

Mise en évidence de la phosphatase acide (monophosphoestérase II) dans les sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*

A. WALEK-CZERNECKA

Depuis près de vingt ans qu'on travaille sur la localisation histo-chimique de la phosphatase acide dans les tissus des plantes supérieures, les investigations ont porté principalement sur les organes jeunes (Glick et Fischer 1946; Dyar 1950; Jensen 1956; Avers 1958, 1961; Avers et King 1960; Wilson et Cutter 1955).

Une forte activité enzymatique a été constatée dans les méristèmes et dans les tissus en voie de différenciation; en dehors de cette région, elle diminue ou devient nulle.

En cherchant à déterminer la localisation intracellulaire de l'activité phosphatasique acide, on attribuait cette activité aux mitochondries (Wilson et Cutter 1955; Jensen 1956). Avers et King (1960) prétendent qu'à côté de mitochondries, les lysosomes seraient le siège de l'enzyme. Dans son dernier travail, Avers suggère que les proplastides et „autres systèmes" pourraient être aussi le lieu de l'activité enzymatique (Avers 1961).

La question étant loin d'être résolue, il nous a paru intéressant d'entreprendre de nouvelles recherches sur le matériel plus favorable. Nous avons choisi comme matériel d'étude l'épiderme des écailles bulbaires d'*Allium cepa*, dont les cellules, bien connues à la suite des recherches de Perner (un exposé de ses travaux est dans sa publication de 1958) et de Sorokin (1938), contiennent des éléments figurés bien caractérisés qui se détachent avec une netteté particulière sur le fond du cytoplasme peu dense. Ces cellules se prêtent bien à l'examen vital, ce qui rend possible le contrôle des images obtenues au cours de réactions et facilite leur interprétation.

Nous avons utilisé le plus souvent l'épiderme supérieur des écailles internes qui présentent des cellules aux parois minces, plus plates que celles des écailles externes (leur hauteur n'excède pas 30 μ), ce qui assure la pénétration uniforme du substrat dans l'intérieur de la cellule (Holt et Hicks 1961). Dans ces cellules les sphérosomes

sont moins nombreux et de taille plus grosse que ceux des autres écailles.

Nous avons utilisé le matériel frais et fixé soit au formol neutre (Lillie 1954, d'après Pearse 1961) pendant 2 à 14 heures, soit au formol à 4%, tamponné à pH 7,2 par un tampon phosphate, soit au FoCa de Baker, pendant 18 à 24 heures, à 0—2°C. Les deux derniers fixateurs ont été utilisés avec l'addition de saccharose à 7,5% et à 8,5%, ou sans saccharose (Holt 1959; Holt et Hicks 1961). Deux méthodes de détection de l'activité phosphatasique acide ont été employées parallèlement: la méthode au plomb de Gomori, comme substrat le glycérphosphate de sodium, l'incubation dans le milieu de Gomori (1952) pendant 2—3 heures, à 37°C et à 22°C; la méthode de couplage simultané (Pearse 1961), comme substrat le α -naphtyle phosphate de sodium, le diazonium utilisé le „Fast Red RC salt”. La durée de l'incubation à l'épreuve, à 37°C ou à 22°C, était de 10 minutes à une heure. Une partie de coupes a été incubée dans un bain contenant 0,44 M du saccharose (Scarpelli et Pearse 1958) ou 8,5% et 7,5% du saccharose (Holt 1959; Holt et Hicks 1961).

Trois contrôles ont été effectués: destruction de l'enzyme par séjour de 15 min. dans un bain d'eau à 90°C, avant l'incubation; bain soit privé de substrat, soit additionné de fluorure de sodium à 0,01M.

Les deux méthodes employées ont fourni des images superposables: l'activité phosphatasique acide est localisée électivement au niveau de sphérosomes (Planche I et II). Nous n'avons, par contre, décelé aucune réaction enzymatique dans les mitochondries ni dans les plastes.

Lorsque la durée de l'incubation était prolongée, il arrivait que dans le cytoplasme sousmembranaire de fines granulations, dont la taille est située à la limite du pouvoir séparateur du microscope optique, prenaient une faible coloration. Leur signification exacte nous échappe pour le présent. Nous ne sommes pas même sûrs si ces particules correspondent bien à une entité morphologique préexistante de la cellule vivante.

