la mesure de la radioactivité du caoutchouc est la plus intéressante et sera seule considérée dans ce chapitre.

I. — Influence du temps d'incubation.

Ces expériences ont été conduites sur quatre latex stériles, issus de quatre hévéas d'origine génétique différente (BD. 5, Tjir. 1, PR. 107, Waring 4). Pour chaque temps choisi, 2 ml. de chacun des latex sont incubés avec $10\ \mu\ \text{C}$ d'acétate de sodium ^{214}C à 28° .

La figure 3 représentant la variation des rendements en caoutchouc radioactif, résume les résultats obtenus. La réaction de transformation de l'acétate de sodium en cis-polyisoprène débute très rapidement puisque, au temps zéro (temps nécessaire pour mélanger le substrat et peser le latex dans le tube, puis pour arrêter la réaction), le caoutchouc récupéré est déjà radioactif. Cette vitesse initiale semble se maintenir pendant une heure environ pour diminuer ensuite. Les expériences n'ont pas été poursuivies au-delà de six heures parce que nous avons pensé que les métabolismes microbiens pouvaient alors interférer avec ceux du latex.

A la suite de ces essais, nous avons adopté la durée de 3 heures pour toutes nos incubations. En effet :

— Pour des temps plus courts, on risque d'arrêter la réaction à un moment où le latex est encore en pleine activité.

— Pour des temps plus longs, le gain en substrat transformé ne justifie pas de courir le risque d'un développement microbien néfaste.

II. — Influence de la température d'incubation.

Du latex stérile provenant d'un arbre du clone BD. 5 a été incubé pendant des temps variables à 28° , 32° et 37° . La température de 28° est celle au-delà de laquelle il est possible de faire fonctionner un thermostat le matin en pays tropical, pour obtenir une température constante.

Les quantités mises en jeu sont les suivantes : Latex 1 ml., Acétate de sodium ^{214}C $5\ \mu\ \text{C}$. Les résultats sont résumés dans la figure 4.

La température d'incubation semble avoir peu d'influence sur le rendement de la transformation du substrat en caoutchouc.

D'autre part, comme la température de 30° correspond à peu près à la température moyenne des régions d'hévéaculture, nous l'avons adoptée pour

la plupart des incubations. Etant donné que le thermostat fonctionne avec un battement de $\pm 0^{\circ}1$, on peut conclure de cette expérience que les erreurs dues à la variation de température au cours des incubations sont indécétables.

III. — Influence de la concentration en substrat.

Les latex provenant de quatre hévéas d'origine différente (BD.5, Tjir. 1, PR 107, Waring 4) ont été incubés avec des doses croissantes (0,5 à 50 μ C/ml.) d'acétate de sodium 2^{14}C (3 heures à 28°). La figure 5 illustre les résultats obtenus.

Il ressort de cette expérience que la concentration optima en substrat semble de situer entre 5 et 10 μ C/ml. de latex. Etant donné l'activité de l'acétate de sodium 2^{14}C , cette quantité représente de 0,5 à 1 μ mole de substrat (0,0415 à 0,0830 mg.). Le latex contient naturellement de 0,08 à 0,24 μ mole/ml. en moyenne d'acétate (dosage V.F.A.). Au-delà de cette teneur (1 μ mole/ml.) le latex ne semble plus pouvoir métaboliser l'excédent de substrat, quelle que soit la vitesse avec laquelle il le transforme.

Nous avons, dans le même esprit, incubé une même dose d'acétate avec des quantités croissantes de latex, les résultats de cette expérience, après transformation, sont reportés dans la figure 7 et sont en accord avec ceux des expériences précédentes.

Pour expliquer ces faits, on peut émettre l'hypothèse que cette dose d'acétate sert à saturer, soit un cofacteur, soit un enzyme présent en quantité finie dans le latex, mais on comprend difficilement que d'un latex à l'autre, la même concentration en substrat provoque le même phénomène ou alors il faudrait admettre que la quantité de ce cofacteur ou de cet enzyme est relativement constante dans les latex.

Dans la suite de ce travail, la plupart des incubations ont été effectuées avec 5 μ C d'acétate de sodium 2^{14}C dont l'activité se situe entre 8 et 10 mC/mmole, de façon à rester dans une zone de concentration en substrat inférieure à la concentration de saturation pour laquelle la mesure des rendements n'a plus de signification.

IV. — Influence du pH.

L'influence du pH sur la transformation d'un substrat quelconque au sein du latex est une des questions les plus délicates à résoudre parce qu'il est très difficile de faire varier le pH de cette suspension pour plusieurs raisons :

- L'addition d'une solution, même tamponnée au pH requis, provoque toujours un abaissement du rendement.
- Le latex frais n'est stable qu'aux pH alcalins et jusqu'à pH 6,5.
- Le latex est lui-même un milieu relativement tamponné.

