Hétérogénéité enzymatique des sphérosomes

M. J. OLSZEWSKA, A. WALEK-CZERNECKA, M. KWIATKOWSKA, B. GABARA

L'intensité des colorations enzymatiques qui servent à visualiser l'activité de certaines hydrolases est différente dans les sphérosomes de la même cellule et varie d'un tissu à l'autre. Cette constatation suggère qu'au point de vue enzymatique il existe une hétérogénéité des sphérosomes.

Nos observations ont porté sur l'épiderme des écailles bulbaires d'*Allium cepa* (qui étaient l'objet des recherches sur la présence des hydrolases dans les sphérosomes — Walek-Czernecka 1962, 1963 et 1965), sur l'épiderme des feuilles d'*Haemanthus katherinae*, sur celle des ovaires d'*Ornithogalum umbellatum* et sur le méristème racinaire d'*Allium cepa*. Le matériel a été fixé à 4°C dans le formol-calcium de Baker additionné de saccharose à 7,5—8,5%, pendant 18—24 h. Les racines, après la fixation, ont été macérées à la pectinase (Olszewska et coll. 1963).

Nous avons mis en évidence l'hétérogénéité enzymatique des sphérosome par des méthodes de double coloration. Cette technique avait été introduite par Shnitka et Seligman (1961) qui avaient démontré dans une même cellule animale l'existence des estérases résistantes et sensibles aux inhibiteurs.

Nous avons apporté certaines modifications à la méthode originale. La première incubation en présence de l'O-acétyle-5-bromo-indoxyle et de l'inhibiteur a été suivie d'un lavage des coupes pendant 2h. dans de l'eau distillée additionnée de saccharose à 7,5—8,5%. Les estérases sensibles aux inhibiteurs ont été ensuite décelées, dans le même matériel, par des techniques de couplage simultané. A part de la différenciation des estérases sensibles et résistantes aux inhibiteurs, nous avons révélé dans les mêmes préparations deux enzymes hydrolytiques diverses. Les résultats sont nets et lisibles à condition que les couleurs des produits finaux de deux réactions enzymatiques soient différentes.

A la base de ces méthodes, nous avons décelé dans les mêmes cellules les enzymes suivantes:

1° Les estérases E600-résistantes (le substrat — O-acétyl-5-bromo-indoxyle, additionnée d'E600 en conc. 10^{-5} M), à côté des estérases E600-sensibles (le substrat — acétate d' α -naphtol ou acétate de Naphtol AS-D suivant Burstone, 1961, le diazonium sel Fast Red Violet LB).

2° Les estérases NaF-résistantes à côté des estérases NaF-sensibles ont été décelées par le même procédé; le premier substrat a été additionné de NaF 10^{-3} M.

3° Les indoxylestérases (le substrat — O-acétyl-5-bromo-indoxyle) à côté d'autres estérases non spécifiques, mises en évidence par l'acétate d' α -naphtol ou acétate de Naphtol AS-D, sel Fast Red Violet LB. Cette expérience a eu pour but de démontrer une sélectivité des estérases des sphérosomes par rapport aux différents substrats.

4° Les indoxylestérases (le substrat — O-acétyl-5-bromo-indoxyle) à côté de la phosphatase acide (méthode de Burstone, 1961, diazonium sel Fast Red Violet LB).

5° Les indoxylestérases (le substrat — O-acétyl-5-bromo-indoxyle) et tweenestérases (technique de Gomori au plomb, Tweens 40, 60 et 80).

Les conditions expérimentales des incubations avaient été indiquées dans nos publications précédentes (Wałek-Czernecka 1962, 1963; Olszewska et coll. 1965).

Nous avons obtenu, chez tous les objets examinés, les mêmes résultats. Ce sont toujours les sphérosomes qui se colorent électivement. Les petits sphérosomes (d'un diamètre de $0,4 \mu$ jusqu'à la limite de la visibilité) ne présentent qu'une seule activité enzymatique; cette population renferme deux espèces de granulations: à côté des sphérosomes contenant la première enzyme étudiée, il y a d'autres qui sont doués de seconde activité enzymatique. Les sphérosomes les plus grands en contiennent toutes les deux. Les sphérosomes d'une taille moyenne appartiennent soit à la première, soit à la seconde catégorie. Chez *Ornithogalum*, une seule activité enzymatique existe aussi bien au niveau des petits sphérosomes, qu'au niveau des sphérosomes d'une taille considérable; parmi ces derniers on rencontre de même les sphérosomes qui présentent une double activité enzymatique.

Le plus souvent, les dépôts des deux produits finaux des réactions enzymatiques sont nettement séparés, mais il arrive qu'à la suite de deux réactions enzymatiques successives, la coloration des sphérosomes est mixte.

Laboratoire de Cytochimie
et Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Végétales,
Université de Łódź,
Łódź, Pologne

(Reçut: 29.XII.1964.)

BIBLIOGRAPHIE

- Burstone M. S., 1961, Histochemical demonstration of phosphatases in frozen sections with Naphtol AS-phosphate, J. Histochem. Cytochem. 9:146—153.
Olszewska M. J., Gabara B., Orde S., 1963, Méthode simple pour la préparation des méristèmes radiculaires permettant la détection cytochimique de certaines hydrolases, Acta Soc. Bot. Pol. 32:651—654.

- Olszewska M. J., Gabara B., Stęplewski Z., 1965, Recherches cytochimiques sur la succession d'enzymes hydrolytiques, sur la présence de la thiamine pyrophosphatase et des polysaccharides au cours du développement de la plaque cellulaire, *Protoplasma*, sous presse.
- 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.
- Wałek-Czernecka A., 1962, Mise en évidence de la phosphatase acide (monophosphoestérase II) dans les sphérosomes des écailles bulbaires d'*Allium cepa*, *Acta Soc. Bot. Pol.* 31:539—543.
- Wałek-Czernecka A., 1963, Note sur la détection d'une estérase non spécifique dans les sphérosomes, *Acta Soc. Bot. Pol.* 32:405—408.
- Wałek-Czernecka A., 1965, The histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes in the spherosomes on plant cells, *Acta Soc. Bot. Pol.*, sous presse.

Heterogenność enzymatyczna sferosomów

Streszczenie

Za pomocą podwójnego barwienia cytoenzymatycznego wykrywano w tych samych preparatach (skórka łusek cebuli i merystem korzeniowy *Allium cepa*, skórka liści *Haemanthus katherinae* oraz skórka zalążni *Ornithogalum umbellatum*) następujące hydrolazy: esterazy odporne i wrażliwe na E-600, esterazy odporne i wrażliwe na NaF, esterazy indoksyłowe i inne esterazy niespecyficzne, esterazy indoksyłowe i kwaśną fosfatazę, esterazy indoksyłowe i tween-esterazy. Stwierdzono, że największe sferosomy zawierają oba badane enzymy, najmniejsze sferosomy tej samej komórki wykazują obecność tylko jednego enzymu; sferosomy o wymiarach pośrednich należą bądź do pierwszej, bądź do drugiej kategorii.