

LA DIFFERENCIATION PLASTIDALE CHEZ L'ACETABULAIRE ETUDIEE PAR L'EMISSION DE FLUORESCENCE A 77° K

E. DUJARDIN, S. BONOTTO, C. SIRONVAL et R. KIRCHMANN

Laboratoire de Photobiologie, Université de Liège et Département de Radiobiologie,
C.E.N.-S.C.K., Mol (Belgique)*

(Reçu le 28 mars 1975)

(Revision reçue et acceptée le 30 juin 1975)

SUMMARY

Plastidal differentiation in Acetabularia studied by fluorescence emission at 77° K

Examination of the 77° K fluorescence emission spectra provides a good criterion for distinguishing chloroplasts of the apical from those of the basal region of the stalk of *Acetabularia* cells at stage 4. Extraction increases the differences between the emission spectra of apical and basal chloroplasts. By using the 77 °K fluorescence emission spectra technique, it is possible to show the differentiation of the plastids and to follow it during the regeneration of anucleate and nucleate fragments.

INTRODUCTION

Les chloroplastes des algues Acétabulaires entières présentent un spectre d'émission de fluorescence à 77° K similaire dans les différentes régions du siphon axial: apex, centre et base. Cependant, lorsqu'on soumet les algues à une série de traitements "chaud-froid" [1], le spectre d'émission de fluorescence à 77° K change d'une manière qui dépend de la région et permet de la distinguer [1].

Dans le présent travail, nous faisons part de l'influence de l'extraction des chloroplastes sur l'émission de fluorescence. Nous montrons que la différenciation entre régions de l'algue persiste après l'extraction des chloroplastes, mais avec des modalités différentes de celles observées in situ. Nous montrons également que les caractères de l'émission de fluorescence à 77° K des chloroplastes se modifient au cours de la régénération, soit d'algues anucléées, soit de fragments nucléés basaux.

*Les tirés à part peuvent être demandés à l'adresse: Laboratoire de Photobiologie, Département de Botanique, Université du Sart-Tilman, B-4000 Liège (Belgique).

MATERIEL ET METHODES

(1) Culture des algues

Les algues *Acetabularia mediterranea* Lamouroux [2], sont cultivées selon la méthode décrite auparavant [3, 4], à $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$ et à 1800–2000 lux (Tubes Phytor, LF-40 W, ACEC), la lumière étant donnée pendant 12 h, entre 8 h du matin et 8 h du soir.

(2) Anucléation des algues

Les algues sont anucléées au stade 4 [5] en coupant la partie basale (5 mm) du siphon axial [6]. On obtient ainsi une algue anucléée capable de se différencier en l'absence du noyau, et un fragment nucléé basal qui régénère le plus souvent un nouveau siphon axial après quelques jours. Cependant, un nombre limité (environ 10 % dans nos conditions expérimentales) de fragments nucléés basaux ne régénère que plusieurs semaines après l'amputation du siphon.

(3) Extraction et traitement des chloroplastes

Plusieurs essais préliminaires ont montré qu'une purification des chloroplastes par centrifugation sur gradient discontinu de saccharose donne des organites ayant des spectres d'émission plus altérés que ceux de la figure 1B. Afin de mieux préserver les chloroplastes, nous homogénéisons rapidement les algues dans le tampon de Shephard et Levin [7], et nous récoltons les chloroplastes (contaminés par d'autres constituants cellulaires) sur un filtre Millipore muni d'un préfiltre qui retient les fragments des parois cellulaires. Cette opération ne dure que quelques minutes. Le filtre Millipore est ensuite fixé sur le type de portoir décrit par Sironval et al. [8] et le spectre d'émission de fluorescence dû aux chloroplastes est obtenu à l'aide d'un fluorimètre Zeiss [8, 9]. Les traitements chaud-froid sont effectués selon la procédure décrite précédemment [1], appliquée au filtre Millipore. Dans ces conditions, les chloroplastes restent sur le filtre, protégés par la fenêtre en cellophane du portoir.