Pour pouvoir effectuer des incubations d'acétate de sodium 2^{14}C dans du latex amené aux pH voulus, nous avons été conduits à introduire dans le tube où va s'effectuer l'incubation, en plus de la dose d'acétate, 0,5 ml. d'une solution tampon, puis à lyophiliser ce mélange. En reprenant le mélange de sels par 1 ml. de latex, on recrée une solution de concentration voulue sans avoir dilué le latex. Le pH est alors mesuré. Avec une solution

$\text{PO}_4\text{HK}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$, l'expérience nous a montré que l'action du tampon sur le latex est nulle pour une concentration de 0,01 M. Par contre, à 0,1 M, on peut modifier le pH du latex et établir pour un latex donné, l'influence du pH sur le rendement de la transformation.

La figure 7 transcrit les résultats obtenus avec 2 latex différents, incubés avec 2 concentrations différentes de substrat. On peut conclure de ce graphique que :

- Le rendement d'un latex tamponné est inférieur à celui du témoin.
- Le pH optimum est identique à celui du pH naturel du latex.
- L'aptitude du latex à métaboliser l'acétate varie fortement dans un domaine étroit de pH.

Il nous a donc paru logique de ne pas modifier le pH naturel de latex par addition de tampon et de veiller à ce que l'addition de cofacteurs ou de substrats divers ne vienne pas le modifier.

V. — Influence de la dilution.

KEKWICK et coll. (5) avaient attribué l'amélioration du rendement obtenu en incubant de l'acide mévalonique marqué dans du latex par rapport à celui de l'expérience de PARK et BONNER, au fait de n'avoir apporté aucune modification à la composition naturelle du latex sauf par l'addition du substrat.

Dans cet ordre d'idée, une première série d'essais consistant à incuber 1 ml. de latex dilué par 1, 2, 3 ml., etc... d'eau avec 5 μ C d'acétate de sodium ^{24}C a montré que l'addition de 1 ml. d'eau suffit à faire tomber la radioactivité du caoutchouc de 8.500 cmp/mg à 0.

Nous avons pensé alors que la modification brutale de la pression osmotique du latex suffisait à expliquer une chute aussi importante de l'activité enzymatique. Ce même genre d'expérience a été recommencé en ajoutant à 1 ml. de latex 1 ml. d'eau contenant des doses croissantes de saccharose (0, 0,125, 0,250, 0,375, 0,500, 0,625, 0,750 M). La figure 8 illustre les résultats obtenus et l'on peut en conclure que :

- 1 ml. d'eau pure provoque bien l'arrêt de la transformation d'acétate en caoutchouc.
- La dilution par des solutions de saccharose ne provoque pas une perturbation aussi complète.
- Les meilleurs rendements sont obtenus avec une concentration de 0,375 M de saccharose.

Il était intéressant de connaître également l'effet de la dilution du latex par des volumes d'eau ou de solution isotonique inférieurs à 1 ml. par ml. de latex. Nous avons choisi, d'après l'expérience précédente, une solution de saccharose 0,375 M. Les résultats obtenus en incubant 5 μ C d'acétate marqué par ml. de latex ont été transcrits sur la figure 9 et indiquent que :

- L'addition d'eau, même en faible volume, perturbe d'une façon importante, la transformation d'acétate en caoutchouc.
- Dans le cas présent, la dilution du latex par de l'eau ne détruit pas toute activité.

- L'addition d'une solution de saccharose provoque moins d'effet que l'eau pure. Rappelons que TEAS (2) avait utilisé du latex dilué au cours de ses expériences.

Il faut alors remarquer que le rendement en acétate transformé par ml de latex est le quart de celui du témoin, lorsque l'on ajoute 1 ml. de solution de saccharose 0,375 M. On peut attribuer cette diminution du rendement à deux causes :

- La concentration en enzyme et en substrat varie.
 — La dilution avec une solution isotonique provoque, malgré tout, la destruction d'organites indispensables au métabolisme de l'acétate.

Pour confirmer la première hypothèse, on peut essayer de calculer l'influence de la dilution sur le nombre de μ moles (*) de substrat transformées en caoutchouc, en remarquant d'une part que la concentration en substrat varie de 5 à 2,5 μ C, de l'autre que la concentration en enzyme varie aussi de moitié. Comme, dans ce domaine de concentrations en substrat, on peut admettre qu'il y a proportionnalité entre la concentration et le nombre de μ moles de substrat transformées N, on peut écrire : $N = K_1 C$.

De même, en général, N est proportionnel à la concentration en enzyme (16) : $N_2 = K_2 C$.

Si la concentration en substrat et la concentration en enzyme varie en même temps, leurs effets se multiplient, et l'on peut écrire : $N = K_1 \times K_2 \times C^2$.

Dans cette expérience, lorsque l'on ajoute un volume v de solution, la concentration devient :

$$Cv = \frac{Co}{1 + v} = Co \times \frac{1}{1 + v}$$

Co = concentration initiale.

