

4

Compartmentation de diverses oxydoréductases (peroxydase, *O*-diphénol oxydase et malate déshydrogénase) dans le latex d'*Hevea brasiliensis*, (Kunth), Müll. Arg.

Michel COUPÉ (*), Serge PUJARNISCLE (**) et Jean d'AUZAC (*)

(Manuscrit reçu le 27 septembre 1971)

RÉSUMÉ

L'utilisation conjointe de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, de centrifugations différentielles et isopycniques et de déstabilisations contrôlées des organites du latex d'hévéa a permis une meilleure connaissance de la répartition de diverses oxydoréductases.

C'est ainsi que la plus grande partie de la peroxydase (60 à 80 %) se localise dans les lutoïdes (vacuome polydispersé à caractère lysosomal).

La quasi-totalité de l'*o*-diphénol oxydase se trouve liée aux particules de FREY-WYSSLING, qui seraient un type de plaste propre au latex.

La malate déshydrogénase est presque totalement soluble, cependant, un faible pourcentage de son activité est lié à un type de particule non encore défini.

Environ 50 % de la catalase sont localisés dans un type d'organite, qui en première approximation, serait le même que celui contenant la malate déshydrogénase.

SUMMARY

Disk electrophoresis, differential and isopycnic centrifugations and controlled destabilizations of latex organelles, have been employed in order to obtain a better knowledge of the compartmentation of some oxidoreductases in hevea latex.

It was shown that the most important part of peroxidase (60 to 80 %) is localized in lutoïd particles (polydispersed vacuome with lysosomal characteristics).

Almost all o-diphenol oxidase was bound to FREY-WYSSLING particles which may be a kind of specific plastids of hevea latex.

Malate dehydrogenase is almost completely soluble. Nevertheless, a low percentage of its activity is bound to a kind of indefinite particle.

About 50 % of catalase are localized in a kind of particle which, in a first approach, may be the same as the one containing malate dehydrogenase.

(*) Laboratoire de Physiologie Végétale ; Faculté des Sciences. B.P. 4322. Abidjan (Côte d'Ivoire).

(**) Laboratoire de Physiologie Végétale ; O.R.S.T.O.M., Centre d'Adiopodoumé. B.P. 20, Abidjan (Côte-d'Ivoire).

30 NOV. 1972

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n°

PUJARNISCLE

5780 Bio
Veg

INTRODUCTION

I. — Le latex et ses organites.

Le latex d'*Hevea brasiliensis*, tel qu'il est obtenu après saignée de l'arbre, est une suspension complexe de particules polyterpéniques et d'organites que des arguments cytologiques et biochimiques permettent d'assimiler au cytoplasme de la cellule laticifère (COCKBAIN et SOUTHORN, 1962; Mc MULLEN, 1962; DICKENSON, 1964). Mise à part une très faible quantité de noyaux, de ribosomes et de mitochondries, les organites du latex appartiennent principalement à deux classes : les lutoïdes et les particules de FREY-WISSLING (DICKENSON, 1969).

Les lutoïdes sont des organites d'un diamètre de 2 à 5 μ , entourés par une membrane simple de 100 Å d'épaisseur. Du point de vue biochimique, ils sont caractérisés par un contenu varié d'hydrolases acides, dont la phosphatase, qui permettent de les comparer aux lysosomes des cellules animales (PUJARNISCLE, 1966 b). Leur aptitude à accumuler électivement certains constituants du cytoplasme laticifère, permet par ailleurs de préciser leur caractère vacuolaire (RIBAILLIER et *al.*, 1971).

Les particules de FREY-WYSSLING ont un diamètre de 4 à 6 μ ; elles sont limitées par une double membrane dont le feuillet interne s'invagine en un système complexe de tubules. Elles contiennent en outre des inclusions de β -carotène et de lipides. Leur morphologie générale rappelle celle des chromoplastes en voie de dégénérescence décrits par CAMEFORT (1964) chez l'arille d'if. Leur fonction est très mal connue, l'on sait seulement qu'elles sont aptes à assurer la transformation du mévalonate en β -carotène (BARNARD et DICKENSON, 1966).

II. — Les oxydases du latex.

Le latex est connu depuis fort longtemps pour contenir une peroxydase et une catalase. Ces enzymes ont été étudiées par de HAAN-HOMANS (1950) qui a

ABRÉVIATIONS

- DOC : désoxycholate de sodium.
DOPA : dihydroxyphénylalanine.
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique.
MDH : malate déshydrogénase.
NAD, NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, oxydé et réduit.
NADP, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, oxydé et réduit.
TEA : triéthanolamine.
Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane.

trouvé, en plus, une tyrosinase. HSIA (1958) a montré que l'*o*-diphénol oxydase était sédimentable, alors que la peroxydase se répartissait entre les fractions sédimentables et surnageantes du latex.

Récemment, TATA et EDWIN (1970) ont séparé, par électrophorèse sur gel d'amidon, l'*o*-diphénol oxydase, la catalase et la peroxydase du latex. Ils ont mis en évidence la présence de plusieurs isoenzymes et le fait que les enzymes du sédiment diffèrent de celles du surnageant.

La malate déshydrogénase (MDH) est une des enzymes les plus actives du latex et, jusqu'à ce jour, on la considérait comme typiquement cytoplasmique (d'AUZAC et JACOB, 1969).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. — Récolte et traitement du latex.

Immédiatement après le coup de gouge du saigneur, on laisse le latex s'écouler pendant 3 à 4 mn afin de ne pas récolter la fraction dont les organites ont le plus souffert du traumatisme causé par la saignée (PUJARNISCLE et *al.*, 1970).

Le latex est ensuite recueilli dans un récipient refroidi par de la glace. A chaque fraction de 50 ml, il est ajouté 3 ml d'un mélange 0,3 M en mannitol et M en tampon triéthanolamine (TEA) de pH 7,5.

Environ une heure après la récolte, le mélange est centrifugé 60 mn à 0 °C avec le rotor R. 24 d'une centrifugeuse Sorvall RC2B à 49 000 × g moyen.

On obtient ainsi une couche surnageante contenant le caoutchouc qui est éliminé, un sérum clair que nous appellerons le « surnageant » et un sédiment constitué pour la plus grande part de lutoïdes et de particules de FREY-WYSSLING.

Le sédiment est lavé avec du mannitol 0,3 M tamponné à pH 7,5 par du TEA 0,05 M. Il est ensuite remis en suspension dans environ 10 volumes de mannitol tamponné. Une nouvelle centrifugation de 15 mn à 5 000 × g moyen permet de recueillir un sédiment purifié.

Les surnageants et les sédiments ainsi obtenus à partir du latex frais servent à préparer des poudres acétoniques, en ajoutant goutte à goutte 1 volume de surnageant ou de sédiment (ce dernier étant dilué trois fois) dans 10 volumes d'acétone à -20 °C. Après décantation, l'acétone est siphonnée, les précipités sont lavés deux fois par 250 ml d'acétone, filtrés sur Büchner et enfin séchés sous vide sur P₂O₅.

II. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les électrophorèses ont été réalisées selon la technique d'ORSTEIN et DAVIS (1964 *a et b*). Pour ce faire, on a employé un appareil analytique SHANDON. Les gels contenaient 7,5 % d'acrylamide. Un courant de 3 mA par tube était maintenu durant toute l'électrophorèse ; le plus souvent la séparation a été réalisée à température ambiante. Dans nos conditions, la migration complète du bleu de bromophénol durait 20 mn. Les électrophorèses de peroxydases ont été conduites pendant une à deux heures au réfrigérateur à +5 °C.

Les lyophilisats de protéines du surnageant et du sédiment ont été introduits dans un tampon TEA 0,1 M de pH 7,5 contenant 10 % de saccharose. Il a été déposé de 0,25 à 2 mg de lyophilisat par tube.

Le tampon d'électrophorèse était soit du tris, 25 mM ; glycine, 192 mM ; de pH 8,5 ; soit un mélange de β -alanine, 87,5 mM ; acide acétique, 36 mM ; de pH 4,5 (REISFELD et *al.*, 1962).

Révélation des activités enzymatiques :

Toutes les révélations ont été conduites à 30 °C.

Peroxydase : Les gels ont été préincubés 10 mn à 30 °C dans le milieu suivant : tampon acétate, 0,2 M, pH 4,5 ; CaCl_2 , 0,5 mM ; gaïacol redistillé, 0,5 mM.

