

La méthode hématocrite appliquée à la mesure des changements de volume de chloroplastes isolés d'épinard

Autor(en): **Siegenthaler, Paul André**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **78 (1968)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-54878>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

La méthode hématocrite appliquée à la mesure des changements de volume de chloroplastes isolés d'épinard

Par *Paul André Siegenthaler*

(Laboratoire de physiologie végétale

Institut de botanique, Université de Neuchâtel)

Manuscrit reçu le 1^{er} février 1968

Introduction

Plusieurs méthodes ont été proposées dans la littérature pour mesurer les changements de structure de chloroplastes isolés.

La plupart d'entre elles sont des méthodes indirectes basées sur les variations de poids (méthode gravimétrique), de densité optique (méthode spectrophotométrique⁴) de diffusion optique (méthode de la diffusion optique) et de conductivité électrique (méthode du compteur de Coulter) qui accompagnent les changements de volume des chloroplastes. Ces méthodes ont été utilisées avec succès pour mettre en évidence les changements de volume des chloroplastes qui suivent un traitement lumineux (Packer et Siegenthaler, 1966) ou une variation de tonicité du milieu environnant (Nishida, 1963). Cependant, ces diverses techniques présentent le désavantage de ne pas mesurer directement le volume des chloroplastes et, souvent, sont accompagnées d'artifices difficiles à apprécier.

C'est pourquoi Itoh et al. (1963) et Packer et al. (1965) ont cherché à développer une nouvelle technique dont le principe repose sur la centrifugation des chloroplastes et la mesure directe de leur volume sédimenté. Cette technique a été utilisée avec succès puisqu'elle fut à l'origine de la découverte du gonflement des chloroplastes à la lumière (Packer et al. 1965). Cependant, le procédé mis au point par ces auteurs présente quelques inconvénients sérieux. Tout d'abord, le temps de centrifugation nécessaire pour obtenir une sédimentation complète des chloroplastes est trop long (une heure et demie) – période au cours de laquelle les chloroplastes peuvent subir des dommages irréversibles. En outre, dans le cas d'un traitement lumineux, une deuxième difficulté apparaît, celle de maintenir la suspension de chloroplastes à la lumière, grâce à l'emploi de tubes translucides; ce dispositif a pour conséquence d'élever d'une manière sensible la température du mélange réactionnel étudié.

Nous inspirant de la méthode hématocrite, couramment utilisée pour mesurer le volume des globules sanguins, nous avons cherché à appliquer cette technique à la mesure du volume relatif des chloroplastes. Sans en donner les détails, Tolberg et Macey (1965) utilisèrent cette méthode pour étudier le comportement osmotique des chloroplastes isolés d'épinard. Dans ce qui suit, nous décrivons la technique chlorocrite (par analogie avec la technique hématocrite) qui permet de mesurer rapidement les changements de volume de chloroplastes isolés dans diverses conditions, notamment à la suite d'un traitement lumineux.

Matériel et méthodes

Préparation des chloroplastes

Les chloroplastes de feuilles d'épinard sont obtenus selon le procédé de Whatley et Arnon (1963) adapté par Siegenthaler et Packer (1965).

Des feuilles d'épinard, provenant du marché local, sont soigneusement triées puis maintenues à l'obscurité à 4 °C pendant au moins 24 heures pour en réduire la teneur en amidon. Après avoir détaché les nervures centrales, on conserve les limbes foliaires que l'on broie à l'aide d'un mélangeur électrique pendant 30 secondes dans un milieu contenant 175 mM de NaCl et 100 mM de tampon Tris-HCl¹ (pH 8,0). La suspension ainsi obtenue est filtrée à travers 2 couches de gaze hydrophile (qualité 10/9 de Schaffhouse) et le filtrat est centrifugé pendant 1 minute à 200 g. La suspension surnageante est à nouveau centrifugée pendant 10 minutes à 1000 g pour sédimenter les chloroplastes. Ceux-ci sont remis en suspension dans le même milieu d'isolement puis centrifugés à 2000 g pendant 10 minutes. Le sédiment de chloroplastes est mélangé avec soin dans le même milieu de suspension de façon à obtenir une concentration finale de 1,5 à 2,5 mg de chlorophylle par millilitre.