Après la technique de Gomori, les noyaux et les membranes cellulaires étaient souvent d'un brun plus ou moins foncé (Planche II, fig. 3); après l'application de la méthode aux azoïques, ils restaient incolores.

La plupart des sphérosomes dans les préparations a conservé son aspect normal: ils sont sphériques, de 0,3 à 0,8 μ de diamètre, très réfringents. Mais il arrive qu'ils présentent des formes aberrantes. Les altérations se traduisent par le gonflement des sphérosomes, leur transformation en vésicules, et par rupture de ces derniers. Parfois les sphérosomes se réduisent à des cupules ou à des croissants (Pl. I, fig. 2).

Chez les plantes, les sphérosomes sont considérés comme constituants permanents de la cellule. On n'est pas encore fixé sur leur rôle. Il nous semble que l'existence de l'activité phosphatasique acide dans les sphérosomes pourrait donner des indications nouvelles sur leur signification fonctionnelle, et notamment la participation dans les processus hydrolytiques intracellulaires. D'autre part, la présence de la phosphatase acide qui est l'enzyme particulièrement caractéristique des lysosomes de de Duve, leur „tracer enzyme", rapproche les sphérosomes de ces derniers. La nature cytologique des sphérosomes, de même que les altérations qu'ils subissent sous l'action des divers agents, semblent être compatibles avec les caractéristiques des lysosomes (de Duve et coll. 1955; de Duve 1958; 1959; Novikoff 1961).

Nos études préliminaires ont révélé dans les sphérosomes d'autres hydrolases. Les résultats définitifs seront exposés dans une autre publication.

Nous tenons aussi à rappeler que Genèves, Lance et Buva (1958), dans leurs recherches de microscopie électronique, observaient dans diverses catégories de cellules végétales, à côté des plastes et des mitochondries, des corpuscules plus petits qu'ils trouvaient très analogues aux „dense bodies" et aux lysosomes des cellules animales. Les descriptions de ces particules cytoplasmiques pourraient s'appliquer, à notre avis, aux sphérosomes. Perner donne la même interprétation aux „dense bodies", observés par Leyon dans les images électroniques des feuilles d'*Aspidistra* (Perner 1958).

Cette note n'est qu'une simple annonce d'une observation qui est l'objet d'autres recherches en cours. Si les études ultérieures confirment ces premiers résultats et permettent de les étendre sur d'autres objets, on trouverait dans les sphérosomes des équivalents des lysosomes de la cellule animale.

En résumé, nous avons démontré l'existence d'une activité phosphatasique acide dans l'épiderme des écailles bulbaires d'*Allium cepa*. La localisation de l'enzyme est située au niveau des sphérosomes.

Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie végétales, Université de Łódź,
Łódź, Pologne

STRESZCZENIE

Stosując równolegle dwie metody histochemiczne ujawniania aktywności kwaśnej fosfatazy (monofosfoesterazy II), a mianowicie: metodę Gomoriego (1952) i metodę równoczesnego sprzęgania ze związkami azowymi (wg Pearse'a 1961, użyta sól dwuazoniowa „Fast Red RC"), ustalono, że w skórcie łusek cebuli aktywność kwaśnej fosfatazy zlokalizowana jest wyłącznie w sferosomach. Chondriosomy okazały się wolne od enzymu.

Wysunięto następujące przypuszczenia: 1) sferosomy biorą udział w procesach trawiennych komórki, 2) są one odpowiednikiem lizosomów komórki zwierzęcej, których wskaźnikiem jest właśnie kwaśna fosfataza.

Explication des planches

Planche I.

Sphérosomes dans les cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*.
Méthode de couplage simultané (Agr. env. $\times 1800$)

Fig. 1. Portion de cytoplasme d'une cellule épidermique. Fixation au formol à 10% neutre pendant 2 heures. Incubation courte à 22°C. Bain d'incubation contenant du saccharose (0,44 M). Les sphérosomes sont nombreux, le plus souvent sphériques

Fig. 2. Fragment cytoplasmique d'une cellule de la même écaille. Même fixation. Incubation pendant 10 minutes à 37°. Sphérosomes d'aspect varié; les uns sont globuleux, les autres ayant subi quelque altération

Fig. 3. Matériel frais. Incubation pendant 30 minutes à 37°C. Fragment d'une cellule épidermique montrant des sphérosomes de diverse taille mais de formes régulières, colorés uniformément