L'incubation proprement dite a été faite en ajoutant H_2O_2 pour obtenir une concentration finale de 1 mM. L'apparition de la coloration rouge-orange du tétragaïacol a été suivie à 470 nm et enregistrée grâce à un dispositif simple. Le gel et le milieu d'incubation étaient placés dans un tube porté par un chariot se déplaçant dans le compartiment à cuves d'un spectrophotomètre Maroc de Jobin-Yvon. Le chariot et le gel défilaient à la vitesse de 18,75 mm/mn devant une fente d'environ 0,05 mm. Le spectrophotomètre est couplé à un enregistreur Beckman de « 10 inches » dont la vitesse de déroulement était de 2 inches/mn. Les temps d'incubation nécessaires variaient de 2 à 15 mn.

o-diphénol oxydase : Le milieu est constitué de : d,l-DOPA, 50 mM ; phosphate de potassium, 0,25 M, pH 6,0 ; CaCl_2 , 5 mM. La révélation, dans ces conditions, se faisait en quelques heures sous agitation.

Malate-déshydrogénase : La MDH est révélée dans le milieu suivant : tris, 0,2 M, pH 9,25 ; malate, 5 mM ; NAD, 0,4 mM. Il contenait en outre 0,5 mg de nitro bleu de tétrazolium et 0,1 mg de N-méthyl phénazonium méthosulfate pour un volume de 3,5 ml.

La révélation était conduite à l'obscurité à 30 °C ; elle demandait environ 5 mn pour l'enzyme du surnageant et 30 mn pour celle du sédiment.

III. — Séparation des organites du latex par centrifugation isopycnique.

10 ml de latex sont dilués 2 fois dans le tampon mannitol (tris, 0,05 M, pH 7,5 ; mannitol, 0,3 M ; EDTA, 10 mM ; polyéthylèneglycol 600, 5 %) et le mélange est déposé au sommet d'un tube de centrifugeuse contenant un gradient linéaire de saccharose variant de 0 à 50 % dissous dans le même tampon (volume du gradient 32 ml). Deux ml de saccharose à 70 % sont placés au fond du tube afin d'arrêter les agrégats.

On effectue une centrifugation de 40 mn dans le rotor HB4 de la Sorvall RC2B à 27 500 \times g moyen. Le fractionnement est réalisé en perçant le fond du tube, et on recueille des fractions de 2,5 ml. On obtient ainsi de 15 à 16 fractions.

IV. — Méthodes de dosages.

— Peroxydase (E.C.1.11.1.7.).

L'activité de la peroxydase est déterminée en mesurant à 470 nm la cinétique de la transformation du gaïacol. Le milieu d'incubation contient : gaïacol, 5 mM ; H_2O_2 , 0,1 mM ; CaCl_2 , 5 mM ; tampon acétate de pH 4,5, 100 mM. Le témoin est constitué par de l'eau. La pente à l'origine de la courbe de la densité optique en fonction du temps est mesurée sur le graphique.

La valeur adoptée pour le coefficient d'extinction moléculaire du tétragaïacol est $26,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mole}^{-1}$ à 470 nm (CHANCE et MAEHLY, 1955). Les résultats sont exprimés en μmoles de tétragaïacol formées par mn et par mg de protéines à 25 °C.

— o-diphénol oxydase (E.C.1.10.3.1.).

L'activité de l'*o*-diphénol oxydase est mesurée selon la technique de LANCE (1963) à pH 6,5 en tampon phosphate 0,1 M et en présence de 10 mM de d,l-dihydroxyphénylalanine (d,l-DOPA), le volume étant de 5 ml ; le mélange réactionnel est vigoureusement agité. La densité optique à 490 nm est mesurée au bout de 4 mn. Pour chaque dosage, on fait deux témoins, l'un contenant tous les réactifs sauf la DOPA qui est remplacée par de l'eau,

l'autre contenant tous les réactifs sauf l'enzyme. Les densités optiques des deux témoins sont soustraites de celle obtenue dans la dosage (1). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires ($\Delta DO/mn$).

— *Malate-déshydrogénase* (E.C.1.1.1.37.).

On mesure la consommation du NAD réduit à 340 nm dans un milieu 0,1 M en TEA pH 7,5; 0,2 mM en NADH et 0,15 mM en oxalacétate; le volume final étant 3 ml. L'activité est exprimée en μ moles de NADH consommées par mn et par mg de protéine à 25 °C.

— *Catalase* (E.C.1.11.1.6.).

L'activité de la catalase est dosée en mesurant à 0 °C l'oxygène dégagé à l'aide d'un manomètre de Warburg. Le milieu réactionnel (4 ml) a la composition suivante : H_2O_2 , 20 mM; tris-HCl pH 7,5, 100 mM. Dans ces conditions, le volume d'oxygène dégagé est proportionnel au temps pendant au moins 6 mn. Les résultats sont exprimés en μ moles d' O_2 dégagées par mn et par mg de protéine à 0 °C.

— *Phosphatase acide* (E.C.3.1.3.2.).

L'activité a été déterminée en utilisant le *p*-nitrophényl phosphate (10 mM) en tampon acétate 0,1 M de pH 5,0 selon la méthode décrite précédemment par PUJARNISCLE (1969).

Les résultats sont exprimés en μ moles de *p*-nitrophénol libérées par mn et par mg de protéines à 30 °C.

— β -*carotène*.

Il est dosé suivant la méthode de THOMPSON et KON (1950). Dans un tube à hémolyse, on réalise le mélange suivant : Na_2SO_4 anhydre, 1 g; alumine, 1 g; extrait à doser, 0,5 ml. Cette poudre est triturée, puis placée sous vide sur P_2O_5 et déshydratée pendant 4 heures à l'obscurité.

La poudre sèche est agitée dans 5 ml de benzène à 2 % d'acétone; le mélange est centrifugé 10 mn à $2\,200 \times g$ moyen dans une centrifugeuse Jouan modèle E90 et le surnageant est passé au spectrophotomètre à 450 nm.

— *Protéines*.

Il a été effectué selon la méthode de LOWRY et *al.* (1961) avec le réactif de Folin-Ciocalteu après deux précipitations en milieu acide trichloracétique 0,6 M. La sérum albumine bovine a été utilisée comme étalon.

V. — Présentation des résultats.

Compte tenu du fait que ce travail a porté sur les systèmes particuliers, dans de nombreux cas, nous avons été ramenés à distinguer 3 types d'activité enzymatique : *libre*, *soluble* et *totale*.

— *Activité libre* : Elle est mesurée en milieu isotonique (généralement 0,3 M en mannitol) pendant des temps très courts (jamais plus de 10 mn) directement sur la suspension d'organites. Elle rend compte, lorsque les organites cellulaires sont dans un parfait état d'intégrité, de l'activité des enzymes accessibles à leurs substrats.

— *Activité soluble* : C'est celle déterminée sur le surnageant obtenu après centrifugation des suspensions à $24\,000 \times g$ moyen, pendant 20 mn dans le rotor 50 Ti de l'ultracentrifugeuse Spinco modèle L2-50. Elle représente la part des enzymes entièrement libérées et qui se trouvent alors sous forme soluble.

— *Activité totale* : Elle est mesurée après destruction complète des organites dans un milieu contenant du désoxycholate de sodium (DOC) à la concentration de 5 mM. Elle représente donc le potentiel actif global de l'enzyme contenu dans les particules.

(1) On a ajouté 5 mM de $CaCl_2$, lors des dosages de l'*o*-diphénol oxydase et de la peroxydase, car l'ion Ca^{++} s'est avéré un activateur puissant de ces enzymes dans nos conditions opératoires (résultats non publiés).

Il est à noter que, d'une façon générale, cette activité mesurée directement sur la suspension traitée avec 5 mM de DOC est peu différente de celle mesurée sur le surnageant obtenu après centrifugation à $24\,000 \times g$ moyen, pendant 20 mn de cette même suspension.

Les enzymes étudiées ici sont donc facilement solubilisées par ce détergent.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. — Répartition de différentes enzymes d'oxydoréduction entre surnageant et sédiment.

Nous avons analysé les différentes activités enzymatiques considérées sur des poudres acétoniques obtenues à partir des surnageants et sédiments de 8 latex. Nous avons volontairement choisi des latex très différents, soit par leur origine clonale, soit par la période du cycle végétatif à laquelle ils ont été récoltés.

En plus des 4 enzymes d'oxydoréduction considérées, nous avons également analysé la phosphatase acide dont on sait qu'elle est en majeure partie lutoïdique (PUJARNISCLE, 1966 *a*) donc sédimentable et de plus, d'activité variable en fonction des clones et du cycle végétatif (RIBAILLIER, 1971).

