

Bien extraire les protéines totales de latex de *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.)

Introduction

Le latex de l'hévéa est riche en protéines (environ 1,5 à 2,5 % du poids frais) qui sont des molécules biologiques, jouant un rôle actif et vital dans le fonctionnement des cellules (enzymes, anticorps, antigènes, toxines ...). Les protéines du latex sont analysées comme paramètre biochimique pour des études telles que le potentiel de production de caoutchouc, la sensibilité à l'encoche sèche, la tolérance au déficit hydrique, etc. Elles se retrouvent dans tous les compartiments du latex avec environ 20 % fixées sur les particules de caoutchouc, 60 % en solution dans le cytosol et le reste associé à la fraction sédimentable, composée essentiellement de particules lutoïdes et de particules de Frey-Wyssling. Cette fiche technique montre comment extraire les protéines totales de latex en vue de leur dosage comme paramètre biochimique.

Prélèvement de latex

- Effectuer le prélèvement de latex dans le dernier trimestre de l'année, reconnu comme période de stabilité physiologique du latex.
- Après la saignée, éliminer les cinq premières gouttes de latex, car elles renferment des impuretés.
- Recueillir, par la suite, le latex qui s'écoule, dans des tubes flacon de 50 ml maintenus dans de la glace (figure 1).
- Pour un clone donné, prélever le latex séparément sur trois arbres de même état sanitaire.
- Mélanger ensuite le latex des trois arbres de même état sanitaire pour constituer l'échantillon du clone.
- Conserver le latex, ainsi prélevé, dans une glacière contenant de la glace.



Figure 1 : Prélèvement de latex de *Hevea brasiliensis*

Méthode d'extraction des protéines

- Utiliser la méthode de centrifugation différentielle à froid sur du latex fraîchement récolté pour extraire les protéines totales de latex.
- Extraire les protéines totales des trois fractions du latex : cytosol, particules de caoutchouc et particules de lutoïdes du latex.

Extraction des protéines du cytosol

- Centrifuger le latex, fraîchement prélevé et conservé dans la glace jusqu'au laboratoire, à 15 000 rotations par minute (RPM) pendant 15 minutes à 4 °C. La centrifugation génère trois fractions :
- 1** : un culot (fraction lourde) constitué de particules de lutoïdes, de particules de Frey-Wyssling et de fines particules contaminantes de caoutchouc ;
- 2** : une fraction blanche, au-dessus de la fraction lourde, constituée de particules de caoutchouc mélangées à du cytosol et ,
- 3** : une phase légère constituée de particules de caoutchouc prises en masse formant un bouchon (figure 2).
- Écarter, avec une spatule, le bouchon de caoutchouc.
- Prélever, à l'aide d'une seringue de 1 ml, le surnageant qui contient les protéines du cytosol dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml.
- Conserver les tubes Eppendorf contenant les protéines du cytosol à - 80 °C.

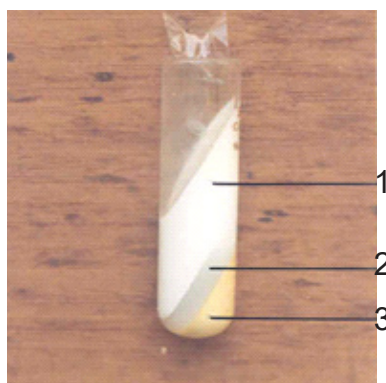


Figure 2 : Profil de latex frais d'hévéa obtenu après centrifugation à 15 000 RPM pendant 15 minutes à 4°C.
1 – Bouchon de particules de caoutchouc 2 – Fraction blanchâtre 3 – Culot

Extraction des protéines des particules de caoutchouc

- Collecter la fraction légère constituée de particules de caoutchouc prises en masse obtenue après la première centrifugation.
- Suspendre la fraction légère collectée dans un égal volume de SDS 10 % (p/v) (sodium dodécyl sulfates) pendant une heure.
- Centrifuger à 22 000 RPM pendant une heure à 4 °C. Le surnageant obtenu contient les protéines liées aux particules de caoutchouc.
- Prélever à l'aide d'une seringue de 1 ml, le surnageant contenant les protéines des particules de caoutchouc, dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml.
- Conserver à – 80 °C, les tubes Eppendorf contenant les protéines de particules de caoutchouc.