Cv = concentration après dilution par un volume v.

$$\text{d'où } N = K_1 \times K_2 \times Co^2 \times \frac{1}{(1 + v)^2}$$

$$\text{Posons : } K_1 \times K_2 \times Co^2 = K \qquad N = K \times \frac{1}{(1 + v)^2}$$

Il est possible, d'après cette dernière équation, de calculer à partir de N témoin, le nombre de μ moles transformées pour chaque expérience d'incubation et de tracer la courbe correspondante. On remarquera sur la figure 9 que la courbe expérimentale et la courbe théorique sont très voisines.

Ainsi, dans la mesure où nos approximations sont exactes (proportionnalité entre les concentrations en substrat et en enzyme et le nombre de μ moles transformées), on peut penser qu'une solution de saccharose 0,375 M protège efficacement les organites fondamentaux du latex contre les variations de la pression osmotique du latex dans le domaine de concentration que nous avons étudié.

(*) Pour éviter les confusions, il est préférable d'exprimer les résultats en μ moles de substrat transformées plutôt qu'en rendement %.

VI. — Influence de l'atmosphère d'incubation.

Le tableau IV indique les résultats obtenus en incubant plusieurs latex avec 5 μ C d'acétate de sodium ^{214}C , d'une part sous oxygène et de l'autre sous azote (*). Il ressort de l'examen de ce tableau que la nature de l'atmosphère d'incubation n'a pas d'influence significative sur la transformation du substrat en caoutchouc, tout au moins dans les conditions utilisées.

En effet, il est très difficile, étant donné la multiplicité des opérations (saignée, transvasement du latex dans les tubes à réaction etc...) d'éviter tout contact du latex avec l'air. Il est donc possible que les traces d'oxygène absorbé par le latex soient suffisantes pour uniformiser les résultats.

TABLEAU IV
INFLUENCE DE L'ATMOSPHERE D'INCUBATION

Période de l'expérience	Clone d'où est issu le latex	Radioactivité du caoutchouc		Rendements		Moyenne des rendements	
		O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂
Janvier fin du cycle végétatif	Waring 4	2900	2900	4,7	4,9	7,6	7,1
	PR. 107	4900	4000	9,6	7,9		
	BD. 5	5800	5500	11,3	11,2		
	Tjir. 1	2500	2200	4,9	4,3		
1961	Waring 4	3000	2900	5,0	4,9	6,9	7,1
	PR. 107	3500	3750	6,7	7,2		
	BD. 5	4600	4600	9,0	9,3		

VII. — Influence de l'infection.

Les circonstances ne nous ont pas permis de suivre l'influence de l'infection sur la transformation de l'acétate de sodium ^{214}C au sein du latex avec toute la continuité désirable le service de microbiologie de l'IRCV ayant été désorganisé.

Néanmoins, il faut rappeler que les précautions prises pour éviter la pollution du latex au moment de la récolte nous mettent à l'abri des critiques.

De plus, il nous a été possible, au cours d'une série d'essais, de suivre l'évolution microbienne de deux latex récoltés suivant les conditions décrites précédemment. Un de ces latex est récolté sur un arbre en exploitation, l'autre sur un arbre vierge. Chacun des deux latex est incubé à raison de 50 μ C d'acétate de sodium ^{214}C pour 10 ml. de latex. Une série d'incubations identiques est effectuée en réinfectant chaque latex avec trois gouttes d'un latex en pleine évolution microbienne.

Les comptages microbiens, exprimés en germe par ml., sont effectués d'une part avant le début de l'incubation, de l'autre après 6 heures d'incubation. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau V (selon méthode de TAYSUM) (17).

(*) La saignée a été effectuée sous azote.

Etant donné les difficultés rencontrées dans les régions tropicales pour ce genre de recherches, les résultats cités dans le tableau doivent être examinés en tant que valeur relative plus qu'en valeur absolue.

- La méthode de récolte est efficace, car en l'absence de précautions, on enregistre des comptages de l'ordre de 1×10^4 à 1×10^5 germes par ml.
- En six heures d'incubation, le développement microbien est peu important et le nombre de germes est seulement décuplé.
- La conversion de l'acétate en caoutchouc semble peu influencée par le développement microbien quel que soit le niveau de l'infection.

TABLEAU V

ETUDE DU DEVELOPPEMENT MICROBIEN AU SEIN DU LATEX

Arbres	Latex	Comptage microbien (en germes par ml.)		Radioacti- vité du caoutchouc en cpm/mg
		à l'origine	6 heures après	
Arbre en exploitation normale	Latex témoin	1×10^2	1×10^3	390
	Latex infecté	2×10^7	2×10^9	270
Arbre vierge	Latex témoin	1×10^2	6×10^2	400
	Latex infecté	1×10^7	1×10^8	405

D'autre part, les autoradiogrammes correspondant à ces incubations montrent que les latex réinfectés convertissent l'acétate marqué en des dérivés identiques à ceux obtenus avec les latex normaux, avec toutefois moins d'intensité. Il semble donc que le métabolisme microbien n'interfère pas avec le métabolisme propre du latex, mais ralentit peut-être ce dernier.