RESULTATS

(1) Effet de l'extraction des chloroplastes suivie de transitions brusques de température (traitements chaud-froid) sur le spectre d'émission de fluorescence à $77^{\circ} K$

La Fig. 1 montre les spectres d'émission de fluorescence à $77^{\circ} K$ des chloroplastes situés dans les zones apicale (a) et basale (b) d'Acétabulaire in situ au stade 4 [5]. On obtient un spectre du même type pour les deux zones, comportant une large émission essentiellement répartie entre 685 et 730 nm. Lorsqu'on extrait les chloroplastes de l'apex (Fig. 1, c), et de la base (Fig. 1, d), le spectre se modifie, et les chloroplastes des deux zones paraissent alors nettement différents. L'extraction accroît la contribution de l'émission à 720 nm chez les chloroplastes apicaux, alors qu'elle souligne la contribution de l'émission

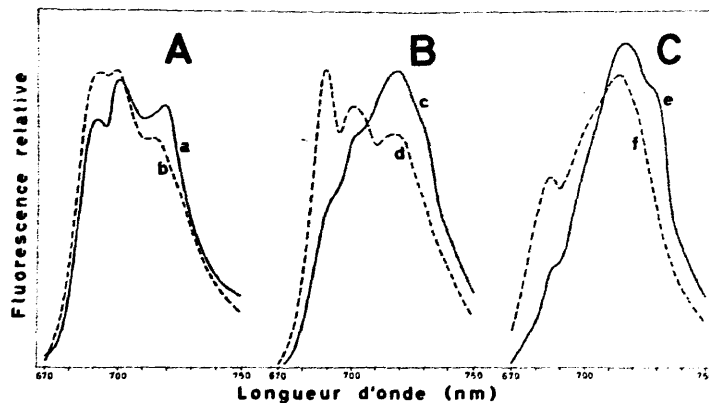


Fig. 1. A. Spectres d'émission à la température de l'azote liquide de la région apicale (a) et basale (b) de cellules d'Acétabulaires intactes (nucléées). B. Spectres d'émission de chloroplastes extraits de la partie apicale (c) et basale (d) de cellules intactes (nucléées). C. Spectres d'émission des mêmes chloroplastes (e, f) que en B, mais après 20 traitements chaud-froid. Afin de gagner de la place, on n'a pas représenté la ligne de base des spectres; seule la forme de l'émission est à considérer. Le traitement chaud-froid est effectué dans les conditions décrites dans MATERIEL ET METHODES et dans un travail précédent [1].

sion à 685-690 nm chez les chloroplastes basaux. Les deux types de plastes sont définis par les spectres c, d, e, f de la figure 1 comme suit:

(a) *Le type apical*: (1) les émissions à 700 et 720 nm dominent par rapport à l'émission à 685 nm (Fig. 1, c); (2) 20 traitements chaud-froid appliqués aux plastes après leur extraction accroissent encore la contribution de l'émission à 720 nm, de sorte que le rapport:

$$\frac{\text{Intensité* de l'émission à 685 nm}}{\text{Intensité* de l'émission à 720 nm}} = \frac{E_{685}}{E_{720}}$$

est compris entre 0.5 et 0.3 après les 20 traitements (Fig. 1, e).

(b) *Le type basal*: (1) l'émission à 685-690 nm domine par rapport aux émissions à 700 et 720 nm (Fig. 1, d); (2) 20 traitements chaud-froid, appliqués après l'extraction, accroissent la contribution de l'émission à 720 nm, mais le rapport E_{685}/E_{720} reste égal ou supérieur à 0.5 après les 20 traitements (Fig. 1, f).

