

Sur la désorganisation des grains d'aleurone et sur l'évolution des plastes dans l'embryon de la courge

Par Stjepan Urban.

Dernièrement les cytologues français Guillaumon d, P. Dangeard et P. A. Dangeard ont développé la théorie sur la continuité du système vacuolaire. D'après cette théorie, les vacuoles naissent toujours d'autres vacuoles. Dans les graines mûres les vacuoles prennent la forme de grains d'aleurone. A l'époque de mûrir, les graines sont remplies d'un contenu protéique qui y est dissous à l'état colloïdal. Dans les graines mûres le contenu des vacuoles se déshydrate totalement, et la masse protéique prend la forme solide des grains d'aleurone. (P. Dangeard 1921, Guillaumon d 1924, P. A. Dangeard 1931.) A l'époque de la germination l'eau perce dans les grains d'aleurone, dissout la masse solide et les grains d'aleurone prennent de nouveau la forme des vacuoles. (P. Dangeard 1921—1922.) Ces vacuoles qui sont, au commencement, petites et ont la forme de petits canaux, deviennent ensuite de plus en plus grandes et remplissent, dans les plus vieilles cellules, la plus grande partie de la cellule (Guillaumon d 1924, 1925, 1926, 1933.)

Cette théorie sur la continuité des vacuoles se fonde sur la théorie de la naissance des aleurones dans les vacuoles qui règne dans la botanique déjà depuis les recherches de Waker et qui y domine encore aujourd'hui. Recemment l'Américain Mottier a expliqué, d'une toute autre façon, la naissance des aleurones (Mottier 1921). D'après ses idées, l'aleurone se produit d'une manière plastidogénique. Dans les cellules on trouve des plastides comme l'élément permanent. Ils sont dans les cellules des endospermes d'une forme toute menue, les soi-disants primordia qui servent d'organiseurs d'aleurones. Indépendamment de Mottier, M. Vouk est arrivé à la même conception sur la naissance des aleurones (Vouk 1925). A la même conception se rattache à Zagreb aussi M. Arnold (Arnold 1925). D'après la conception de Vouk, comme organisateurs d'aleurones agissent des plastides spéciaux, les aleuroplastes. A la base de cette conception, Vouk a élargi la théorie de Wiesner sur les produits organoïdes et d'après lui, tous les produits organoïdes naissent d'une façon plastidogénique: l'amidon naît des amyloplastes, l'aleurone des aleuroplastes, et plusieures gouttelettes graisseuses naissent des élaïoplastes.

Cette théorie-ci sur la naissance des grains d'aleurone d'une façon plastidogénique détruit les fondements de la théorie de D a n g e a r d et de G u i l l i e r m o n d sur la continuité des vacuoles. Mais elle est aussi un argument très important à l'appui de la théorie de S c h i m p e r et de M e y e r sur la continuité des plastes parce que, même d'après M o t t i e r et V o u k, des menus plastes se trouvent dans les cellules comme leur élément permanent.

J'ai fait mes recherches pour établir la provenance des plastes sur les racines de *Cucurbita Pepo* et de *Lupinus*. Comme il n'y a pas moyen de publier maintenant ma dissertation détaillée sur l'évolution des plastes et sur les cytosomes dans les racines de la courge et de *Lupinus* blanc, je dois me contenter momentanément par la publication de ce court exposé sur mes observations chez la courge, où j'ai observé l'évolution des grains d'aleurone et des plastes pendant la germination.

Matériel et méthodes techniques.

J'ai fait des recherches sur la radicule et sur les cotylédons dans les graines de la courge. Les graines germent très vite. Les processus de gonflement et de germination ne se poursuivent pas également vite dans toutes les graines. Quelques graines germent déjà après 36 heures, tandis que d'autres ne germent qu'après 3 ou 4 jours. Je n'ai pas fait de distinction entre les différentes graines d'après la durée du processus de germination, mais d'après les progrès qu'avait fait la graine dans la germination. J'ai fait des distinctions suivantes:

- 1° La graine s'est gonflée. Ça se passe dans quelques heures (5 à 6), après que les graines ont été mises sur du papier humide.
- 2° Le germe n'a pas encore percé la cosse de la graine.
- 3° Le germe a déjà percé la cosse de la graine.
- 4° Le germe a déjà poussé quelque peu au dehors de la cosse de la graine.