Le tableau I fait état des résultats obtenus. On admettait à ce jour que la phosphatase acide est essentiellement sédimentable, tandis que la MDH est cytoplasmique (PUJARNISCLE, 1968; d'AUZAC et JACOB, 1969). Cette répartition se traduit par des rapports d'activité sédiment/surnageant compris entre 5 et 20 pour la phosphatase acide et entre 0,03 et 0,1 pour la MDH. En première approximation, on pourrait donc considérer, à la vue des rapports d'activité, que l'*o*-diphénol oxydase est sédimentable, tandis que la peroxydase et la catalase, pour lesquelles le rapport d'activité sédiment/surnageant est de l'ordre de 2, ont vraisemblablement une répartition bimodale.

Cependant, la valeur élevée de ce rapport n'est pas nécessairement l'indice d'une répartition unimodale. Le cas de la phosphatase acide illustre les précautions qu'il convient de prendre dans l'interprétation. D'une part la libération dans le surnageant d'une activité phosphatasique par les lutoïdes dégradés, d'autre part la présence dans le surnageant d'une NADP-phosphatase (JACOB et *al.*, 1970) et d'une phosphatase acide non lutoïdique (RIBAILLIER et *al.*, 1971) peuvent contribuer à modifier le rapport des activités sédiment/surnageant.

Sur le plan de la variabilité des activités enzymatiques entre les différents latex, on peut faire les remarques suivantes :

- l'existence d'une variabilité notable de l'activité phosphatase acide du sédiment est confirmée;
- le rapport des activités peroxydase sédiment/surnageant présente une constance assez remarquable;
- les activités de la MDH du surnageant et du sédiment sont également assez constantes;

- l'*o*-diphénol oxydase est par contre extrêmement variable;
- les activités catalase sont relativement variables; il en est de même du rapport des activités sédiment/surnageant.

TABLEAU I

Répartition entre le surnageant et le sédiment de diverses activités enzymatiques.

Latex n°	Surnageant	Sédiment	Rapport $\frac{\text{Sédiment}}{\text{Surnageant}}$	
Phosphatase acide	1	0,112	1,240	11,0
	2	0,170	3,010	17,7
	3	0,180	2,260	12,4
	4	0,066	0,787	11,9
	5	0,167	0,885	5,3
	6	0,040	0,204	5,1
	7	0,070	0,400	5,7
	8	0,066	0,423	6,4
Peroxydase	1	0,060	0,120	2,0
	2	0,034	0,090	2,6
	3	0,090	0,302	3,3
	4	0,017	0,062	3,6
	5	0,020	0,043	2,1
	6	0,017	0,039	2,3
	7	0,035	0,075	2,1
	8	0,025	0,056	2,2
Malate déshydrogénase	1	7,770	0,700	0,090
	2	7,660	0,574	0,075
	3	8,970	0,250	0,028
	4	7,050	0,216	0,031
	5	4,050	0,145	0,036
	6	5,680	0,328	0,058
	7	4,540	0,364	0,035
	8	3,880	0,233	0,060
<i>o</i> -diphénol oxydase	4	0,235	7,870	33,5
	5	0,888	6,690	7,53
	6	0	0,043	
	7	0	0,124	
	8	0	0,262	
Catalase	1	0,033	0,176	5,3
	2	0,138	0,487	3,5
	3	0,147	0,321	2,2
	4	0,290	0,223	0,8
	5	0,081	0,288	3,5
	6	0,117	0,125	1,1
	7	0,091	0,065	0,7
	8	0,185	0,174	0,9

II. — Caractérisation par électrophorèse de diverses isoenzymes.

Isoenzymes de la peroxydase.

1. — *En électrophorèse directe à pH 8,5* il apparaît des différences marquées entre les bandes de peroxydases obtenues à partir des surnageants et des sédiments (fig. 1 et 2). C'est ainsi que la bande principale retrouvée dans tous les sédiments analysés présente, dans nos conditions, une mobilité électrophorétique de 23 à 25 mm/h, tandis que celle du surnageant se déplace vers l'anode à la vitesse de 50 à 53 mm/h.

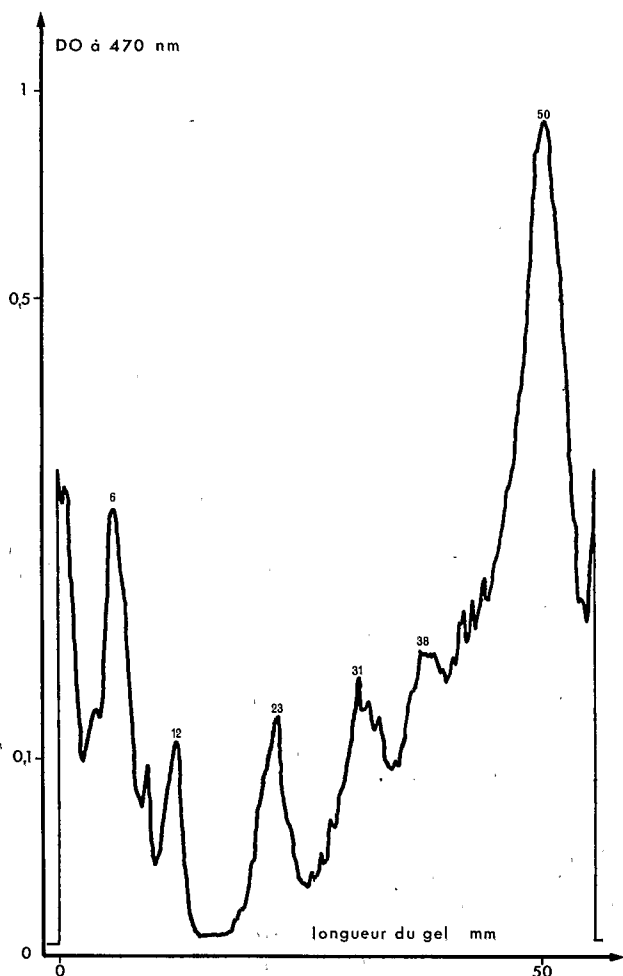


FIG. 1. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des peroxydases du surnageant. Lyophilisat du surnageant : 1 mg. Electrophorèse directe : 60 mn à pH 8,5. Révélation par 10 mn d'incubation, lecture de la densité optique à 470 nm.

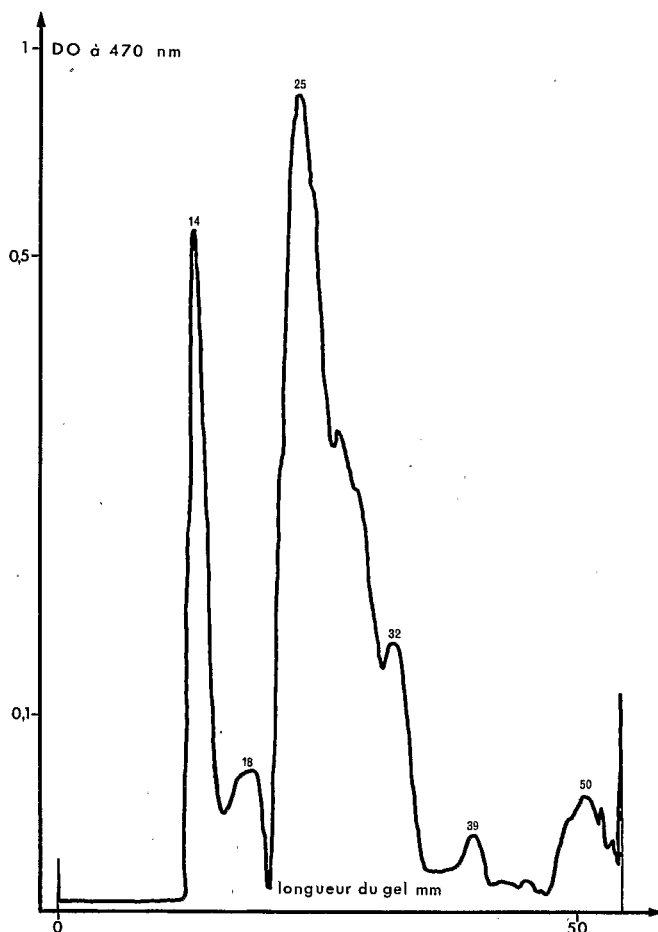


FIG. 2. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des peroxydases du sédiment. Lyophilisat de sédiment : 0,5 mg. Electrophorèse directe 60 mm à pH 8,5 (autres conditions : voir fig. 1).

Les figures 1 et 2 montrent de nombreuses bandes moins intenses et dont la présence varie selon les latex utilisés.

