

50. Recherches sur les chromatophores II.

Isolement et propriétés des chromatophores ultramicroscopiques de carottes et de feuilles d'épinards

par Werner Straus.

(23. II. 42.)

Dans le premier mémoire sur les chromatophores¹⁾, nous avons indiqué une méthode d'isolement et de purification des chromatophores de carottes et de feuilles d'épinards. Nous avons montré que les constituants colorés des extraits aqueux se laissent flocculer par acidification à un p_H voisin de 4,5. Le précipité peut être lavé à l'eau distillée et redissous dans une solution diluée d'ammoniaque. La méthode de purification repose sur ces faits: floculation répétée, suivie de lavage à l'eau et centrifugation de la solution ammoniacale. On peut alors admettre que la plus grande partie des substances incolores a été éliminée. En effet, l'examen microscopique des produits purifiés ne révélait plus que des particules colorées; les teneurs en protides et en lipides restaient approximativement constantes à partir de la deuxième reprecipitation.

Cette constance d'analyses était cependant plus prononcée dans le cas des chromatophores de feuilles d'épinards que dans celui des carottes. En effet, les valeurs trouvées pour les sédiments des feuilles d'épinards étaient, aux erreurs d'expériences près, de 12 % pour l'azote et de 24 % pour les lipides, alors que celles des carottes ont varié de 8,9 %—10,2 % pour l'azote et de 34 %—37 % pour les lipides. Comme les sédiments des carottes, contrairement à ceux des feuilles d'épinards, étaient constitués par des formes très diverses, nous avons pensé¹⁾ que les différences d'analyses étaient dues à cette diversité morphologique. L'examen microscopique des chromatophores verts ne révélait que des petits grains alors que les sédiments rouges contenaient, à côté de petits grains, des particules plus grandes et de formes variées.

Dans le présent travail, nous avons essayé de fractionner le mélange de chromatophores en vue de séparer les différentes formes morphologiques. Au cours de ce travail nous avons trouvé qu'on peut isoler une série de grains colorés de plus en plus petits à partir des sédiments purifiés de chromatophores, aussi bien dans le cas des carottes que dans celui des feuilles d'épinards. Ces fractions ont des propriétés différentes les unes des autres; cependant ces diffé-

¹⁾ Helv. **25**, 179 (1942).

rences ne correspondent pas à des variations irrégulières. S'il en était ainsi, on aurait dû conclure à des propriétés fortuites et la continuation des recherches n'aurait plus présenté beaucoup d'intérêt. Les propriétés comme p. e. l'acidité, les teneurs en protides, lipides et pigments varient, au contraire, d'une façon définie avec la grandeur des particules. Ces résultats semblent indiquer l'existence d'une loi générale, commune à toutes les formes de chromatophores que nous avons étudiées.

Avant d'entrer dans le détail de l'isolement et des propriétés des particules de grandeur différente, nous voudrions noter les ressemblances frappantes qui existent entre les particules rouges des carottes et les inclusions trouvées dans les cellules atteintes d'une virose. Signalons dans ce but quelques impressions qu'on acquiert en observant fréquemment les corpuscules rouges des carottes.

Comme nous l'avons déjà indiqué¹⁾, les chromatophores des carottes se présentent sous la forme de grains, de bâtonnets droits et incurvés et de petits cristaux. Ces cristaux se comportent au cours de la purification comme les autres formes. Leur point isoélectrique et leur solubilité dans l'ammoniaque les rapprochent donc des autres formes. Leur mobilité ressemble à celle des bâtonnets. L'intensité de coloration des cristaux n'apparaît pas plus grande que celle des bâtonnets. Par conséquent on doit conclure qu'il ne s'agit pas de cristaux de carotène mais de cristaux de chromatophores²⁾. On trouve souvent dans les sédiments des carottes des rubans droits ou incurvés ou même en forme de spirales. Ces formes de longueur et de largeur diverses sont dignes d'intérêt en tant que formes intermédiaires entre les bâtonnets et les cristaux.

La grandeur des bâtonnets, rubans et cristaux varie entre 1μ et 20μ . En les regardant fréquemment, on acquiert l'impression que les petites formes sont des fragments des grandes. On peut aussi observer des formes partiellement fendues.