Toutes ces opérations se font à 4 °C environ et à l'obscurité. La concentration en chlorophylle est déterminée par la méthode spectrophotométrique décrite par Whatley et Arnon (1963) et le nombre de chloroplastes est évalué à l'aide d'une cellule à compter «Thoma brightlined Assistant».

Description de la technique «chlorocrite»

Pour cette technique on utilise des tubes capillaires «hématocrite» (75 mm de longueur; 1,3 à 1,4 mm de diamètre extérieur et 1 mm environ de diamètre intérieur) et une centrifugeuse «hématocrite» (Christ, 1500 t/min) munie d'un plateau circulaire sur lequel on peut disposer 36 tubes capillaires. Ces tubes sont remplis avec une suspension de chloroplastes ayant généralement une concentration de 1,0 mg de chlorophylle par millilitre. En plongeant l'extrémité du tube dans la suspension de chloroplastes et en le maintenant incliné, le liquide monte facilement dans le tube par capillarité. Celui-ci est ensuite fermé à la flamme à l'une de ses extrémités et placé immédiatement dans les sillons radiaux de la centrifugeuse en prenant soin de diriger l'extrémité fermée vers l'extérieur. On centrifuge pendant 10 minutes puis on procède, à l'aide d'une réglette graduée, à la mesure de la hauteur du sédiment des chloroplastes. La section du tube étant constante, cette mesure est proportionnelle au volume de ces organites. Le volume des chloroplastes sédimentés (correspondant à une hauteur a mm) s'exprime en pour-cent par rapport au volume total (correspondant à une hauteur b mm) de la suspension ajoutée initialement.

$$\text{Volume des chloroplastes sédimentés} = \frac{a}{b} \times 100$$

(unité arbitraire: UA)

Des chloroplastes (1 mg de chlorophylle par millilitre) mis en suspension dans une solution de Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) et de NaCl (175 mM) présentent généralement un volume sédimenté ($a/b \times 100$) voisin de $9,0 \pm 0,2$.

¹ Abréviations utilisées: Tris-HCl: 2-amino-2 hydroxyméthyl-2-propandiol-1,3 ou tris-hydroxyméthyl aminométhane ajusté au pH 8,0 à l'aide d'acide chlorhydrique. UA: unité arbitraire.

Pour les expériences que nous décrivons dans ce travail, la mesure relative du volume des chloroplastes est suffisante puisque ce sont les changements de volume qui nous intéressent et non pas le volume absolu des chloroplastes.

Résultats

Estimation du volume moyen d'un chloroplaste par la technique «chlorocrite»

Afin de déterminer si le volume des chloroplastes obtenu par sédimentation correspond à celui que fournissent d'autres méthodes (par exemple la méthode du compteur de Coulter), il était intéressant d'évaluer le volume moyen d'un chloroplaste. Connaissant le nombre total des chloroplastes introduits dans le capillaire et le volume correspondant des chloroplastes sédimentés, le volume moyen d'un chloroplaste est estimé à $88 \mu^3$ (tableau 1).

Tableau 1

Calcul du volume moyen d'un chloroplaste

Volume de la suspension de chloroplastes introduite dans le capillaire avant la centrifugation ($b = 62,2$ mm)	48,827 mm ³
Volume des chloroplastes sédimentés après 30 minutes de centrifugation ($a = 5,8$ mm)	4,553 mm ³
Volume sédimenté: $\frac{a}{b} \times 100$ (Unités arbitraires)	9,3 UA
Nombre total de chloroplastes introduits initialement dans le capillaire (12×10^8 chloroplastes par milligramme de chlorophylle)	52×10^6
Volume moyen d'un chloroplaste	$88 \mu^3$

Influence du temps de centrifugation

Le temps de centrifugation nécessaire pour obtenir une sédimentation complète dépend de la concentration en chlorophylle de la suspension de chloroplastes (fig. 1 A) Pour des concentrations faibles de chlorophylle (0,5 mg/ml), une à deux minutes de centrifugation suffisent pour obtenir un volume sédimenté stable tandis que plusieurs minutes sont requises pour des concentrations plus élevées de chlorophylle.