On remarquera qu'il existe dans le surnageant des bandes de faible intensité correspondant très vraisemblablement à celles du sédiment; ceci est notamment le cas pour les bandes migrant respectivement à la vitesse de 12-14 et 23-25 mm/h. L'identité de certaines bandes secondaires pourrait être attribuable à une pollution inévitable des surnageants par des enzymes provenant d'organites endommagés lors de la saignée ou des traitements ultérieurs.

2. — En électrophorèse inversée à pH 8,5 on constate dans le sédiment l'existence de peroxydases cationiques (tableau II).

La faible bande apparaissant dans le surnageant et possédant la même mobilité que la bande principale du sédiment pourrait résulter d'une pollution.

TABLEAU II
Mobilités électrophorétiques des peroxydases du surnageant et du sédiment.

Mobilité	Bande n°	Surnageant	Sédiment
Electrophorèse	1	6	14
directe à pH 8,5 ;	2	12	25
peroxydase anionique	3	23	
mm/h	4	31	
	5	38	
	6	50-53	
Electrophorèse	1	20	18
inverse à pH 8,5 ;	2		22
peroxydase cationique	3		27
mm/h			
Electrophorèse			
directe a pH 4,5 ;	1	13	
peroxydase cationique	2		0,12
mm/h			

Les chiffres en italique correspondent aux bandes principales qui se retrouvent systématiquement.

3. — *En électrophorèse directe à pH 4,5*, il apparaît également une différence importante dans le déplacement et donc dans la nature des peroxydases du surnageant et du sédiment.

Dans ces conditions, le sédiment présente une bande à très faible mobilité, tandis qu'une bande large et de mobilité moyenne apparaît dans le surnageant (tableau II).

L'électrophorèse sur gel montre sans équivoque l'existence, dans le latex, d'un système peroxydasique complexe; comme dans la plupart des milieux végétaux, de nombreuses isoenzymes sont présentes. Il convient de remarquer cependant que la mobilité des diverses isoenzymes permet de constater l'existence de peroxydases différentes dans le surnageant et dans le sédiment.

Isoenzymes de l'o-diphénol oxydase.

La figure 3 montre l'existence d'une activité très intense dans le sédiment. On remarquera cependant la présence, dans le surnageant, d'au moins une bande d'activité migrant de façon distincte par rapport à l'enzyme du sédiment.

Ce résultat conduit à admettre que la faible activité rencontrée dans le surnageant des latex 4 et 5 du tableau I correspond, au moins en partie, à une enzyme différente de celle du sédiment.

Isoenzymes de la malate déshydrogénase.

L'électrophorèse met en évidence l'importante quantité de MDH du surnageant (fig. 4). Il apparaît, là encore, qu'au moins une isoenzyme à migration plus rapide est présente dans le sédiment.

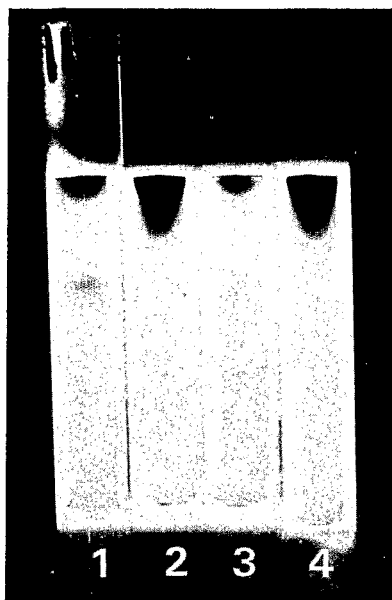


FIG. 3

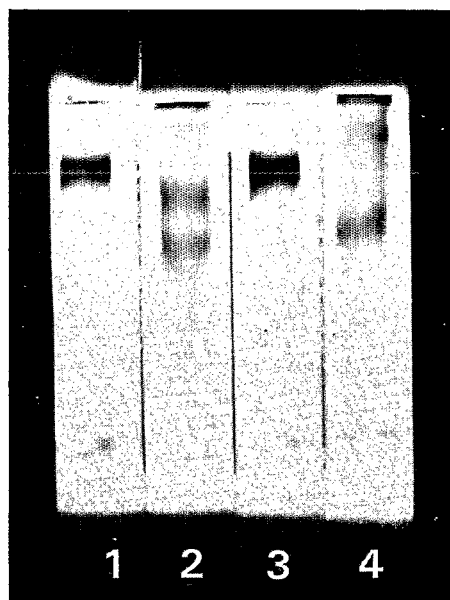


FIG. 4

FIG. 3. — Electrophorèse des *o*-diphénol oxydases du surnageant et du sédiment. Tubes 1 et 3 : 1 mg de lyophilisats issus de 2 surnageants différents. Tubes 2 et 4 : 0,25 mg de lyophilisats issus des 2 sédiments correspondants. La bande migrant faiblement dans les électrophorèses des surnageants (1 et 3) correspond vraisemblablement à une certaine pollution par des enzymes issues d'organites dégradés.

FIG. 4. — Electrophorèses des MDH du surnageant et du sédiment. Tubes 1 et 3 : 0,5 mg de lyophilisats issus de 2 surnageants différents. Tubes 2 et 4 : 0,2 mg de lyophilisats issus des 2 sédiments correspondants. La bande à faible migration du tube 2 (sédiment) correspond vraisemblablement à la bande principale du surnageant ; elle proviendrait d'une certaine pollution du sédiment par la MDH du sérum, quantitativement très importante.

III. — Localisation des oxydoréductases par centrifugation isopycnique.

La centrifugation isopycnique du latex permet aisément de distinguer que celui-ci est constitué principalement par trois types de particules (PUJARNISCLE, 1968).

On trouve tout en haut du tube une couche blanche formée de particules de caoutchouc agglomérées, vers le bas du tube une couche grisâtre, constituée par les lutoïdes, enfin en position intermédiaire, une bande assez étalée, de coloration jaune-orange, correspondant aux particules de FREY-WYSSLING, caractérisées par une haute teneur en lipides et caroténoïdes (FREY-WYSSLING, 1929).

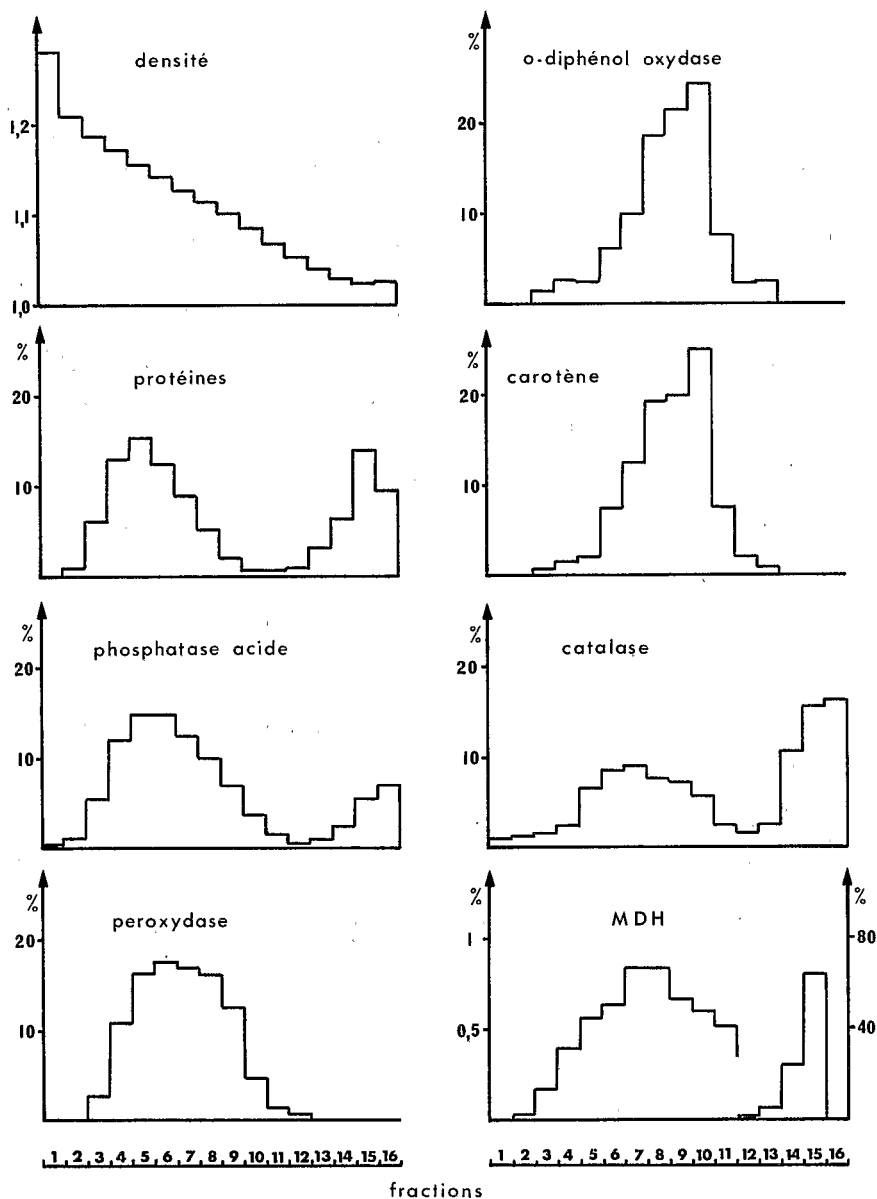


FIG. 5. — Analyse des fractions obtenues après centrifugation isopycnique du latex. Les résultats des dosages enzymatiques sont donnés en % de l'activité totale récupérée. La fraction n° 16 correspond essentiellement au caoutchouc flottant au sommet du tube. N.B. Dans le cas de la MDH l'échelle est de 0 à 1 % pour les fractions 1 à 11 et de 0 à 100 % pour les fractions de 12 à 16.