Le germe se développe, à vrai dire, très vite mais dans les cotylédons le même processus ne se passe pas également vite. Les parties inférieures des cotylédons accusent les transformations beaucoup plus tôt que les parties supérieures.

Pour la fixation je me suis servi des mélanges de R e g a u d, de B e n d a, de C a r n o y, de F l e m m i n g. J'ai employé des fixateurs mitochondriaux, et comme contrôle m'ont servi d'autres fixateurs aussi.

J'ai coupé les objets à une épaisseur de 4μ et je les ai colorés avec de l'hématoxyline, d'après R e g a u d et d'après M e v e s, avec de la safranine, avec le violet de la Gentiane et avec l'orangé, avec de la fuxine acide d'après A l t m a n n et F l e m m i n g, et avec de l'éosine.

En outre, j'ai essayé de colorants vitaux, mais ils n'ont pas pu donner chez ces objets, de résultats satisfaisants.

Observations.

Dans le germe qui vient seulement de se gonfler les cellules sont si petites qu'il est impossible d'obtenir des bonnes coupes à l'aide de la main, des coupes qui seraient convenables pour l'observation et pour l'exécution des réactions microchimiques. C'est à cause de cela que j'ai été lié au matériel fixé et aux préparations colorées seules.

Les préparations faites d'après la méthode de Regaud m'ont donné de très bonnes images. Toutes les cellules dans le germe ont été remplies de grains d'aleurone. Dans les cellules n'étaient visibles que les noyaux et les grains d'aleurone (fig. 4). La structure des grains d'aleurone est très intéressante. Les grains qui se trouvent encore toujours à l'étape de repos absorbent l'hématoxyline d'une manière assez faible et se distinguent par plusieurs globoides qui sont très réfringents. Les grains d'aleurone qui sont au début de leur désorganisation ont la forme de vacuoles qui ne prennent pas de couleur, et à l'un de leurs bouts se trouve une forme très colorée qui ressemble au croissant de la lune.

Wagner (1929—1930) allègue d'avoir vu dans la radicule des graines sèches de la courge des mitochondries en petit nombre, qui deviennent de plus en plus nombreuses pendant la germination, et quand le germe a quelque peu poussé on trouve dans les cellules des chondriocotes aussi. Wagner remercie ses résultats à l'emploi de la méthode Lewitsky. Il dit que la méthode de Lewitsky peut rendre visibles les chondriosomes même dans les graines sèches tandis que la méthode de Regaud ne donne, d'après lui des bons résultats qu'après. Je n'ai pas eu l'occasion d'essayer la méthode de fixation de Lewitsky, mais affirmation de Wagner d'avoir vu dans les graines sèches des chondriosomes (Wagner 1929—1930) me paraît incroyable, parce que dans les graines sèches, tous les éléments qui absorbent autrement, les couleurs très vite, teignent très faiblement. Les nucléoles et les grains d'aleurone dans les graines sèches prennent à peine l'hématoxyline, la fuxine acide, la safranine et le violet de Gentiana. C'est une des raisons pour lesquelles je tiens que les mitochondries de Wagner dans les graines sèches ne sont que des produits artificiels dus au hasard. La deuxième de mes raisons, c'est qu'il n'y a pas de grande différence entre la façon de fixer d'après la méthode de Lewitsky et d'après les méthodes de Regaud et de Benda dont je me suis servi, moi.¹ Enfin je sais de ma propre expérience combien souvent peuvent naître, dans les préparations, même malgré la plus grande attention différents produits artificiels pour lesquels on est véritablement dans l'embarras de dire si ce sont de produits artificiels ou des éléments

¹ Lewitsky fixe d'abord dans le mélange du formol et de l'acide chromique, pendant 2 jours, ensuite, dans le mélange de l'acide osmique et du bichromate de la potasse, pendant 3 jours.

Mélange de Regaud: bichromate de la potasse + formol.

Mélange de Benda: acide chromique + acide osmique.

cellulaires. En outre, Guillaumon d fait toujours ressortir la méthode de Regaud comme la meilleure de toutes les méthodes mitochondriales, et c'est lui, bien sûr, qui a la plus grande expérience dans la manipulation des méthodes mitochondriales. Me fondant sur tout ce qui vient d'être dit, je crois que Wagner a décrit quelques produits artificiels comme étant des mitochondries dans des graines sèches au premier stade de la germination.