VIII. — Reproductibilité des résultats.

Le but du présent travail étant de définir les meilleures conditions opératoires, il convient de compléter les informations acquises par une évaluation du degré de confiance que l'on peut accorder à deux résultats, isolés à deux groupes de résultats... Pour ce faire, nous avons utilisé une expérience dans laquelle :

- Le substrat est incubé, en plusieurs opérations séparées, dans un même latex.
- Le substrat est incubé dans les mêmes conditions sur deux latex récoltés séparément.

Pour respecter ces deux cas, le latex d'un même arbre a été récolté au cours de 12 saignées successives. A chaque saignée, six incubations ont été effectuées sur le même lot de latex avec 5μ C d'acétate de sodium ^{214}C (3 heures à 28°).

Le Tableau VI résume les résultats obtenus. Une première remarque doit alors être faite : en dessous de 1 % de rendement (cas D E F G), la dispersion des résultats est relativement élevée parce que les erreurs de mesure de la radioactivité sont elles-mêmes plus grandes. On peut donc considérer seulement les rendements supérieurs à 1 % (*) et constater alors que le coefficient de variabilité du rendement de six incubations est en moyenne de 12 % et, au maximum, de 20 %.

TABLEAU VI

ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE DES INCUBATIONS

Désignation de la saignée	Moyennes des rendements	σ	Cv %	Observations
A	2,70	$\pm 0,53$	19,6	en éliminant 1 chiffre.
	2,56	$\pm 0,46$	18,0	
B	2,88	$\pm 0,26$	9,0	
C	1,57	$\pm 0,12$	7,6	
D	0,74	$\pm 0,42$	56,8	
E	0,68	$\pm 0,29$	42,7	en éliminant 1 chiffre.
	0,60	$\pm 0,22$	36,7	
F	0,78	$\pm 0,09$	11,5	
G	0,57	$\pm 0,15$	26,3	en éliminant 1 chiffre.
	0,62	$\pm 0,08$	12,9	
H	5,96	$\pm 0,59$	9,9	
I	1,41	$\pm 0,15$	10,6	
J	3,73	$\pm 0,44$	11,8	
K	3,97	$\pm 0,60$	15,1	en éliminant 1 chiffre.
	3,75	$\pm 0,31$	8,3	
L	4,37	$\pm 0,51$	11,7	
Ensemble des motifs	2,45	$\pm 1,73$	70,6	en éliminant 1 chiffre.
	2,45	$\pm 1,72$	70,2	

(*) En pratique, nous avons admis de ne pas tenir compte des expériences isolées dont le rendement est inférieur à 1 %.

On peut dire que si deux résultats diffèrent de plus de 24 % (différence significative : $2 \times Cv$) il existe 95 % de chance pour qu'ils n'appartiennent pas au même groupe. Par contre, si l'on considère la variation des rendements obtenus en utilisant des latex récoltés au cours de plusieurs saignées consécutives (cf. ligne du bas du tableau), on voit que le coefficient de variabilité atteint une valeur très élevée.

Il faut donc retenir que la comparaison de deux latex différents demande beaucoup de prudence et de nombreuses répétitions pour être valable. C'est une des difficultés majeures de notre expérimentation, car, pour relier les observations effectuées « in vitro » aux conditions normales de la plante, il est nécessaire par exemple d'entreprendre la comparaison d'un latex issu d'un arbre ayant subi un traitement et d'un latex récolté sur un arbre témoin. Il faut alors que la variation du rendement du latex issu de l'arbre traité soit très importante pour pouvoir l'imputer au traitement appliqué.

IX. — Incubation d'acétate de sodium ^{214}C sur tissus.

Plusieurs séries d'expériences d'incubations d'acétate de sodium ^{214}C ont été effectuées en utilisant des rondelles minces de tissus prélevées dans la région libérienne où sont inclus les vaisseaux laticifères. Les rondelles sont incubées dans une solution de Knop (5 ml) complétée avec 10 ou 20 μC d'acétate pour 3 à 4 g de tissus humides (incubation de 6 heures à 28°). Dans ces conditions, la radioactivité du caoutchouc résultant est très faible (inférieure à 150 cpm/mg). Par contre, les acides organiques et les acides aminés sont très marqués.

Il semble toutefois possible d'améliorer le rendement de la transformation du substrat en caoutchouc en diminuant le volume de la solution de Knop, en incubant de très fines rondelles de tissus et en agitant le tube à réaction très doucement.