Les distributions de ces deux derniers types d'organites, le long du gradient de densité, ont été suivies respectivement en dosant l'activité phosphatase acide et la teneur en caroténoïdes des fractions obtenues après centrifugation isopycnique du latex.

Les résultats obtenus (fig. 5) permettent plusieurs observations :

— L'activité *o*-diphénol oxydase présente une distribution qui suit assez fidèlement celle des caroténoïdes; toutes deux passent par un maximum pour les fractions 8, 9 et 10. L'*o*-diphénol oxydase serait donc une enzyme localisée dans les particules de FREY-WYSSLING.

— L'activité de la peroxydase, de même que celle de la phosphatase acide, passent par un maximum dans les fractions 5, 6, 7 et 8. Cette oxydase serait donc d'origine lutoïdique.

— Les distributions de la catalase et de la MDH particulières sont proches l'une de l'autre dans ce gradient, et ne correspondent ni à la distribution de la phosphatase acide, ni à celle des caroténoïdes.

— Enfin, il faut remarquer que la courbe de distribution des protéines suit de très près celle de la phosphatase. On ne peut déceler aucune remontée de cette courbe dans les fractions où l'*o*-diphénol oxydase, la catalase et la MDH culminent. Ceci confirmant les observations faites précédemment, à savoir qu'après le caoutchouc, les lutoïdes forment le système particulière le plus abondant du latex et qu'il n'est pas possible de mettre en évidence les autres particules par leur teneur en protéines (PUJARNISCLE, 1968; 1969).

IV. — Déstabilisation contrôlée des organites du latex.

Dans le but de localiser les enzymes considérées dans le latex, nous avons suivi leur courbe d'activation après déstabilisation des organites du sédiment du latex. Cette méthode a déjà été appliquée avec succès par GIANETTO et de DUVE (1955) aux lysosomes de la cellule hépatique de rat et par PUJARNISCLE (1969) aux lutoïdes du latex.

Les organites du sédiment obtenu par centrifugation différentielle du latex, et contenant principalement des lutoïdes et des particules de FREY-WYSSLING, ont subi une lyse progressive, soit en faisant varier la pression osmotique du milieu de suspension, soit par action du désoxycholate de sodium, soit par action de la digitonine.

Action de la pression osmotique.

Le sédiment, en suspension dans le mannitol 0,3 M, a subi une préincubation d'une heure à 0 °C. Dans des milieux contenant des quantités variables de sorbitol et tamponnés à pH 7,5 par du tris-HCl 0,05 M.

On a ensuite dosé, d'une part les *activités libres* phosphatases acide, *o*-diphénol oxydase, peroxydase, catalase et MDH directement sur ces suspensions, d'autre part les *activités solubles* de ces enzymes sur les surnageants après centrifugation de ces suspensions. Dans tous les cas, les dosages ont été effectués dans des milieux contenant du sorbitol aux même concentrations que celles des préincubations.

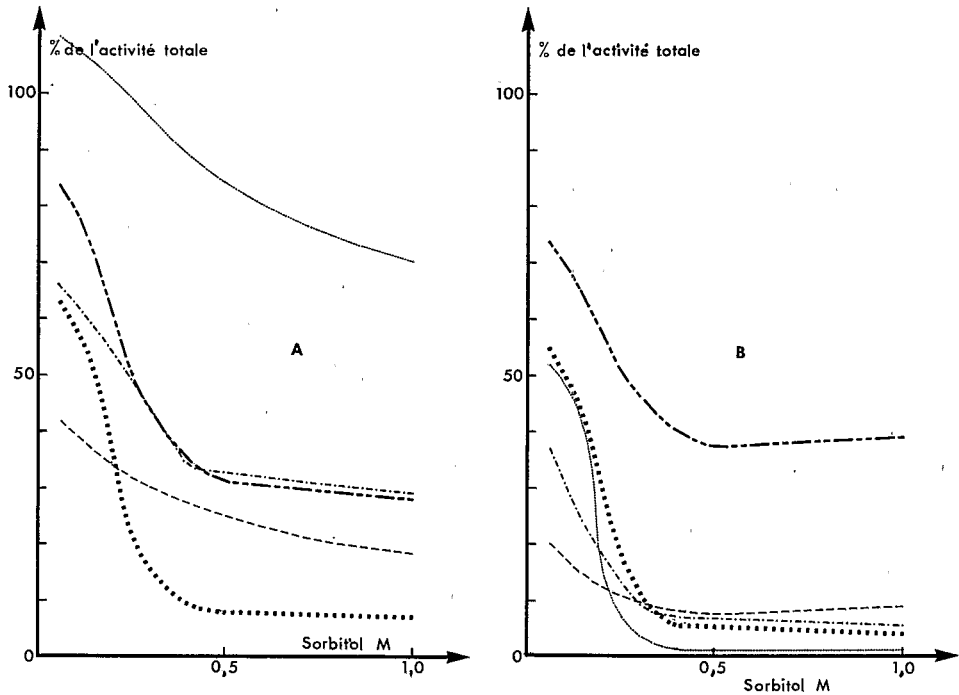


FIG. 6. — Activation des enzymes par traitement osmotique.

A — Activité libre

B — Activité soluble

..... activité de la peroxydase

----- activité de la MDH

----- activité de la catalase

----- activité de la phosphatase acide

----- activité de l'o-diphénol oxydase

La fig. 6 illustre les résultats obtenus dans ces conditions, toutes les activités enzymatiques ayant été ramenées à l'activité totale obtenue après préincubation du sédiment dans un milieu 0,3 M en sorbitol et 5 mM en DOC.

On remarquera qu'en ce qui concerne les activités libres des enzymes considérées (fig. 6 A), la peroxydase diminue assez régulièrement et dans de faibles proportions lorsque la concentration en sorbitol augmente; par contre, les autres enzymes voient leur activité diminuer dans de fortes proportions jusqu'à une concentration de sorbitol comprise entre 0,3 et 0,4 M. Au delà de ces concentrations, les activités se stabilisent à une valeur à peu près constante.

Les variations des activités solubles des 4 enzymes considérées (fig. 6 B) sont semblables, et ceci même dans le cas de la peroxydase.

Action du désoxycholate de sodium.

Le sédiment a été préincubé pendant une heure environ à 0 °C dans des milieux contenant du mannitol 0,3 M tamponné à pH 7,5 par du tris-HCl 0,05 M, et des quantités variables de désoxycholate de sodium.