En ce qui concerne la comparaison avec les virus, les bâtonnets rouges des carottes ressemblent aux particules X des cellules virosées. Ces particules se multiplient comme les chromatophores par division. Les particules X sont fréquemment accompagnées de particules cristallisées et quelquefois de grains³⁾. On ne sait pas si ces particules incluses dans les cellules atteintes de virose sont à considérer comme des produits du métabolisme pathologique des cellules ou comme des agglomérats des virus eux-mêmes. Les observations sont plutôt en faveur de cette dernière possibilité³⁾.

¹⁾ Helv. **25**, 179 (1942).

²⁾ Un dessin de ces cristaux se trouve p. e. dans: *Strassburger, Lehrbuch der Botanik* (1936), p. 14.

³⁾ Toutes les indications sur les virus ont été puisées dans: *Methoden der Virusforschung, bearbeitet von H. da Rocha-Lima, J. Reiss, K. Silberschmidt, Handbuch d. biol. Arb. Meth. Abt. XII, Teil 2, II* (1939).

Le présent travail indiquera d'autres ressemblances entre les virus et les chromatophores. Un caractère des virus est leur dimension ultramicroscopique. Comme nous l'avons déjà dit, on peut séparer à partir du mélange de chromatophores des carottes, aussi bien que de celui des feuilles d'épinards, une série de corpuscules de plus en plus petits. Le diamètre de la plus grande partie de ces particules colorées est inférieur au pouvoir séparateur d'un microscope muni d'un objectif à immersion. Les grandes formes de chromatophores représentent des complexes protides — lipides. A mesure que les particules deviennent plus petites, leur fraction lipidique baisse. Ainsi les plus petites particules des chromatophores se composent — comme les virus — principalement de protéides.

Pour éviter des malentendus, précisons dans quel sens nous employons le terme de chromatophore. Pour le botaniste, le chromatophore est un organe de la cellule végétale de forme définie. Lorsque nous nous servons de cette expression, nous ne nous occupons pas de cette structure familière au botaniste. Pour nous, le terme de chromatophore est synonyme de porteur de pigment et nous appelons chromatophores les particules isolées, colorées, qui ont les propriétés que nous décrivons.

Séparation des chromatophores de différentes grandeurs.

Le fait que les chromatophores peuvent être floculés par les acides dilués et qu'ils sont solubles dans les alcalis dilués, indique leur caractère acide. Nous avons trouvé que l'acidité n'est pas la même pour tous les chromatophores. *Elle augmente régulièrement lorsque la grandeur des particules diminue.* Les particules d'une grandeur donnée possèdent une acidité bien définie et floculent à un p_H bien établi, c'est-à-dire à leur point isoélectrique.

Prenons une solution de sédiment purifié, contenant des chromatophores de grandeurs différentes. Acidifions jusqu'au début de la floculation et centrifugeons. Le sédiment contient les grandes particules mais on y en trouve aussi de petites qui ont été entraînées. Le liquide surnageant ne contient pratiquement que de petites particules. En répétant plusieurs fois cette floculation partielle sur le sédiment redissous on obtient des fractions qui renferment des particules de différente grandeur.

Voici comment nous avons procédé: L'extrait aqueux centrifugé a été additionné d'acide acétique dilué jusqu'à ce que la totalité des chromatophores ait floculé. (Bleuissement très faible du papier au Congo.) Le mélange de chromatophores obtenu après centrifugation est purifié selon le procédé antérieurement décrit¹⁾.

Le produit ainsi purifié est dissous p. e. dans 500 cm³ de solution ammoniacale à 0,05 %. On y ajoute goutte à goutte de l'acide acétique

¹⁾ Helv. 25, 179 (1942).

à 20 % jusqu'à ce que la floculation commence. (Ce moment coïncide, dans le cas des particules rouges, avec un affaiblissement de la formation des volutes lorsqu'on agite le liquide; pour les particules vertes, ce moment est reconnu par un virage du vert foncé au vert plus clair.) On centrifuge une demi-heure à 3000 tours/minute et on décante la solution surnageante. Le sédiment est redissous dans l'eau ammoniacale et la séparation des liquides qui surnagent après floculation partielle est répétée plusieurs fois. Les liquides surnageants réunis sont acidifiés avec de l'acide dilué jusqu'à floculation de la totalité des chromatophores qui s'y trouvent. On centrifuge et on lave à la centrifuge avec de l'eau distillée.