RESUME

Dans le but d'étudier les mécanismes liés à la biosynthèse du caoutchouc au sein des vaisseaux laticifères de l'hévéa brasiliensis, le latex a été utilisé comme milieu enzymatique et l'acétate ^{214}C comme substrat. Dans cette première partie, les conditions opératoires ont été définies. C'est ainsi qu'on a étudié successivement l'influence du temps et de la température d'incubation, de la concentration en substrat, du pH, de la dilution du milieu réactionnel, de l'atmosphère d'incubation, de l'infection microbienne du latex et enfin la reproductibilité des résultats. Il a été possible d'obtenir des rendements de la transformation de l'acétate de sodium ^{214}C , en caoutchouc radioactif, très supérieurs à ceux cités précédemment. La suite de ce travail sera axé sur l'étude de divers promoteurs et de leur métabolisme propre, en relation avec la biosynthèse du caoutchouc.

BIBLIOGRAPHIE

1. — B. ARREGUIN, J. BONNER et B.J. WOOD. — *Arch. Biochem.*, 1951, **31**, 234.
2. — H.J. TEAS et R.S. BANDURSKI. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 3549.
3. — R.B. PARK et J. BONNER. — *J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, 340.
4. — F. LYNEN et V. HENNING. — *Ang. Chem.*, 1960, **72**, n° 22, 820.
5. — R.G.O. KEKWICK, B.L. ARCHER, D. BARNARD, G.M.C. HIGGINS, G.P. Mc SWEENEY, C.G. MOORE. — *Nature*, 1959, **184**, 268.

5. — B.L. ARCHER, G. AYREY, E.G. COCKBAIN, G.P. Mc SWEENEY. — *Nature*, 1961, **189**, 663.
6. — P.L.E. FOURNIER et TUONG CHI CUONG. — *Rub. Chem. and Technology*, 1961, **34-5**, 1229.
7. — E.H. ANDREW et P.B. DICKENSON. — Proceedings of the Natural Rubber Research Conference (Kuala Lumpur 1960) p. 756 — Rubber Research Institute of Malaya (1960).
8. — D.H. TAYSUM. — *J. of Appl. Bact.*, 1957, **20**, 189-194.
9. — J. d'AUZAC et S. PUJARNISCLE. — *Rev. Gén. Caout.*, 1959, **36**, 1687.
10. — A. JEANES, C.S. WISE, R.J. DIMLER. — *An. Chem.*, 1951, **23**, 415.
11. — W.E. TRAVEYLAN, D.P. PROCTOR, J.S. HARRISON. — *Nature*, 1959, **166**, 144.
12. — S. MUKHERJEE, H.C. SRIVASTATA. — *Nature*, 1959, **169**, 1687.
13. — E.F. Mac FARREN. — *An. Chem.*, 1951, **23**, 168.
14. — A.L. LEVY, D. CHUNG. — *An. Chem.*, 1953, **25**, 396.
15. — I. ZABIN. — *J. Biol. Chem.*, 1957, **226**, 851.
16. — M. DIXON et E.C. WEBB. — *Enzymes* p. 63 Acade Press Inc. Publisher Ny (1958).
17. — D.H. TAYSUM. — *J. of Appl. Bact.*, 1956, **19**, 54.

