Méthode simple pour la préparation des méristèmes racinaire permettant la détection cytochimique de certaines hydrolases

M. J. OLSZEWSKA, B. GABARA, S. OHDE

La localisation intracellulaire d'enzymes hydrolitiques est difficile dans le matériel végétal qui ne se prête pas à le couper à la main. Il est bien connu que l'inclusion à la paraffine provoque une inactivation partielle des phosphatases et des estérases; les pertes d'activité vont respectivement jusqu'à 75 % et 60 % (Lison 1960; Pearse 1961). Les coupes par congélation de tissus frais sont d'habitude trop épaisses pour que les détails intracellulaires puissent être étudiés, surtout dans le cas de petites cellules méristématiques. Les mêmes objections concernent les préparations effectuées des racines incubées in toto et aplaties avant l'examen microscopique (Avers et King 1960; Avers 1961). Sharma et Chatterje (1961) n'ont pas constaté la présence de phosphatase acide dans le cytoplasme des méristèmes racinaires de *Vicia faba* macérés à HCl.

Nous avons essayé de localiser la phosphatase acide, la phosphatase alcaline et les lipases dans les coupes à la paraffine. L'acétone froid, recommandé dans ce cas par Pearse (1961) pour le matériel animal, s'est montré un mauvais fixateur de notre matériel. En utilisant le formol à 4 % tamponné à pH 7,2 par un tampon phosphate, ainsi que le FoCa de Baker, nous n'avons pas obtenu d'images reproductibles d'activité enzymatique, bien que les structures cellulaires fussent bien conservées.

Ce n'est qu'après la macération des racines à la pectinase que les résultats ont été satisfaisants, malgré la perte importante d'activité phosphatasique acide (voir ci-dessous). Les racines d'*Allium cepa* ont été fixées au FoCa de Baker additionné de saccharose à 7,5 % (Holt 1959; Holt et Hicks 1961) à 4° pendant 18—24 h.; ensuite elles ont été lavées dans de l'eau distillée, coupées longitudinalement en deux parties et placées dans une solution de pectinase (Sigma) à 0,8 % (tamponnée à pH 4,2 par un tampon acétate) à 37° pendant 2 heures.

Afin de vérifier une perte de la phosphatase due au traitement à la pectinase, nous avons dosé l'activité phosphatasique acide dans les racines fraîches, fixées au FoCa de Baker et incubées avec la pectinase. Ces expériences ont porté sur l'homogenat provenant d'env. 100 racines (env. 2 g) d'une longueur de 2 cm, y compris la zone méristématique.

Le dosage a été effectué d'après la méthode décrite par Maciejewska-Potapczykowa (1960), à laquelle nous avons apporté deux modifications, et notamment le pH du tampon citrate a été de 5,1 (au lieu de 5), l'acide sulfurique a été utilisé en concentration de 3,1 N (au lieu de 2N). La quantité de phosphore libéré en une heure à partir de β -glycérophosphate de sodium, exprimée en unités de Holden et Pirie (Maciejewska-Potapczykowa l. c.), mg de P par 1 g de poids frais, est présentée sur le tableau 1.

Tableau 1

Racines fraîches	Racines fixées au FoCa de Baker	Racines fixées au FoCa de Baker et macérées à la pectinase
85,92 *	71,1 **	43,22 ***

* Les valeurs contenues dans ce tableau correspondent aux nombres moyens de *, ** et *** expériences.

Ces résultats montrent que la perte d'activité phosphatasique acide dans les racines macérées à la pectinase atteint 50 %, mais la fixation au FoCa de Baker inactive env. 20 % de cet enzyme. Les racines fixées au FoCa et soumises à l'action de la pectinase gardent encore 60 % d'activité enzymatique du matériel traité à ce fixateur.

Nous avons employé deux méthodes cytochimiques de détection de l'activité phosphatasique acide: le procédé de Gomori (la durée d'incubation à 37° a été de 1 h. 30 min.) et la méthode de couplage simultané (comme substrat 1' α -naphtyle-phosphate de sodium, les sels Red RC ou Blue RR ont été utilisés, la durée d'incubation à 37° a été de 12 min). L'activité estérasique non spécifique a été mise en évidence soit par la technique aux azoïques (l'acétate d' α -naphtyle comme substrat, le sel Blue B ou le sel Blue RR ont été employés, la durée d'incubation à 18—22° a été de 15 min.), soit par la méthode aux indoxyles (le 0-5-bromo-indoxyle comme substrat, la durée d'incubation à 37° allait jusqu'à 1 heure).

Les bains d'incubation ont été additionnés de saccharose à 7,5 % (Holt 1959; Holt et Hicks 1961). Les fragments de racines, après l'incubation, ont été placés dans une goutte de glycérine gélatinée sur la lame; par compression entre la lame et la lamelle, les cellules ont été définitivement séparées et aplaties.