Fig. 4. Cellules épidermiques d'une écaille interne. Fixation au formol à 10% neutre pendant 14 heures. Incubation à 37°C pendant 30 minutes. Les sphérosomes sont sphériques, leur nombre est réduit, leur taille relativement plus élevée

Planche II

Sphérosomes dans les cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*.
Fig. 1, 2, 3 — technique de coloration enzymatique de Gomori (Fig. 2, 3, 4 — agr. env. $\times 1800$, fig 1 — agr. $\times 1000$)

Fig. 1. Fragment d'une cellule épidermique prélevée sur une écaille interne. Fixation par FoCa de Baker, additionné de saccharose à 8,5% pendant 20 heures. Incubation pendant 3 heures à 37°C dans un milieu de Gomori contenant du saccharose à 8,5%. On voit des sphérosomes de diverse taille, sous forme de globules et d'anneaux, ces derniers représentent des sphérosomes hors du plan focal

Fig. 2. Détail à plus fort grossissement de la figure 1

Fig. 3. Fragment d'une cellule épidermique. Fixation et coloration les mêmes que précédemment. Sphérosomes globuleux. Les formes allongées résultent de la fusion, après coloration enzymatique, de deux granules approchés l'un de l'autre

Fig. 4. Fragment d'une cellule épidermique fixée dans les vapeurs de tetroxyde d'osmium pendant 10 minutes, colorée par le Soudan III et IV dans l'acool à 70% pendant 30 minutes. On voit, côte à côte les chondriosomes et les sphérosomes; ces derniers sont plus ou moins hypertrophiés et altérés