(2) *Fluorescence à 77° K des chloroplastes extraits d'algues anucléées qui régénèrent*

Au moment de l'anucléation au stade 4 [5], et aussitôt après, les chloroplastes extraits de l'apex se distinguent de ceux provenant de la partie sub-basale par les caractères de leur émission de fluorescence définissant les types apicaux et basaux (Fig. 1, c et d). 6 jours plus tard, la fluorescence des chloroplastes provenant de la partie apicale (Fig. 2, a) et de la partie sub-basale

*Hauteurs relatives de l'émission à 685 et 720 nm.

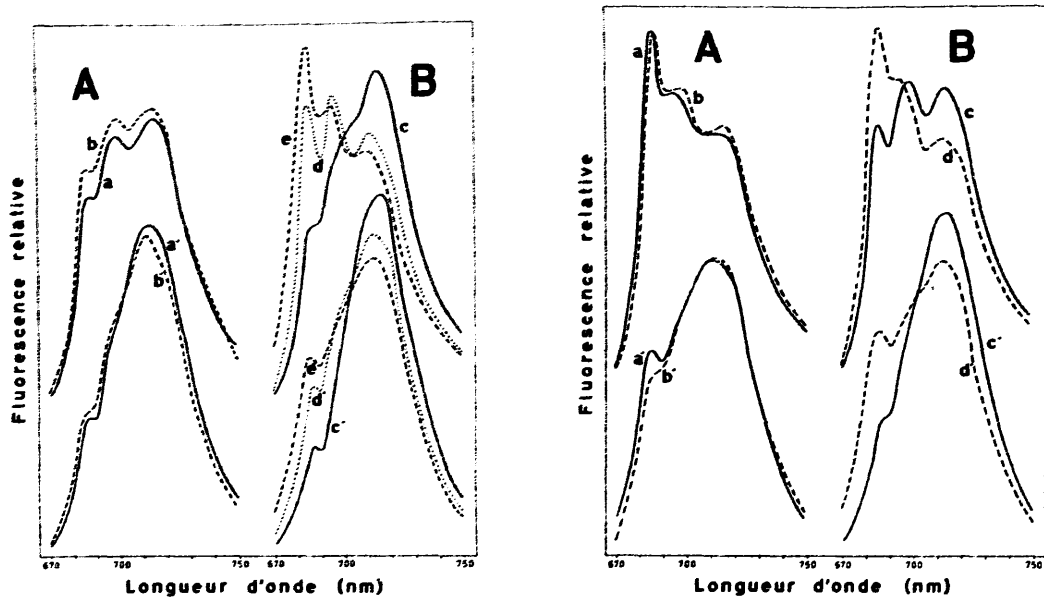


Fig. 2. A. En haut: spectres d'émission des chloroplastes extraits de la partie apicale (a) et sub-basale (b) d'algues anucléées depuis 6 jours. En bas: spectres d'émission des mêmes chloroplastes (a', b') après 20 traitements chaud-froid. **B.** En haut: spectres d'émission des chloroplastes extraits de la partie apicale (c), centrale (d) et sub-basale (e) d'algues anucléées depuis 27 jours. En bas: spectres d'émission des mêmes chloroplastes (c', d', e') après 20 traitements chaud-froid. Voir légende de la Fig. 1.

Fig. 3. A. En haut: spectres d'émission des chloroplastes de la partie apicale (a) et basale (b) de fragments nucléés basaux en régénération depuis 6 jours. En bas: spectres d'émission des mêmes chloroplastes (a', b') après 20 traitements chaud-froid. **B.** En haut: spectres d'émission des chloroplastes extraits de la partie apicale (c) et basale (d) de fragments nucléés basaux en régénération depuis 27 jours. En bas: spectres d'émission des mêmes chloroplastes (c', d') après 20 traitements chaud-froid. Voir légende de la Fig. 1.

(Fig. 2, b) est de type apical; à ce moment, les algues anucléées n'ont pas encore initié l'ébauche du chapeau. 10 jours plus tard, lorsque les algues anucléées ont formé un chapeau de 2 mm de diamètre (stade 7) [5], les chloroplastes provenant de l'apex émettent une fluorescence de type apical, mais ceux de la partie sub-basale ont réacquis une fluorescence de type basal. Cette situation s'accroît par la suite.