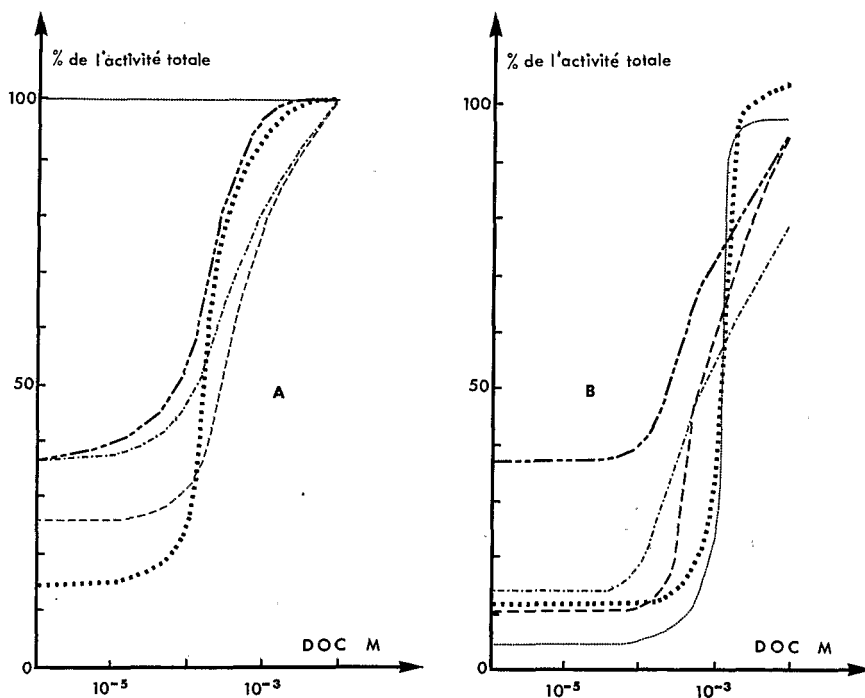


FIG. 7. — Activation des enzymes par traitement au désoxycholate.

A : Activité libre

B : Activité soluble

Voir légende fig. 6.

Comme précédemment, on a ensuite mesuré les activités libres et solubles des enzymes, tous les dosages s'effectuant dans des milieux dont la concentration en mannitol est de 0,3 M.

Toutes les activités ont été ramenées à l'activité totale mesurée après préincubation du sédiment en présence de 5 mM de désoxycholate.

On peut observer, d'après les résultats obtenus, que l'activité peroxydase libre (fig. 7 A) reste constante, quelle que soit la concentration de désoxycholate, et qu'elle est égale à l'activité totale. La phosphatase libre passe assez rapidement à 100 % pour une faible variation de désoxycholate, alors que, pour la catalase, la MDH et l'*o*-diphénol oxydase libres, cette activation est sensiblement plus progressive.

En ce qui concerne les activités solubles (fig. 7 B), on peut, comme précédemment, remarquer la ressemblance des courbes de solubilisation de la catalase, de la MHD et, à un degré moindre, de l'*o*-diphénol oxydase. Il apparaît, d'autre part, une grande similitude dans la solubilisation de la phosphatase acide et de la peroxydase.

Action de la digitonine.

Le sédiment a été préincubé à 0 °C dans les milieux contenant du mannitol 0,3 M tamponné à pH 7,5 par du tris-HCl 0,05 M et de la digitonine à des concentrations variables.

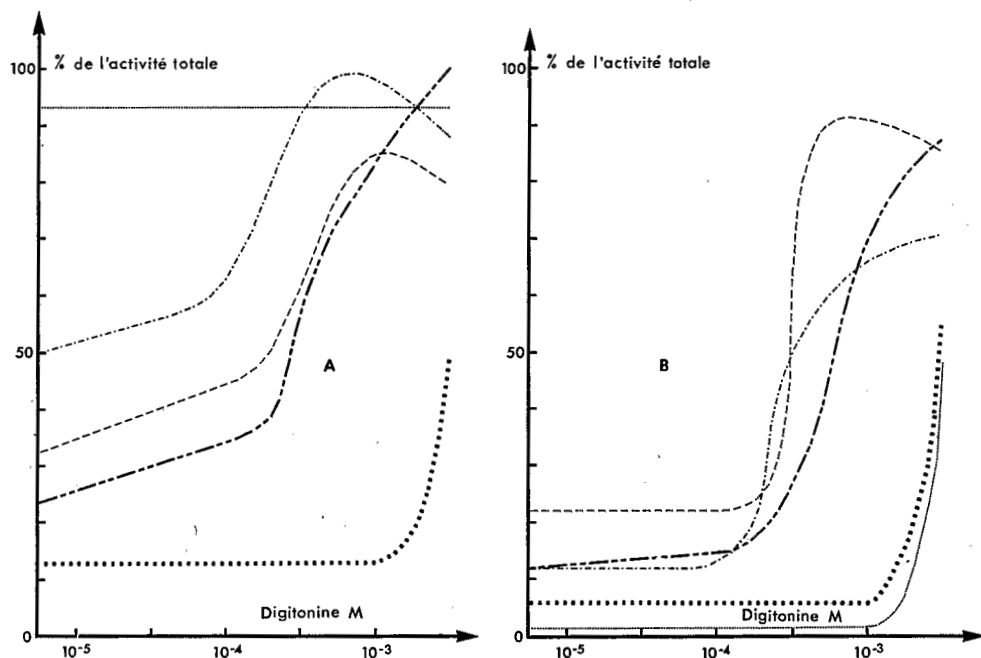


FIG. 8. — Activation des enzymes par traitement à la digitonine.

A : Activité libre

B : Activité soluble

Voir légende fig. 6.

Les activités libres et solubles des cinq enzymes ont ensuite été mesurées, toujours en milieu mannitol 0,3 M. Les résultats rapportés dans la figure 8 représentent leurs variations par rapport aux activités totales mesurées en présence de 5 mM de DOC.

A la différence de la lyse obtenue par les deux méthodes précédentes, les résultats sont ici beaucoup plus nets et les différences entre les courbes d'activation plus marquées.

En première approximation, nous pouvons observer deux familles de courbes d'activation.

— La première famille groupe la phosphatase acide et la peroxydase (exception faite de l'activité de la peroxydase libre qui reste constante). Ces enzymes commencent à être libérées pour des concentrations de digitonine supérieures à 1 mM. Dans ce cas, la corrélation entre les variations de la phosphatase et de la peroxydase solubles est très étroite. On peut raisonnablement en déduire que la peroxydase provient bien des lutoïdes.

— La deuxième famille comprend l'*o*-diphénol oxydase, la catalase et la malate déshydrogénase qui commencent à être libérées pour une concentration de digitonine de 0,3 mM. Dans ce cas, il existe une certaine corrélation entre les variations des activités de ces enzymes; les courbes obtenues sont cependant loin d'être tout à fait semblables.

L'*o*-diphénol oxydase présente des courbes d'activation très différentes de celles de la phosphatase acide (notamment en ce qui concerne les activations obtenues avec la digitonine). Elle n'appartient donc pas aux lutoïdes et, compte tenu des résultats donnés par centrifugation isopycnique, elle appartiendrait aux particules de FREY-WYSSLING.

Les organites dans lesquels sont localisées la catalase et la malate déshydrogénase présentent certaines similitudes de comportement avec les particules de FREY-WYSSLING (*o*-diphénol oxydase). Cependant l'analogie n'est pas parfaite et, au vu des résultats obtenus lors des destabilisations contrôlées, des organites, il n'est pas possible de nier ou d'affirmer l'appartenance de ces enzymes aux particules de FREY-WYSSLING.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il avait déjà pu être montré précédemment que l'activité phosphatase acide du latex est concentrée dans les lutoïdes (PUJARNISCLE, 1966 *a*). Cependant on trouve aussi dans le surnageant, d'autres phosphatases acides, en particulier une NADP phosphatase (JACOB *et al.*, 1970), et une phosphatase activée par Mg^{++} (RIBAILLIER *et al.*, 1971). De même, TATA et EDWIN (1970) on pu mettre en évidence, par électrophorèse sur gel d'amidon, la multiplicité des systèmes enzymatiques du latex, résultat confirmé ici en ce qui concerne les enzymes d'oxydo-réduction.

L'*o*-diphénol oxydase et la peroxydase qui, compte tenu des résultats du tableau I, sont principalement de nature particulaire, n'en possèdent pas moins une activité non négligeable dans le surnageant. L'analyse par électrophorèse montre bien qu'on a affaire à plusieurs isoenzymes, les unes spécifiquement particulaires, les autres spécifiques du surnageant.

L'analyse de la MHD après centrifugation isopycnique avait montré que son activité se localisait en presque totalité dans le sérum du latex. Néanmoins, un pourcentage très faible de cette activité se retrouvait systématiquement dans les fractions particulières du gradient de densité et on avait admis, en première approximation, que cette activité pouvait être due à des phénomènes d'adsorption (PUJARNISCLE, 1969). Il ne semble pourtant pas que ce soit le cas, car l'électrophorèse montre que cette MHD est différente de l'isoenzyme du surnageant.

Ces résultats indiquent donc que la localisation multiple d'une activité enzymatique donnée est liée à la présence de diverses isoenzymes. Cela confirme, s'il en était encore besoin, le postulat de la localisation unique des enzymes énoncé par de DUVE (1959).