Planche I

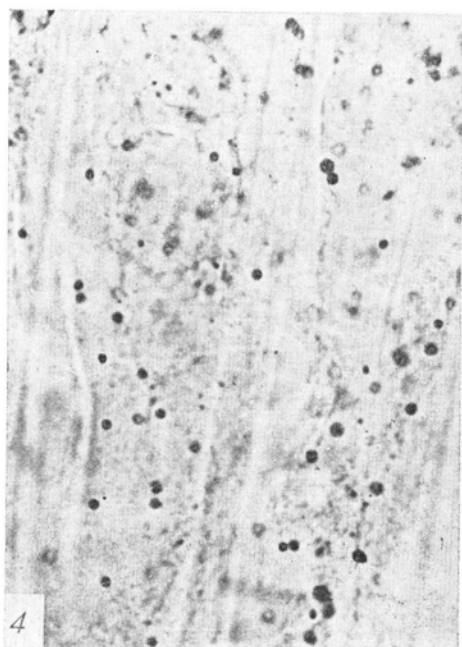
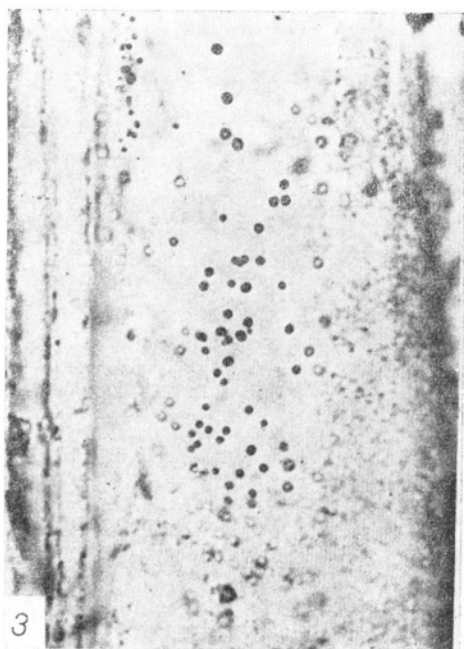
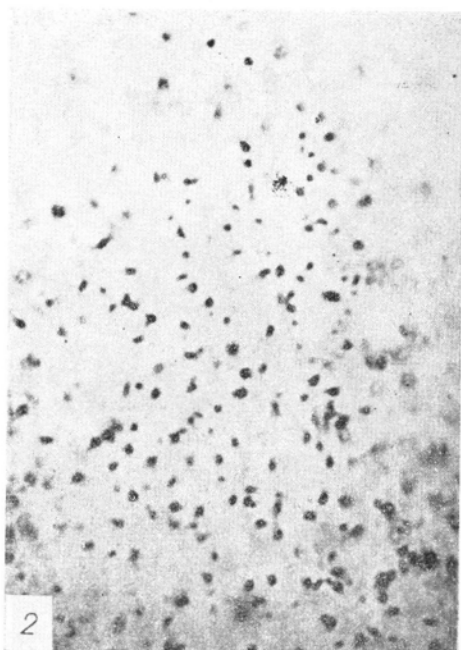
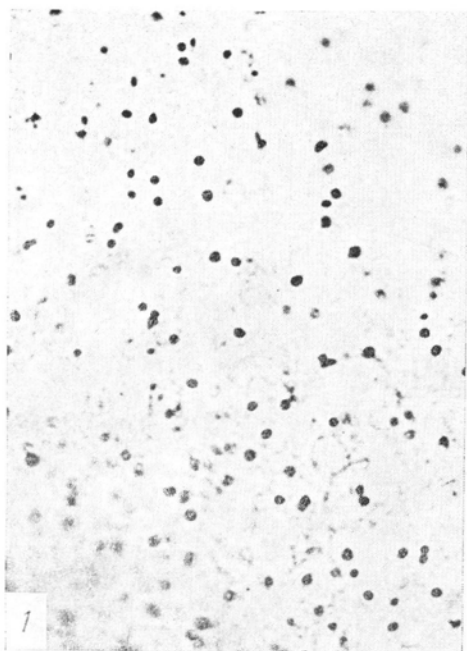
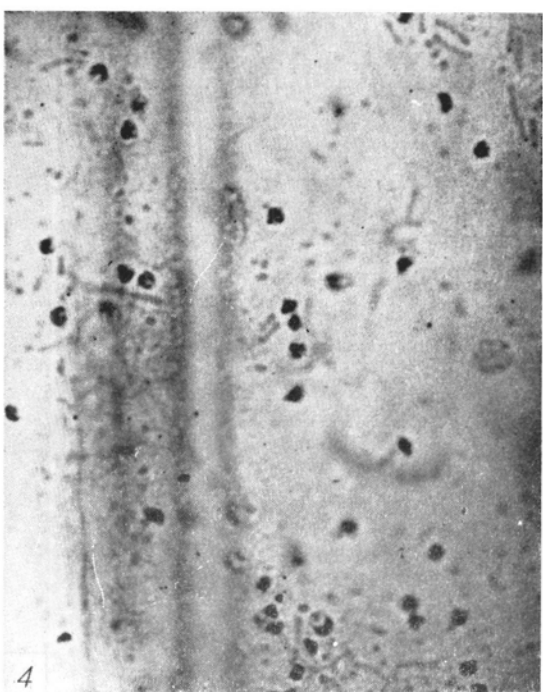
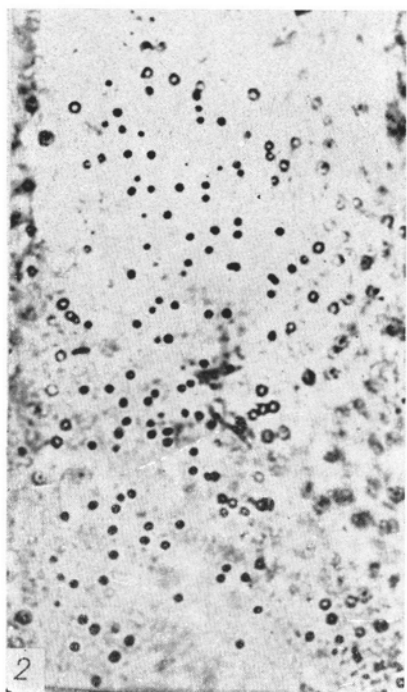
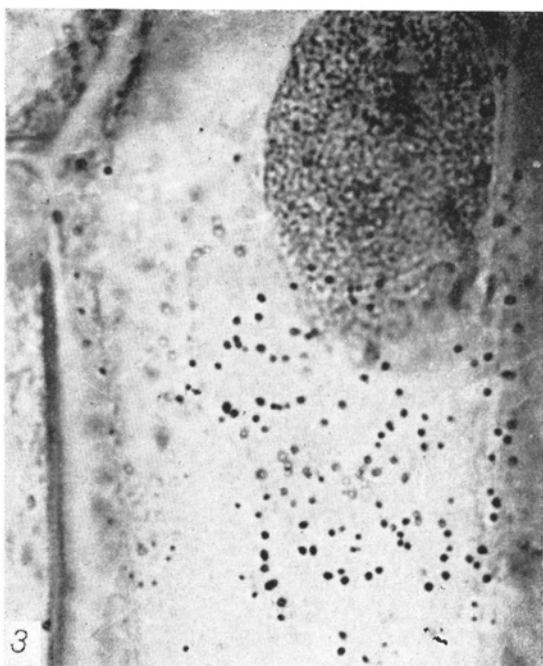
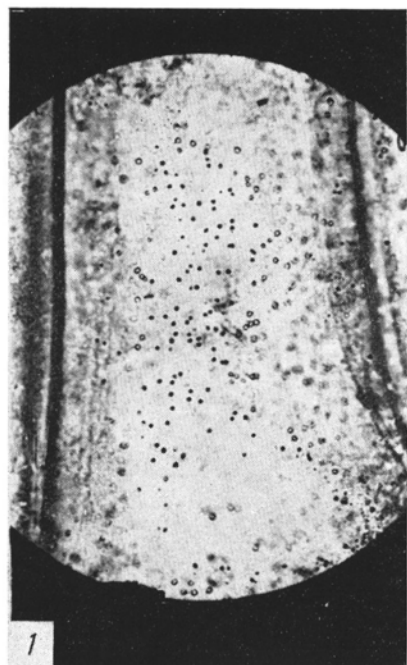