Les fragments anucléés depuis 27 jours, et qui croissent, ont formé un chapeau de 3 mm de diamètre. La fluorescence des chloroplastes extraits de l'apex est de type apical (Fig. 2, c); ceux extraits de la partie sub-basale montrent une fluorescence de type basal (Fig. 2, e). La croissance est alors suffisante pour observer les chloroplastes de la partie centrale; la fluorescence émise par les chloroplastes est intermédiaire entre les types apical et basal (Fig. 2, d).

Lorsqu'on applique une série de traitements chaud-froid aux chloroplastes extraits des cellules anucléées depuis 6 jours (Fig. 2, a' et b') ou depuis 27 jours

(Fig. 2, c', d' et e'), l'émission entre 695 et 730 nm s'accroît relativement à celle à 685 nm.

(3) Fluorescence à 77° K des chloroplastes extraits de fragments nucléés basaux

Au départ, la fluorescence de ces chloroplastes est de type basal. Après 6 jours, certains fragments ont régénéré un siphon axial de 4 mm; d'autres (environ 10 %) n'ont pas évolué. Les chloroplastes extraits de la partie apicale et basale des fragments qui régénèrent, présentent tous une fluorescence de type basal (Fig. 3, a et b). Il en va de même des chloroplastes des fragments qui n'ont pas régénéré. Après 27 jours, les fragments qui régénèrent ont un siphon axial de 17 mm. La fluorescence des chloroplastes extraits de l'apex du siphon axial tend vers le type apical (Fig. 3, c), tandis que celle des chloroplastes provenant de la base est caractéristique du type basal (Fig. 3, d). Même après 27 jours, les chloroplastes extraits des fragments nucléés qui ne régénèrent pas ont conservé le caractère basal (Fig. 4, a).

Après une série de traitements chaud-froid, on observe un accroissement de l'émission entre 695 et 730 nm par rapport à celle à 685 nm, pour les chloroplastes provenant des fragments basaux qui régénèrent (Fig. 3, a', b', c' et d') ou qui ne régénèrent pas (Fig. 4, a').

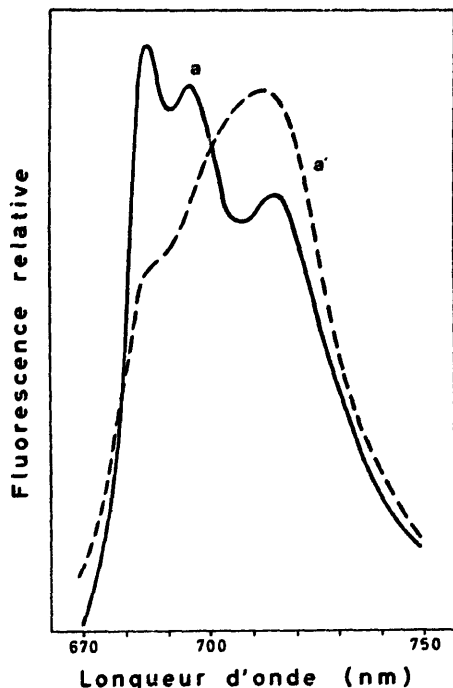


Fig. 4. Spectres d'émission des chloroplastes extraits des fragments nucléés basaux n'ayant pas régénéré, 27 jours après l'amputation du siphon axial. (a), spectre au départ; (a'), spectre après 20 traitements chaud-froid. Voir légende de la Fig. 1.

DISCUSSION

Les spectres a et b de la Fig. 1 correspondent à ceux en tireté publiés dans la réf. 1 (fig. 1) pour les régions apicale et basale de l'algue intacte au stade 4 [5]. On a amélioré, dans le présent travail, la résolution des spectres en réduisant la fente d'entrée du spectrophotomètre d'un facteur 3.