Fig. - 1

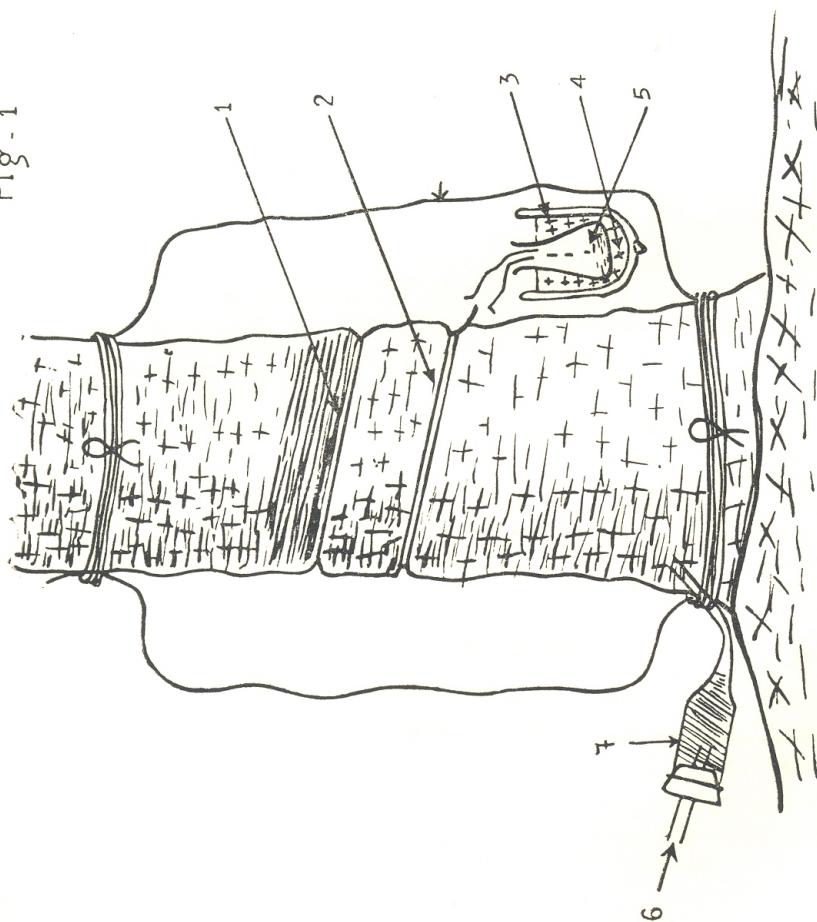


Fig. 1. — Schéma du mode de saignée utilisé pour la récolte du latex destiné aux incubations de promoteur marqué.

- 1 --- Ancienne encoche de saignée
- 2 --- Nouvelle encoche de saignée
- 3 --- Vase Dewar
- 4 --- Glace ou saumure réfrigérante
- 5 --- Latex
- 6 --- Arrivée d'azote
- 7 --- Filtre stérile

Fig. - 2

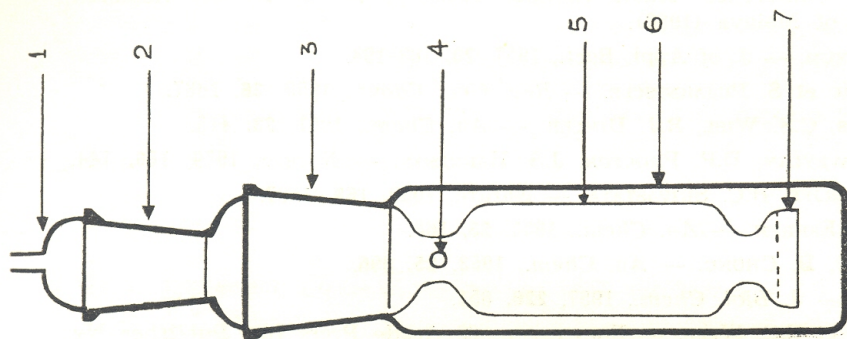


Fig. 2. — Schéma d'un tube à analyse du caoutchouc.

- 1 --- Bouchon
- 2 et 3 --- Rodage
- 4 --- Orifice de circulation du solvant
- 5 --- Chambre de dissolution
- 6 --- Enveloppe extérieure
- 7 --- Verre fritté n° 1.

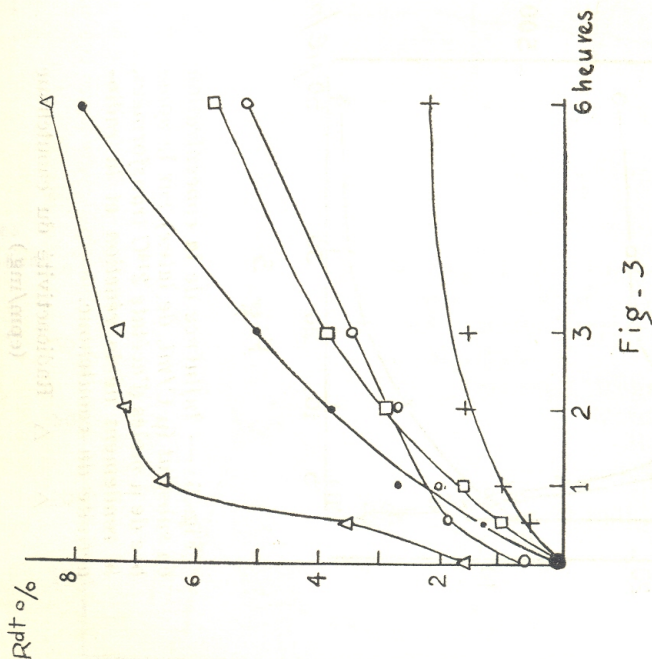


Fig. 3. — Influence du temps d'incubation sur le rendement de la transformation de l'acétate ^{214}C en caoutchouc.

- △ — △ Latex de PR. 107 (1)
- — ● Latex de BD. 5
- + — + Latex de PR. 107 (2)
- — □ Latex de Tjir. 1
- — ○ Latex de Waring 4