Ainsi, le mélange initial de chromatophores a été séparé en deux fractions. Le sédiment restant à la fin après ces séparations répétées de liquides surnageants contient les plus grandes particules, tandis que le sédiment obtenu à partir des liquides surnageants contient les petites particules. Ce dernier sédiment est redissous dans l'eau ammoniacale à 0,05 %. En appliquant à cette solution le même procédé on obtient de nouveau deux fractions qui se distinguent par la grandeur des particules qu'elles contiennent. En continuant ces opérations on obtient des fractions qui renferment des particules de plus en plus petites et qui sont de moins en moins colorées. (Nous verrons par la suite que la concentration en pigments diminue au fur et à mesure que la grandeur des particules baisse.)

Les fractions ainsi obtenues, contenant des particules de plus en plus petites, sont purifiées par une floculation fractionnée plus poussée: Chacune des fractions est dissoute dans un petit volume d'eau ammoniacale et additionnée d'acide acétique jusqu'au p_H de 7. Ensuite on y ajoute goutte à goutte p. e. de l'acide acétique à 3 %. Après chaque addition de deux gouttes on sépare par centrifugation le précipité éventuellement formé. Ces précipités, qui sont jetés, contiennent des particules plus grandes que la fraction principale. Celle-ci flocule après addition d'un certain nombre de gouttes. Le liquide séparé de la fraction principale, qui contient des particules plus petites que le sédiment, est jeté. Après redissolution du sédiment on répète la purification p. e. avec de l'acide acétique à 1 % et on élimine ainsi encore une partie des particules plus grandes et plus petites que celles de la fraction principale.

Une fraction est considérée comme pure lorsqu'elle flocule entièrement, à une goutte près, de l'acide acétique très dilué.

Le procédé de fractionnement est toujours suivi d'examen microscopiques.

Les chromatophores ultramicroscopiques des carottes.

Au moyen du procédé de séparation décrit, nous avons isolé six fractions contenant des particules de plus en plus petites. Ces frac-

tions sont appelées A, B, C, D, E et F. Elles ne contiennent que des chromatophores en forme de grains de grandeurs différentes. Les grands chromatophores — bâtonnets, rubans et cristaux — qui sont restés dans le résidu ne sont pas considérés dans ce travail.

Examen microscopique:

L'examen microscopique de ces grains, qui appartiennent pour la plus grande partie au domaine ultramicroscopique, est rendu possible par le fait qu'ils apparaissent comme de tout petits points clairs et sombres lorsqu'on déplace l'objectif du microscope. Nous sommes apparemment en présence d'un cas semblable à celui des solutions colloïdales d'or où l'indice de réfraction des particules est très différent de celui du milieu. C'est pour cette raison que des particules d'or d'un rayon de $5\text{ m}\mu$ sont encore visibles au microscope¹⁾.

C'est à l'état floclé que les chromatophores les plus petits sont le mieux observables. En solution, ils ne sont presque plus visibles.

La fraction A est la moins homogène du point de vue morphologique. Elle ne contient plus de bâtonnets mais les grains sont de grandeur différente. Au moyen de l'oculaire micrométrique nous avons mesuré des diamètres de $3\ \mu$, $1,5\ \mu$, $0,7\ \mu$ et $0,3\ \mu$. Les diamètres des particules ne changent pas d'une façon continue; au contraire, ce sont toujours les mêmes diamètres qui se répètent. Chaque type de corpuscule paraît avoir la moitié de la dimension du type précédent. Ce résultat doit encore être vérifié par des observations ultérieures.

Les fractions B, C et D sont morphologiquement plus homogènes. *Chaque fraction se compose de grains sensiblement plus petits que ceux de la fraction précédente.* La plupart des grains de chaque fraction est de la même grandeur. Des rares particules plus grandes sautent immédiatement aux yeux. La quantité des particules de grandeur inférieure à la moyenne est difficilement appréciable.

Dans les fractions E et F on ne peut reconnaître que de tout petits points.

Dans ce travail nous n'avons pas l'intention de pousser plus loin la séparation des particules; nous aurions dû employer beaucoup plus de carottes que nous ne l'avons fait. Notre premier but étant de démontrer le rapport des propriétés des chromatophores avec leur grandeur, la séparation réalisée était amplement suffisante.

Propriétés des solutions:

Les solutions ammoniacales de chaque fraction montrent des propriétés parfaitement distinctes. L'aspect des solutions déjà permet d'apprécier l'ordre de grandeur des particules qui s'y trouvent.

Ainsi les solutions contenant des particules de plus en plus petites sont de moins en moins troubles. Les solutions de grands chromatophores (bâtonnets, rubans et cristaux) sont assez troubles. Les solu-

¹⁾ H. Freundlich, Grundzüge der Kolloidlehre (1924), p. 98.

tions des fractions A—F, par contre, sont beaucoup plus limpides; la fraction A est moins claire que B, B moins que C, etc.