L'extraction des chloroplastes accentue la différence entre les émissions de fluorescence des plastes de la région apicale et de la région basale. On doit admettre que les chloroplastes apicaux sont effectivement différents des chloroplastes basaux, comme cela est suggéré par les observations ultramicroscopiques [10, 14]. En elle-même, la différence n'est pas due à l'environnement des chloroplastes dans la cellule puisqu'ils se distinguent après extraction; l'inhomogénéité leur est intrinsèque.

Les spectres d'émission à basse température peuvent être considérés comme reflétant l'état d'organisation des lamelles plastidiales de la population de chloroplastes étudiée. En l'absence de réactions photochimiques, à 77° K, les complexes protéine-pigments absorbant à grande longueur d'onde émettent l'énergie récoltée par les pigments absorbant à longueur d'onde plus faible, et qui leur est transférée. Le transfert suppose une certaine organisation lamellaire. La chlorophylle peut être considérée dans ces conditions comme un marqueur fluorescent de l'état de cette organisation.

L'administration des traitements chaud-froid provoque un accroissement relatif de l'émission à 710 nm, mais contrairement à ce qui a été observé antérieurement in situ [1], les chloroplastes extraits de la région apicale ne se comportent pas à cet égard différemment de ceux provenant de la région basale. On ne constate pas, par exemple, que, chez les chloroplastes de l'apex, les traitements chaud-froid, même répétés 20 fois, accroissent l'émission à 685 nm, comme c'est le cas in situ [1]. Ceci suggère que l'environnement des chloroplastes au sein de la cellule agit sur les modifications provoquées par les traitements chaud-froid. Il n'est d'ailleurs pas exclu que l'environnement agisse également lors de l'extraction.

L'application de la technique d'émission de fluorescence à 77° K, en vue de distinguer le caractère apical ou basal des chloroplastes, est illustrée par les expériences d'anuélation et de régénération. La Fig. 2 montre sans équivoque la présence de chloroplastes apicaux dans la région sub-basale d'algues anuélées depuis 6 jours et de chloroplastes basaux dans cette même région, 21 jours plus tard. La Fig. 3 prouve que la partie apicale des fragments nucléés basaux en régénération contient des chloroplastes basaux et apicaux respectivement 6 et 27 jours après le sectionnement du siphon axial.

L'évolution de la population plastidiale dans la région sub-basale des fragments anuélés est particulièrement intéressante et mérite certainement d'être étudiée plus en détail. Il est surprenant, en effet, de constater que 6 jours après l'anuélation les chloroplastes de cette région sont apicaux. On s'attendrait plutôt à ce qu'ils restent basaux. En l'absence du noyau, tout se passe donc comme si le gradient apico-basal de l'émission de fluorescence disparaît.

sait temporairement pour réapparaître plus tard. Ce que l'on observe pour la partie apicale des fragments nucléés basaux en régénération depuis 6 jours est également surprenant: les chloroplastes sont nettement de type basal, alors qu'on s'attendrait à ce qu'ils tendent vers le type apical. On sait, en effet, que déjà 3 jours après le sectionnement du siphon axial, la population plastidale de la nouvelle zone apicale des fragments nucléés basaux subit des transformations morphologiques importantes [14]. Certains chloroplastes de cette zone sont, par exemple, constitués d'une partie nettement basale et d'une partie "sous-apicale" [14].

Comment expliquer cette discordance entre les données de l'émission de fluorescence et celles de la microscopie électronique? Elle pourrait être plus apparente que réelle. Il se pourrait, par exemple, que les chloroplastes de la partie apicale des fragments nucléés basaux en régénération maintiennent, pendant au moins 6 jours, des lamelles ayant une organisation structurale de type basale, malgré que leur aspect général au microscope électronique ait subi des changements.