A la suite de ces expériences, nous avons adopté un temps de centrifugation de 10 minutes pour des concentrations de chlorophylle variant de 0,5 à 1,5 mg/ml.

Influence de la concentration des chloroplastes

Le volume sédimenté des chloroplastes après 10 minutes de centrifugation est une fonction linéaire de la concentration en chlorophylle (fig. 1 B).

Influence de la tonicité du milieu de suspension

Un changement de tonicité du milieu de suspension entraîne une modification du volume des chloroplastes. Ce mécanisme a été décrit en détail par Nishida (1963)

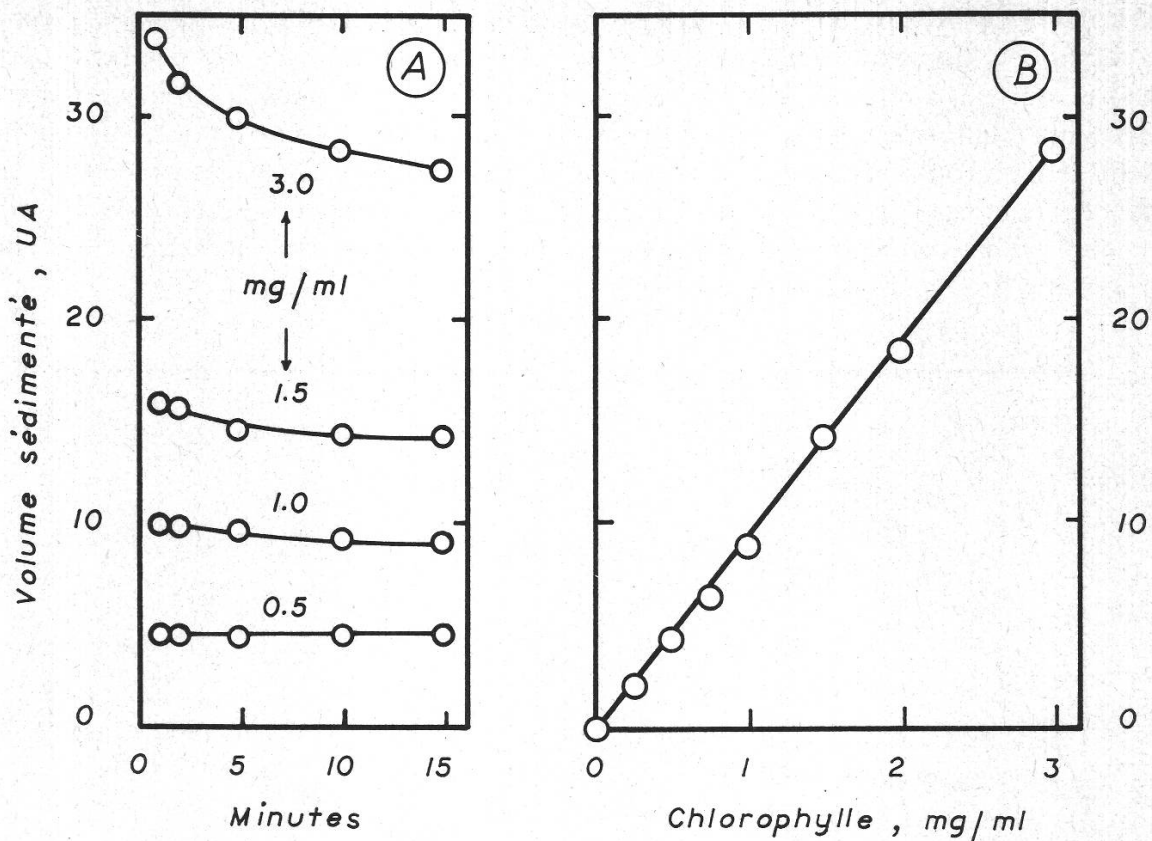


Figure 1

Influence du temps de centrifugation et de la concentration en chlorophylle sur le volume sédimenté de chloroplastes mesuré par la méthode chlorocrite