Ces oxydases ayant une localisation complexe dans le latex, nous avons été amenés à tenter de les localiser à l'aide de deux techniques différentes : l'analyse de leur distribution le long d'un gradient de densité après centrifugation isopycnique du latex, et l'analyse des courbes d'activation obtenues après une destabilisation contrôlée des organites formant le sédiment du latex.

Les résultats de la centrifugation isopycnique donnés dans la figure 5 nous ont permis, en première approximation, de tirer les conclusions suivantes :

L'*o*-diphénol oxydase serait liée aux particules de FREY-WYSSLING caractérisées par la haute teneur en caroténoïdes, alors que la peroxydase appartiendrait aux lutoïdes caractérisées par la phosphatase acide.

Les résultats obtenus avec la catalase et la MHD sont plus difficiles à interpréter. Ces enzymes occupent toutes deux, compte non tenu de leur activité sérique, une position intermédiaire entre celle de la phosphatase acide et celle des caroténoïdes.

La présence de l'*o*-diphénol oxydase dans les particules de FREY-WYSSLING ne saurait trop nous surprendre. Certains résultats obtenus précédemment donnaient comme très probable une telle localisation (PUJARNISCLE, 1969). En outre, ces particules, dont les caractères morphologiques ont été décrits par DICKENSON (1964), présentent de très grandes similitudes structurales avec les chromoplastes en voie de dégénérescence décrits par CAMEFORT (1964) dans l'arille d'if. Or de nombreux auteurs localisent cette enzyme dans les chloroplastes (ARNON, 1949; MAYER, 1966; SATO, 1966; VIEIRA DA SILVA, 1970). Ainsi, les particules de FREY-WYSSLING pourraient donc représenter un cas particulier de plaste propre à la cellule laticifère.

Par contre, étant admis que les lutoïdes constituent un vacuome polydispersé possédant les caractères des lysosomes, la présence de la peroxydase dans une telle particule pourrait être *a priori* surprenante.

Si l'on se rappelle que la peroxydase peut être liée à des ribosomes (RICARD, 1969), on peut penser que de telles particules pourraient en l'occurrence être liées à la membrane externe des lutoïdes. Cette hypothèse serait en accord avec les observations de MATILE (1969, 1970) et de COULOMB (1971), selon lesquelles des ribosomes seraient accolés au tonoplaste des cellules méristématiques.

En outre, l'examen des courbes de variation de l'activité libre de cette enzyme (fig. 6 A, 7 A et 8 A) pourrait confirmer ce point de vue car cette activité reste à peu près constante et est presque toujours égale à l'activité totale. Autrement dit, dans les cas considérés, la peroxydase ne présente aucune latence. Cependant il n'en est plus de même lorsque l'on prend en considération les variations de la peroxydase soluble (fig. 6 B, 7 B et 8 B). En effet, dans ces conditions on observe une excellente corrélation entre les variations de la peroxydase soluble et celles de la phosphatase soluble.

Si l'on admet que la lyse osmotique de lutoïdes contrairement à la lyse par action des détergents est inapte à rompre d'éventuelles liaisons entre la peroxydase et la membrane, on doit conclure des résultats obtenus par lyse osmotique (fig. 6 B) que la peroxydase est, comme la phosphatase acide, présente dans le sérum intralutoïdique. Ceci conduit à expliquer le défaut de latence de l'activité libre de la peroxydase soit par la perméabilité de la membrane des lutoïdes aux substrats, soit par une action déstabilisante de ces substrats sur la membrane.

Pour trancher entre ces deux possibilités, on a étudié d'une part l'action labilisante, et d'autre part le pouvoir protecteur de ces substrats sur les lutoïdes. On a vérifié tout d'abord que l'eau oxygénée n'avait aucun effet sur la stabilité des lutoïdes. Par contre, le gaïacol possède effectivement une certaine action labilisante pour des concentrations supérieures à 20 mM, donc bien plus fortes que celle utilisée lors du dosage de la peroxydase (5 mM). S'il n'est pas possible

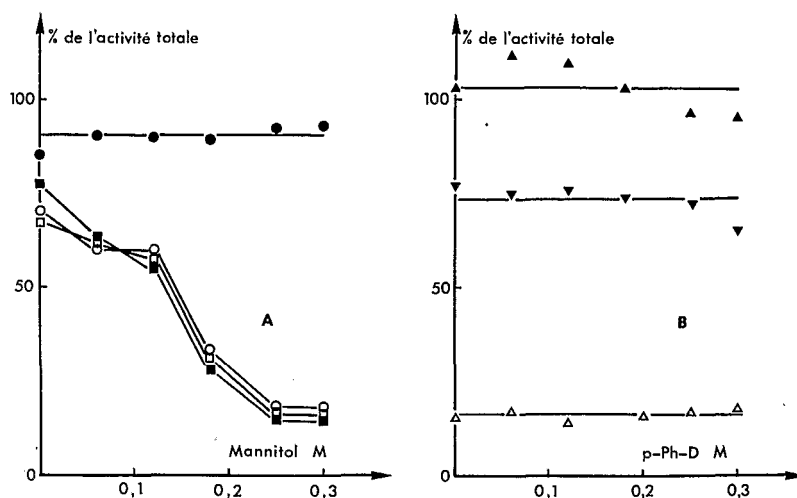


FIG. 9. — Activation des enzymes par traitement osmotique.

A: activité de la phosphatase acide libre (●) et soluble (○) et de la peroxydase (dosée à la *p*-phénylène diamine) libre (■) et soluble (□), en fonction de la concentration en mannitol du milieu de préincubation.

B: Activité de la phosphatase libre en fonction de la concentration en *p*-phénylène diamine (*p*-Ph-D) du milieu de préincubation.

Pour un milieu :

- 0,25 M en mannitol + 5 mM de DOC (▲)
- 0 M de mannitol (▼)
- 0,25 M de mannitol (△).

d'expliquer l'absence de latence de la peroxydase libre par effet destructif de la membrane de ces organites par le gaïacol, il n'est pas possible non plus d'étudier le pouvoir de protection osmotique de ce produit. Ce problème a donc été repris en utilisant un autre substrat, en l'occurrence la *p*-phénylène diamine.

Dans ces conditions (fig. 9 A), en faisant varier la concentration en mannitol lors des préincubations, on observe les mêmes phénomènes que précédemment :

L'activité peroxydase libre reste constante et est à peu près égale à son activité totale. L'activité phosphatase libre varie suivant une courbe analogue à celle de la fig. 6 A.

L'activité peroxydase soluble varie de manière identique à celle de la phosphatase soluble, comme dans le cas de la fig. 6 B.

Lorsque le sédiment est préincubé dans des milieux dont la concentration en *p*-phénylène diamine varie et contenant en outre 0 M de mannitol ou 0,25 M de mannitol, ou encore 0,25 M de mannitol + 5 mM de DOC et que l'on dose ensuite l'activité phosphatase libre, on obtient les résultats de la fig. 9 B.

Dans les trois cas considérés, l'activité phosphatase libre reste constante, quelle que soit la concentration de *p*-phénylène diamine. Ces résultats signifient donc que ce substrat n'a aucune action sur la phosphatase, qu'il n'a aucune action labilisante sur la membrane des lutoïdes, et aucun pouvoir de protection osmotique vis à vis de ces particules.

Ainsi la membrane lutoïdique est perméable à la *p*-phénylène diamine et il en est vraisemblablement de même pour le gaïacol.

A la lumière de ces résultats, on peut raisonnablement localiser la peroxydase dans les lutoïdes.

Si la signification biochimique et physiologique de la présence d'une peroxydase dans les lutoïdes nous échappe, il faut rappeler ici que l'existence de cette même enzyme dans les organites de type lysosomal a cependant été signalée (BAINTON et FARQUAR, 1968; BAGGIOLINI et *al.*, 1970; GOLDFISCHER et *al.*, 1970.)

En ce qui concerne la catalase et la MDH, les résultats obtenus, tant par centrifugation isopycnique que par déstabilisation des organites, montrent que ces deux enzymes sont partiellement d'origine particulaire dans le latex et aussi activables.

Leur distribution le long d'un gradient de densité, ainsi que leurs courbes d'activation obtenues après déstabilisation progressive du sédiment sont très voisines. Il est probable que ces deux enzymes sont contenues dans le même type de particule. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas, à l'heure actuelle de les localiser dans les lutoïdes ni dans les particules de FREY-WYSSLING. Or, en plus du caoutchouc et des ribosomes, ce sont les seules particules qui ont été décelées de façon certaine dans le latex, à ce jour.