Nos résultats incitent à penser que les facteurs qui régissent la différenciation des chloroplastes en l'absence du noyau devraient avoir une vie relativement longue (10 à 20 jours) dans l'hypothèse où ils seraient soumis au contrôle nucléaire [10].

De toute manière, on doit se poser la question de la nature de l'organite auquel le mécanisme même de la différenciation s'applique. Les chloroplastes d'un type dérivent-ils de ceux d'un autre type? Ou dérivent-ils de protoplastes restés à l'état latent, sortes d'initiales plastidales au sens de Frey-Wyssling? [11]. A cet égard, il est intéressant de rappeler que les chloroplastes d'*Acetabularia mediterranea* non seulement sont capables de se diviser [10, 12], mais donnent naissance aussi à des structures semblables aux protoplastes [13]. En outre, le récent travail de Hoursiangou-Neubrun et Puisseux-Dao [14] suggère que des plastes "de type banal" peuvent se transformer en plastes basaux et que de gros plastes basaux peuvent donner naissance à des plastes-fils de type apical. La différenciation des plastes d'*Acetabularia* pourrait ne pas être irréversible, des plastes déjà âgés (basaux) pouvant "se rajeunir" sous le contrôle du noyau. En outre, cette différenciation a lieu dans la même cellule selon un gradient apico-basal, ce qui constitue en soi un fait remarquable. Une étude plus détaillée de l'émission de fluorescence des chloroplastes provenant d'algues anucléées et de fragments nucléés basaux en régénération, couplée à l'examen de l'ultrastructure de leurs lamelles, devrait faire mieux comprendre les phénomènes décrits.

RESUME

L'émission de fluorescence à 77° K fournit un critère qui distingue les chloroplastes du sommet du siphon de l'Acétabulaire au stade 4, des chloroplastes de la base. L'extraction des chloroplastes accroît les différences entre les émissions de ces deux types de chloroplastes. En utilisant l'émission de fluorescence à

77° K, on peut mettre en évidence et suivre au cours du temps la différenciation des plastes pendant la régénération des fragments anucléés ou nucléés de l'algue.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M.G. Nuyts et Mme F. Brouers qui les ont aidés pour les expériences. Ce travail a été effectué en partie grâce aux subsides du "Fonds de la Recherche Scientifique Fondamentale Collective".

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. Sironval, S. Bonotto et R. Kirchmann, *Plant Sci. Lett.*, 1 (1973) 47.
- 2 G. Valet, *Nova Hedwigia*, 17 (1969) 551.
- 3 L. Lateur, *Rev. Algol., N.S.*, 1 (1963) 26.
- 4 L. Lateur et S. Bonotto, *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 106 (1973) 17.
- 5 S. Bonotto et R. Kirchmann, *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 103 (1970) 255.
- 6 J. Hämmerling, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 14 (1963) 65.
- 7 D. Shephard et W.B. Levin, *J. Cell Biol.*, 54 (1972) 279.
- 8 C. Sironval, M. Brouers, J.M. Michel et Y. Kuiper, *Photosynthetica*, 2 (1968) 268.
- 9 C. Sironval, R. Kirchmann, R. Bronchart et J.M. Michel, *Photosynthetica*, 2 (1968) 57.
- 10 S. Puiseux-Dao et A.C. Dazy, dans J. Brachet et S. Bonotto (Eds.), *Biology of Acetabularia*, Academic Press, New York, 1970, p. 111.
- 11 A. Frey-Wyssling, dans C. Sironval (Ed.), *Le Chloroplaste*, Masson, Paris, 1967, p. 17.
- 12 D. Shepard, *Exptl. Cell Res.*, 37 (1965) 93.
- 13 M. Boloukhère, dans J. Brachet et S. Bonotto (Eds.), *Biology of Acetabularia*, Academic Press, New York, 1970, p. 145.
- 14 D. Hoursiangou-Neubrun et S. Puiseux-Dao, *Plant Sci. Lett.*, 2 (1974) 209.