A. Volume sédimenté en fonction du temps de centrifugation pour diverses concentrations en chlorophylle (mg/ml)

B. Volume sédimenté en fonction de la concentration en chlorophylle. Temps de centrifugation: 10 minutes

Le mélange réactionnel contient 175 mM de NaCl, 100 mM de tampon Tris-HCl (pH 8) et des chloroplastes aux concentrations indiquées

Tableau 2

Vérification du comportement osmotique de chloroplastes isolés par la méthode chlorocrite

Le mélange réactionnel contient 20 mM de tampon Tris-HCl (pH 8), diverses concentrations de NaCl et des chloroplastes (0,75 mg de chlorophylle par millilitre. Les suspensions de chloroplastes sont maintenues à l'obscurité (à 20 °C).

Concentrations de NaCl (mM)	Volume des chloroplastes (unités arbitraires) après une incubation de	
	5 min	130 min
43,7	12,7	14,1
87,5	9,0	10,2
131,2	6,4	8,6
175,0	5,6	8,1
350,0	4,9	6,5
875,0	4,5	4,9

et Tolberg et Macey (1965). Nous avons vérifié l'existence d'un tel phénomène par la méthode chlorocrite. Le tableau 2 montre que le volume des chloroplastes sédimentés décroît à mesure que la concentration de NaCl dans le milieu extérieur augmente, conformément à l'effet osmotique attendu. On observe en outre un gonflement des chloroplastes après 130 minutes d'incubation pour toutes les concentrations de NaCl étudiées. Un gonflement maximal de 45 % est obtenu en présence de 175 mM de NaCl. Des concentrations salines plus faibles ou plus fortes exercent un effet protecteur sur les chloroplastes.

