

Note sur la détection d'une estérase non spécifique dans les sphérosomes

A. WALEK-CZERNECKA

Dans la note antérieure (1962) nous avons établi la présence d'une activité phosphatasique acide, strictement localisée dans les sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*. Ces résultats nous ont conduit à admettre que les sphérosomes jouent le rôle dans les processus de la digestion intracellulaire et qu'ils sont assimilables à des lysosomes de de D u v e (de D u v e et al., 1955; de D u v e 1959). L'importance de cette conception s'impose d'autant plus que les sphérosomes demeurent des constituants cellulaires mystérieux, d'origine inconnue; on ignore encore tout de leur fonction réelle.

Compte tenu de ces données préliminaires, nous abordons dans cette note l'étude de l'activité et de la répartition, dans le même tissu, d'une autre hydrolase, notamment de l'estérase non spécifique.

Nos études ont porté sur le même objet que précédemment et les mêmes méthodes de fixation ont été employées. A côté du matériel fixé, nous nous sommes servis des fragments d'épiderme frais. Les déterminations histochimiques ont été effectuées par deux méthodes: la méthode à l'acétate d' α -naphtyl — Fast Blue B ou Fast Blue RR et la méthode indigogène avec O-acétyl-5-bromo-indoxyle comme substrat (P e a r s e 1961). Dans les préparations témoins l'enzyme a été détruit, soit par la chaleur, soit par le phénol à 5%, soit par le Lugol, ou inhibé par le fluorure de sodium à 0,01 M, additionné au bain d'incubation. Le dernier contrôle n'entraînait qu'une inhibition partielle d'activité estérasique.

Les résultats de ces techniques sont hautement satisfaisants. Ils permettent d'obtenir des images précises de l'activité estérasique non spécifique qui siège surtout dans les sphérosomes. Elle est indiquée par la précipitation bleue de l'indigo après la technique aux indoxyles (fig. 4, 5, 6) ou par la coloration noire, noir-pourpre des sphérosomes, lorsque la méthode aux azoïques est employée (fig. 1, 2, 3). Souvent la zone périphérique des sphérosomes est colorée en noir, le centre étant rougeâtre. En utilisant Fast Blue B salt on obtient une faible coloration diffuse du cytoplasme et des noyaux. La coloration diffuse du cytoplasme apparaît quelquefois aussi après l'application de la méthode indigogène. Dans d'autres cas, il arrive qu'à côté des sphérosomes, de fines granulations, de taille moins grosse que celle des sphérosomes, se

colorent en bleu. La coloration enzymatique de ces mêmes éléments est plus accentuée lorsque le sel Blue RR est utilisé (fig. 2).

Perner (1953) a observé des granules semblables dans le cytoplasme isolé des cellules épidermiques d'*Allium cepa* et il les considère comme des artefacts de préparation, provenant du „Grenzschicht” de cytoplasme. L'examen en contraste de phase nous a permis de suivre, en observation continuée, l'apparition dans des cellules vivantes (cyclose) des granules réfringents, dont la taille est presque à la limite de visibilité, qui participent aux mouvements généraux du cytoplasme et deviennent de plus en plus nombreux au cours d'examination. Il semble aussi que la seule fixation au formol, ou à l'alcool à 70° (utilisé comme solvant des Soudans) fasse apparaître un certain nombre de granules, plus petits que les sphérosomes (fig 2); par contre, les images obtenues lors de fixation au tétroxyde d'osmium ne révèlent pas leur présence ce qui est conforme aux résultats apportés par la microscopie électronique (Paveling 1962). Les granulations ci-dessus étant soudanophiles, nous serions enclin d'y voir la manifestation de lipophanérose. Leur coloration enzymatique pourrait se traduire par la liposolubilité partielle des produits de la réaction enzymatique.

Nous n'avons décelé aucune activité estérasique dans les mitochondries ou plastes (fig. 4, 5). Les parois cellulaires restent toujours incolores.

A la suite de notre étude, la localisation de l'activité estérasique non spécifique au niveau des sphérosomes semble être un fait bien établi. Les résultats ci-dessus s'accordent bien avec ceux des auteurs qui utilisent les critères histochimiques de détection des estérases non spécifiques et arrivent à situer leur activité dans les lysosomes des cellules animales (Un exposé de ce sujet jusqu'à près de 1961 se trouve dans la publication de Novikoff (1961), Shnitka et Seligman (1961).

En même temps nos premières observations suggèrent des remarques suivantes: 1° l'effet de fluorure de sodium — l'inhibition partielle de l'activité estérasique — conduit à se demander s'il n'existe dans les cellules examinées deux types d'estérases, dont l'une serait résistante, l'autre sensible à l'action de cet inhibiteur (Wachstein et Meisel 1960; Shnitka et Seligman 1961); 2° la coloration enzymatique du cytoplasme et des granulations minuscules mentionnées ci-dessus serait-elle un artefact de diffusion (Nachlas et al., 1956; Holt, voir de Duve 1960) ou pourrait-elle être interprétée comme indice d'une activité estérasique *in situ* (Wachstein et Meisel; Shnitka et Seligman, l.c.). Nos recherches, actuellement en cours, permettront, nous espérons, de répondre à ces questions.