On ne peut pas rejeter *a priori* l'idée d'un *artéfact*. Cependant, ces deux enzymes pourraient éventuellement appartenir à des mitochondries dont la présence dans le latex a été signalée par DICKENSON (1964) en de rares occasions. Rappelons toutefois qu'il n'a pas été possible à ce jour, de détecter une activité cytochrome oxydase dans le latex (PUJARNISCLE, 1969).

On sait d'autre part que la catalase est localisée dans les peroxysomes des cellules animales (de DUVE, 1960), et végétales (BREIDENBACH et BEEVERS, 1967; TOLBERT et *al.*, 1968). Il est donc possible que la MDH et la catalase du latex appartiennent aussi à des peroxysomes.

Cette dernière hypothèse semble la plus plausible, d'autant que MARTY (1969) a caractérisé ces organites dans le latex d'*Euphorbia characias*. Cependant dans le cas du latex d'hévéa, ils seraient en si petite quantité que leur présence n'a pas encore pu être décelée au microscope électronique. Il est bien évident qu'une telle explication ne peut que constituer une hypothèse de travail qui demandera des confirmations expérimentales.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur Cl. LIORET pour les conseils et critiques qu'il nous a prodigués.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNON D. I., 1949. — Copper enzymes in isolated chloroplasts - Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.
- D'AUZAC J. et JACOB J. L., 1969. — Sur la régulation de la glycolyse au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. *J. Rubber. Res. Inst. Malaya*, **21**, 417-444.
- BAGGIOLINI M., HIRSCH J. G. et de DUVE C., 1970. — Further biochemical and morphological studies of granule fraction from rabbit heterophil leukocytes. *J. cell. Biol.*, **45**, 586-597.

- BAINTON D. F. et FARQUHAR M. G., 1968. — Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I) Histochemical staining of bone marrow smears. *J. cell. Biol.*, **39**, 286-298.
- BARNARD D. et DICKENSON P. B., 1966. — *Natural Rubber Producers' Research Association*. Résultats non publiés.
- BREIDENBACH R. W. et BEEVERS H., 1967. — Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particles from castor bean endosperm. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **27**, 462-469.
- CAMEFORT H., 1964. — Evolution de la structure des plastes pendant la maturation de l'If. (*Taxus baccata* L.). *C.R. Acad. Sci.*, Paris, Sér. D, **298**, 1017-1020.
- CHANCE B. et MAEHLY A. C., 1955. — Assay of catalases and peroxydases. In *Methods in enzymology*, Vol. II, S. P. COLOWICK et N. O. KAPLAN éd., Academic Press, New York, p. 764-775.
- COCKBAIN E. G. et SOUTHORN W. A., 1962. — The structure and composition of Hevea latex. *Rev. gén. Caout. Plast.*, **39**, 1149-1156.
- COULOMB P., 1971. — Phytolysosomes dans le méristème racinaire de la courge (*Cucurbita pepo* L., Cucurbitacée). Activité phosphatasique acide et activité peroxydasique. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, Sér. D, **272**, 48-51.
- DICKENSON P. B., 1964. — The ultra-structure of latex vessels of *Hevea brasiliensis*. *Proceed. natural Rubb. Prod. Res. Assoc.*, Jubilee Conf., Cambridge, 52-66.
- DICKENSON P. B., 1969. — Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **21**, 543-559.
- de DUVE C., 1959. — Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In *Subcellular particles*, T. HAYASHI éd., The Ronald Press Co., New York, p. 128-159.
- de DUVE C., 1960. — La localisation des enzymes dans les éléments figurés de la cellule. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **42**, 11-29.
- FREY-WYSSLING A., 1929. — Microscopisch onderzoek haar voorkomen van harsen in latex van hevea. *Arch. Rubbercult.*, **13**, 394-434.
- GIANETTO R. et de DUVE C., 1955. — Tissue fractionation studies. IV) Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsine by rat-liver particles. *Biochem. J.*, **59**, 433-438.
- GOLDFISCHER S., SCHILLER S. et STERNLIEB T., 1970. — Copper in hepatocyte lysosomes of the toad: *Bufo marinus* L. *Nature*, **228**, 172-173.
- de HAAN-HOMANS L. N. S., 1950. — Oxydation processes in latex of *Hevea brasiliensis*. *Trans. Inst. Rubb. Ind.*, **25**, 346-363.
- HSIA R. C. H., 1958. — Oxygen absorption by *Hevea brasiliensis* latex. *Trans. Inst. Rubb. Ind.*, **34**, 267-290.
- JACOB J. L., RIBAILLIER D. et d'AUZAC J., 1970. — La NADP-phosphatase du latex d'*Hevea brasiliensis*: inhibitions, interférence sur l'anabolisme isoprénique. *Physiol. Vég.*, **8**, 247-262.
- LANCE C., 1963. — Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés *in vitro*. *Thèse Doct. Etat, Sci. nat.*, Paris, C.N.R.S., n° A.O.4063.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. I., FAAR A. L. et RANDALL R. J., 1961. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MARTY F., 1969. — Caractérisation cytochimique infrastructurale de peroxyosomes (microbodies, *sensu stricto*) chez *Euphorbia characias*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, Sér. D, **268**, 1388-1391.
- MATILE P., 1969. — Plant lysosomes. In *Lysosomes in biology and pathology*, J. T. DINGLE et D. B. FELL éd., North Holland Publish. Co., Amsterdam et Londres, p. 406-430.
- MATILE P., 1970. — Enzymologie pflanzlicher Zell compartimente. *Ber. deutsch. bot. Gesellsch.*, **82**, 397-405.
- MAYER A. M., 1966. — Catechol oxidase; Enzymic liberation from sugar beet chloroplasts. *Phytochemistry*, **5**, 1297-1301.
- MAC MULLEN A. I., 1962. — Particulate ribonucleoprotein components of *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem. J.*, **85**, 491-495.
- ORSTEIN L. et DAVIS B. J., 1964 a. — Disc electrophoresis. I) Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349

- ORSTEIN L. et DAVIS B.J., 1964 b. — Disc electrophoresis. II) Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427
- PUJARNISCLE S., 1966 a. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Analogie avec les lysosomes. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, Sér. D, **261**, 2127-2130.
- PUJARNISCLE S., 1966 b. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Distribution de la phosphatase acide, de la β -glucosidase et de la cathepsine dans le latex. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, Sér. D, **262**, 923-925.
- PUJARNISCLE S., 1968. — Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. *Arg. Physiol. Vég.*, **6**, 27-46.
- PUJARNISCLE S., 1969. — Etude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, Müll. Arg. Différences et analogies avec les lysosomes. *Thèse Doct. Etat, Sci. nat.*, Orsay, C.N.R.S., n° AO3379.
- PUJARNISCLE S., RIBAILLIER D. et d'AUZAC J., 1970. — Du rôle des lutoïdes dans l'écoulement du latex chez l'*Hevea brasiliensis*. II) Evolution des hydrolases lutoïdiques et de quelques propriétés du latex au cours de la saignée. *Rev. gén. Caout. Plast.*, **47**, 1317-1321.
- REISFELD R. A., LEWIS U. J. et WILLIAMS D. E., 1962. — Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, **195**, 281-283.
- RIBAILLIER D., 1971. — Etude de la variation saisonnière de quelques propriétés du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Rev. gén. Caout. Plast.*, **48**, 1091-1093.
- RIBAILLIER D., JACOB J. L. et d'AUZAC J., 1971. — Sur certains caractères vacuolaires des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. *Arg. Physiol. Vég.*, **9**, 423-437.
- RICARD J., 1969. — Les peroxydases des végétaux supérieurs. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.*, **15**, 331-362.
- SATO M., 1966. — Metabolism of phenolic substances by the chloroplasts. II) Conversion by the isolated chloroplasts of *p*-coumaric acid to caffeic acid. *Phytochemistry*, **5**, 385-389.
- TATA S. J. et EDWIN E. E., 1970. — Hevea latex enzymes detected by zymogram technique after starch gel electrophoresis. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **23**, 1-12.
- THOMPSON et KON, 1950. Cités par T. W. GOODWIN. — Caroténoïdes. In *Modern methods of plant analysis*, Vol. III, K. PAECH et M. V. TRACEY éd., Spinger-Verlag, Berlin, Göttingen et Heidelberg, p. 308.
- TOLBERT N. E., OESER A., KISAKI T., HAGEMAN R. H. et YAMAZAKI T., 1968. — Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. biol. Chem.*, **243**, 5179-5184.
- VIEIRA DA SILVA J. B., 1970. — Recherches sur diverses manifestations de la résistance à la sécheresse chez les cotonniers. *Thèse Doct. Etat, Sci. nat.*, Orsay, C.N.R.S., n° A.O. 4685.