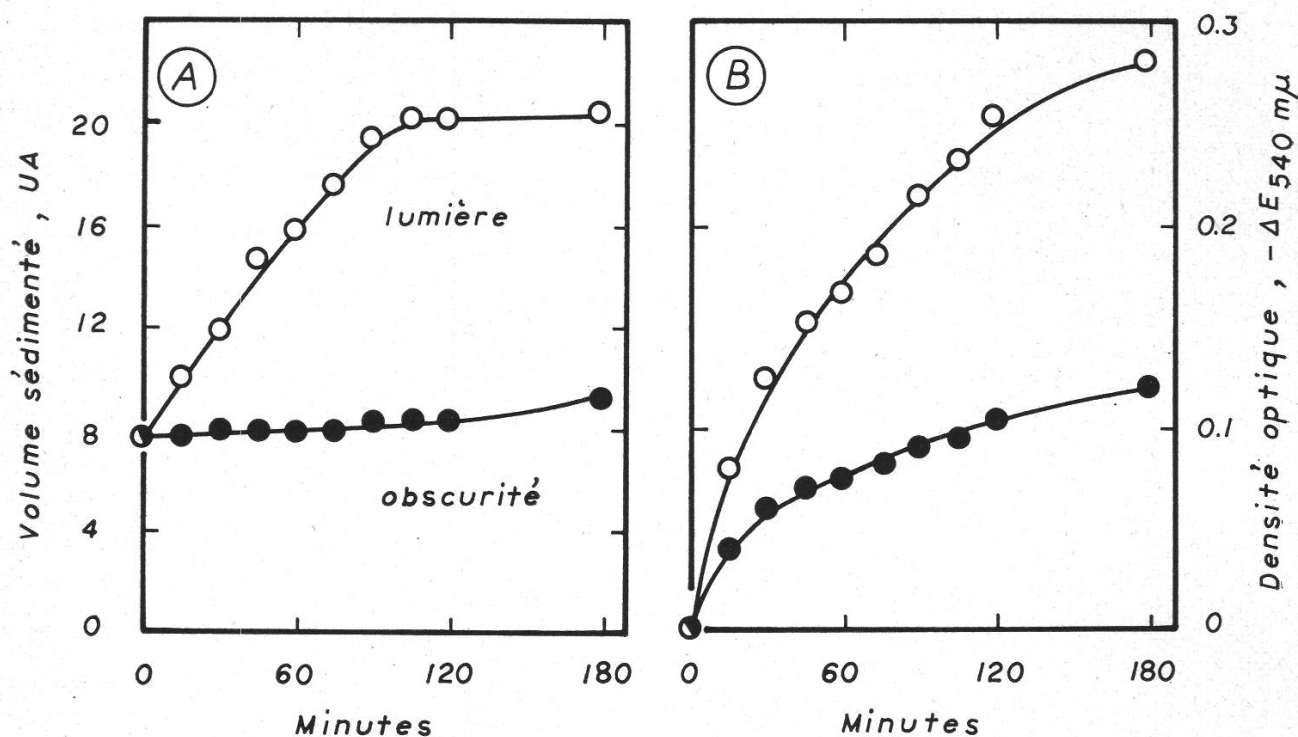


Figure 2

Conséquence d'un traitement lumineux sur le volume de chloroplastes isolés. Comparaison des méthodes «chlorocrite» et spectrophotométrique

A. Volume de chloroplastes sédimentés en fonction du temps d'incubation. Le mélange réactionnel contient 175 mM de NaCl, 100 mM de tampon Tris-HCl (pH 8) et des chloroplastes (1 mg de chlorophylle par millilitre)

B. Variations de densité optique ($-\Delta E_{540 m\mu}$) en fonction du temps d'irradiation. Le mélange réactionnel est le même qu'en A à l'exception de la concentration en chlorophylle qui est de 30 $\mu\text{g/ml}$. Au temps 0, la densité optique est de 0,760

Influence de la lumière

Les conséquences d'une irradiation lumineuse sur le volume des chloroplastes ont été étudiées avec d'autres méthodes (Packer et Siegenthaler, 1966) et l'on sait que, *in vitro*, la lumière accélère le gonflement des chloroplastes qui se produit normalement à l'obscurité (Packer et al., 1965). Dans les expériences décrites à la figure 2, nous comparons les variations de volume de chloroplastes irradiés obtenues à l'aide des méthodes «chlorocrite» et spectrophotométrique. A cet effet, une suspension de

chloroplastes est placée à l'obscurité et à la lumière dans des tubes à essai contenant un milieu salin tamponné. Ces tubes sont maintenus à une température constante (20 °C) dans un bain d'eau thermostaté et sont éclairés par une ampoule Philips Comptalux de 150 W de façon à obtenir une intensité lumineuse de $3,45 \times 10^5$ ergs/cm² · sec (essais de sédimentation) et de $1,66 \times 10^5$ ergs/cm² · sec (essais spectrophotométriques). A intervalles réguliers de 15 minutes, on prélève dans les tubes à essais les échantillons de suspension de chloroplastes destinés aux essais chlorocrites, tandis que pour les expériences spectrophotométriques on mesure directement la densité optique (à 540 mμ) de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre Bausch et Lomb.