Les solutions des fractions A—F montrent un effet *Tyndall* d'intensité différente. Cet effet augmente de A—D, pour diminuer ensuite de E—F. La fraction F, presque complètement claire, montre un effet *Tyndall* très faible.

La formation des volutes qui est en rapport avec la biréfringence dynamique est très prononcée pour les solutions contenant les grands chromatophores (bâtonnets, rubans et cristaux). Tant que la solution est en mouvement, elle présente des effets d'anisotropie optique (volutes brillantes). Ce phénomène diminue de plus en plus lorsque la grandeur des chromatophores baisse. Il est faible pour les fractions A et B, très faible pour C, et imperceptible pour D—F.

La propriété la plus intéressante, qui dépend de la grandeur des particules, a trait à la couleur et à l'état du pigment. En effet, les teintes des solutions sont différentes pour les diverses fractions. Commencant par le rouge-orangé, les solutions prennent, au fur et à mesure que la grandeur des particules diminue, des couleurs brun-rouge, brun, jaune-brun et enfin jaune. Les solutions des fractions A—F ne montrent plus que des teintes allant du brun au jaune.

Les changements de grandeur des chromatophores vont apparemment de pair avec des changements dans le degré de dispersion du carotène. Ici, nous constatons des phénomènes optiques semblables à ceux antérieurement décrits pour des solutions colloïdales de carotène de différent degré de dispersion ¹⁾²⁾). Ces propriétés optiques du carotène à l'état naturel ont une importance particulière. Nous pensons aux réactions qui se produisent sous l'influence de la lumière au niveau de la rétine. C'est un problème sur lequel nous reviendrons plus tard.

Teneur en protides:

Le taux en azote des fractions A—F a été déterminé d'après *Kjeldahl*. (A partir de 3 kg. de bouillie de carottes nous avons obtenu 250 mgr. de chromatophores en forme de grains, constituant les fractions A—F. L'analyse a été faite sur les fractions D, E et F réunies, la quantité obtenue n'ayant été en tout que de 25 mgr.)

	N	protides (N × 6,25)
fraction A	10,8%	67,5%
fraction B	11,5%	71,9%
fraction C.	12,8%	80,0%
fractions D + E + F .	14,2%	87,7%

¹⁾ P. Karrer, W. Straus, Helv. 21, 1624 (1938).

²⁾ W. Straus, „Über kolloidales Carotin und den natürlichen Zustand der Carotinoide“, Diss. Zürich 1939.

Rappelons que la teneur en protides du mélange de la totalité des chromatophores (grandes particules incluses) est environ de 60 %¹⁾.

Ces analyses prouvent que *la teneur en protides augmente lorsque la grandeur des particules diminue.*

Teneur en lipides:

Etant donné que le pourcentage en lipides des sédiments purifiés complète à peu près à 100 % le pourcentage des protides, il s'ensuit que l'augmentation de la teneur en protides correspondant à la diminution des corpuscules se fait aux dépens de la teneur en lipides. A titre de contrôle, nous avons déterminé les lipides de la fraction C et nous avons trouvé 17,4 %.

Teneur en carotène:

L'aspect des solutions et des produits secs à analyser montrent clairement que plus les particules sont petites, plus leur taux en carotène est faible. A côté du changement dans le degré de dispersion, la concentration du pigment varie dans un sens défini.

Le carotène de la fraction C (la plus abondante que nous ayons obtenue: 90 mgr.) a été déterminé au moyen du photomètre de *Pulfrich*. Le résultat a été de 0,10 %. A titre de comparaison, mentionnons que la teneur en carotène du mélange de la totalité des chromatophores se chiffre à environ 2 %.

Les chromatophores ultramicroscopiques des feuilles d'épinards.

L'isolement des chromatophores de différentes grandeurs donne un rendement plus grand pour les feuilles d'épinards que pour les carottes. Pour les épinards il n'y a pas de grandes formes, seulement les grains; les pertes sont par conséquent plus faibles.

En appliquant la méthode de séparation décrite, nous avons obtenu cinq fractions, A—E, pesant ensemble 490 mgr., préparées à partir de 0,75 kg. de feuilles d'épinards. Chacune des fractions A—E contient des grains verts plus petits que celle qui la précède.