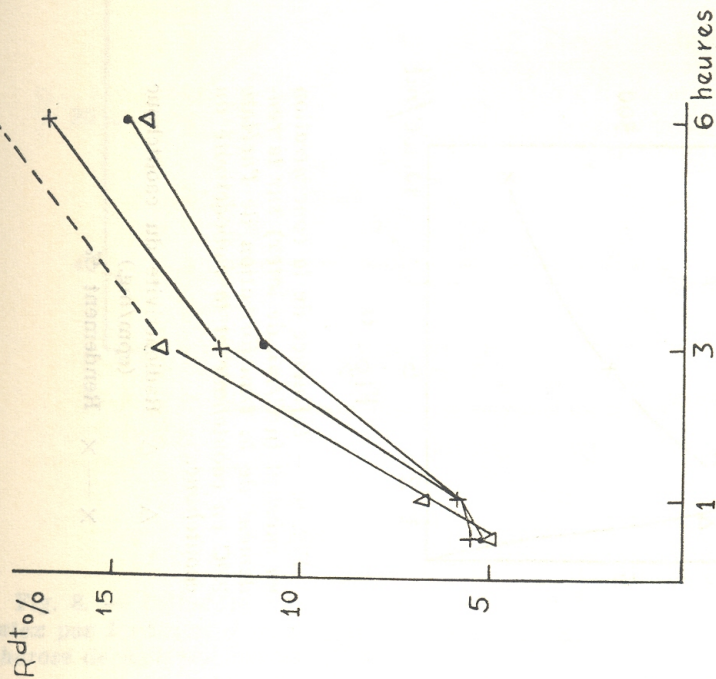


Fig. 4

Fig. 4. — Influence de la température sur le rendement de la transformation de l'acétate ^{214}C en caoutchouc pour les temps d'incubation variables.

- — ● Incubation à 28°C
- + — + Incubation à 32°C
- △ — △ Incubation à 37°C

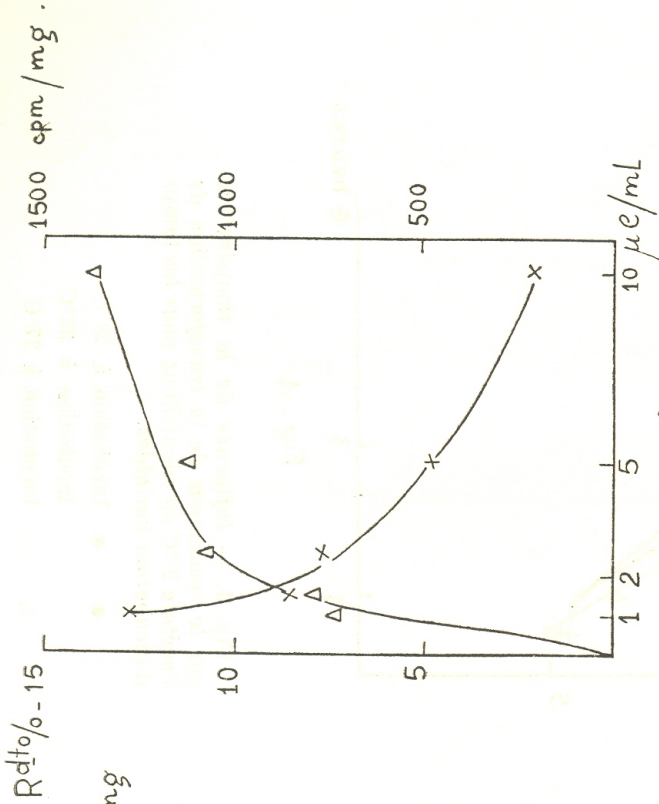


Fig- 6

Fig. 6. — Influence de la concentration en substrat (μ C/ml. de latex) sur le rendement de la transformation de l'acétate ^{214}C en caoutchouc et la radioactivité du caoutchouc.

Δ — Δ Radioactivité du caoutchouc (cpm/mg.)
 X — X Rendement %

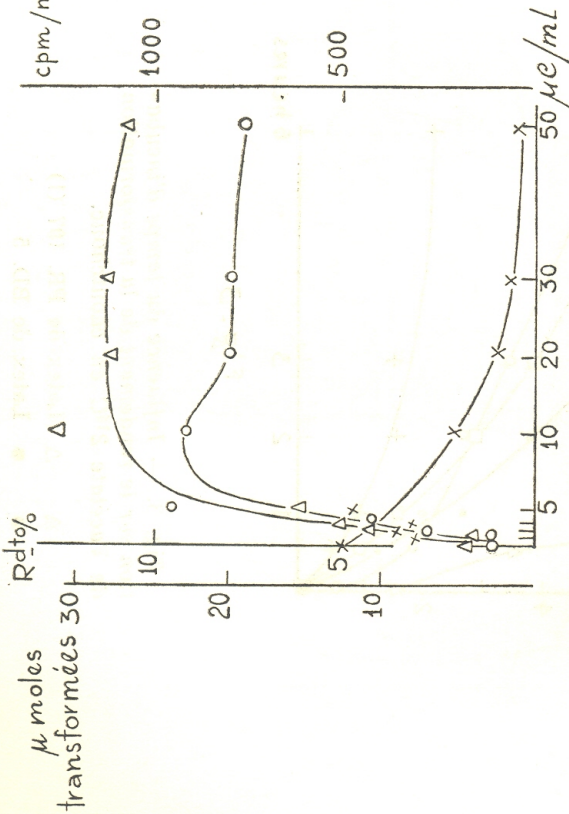


Fig- 5

Fig. 5. — Influence de la concentration en substrat (μ C/ml. de latex) sur le nombre de μ moles d'acétate ^{214}C transformées, le rendement de la réaction et la radioactivité du caoutchouc.