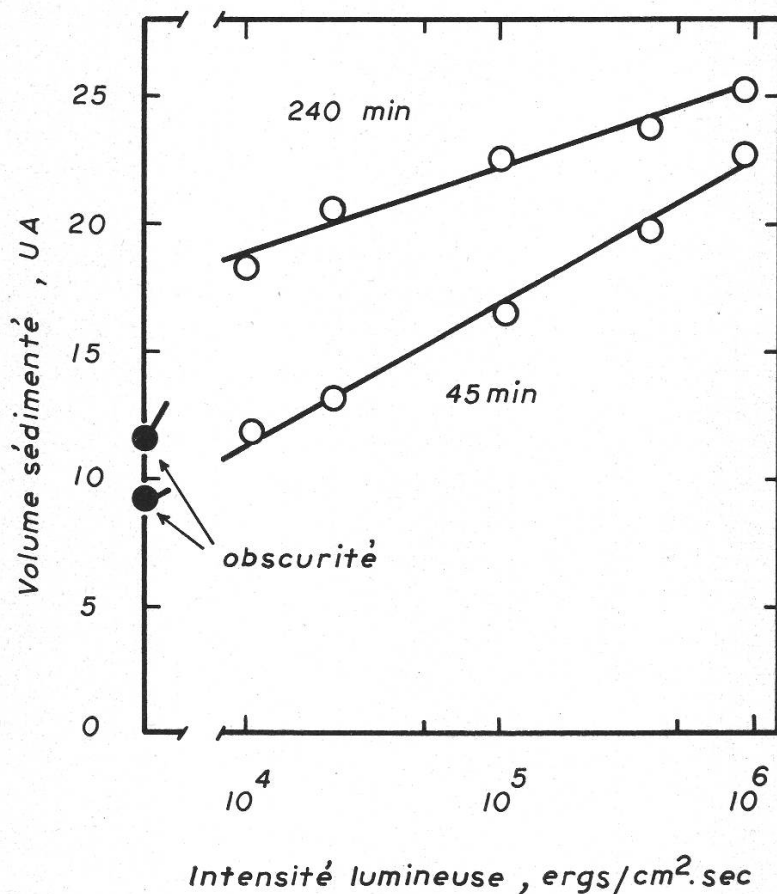


Figure 3

Influence de l'intensité lumineuse sur le volume de chloroplastes mesuré par la méthode chlorocrite. Le mélange réactionnel est le même que pour la figure 2 A. Pendant l'incubation, la température est maintenue constante à 20 °C

La comparaison des figures 2A et 2B montre que l'allure générale des courbes obtenues avec les deux méthodes est la même. Le volume des chloroplastes augmente lentement à l'obscurité et s'accroît beaucoup plus rapidement à la lumière. On peut cependant noter qu'à l'obscurité l'augmentation du volume des chloroplastes avec la méthode spectrophotométrique (fig. 2B) est plus prononcée qu'avec la méthode «chlorocrite». Cette différence provient du fait que des agrégats de chloroplastes

se forment après 60 minutes d'incubation à la lumière et modifient dans le sens d'un gonflement les lectures spectrophotométriques.

Apparemment, ce phénomène n'a pas d'influence sur les mesures de volume des chloroplastes sédimentés.

Une étude de l'influence de l'intensité lumineuse sur le volume des chloroplastes est présentée dans la figure 3. Après 45 minutes d'incubation, le volume des chloroplastes mesuré par la méthode chlorocrite est une fonction linéaire du logarithme de l'intensité lumineuse. Lorsque le temps d'incubation est prolongé jusqu'à 240 minutes, la droite traduisant la relation volume/intensité lumineuse présente une pente moins prononcée.

Discussion

La méthode hématocrite, généralement utilisée pour la mesure du volume des globules sanguins, a été appliquée avec succès pour la détermination du volume de chloroplastes isolés.

Le volume moyen d'un seul chloroplaste calculé à partir des données de sédimentation et de comptage est de $88 \mu^3$ dans une solution de 175 mM de NaCl et de 100 mM Tris-HCl (tableau 1). Utilisant la méthode du compteur de Coulter, Itoh et al. (1963) ont estimé que le volume d'un chloroplaste fraîchement isolé est de $23 \mu^3$ tandis que Nishida et al. (1966) et Siegenthaler (1966) rapportent des valeurs plus élevées, respectivement $50 \mu^3$ et $98 \mu^3$. Ces différences proviennent dans une large mesure de la concentration des sels utilisés pour la mise en suspension des chloroplastes (v. par exemple tableau 2). L'existence d'un espace libre entre les chloroplastes sédimentés ayant pour conséquence une augmentation du volume calculé n'est cependant pas à écarter. Tolberg et Macey l'estiment à 35–50% du volume sédimenté, mais leur calcul est discutable puisqu'ils ne mesurent pas simultanément le volume des chloroplastes d'une même suspension avec les deux techniques.