Le dosage de l'azote d'après *Kjeldahl* a fourni les valeurs suivantes:

	N	N × 6,25
fraction A	11,6%	72,5%
fraction B	12,0%	75,0%
fraction C.	13,0%	81,2%
fraction D	13,9%	86,9%
fraction E	14,5%	90,6%

¹⁾ Helv. 25, 179 (1942).

Les teneurs en protides sont donc à peu près les mêmes que celles trouvées pour les chromatophores des carottes. Cette ressemblance se manifeste également pour d'autres propriétés, p. e. le degré de turbidité et la biréfringence dynamique des solutions. Les produits secs des fractions contenant les grains les plus petits sont d'un vert plus clair que ceux des fractions précédentes. Il est probable qu'il y ait là le même rapport que pour les carottes entre le taux des pigments et la grandeur des particules. Des dosages colorimétriques en fourniront la preuve.

DISCUSSION.

A première vue on est tenté d'expliquer de la manière suivante les phénomènes décrits: Les jus de plantes contiennent les substances les plus diverses. Le traitement entrepris conduit à isoler les mêmes groupes de substances. Des doses croissantes d'acide entraînent nécessairement des précipités de plus en plus riches en protides et de plus en plus pauvres en d'autres substances (p. e. lipides et carotène).

Une telle explication ne permettrait cependant pas de comprendre toute une série d'observations. Le procédé de purification qui précède la séparation en différentes fractions fournit des corpuscules doués de propriétés bien définies: floculation entre p_H 4 et 5, solubilité dans l'eau ammoniacale, insolubilité dans l'eau et dans les solutions de sels neutres, dénaturation (perte de solubilité) par dessiccation. Les substances possédant ces propriétés ont été divisées en fractions au moyen de très faibles variations du p_H . Les propriétés chimiques (teneur en protides, lipides et pigments) de ces fractions se modifient dans un sens défini et corrélatif à la grandeur des particules. Si la composition des fractions résultait du hasard, le rapport observé entre les propriétés morphologiques et chimiques serait incompréhensible.

Les propriétés caractéristiques (acidité, grandeur des particules, teneur en lipides et en protides) sont à peu près les mêmes pour les grains colorés des carottes et pour ceux des feuilles d'épinards. C'est dans cette concordance entre deux plantes différentes que nous voyons l'argument le plus décisif en faveur d'une loi générale.

Pour se rendre compte s'il existe une loi générale ou si les phénomènes décrits ne sont que l'effet d'un hasard, on emploiera le procédé suivant: Sur la base d'analyses de carotène on peut calculer, pour chaque fraction, combien de grammes de substance organique correspondent à une molécule de carotène. On obtiendra ainsi le poids moléculaire des chromatophores. Si la composition des sédiments obéit à une loi générale, les grains d'une certaine grandeur devront avoir une teneur constante en carotène, c'est-à-dire le même poids moléculaire. En ce cas on peut s'attendre à ce que les valeurs trouvées soient des multiples de la même unité.

Pour cette expérience la séparation des particules doit être poussée aussi loin que possible.

RÉSUMÉ.

1. La dimension des chromatophores des carottes et des feuilles d'épinards varie entre des limites très étendues qui vont du domaine du microscope à celui de l'ultramicroscope.
2. Les changements de grandeur des chromatophores s'accompagnent de changements dans les propriétés physiques de leurs solutions: le degré de dispersion et la couleur des pigments, le degré de turbidité, l'effet *Tyndall*, la biréfringence dynamique.
3. Les chromatophores des chloroplastes des feuilles d'épinards et les chromatophores des carottes, de même grandeur, ont des propriétés semblables au point de vue chimique et morphologique. Ils ont en particulier la même teneur en protides et en lipides.
4. Les grands chromatophores contiennent à côté des protides un taux élevé en lipides. La diminution de grandeur des particules va de pair avec l'augmentation de la teneur en protides aux dépens du taux des lipides.
5. Lorsque la grandeur des particules augmente, l'accroissement de la teneur en lipides des chromatophores des carottes va de pair avec une augmentation en carotène.
6. Le caractère acide des chromatophores augmente lorsque la grandeur des particules diminue. Une méthode de séparation des chromatophores de différentes grandeurs, basée sur cette propriété, est décrite.
7. L'interdépendance des propriétés et de la grandeur des particules semble indiquer une loi générale qui régirait la composition chimique des chromatophores. Dès ce moment il est possible d'entreprendre des recherches analytiques plus poussées en vue de déterminer ce rapport.

Genève, Institut de Botanique de l'Université,
Laboratoire de Chimie et de Microbiologie.