Extraction des protéines des particules de lutoïdes

- Laver trois fois, par centrifugation à 15 000 RPM pendant 15 mn à 4 °C, le culot (fraction lourde) obtenu après la première centrifugation, avec un tampon isotonique à pH 7,5.
- Composition du tampon isotonique : 14,4g Tris ; 2,5g MgCl₂ ; 308.95 mg Molybdate d'ammonium. 182 g Mannitol ; 385,5 mg Dithiothréitol dans un volume final de 2.5 l).
- Casser par choc thermique, en les congelant dans l'azote liquide puis en les décongelant dans un bain marie à 37 °C, les lutoïdes débarrassés des particules de caoutchouc.
- Centrifuger à 12 000 RPM pendant 15 mn à 4 °C. Le surnageant obtenu contient les protéines des particules de lutoïdes.
- Prélever, à l'aide d'une seringue de 1 ml, le surnageant contenant les protéines des particules de lutoïdes, dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml.

- Conserver à – 80 °C, les tubes Eppendorf contenant les protéines des particules de lutoïdes.
- Le schéma général de l'extraction des protéines totales de latex de l'hévéa est présenté à la figure 3 ci-dessous.

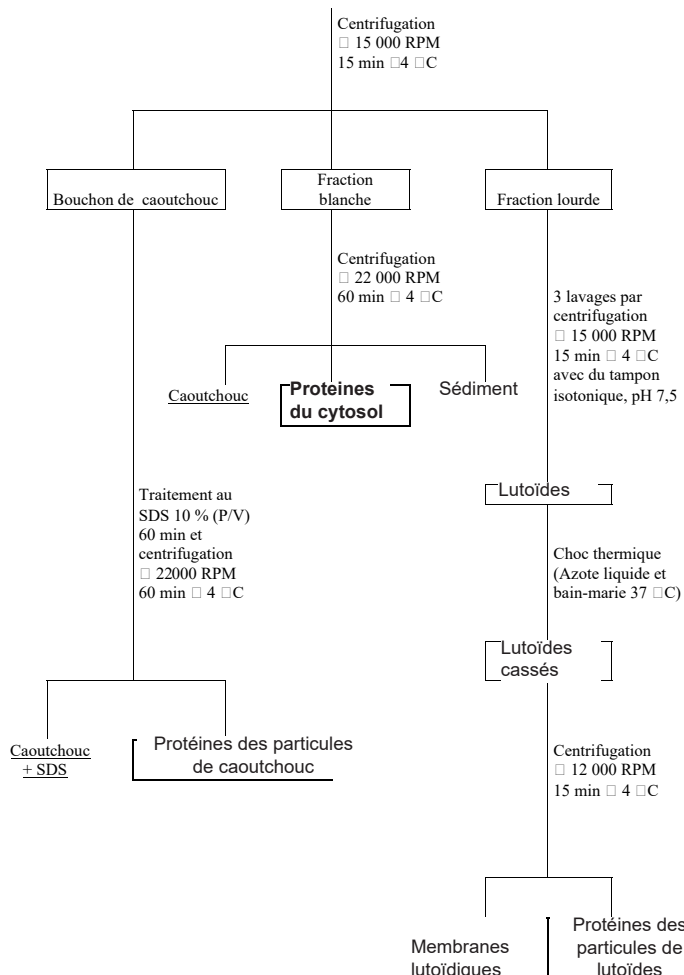


Figure 3 : Schéma général de l'extraction des protéines totales de latex de *Hevea brasiliensis*

Conclusion

La centrifugation différentielle à froid du latex fraîchement récolté permet d'obtenir les protéines totales des particules de caoutchouc, du cytosol et des particules de lutoïdes du latex. Ces extraits des différentes fractions de centrifugation du latex peuvent être quantifiés et aussi être utilisés dans des études telles que le potentiel de production de caoutchouc, la sensibilité à l'encoche sèche, la tolérance au déficit hydrique, etc...