Planche II



BIBLIOGRAPHIE

- Avers C. J., 1958, Histochemical localization of enzyme activity in the root epidermis of *Phleum pratense*, Amer. J. Bot. 45: 609—613.
- Avers C. J., 1961, Histochemical localization of enzyme activities in root meristem cells, Amer. J. Bot. 48: 137—143.
- Avers C. J., King E. E., 1960, Histochemical evidence of intracellular enzymatic heterogeneity of plant mitochondria, Amer. J. Bot. 47: 220—225.
- Dyar M. T., 1950, Some observation of starch synthesis in *Poa* root tips, Amer. J. Bot. 37: 786—791.
- de Duve B. C., Pressman B. C., Giazetto R., Wattiaux R., Appelmanns F., 1955, Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue, Biochem. J. 60: 604—617.
- de Duve C., 1958, Les lysosomes, Exposés Annuels de Bioch. Médicale, 20 série: 197—211.
- de Duve C., 1959, in Subcellular particles, Hayashi Ed., Ronald Press, New York, p. : 1—22.
- Genèves L., Lance A., Buvat R., 1958, Sur la présence dans le cytoplasme végétal et sur la nature ergastoplasmique de constituants figurés analogues aux „lysosomes” ou aux „dense bodies” des cellules animales, C. R. Ac. Sci., 247: 2028—2029.
- Glick D., Fischer E., 1946, Localization of phosphatases in the wheat grain and the epicotyl and roots of the germinated grain, Arch. Biochem., 11: 65—79.
- Gomori G., 1952, Microscopic histochemistry. Principles and practice, Univ. Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Holt S. J., 1958, Validity of the Gomori acid phosphatase technique, Exptl. Cell Res. Suppl. 7: 1—27.
- Holt S. J., Hicks M., 1961, The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy, J. Bioph. Biochem. Cytology 11: 47—66.
- Jensen W. A., 1956, The cytochemical localization of acid phosphatase in root cells, Amer. J. Bot. 43: 50—54.
- Novikoff A., 1961, Lysosomes and related particles, The Cell, v. II: 423—488, Academic Press, New York and London.
- Perner E. S., 1958, Die Sphärosomen der Pflanzelle, Protoplasmatologia III A 2: 1—71.
- Pearse A. G. E., 1961, Histochemistry theoretical and applied, J. a. A. Churchill Ltd., London.
- Scarpelli D. G. Pearse A. G. E., 1958, Physical and chemical protection of cell constituents and the precise localization of enzymes, J. Histochem. Cytochem. 6: 369—376.
- Sorokin H., 1938, Mitochondria and plastids in living cells of *Allium cepa*, Amer. J. Bot. 25: 28—33.
- Wilson K. S., Cutter V., 1955, Localization of acid phosphatase in the embryosac and endosperm of *Cocos nucifera*, Amer. J. Bot. 42: 116—118.