Toutes les méthodes employées ont fourni des images parallèles: aussi bien l'activité phosphatasique acide que l'activité estérasique non spécifique sont localisées électivement dans les granules d'un diamètre de 0,3—0,8 μ (fig. 1, 4, 7, 8, 9, 10). Ces granules peuvent être plus grands, gonflés, ce qu'on constate le plus souvent dans le matériel

Explication des figures

Localisation de l'activité phosphatasique acide et de l'activité estérasique non spécifique dans les cellules des méristèmes radiculaires d'*Allium cepa* macérés à la pectinase

Fig. 1. Fragment de méristème racinaire macéré à la pectinase; l'activité phosphatasique acide mise en évidence par la méthode de couplage simultané, sel Blue RR. Agr. env. 600 ×

Fig. 2 et 3. Détails à plus fort grossissement de la préparation présentée sur la fig. 1. L'activité phosphatasique acide est localisée au niveau de granules de diverse taille; les plus grands sont gonflés, leur diamètre dépasse 2 μ .
Agr. env. 1000 ×

Fig. 4, 5 et 6. Même méthode que précédemment, sel Red RC, cellules vacuolisées

Fig. 4. Les granules peu nombreux, de forme régulière. Agr. env. 1000 ×

Fig. 5. Le début de la cristallisation du produit de la réaction enzymatique au niveau de granules. Agr. env. 1000 ×

Fig. 6. Cellules contenant de nombreux cristaux du produit de la réaction enzymatique. Agr. env. 1000 ×

Fig. 7 et 8. Activité phosphatasique acide mise en évidence par le procédé de Gomori. Les granules d'une taille plus uniforme qu'après la technique de couplage simultané. Agr. env. 1000 ×

Fig. 9 et 10. Activité estérasique non spécifique localisée au niveau de granules.

Fig. 9. Méthode de couplage simultané, sel Blue RR. Agr. env. 1000 ×. Fig. 10. Méthode aux indoxyles. Agr. env. 1000 ×

fixé et incubé dans des milieux dépourvus de saccharose, ou surtout, lorsque le matériel a été soumis à l'incubation trop prolongée destinée à déceler l'activité enzymatique (fig. 2 et 3). Il arrive qu'en présence du sel Red RC les granules contenant les enzymes en question sont entourés de cristaux rouges du pigment (fig. 5 et 6) — produit de la réaction enzymatique; nous n'avons jamais rencontré d'images pareilles dans les cellules incubées avec le sel Blue B ou le sel Blue RR. Après la technique de Gomori, les noyaux ont été colorés en brun; on sait (Lison 1960; Pearse 1961) qu'en ce cas la coloration n'est pas spécifique des phosphatases.

Wałek-Czernecka (1962 a et b, 1963) a établi récemment que l'activité phosphatasique acide et l'activité estérasique non spécifique sont localisées électivement au niveau des sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*. Dans les cellules méristématiques le cytoplasme étant plus dense, la distinction nette des mitochondries granuleux et des sphérosomes est très difficile; par contre, elle est possible dans un matériel plus favorable. Nos essais préliminaires sur l'endosperme et sur la *Spirogyra* semblent prouver qu'en effet la phosphatase acide et l'estérase non spécifique sont localisées dans les granules d'un diamètre de 0,3—0,8 μ , bien distincts des mitochondries qui restent toujours incolores après les réactions enzymatiques. Nos résultats seraient compatibles avec l'hypothèse émise par Wałek-Czernecka (l. c.) que les sphérosomes — les constituants des cellules végétales pourvus d'hydrolases — soient des équivalents des lysosomes de la cellule animale.

Notre procédé, décrit ci-dessus, nous a permis aussi de localiser par des méthodes cytochimiques les lipases et la phosphatase alcaline.

Laboratoire de Cytochimie,
Université de Łódź,
Łódź, Nowotki 18, Pologne

(Reçut 20.12.1962)

STRESZCZENIE

Opisano metodę macerowania merystemów korzeniowych za pomocą pektynazy, pozwalającą na cytochemiczne wykrywanie niektórych hydrolaz. W merystemie korzeniowym cebuli kwaśna fosfataza i esteraza niespecyficzna są zlokalizowane w ziarnistościach cytoplazmatycznych o średnicy 0.3—0.8 μ .

BIBLIOGRAPHIE

- Avers C. J., 1961, Histochemical localisation 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.
- Holt S. J., 1959, Validity of the Gomori acid phosphatase technique, *Expt. Cell Res.*, Suppl. 7:1—27.
- Holt S. J., Hicks M., 1961, The localisation of acid phosphatase in rat liver as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy, *J. Bioph. Biochem. Cytology* 11:47—66.
- Lison L., 1960, *Histochimie et cytochimie animales, principes et méthodes*, Gauthier-Villars éd., Paris.
- Maciejewska-Potapczykowa W., 1960, Zawartość związków fosforu i aktywność nukleaz w trakcie wzrostu roślin: normalnego, stymulowanego niektórymi substancjami wzrostowymi i patologicznego, *Wyd. Łódzkie Tow. Naukowe*, Nr 67.
- Pearse A. E. G., 1961, *Histochemistry theoretical and applied*, J. and A. Churchill Ltd., London.
- Wałek-Czernecka A., 1962a, 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., 1962b, The cytochemical localisation of acid phosphatase in the spherosomes of onion scales, *Folia Histochem. Cytochem.*, sous presse.
- Wałek-Czernecka A., 1963, Note sur la détection d'une estérase non spécifique dans les sphérosomes, *Acta Soc. Bot. Pol.*, sous presse.