Δ — Δ Radioactivité du caoutchouc (cpm/mg.)
 X — X Rendement %
 O — O μ moles transformées

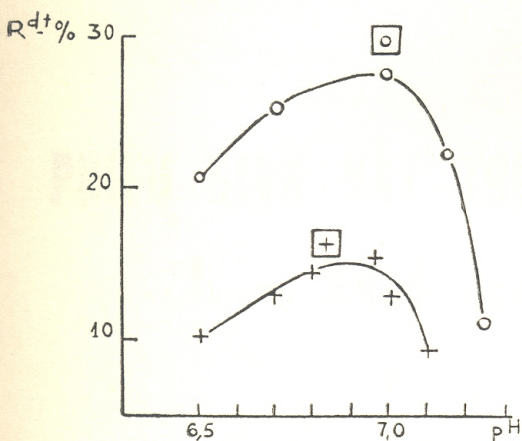


Fig. 7. — Influence du pH du latex sur le rendement de la transformation de l'acétate ^{214}C en caoutchouc.

- — ○ Incubation de 0,5 μ C/ml. de latex en présence de tampon.
- — ○ Incubation de 0,5 μ C/ml. de latex témoin sans tampon.
- + — + Incubation de 5 μ C/ml. de latex en présence de tampon.
- — + Incubation de 5 μ C/ml. de latex témoin sans tampon.

Fig. 7

Fig. 8. — Influence de la dilution du latex par 1 volume d'une solution de saccharose de molarité croissante.

N.B. — Pour une concentration de 0,375 M, la radioactivité correspond à un rendement de 4 %, alors que pour le motif non dilué, le rendement est de 20 %.

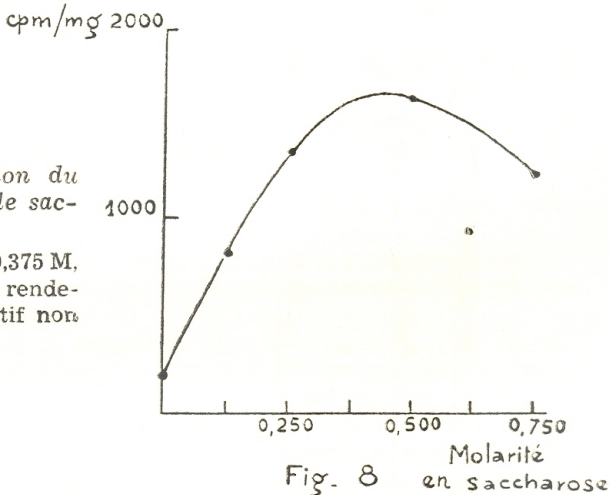


Fig. 8

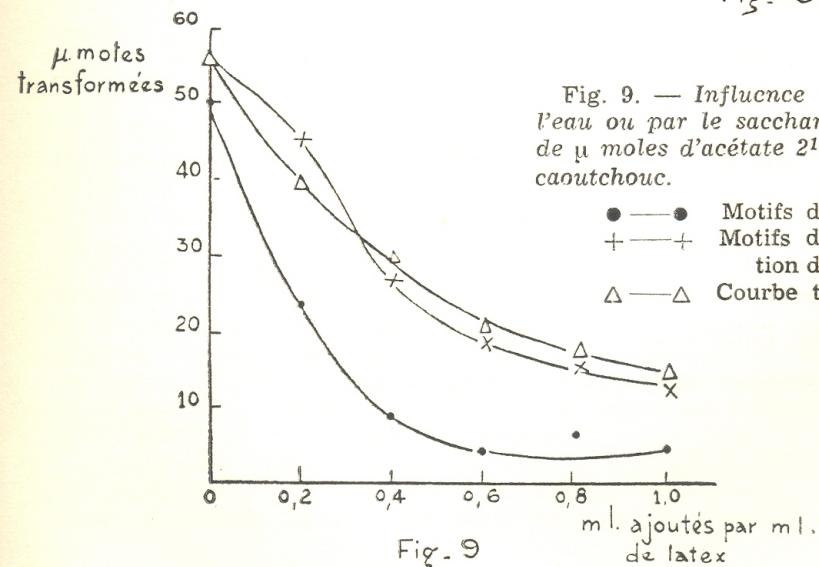


Fig. 9. — Influence de la dilution par l'eau ou par le saccharose sur le nombre de μ moles d'acétate ^{214}C transformées en caoutchouc.

- — ● Motifs dilués par l'eau
- + — + Motifs dilués par une solution de saccharose 0,375 M
- Δ — Δ Courbe théorique calculée.

Fig. 9