En conclusion: la mise en évidence de l'activité estérasique non spécifique localisée au niveau des sphérosomes dans les cellules épidermi-

ques d'*Allium cepa* vient à l'appui de l'hypothèse émise dans la note précédente (Wałek-Czernecka 1962) selon laquelle les sphérosomes, sites d'hydrolases, seraient des analogues des lysosomes décrits dans les cellules animales.

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

STRESZCZENIE

Wykazano aktywność esterazy nie specyficznej w sferosomach skórki łusek cebuli. Potwierdza to przypuszczenie, wysunięte w poprzedniej pracy, że sferosomy są odpowiednikami lizosomów komórki zwierzęcej.

Zakład Anatomii
i Cytologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

BIBLIOGRAPHIE

- de Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F., 1955, Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue, *Biochem. J.* 60: 604—617.
- de Duve C., 1959, Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles; in „Subcellular particles”, Hayashi ed. Ronald Press, New York, p. 128—159.
- de Duve C., 1960, Intracellular localization of enzymes, *Nature* 187: 836 et 853.
- Essner E., Novikoff A. B., 1961, Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy, *J. Bioph. Biochem. Cytology* 9: 773—784.
- Novikoff A. B., 1961, in *The Cell*, J. Brachet et A. E. Mirsky ed., 2: 423—488, Academic Press, New York and London.
- Nachlas M. M., Prinn W., Seligman A. M., 1956, Quantitative estimation of lyo- and desmoenzymes in tissue sections with and without fixation, *J. Bioph. Biochem. Cytology* 2: 489—504.
- Paveling E., 1962, Der elektronenmikroskopische Nachweis der Zwiebelchuppen von *Allium cepa*, *Protoplasma* 55: 429—435.
- Perner E., 1953, Die Sphärosomen (Microsomen) pflanzlicher Zellen, *Protoplasma* 42: 457—481.
- Shnitka T. K., Seligman A. M., 1961, Role of esteratic inhibition on localization of esterase and the simultaneous cytochemical demonstration of inhibitor sensitive and resistant enzyme species, *J. Histochem. Cytochem.* 9: 504—527.
- Wachstein T. M., Meisel E., 1960, Histochemistry of “thiolacetic acid esterase” in relation to de Duve's lysosomes, *J. Histochem. Cytochem.* 8: 317—318.
- Wałek-Czernecka A., 1962, Mise en évidence de la phosphatase acide (monophosphoestérase II) dans les sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*, *Acta Soc. Bot. Pol.* 31: 539—543.
- Wałek-Czernecka A., 1962, The cytochemical localization of acid phosphatase in the sferosomes of onion scales, *Folia Histochem. Cytochem.* (Sous presse).

Planche I

Localisation cytochimique de l'activité estérasiqne non spécifique dans les cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*

Fig. 1. Fragment d'une cellule; méthode aux azoïques, le diazonium Fast Blue RR salt. Incubation pendant 15 min. à la température du laboratoire. La réaction est positive dans les sphérosomes

Fig. 2. Portion du cytoplasme d'une autre cellule. Même méthode de détection de l'enzyme que précédemment. A côté des sphérosomes qui se colorent électivement, des granulations, de taille plus petite, s'observent qui présentent une faible coloration

Fig. 3. Fragment de deux cellules contiguës. Méthode aux azoïques, le diazonium Fast Blue B salt. Incubation 15 min. à 37°C. Les sphérosomes colorés, dont quelques-uns présentent des signes d'altération. La cellule étant un peu aplatie dans la préparation, on voit une de ses parois un peu de biais, sa coloration est due au cytoplasme adhérent; l'autre parois vue en section optique perpendiculaire est incolore

Fig. 4. Fragment d'une cellule. Méthode aux indoxyles. Le réaction se montre positive dans les sphérosomes, elle est négative dans les chondriosomes

Fig. 5. Détail, à plus fort grossissement, de la fig. 4

Fig. 6. Portion du cytoplasme d'une autre cellule. Même méthode et durée d'incubation. La réaction se montre positive au niveau des sphérosomes

Fig. 1, 2, 6 — fixation au FoCa de Baker; fig. 3, 4, 5 — fixation au Fo 4% tamponné à pH 7,2 par un tampon phosphate; les fixateurs sont additionnés de saccharose à 7,5%; durée de fixation variant de 18 à 22 heures, à 0-2°C. Fig. 1, 2, 3, 4 agr. env. $\times 1200$, fig. 5 et 6 — agr. env. $\times 1800$

Planche I