Pour un temps de centrifugation soigneusement déterminé (fig. 1 A), le volume des chloroplastes sédimentés est proportionnel à la concentration de chlorophylle des chloroplastes introduits dans le tube capillaire (fig. 1 B). Des facteurs extérieurs comme la tonicité du milieu de suspension et un éclairage à diverses intensités lumineuses modifient le volume des chloroplastes conformément aux résultats obtenus avec d'autres méthodes. En effet, le volume des chloroplastes sédimentés et la concentration de NaCl dans le milieu de suspension satisfont à la relation de Boyle Van't Hoff.

A partir des données du tableau 2 (incubation: 5 minutes), les volumes sédimentés V reportés sur un graphique en fonction de l'inverse des concentrations en NaCl $1/C$ se placent sur une droite en accord avec l'expression susmentionnée. Ces résultats corroborent ceux de Nishida (1963), Packer et al. (1965) et Nobel (1965) obtenus avec d'autres techniques. Le comportement des chloroplastes vis-à-vis d'un traitement lumineux est le même pour les méthodes chlorocrites et spectrophotométriques (fig. 2) de même que pour la technique du compteur de Coulter (Packer et Siegenthaler, 1966). Le gonflement des chloroplastes observés à la lumière est une fonction logarithmique de l'intensité lumineuse (fig. 3).

En conclusion, la méthode chlorocrite que nous avons décrite dans ce travail présente plusieurs avantages. Elle est simple, rapide, peu coûteuse et permet d'obtenir

des résultats reproductibles comparables en tous points à ceux que l'on obtient avec un équipement plus perfectionné.

Ce travail a pu être réalisé grâce à l'appui du Fonds national suisse de la Recherche scientifique (contrat N° 4227) et à l'excellente collaboration technique de M^{lle} Tjoe Tan.

Summary

The hematocrit method applied for measuring volume changes of isolated spinach chloroplasts

The hematocrit technique has been applied with success for measuring osmotic and light-induced volume changes of isolated spinach chloroplasts. From packed volume data the mean volume of a single chloroplast was found to be $88 \mu^3$. The chlorocrite technique is simple, rapid, cheap and gives reproducible results which can be compared with those obtained with the Coulter counter, spectrophotometric and gravimetric measurements.

Zusammenfassung

Die Hämatokritmethode lässt sich zur Messung osmotischer und lichtinduzierter Volumenänderungen isolierter Spinatchloroplasten verwenden. Die Technik ist einfach und rasch und liefert reproduzierbare und mit anderen Methoden (Coulter-Zähler, Spektrophotometrie, Gravimetrie) übereinstimmende Ergebnisse.

Bibliographie

- Itoh M., S.Izawa et K.Shibata. 1963. Shrinkage of whole chloroplasts upon illumination. *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 319-327.
- Nishida K. 1963. Osmotic swelling of isolated chloroplasts. *Plant and Cell Physiol.* **4**, 247-256.
- N.Tamai et K.Ryoyama. 1966. Light-induced high-amplitude swelling and shrinking in isolated spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiol.* **7**, 415-428.
- Nobel P.S. 1965. Light-induced size changes, charge, and ion translocation of spinach chloroplasts *in vitro*. Doctoral Thesis, University of California, Berkeley.
- Packer L. et P.A.Siegenthaler. 1966. Control of chloroplast Structure by light. *Int. Rev. Cytol.* **20**, 97-124.
- P.A.Siegenthaler et P.S.Nobel. 1965. Light-induced volume changes in spinach chloroplasts. *J. Cell. Biol.* **26**, 593-599.
- Siegenthaler P.A. 1966. Phenylmercuric acetate and phosphate control of light-dependent shrinkage and reactions in chloroplasts. *Physiol. plantarum* **19**, 437-447.
- et L.Packer. 1965. Light-dependent volume changes and reactions in chloroplasts. I. Action of alkenylsuccinic acids and phenylmercuric acetate and possible relation to mechanism of stomatal control. *Plant Physiol.* **40**, 785-791.
- Tolberg A.B. et R.I.Macey. 1965. Osmotic behavior of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 424-430.
- Whatley F.R. et D.I.Arnon. 1963. Photosynthetic phosphorylation in plants. In *methods in enzymology*. Ed. by S.P.Colowick and N.O.Kaplan. Academic Press, New York and London. Vol. 6, p. 309-311.