Avant que le germe ait percé la cosse de la graine, des changements importants se produisent sur les grains d'aleurone. J'ai obtenu mes meilleurs préparations, au stade qui précède le percement de la cosse par le germe, à l'aide de la méthode de Benda. J'ai coloré ces préparations d'après Meves, avec de l'hématoxyline, d'après Altman, avec de la fuxine acide, et d'après Flemming, avec de la safranine, avec le violet de Gentiana et avec l'orangé. Ces dernières m'ont donné les plus belles images. Les grains d'aleurone à ce stade là sont représentés par les figures 2 et 1. Le centre des grains d'aleurone prend les couleurs très faiblement, tandis que les bords, qui ont la forme d'un croissant, d'une périphérie du cercle, d'une périphérie pointillée ou des menus grains disposés tout autour du centre faiblement teint, prennent toutes les couleurs d'une manière très forte: ainsi l'hématoxyline, la fuxine acide et surtout le violet de la Gentiana. Le centre des grains d'aleurone ne se colore pas avec de l'hématoxyline, mais il se colore, en revanche, avec l'acide picrique dans les préparations que j'ai teintées d'après Altman, et avec l'orangé, dans les préparations teintées d'après Flemming.

A ce stade-là, je n'ai pas pu constater ni de cytosomes ni de formes juvéniles des plastes.

Quand le germe perce la cosse de la semence alors la plupart de grains d'aleurone est totalement désorganisée. A ce stade je pouvais faire des coupes avec la main et je pouvais accomplir des réactions microchimiques. Des réactions microchimiques j'ai exécuté celle de Molisch avec le nitrate d'argent et la réaction iodique. Les colorations vitales ne m'ont réussi à ce stade ni avec le rouge neutre ni avec le vert de Janus ni avec Dahlia.

La réaction de Molisch avec le nitrate d'argent m'a donné des images qui correspondaient, complètement quant à l'essentiel, aux images des préparations fixées et colorées. J'ai vu de menus grains qui étaient teintés d'une couleur opaque comme du chocolat, en groupes, à la façon des demi-cercles ou des petits cercles entiers, autour des lieux incolores.

A l'aide de l'iode je pouvais constater, dans quelques cellules, la présence de l'amidon, mais les coupes étaient si densément teintées par l'iode que je ne pouvais pas distinguer grand chose.

Me fondant sur les dites deux réactions je pouvais conclure que, dans les préparations fixées, se trouvaient des plastes.

Les préparations des radicules ont été faites, à ce stade, avec les méthodes de Benda et de Regaud. Les deux préparations donnent les mêmes images du contenu cellulaire, à la seule diffé-

rence que dans les préparations faites d'après la méthode de B e n d a, la structure du cytoplasme est plus écumeuse, et dans les préparations d'après la méthode de R e g a u d. elle est plus hyaline. Le cytoplasme est tout très vacuolisé. Il y a des vacuoles plus grandes et des vacuoles plus petites, mais, en général, elles sont toutes d'une grandeur à peu près égale et rondettes. Autour de grands noyaux on voit isolément dispersés des grains ronds, d'une grandeur de ca 1 μ , très intensivement colorés. Des pareils grains se trouvent isolément dispersés dans le cytoplasme; mais sur les bords des vacuoles et dans le cytoplasme en proximité des vacuoles on trouve des pareils grains non seulement isolés ça et là, mais aussi dans les groupes où ils se trouvent plusieurs ensemble (fig. 5). Me fondant sur la réaction microchimique avec le nitrate d'argent je conclus que ces grains sont des proplastides. Que cette conclusion est juste cela s'ensuit de la fig. 3 qui provient de la même série des préparations. La fig. 3 représente les cellules proméristématiques à la place où perce la racine latérale. C'est à dire que chez la courge les racines latérales percent aussitôt que le germe a percé la cosse séminale, comme l'a aussi remarqué B o w e n (1929, p. 18). Dans le cytoplasme se trouvent plusieurs menus plastides dont plusieurs produisent de l'amidon.

Dans ces préparations, on voit, çà et là, dans les vacuoles, des produits d'une forme irrégulière qui se teignent intensivement avec de l'hématoxyline ferrique tels que les décrit G u i l l i e r m o n d comme des précipitations du contenu vacuolaire dues à l'influence des fixateurs (G u i l l i e r m o n d 1924, p. 41 et 42).

Que ces menus grains soient véritablement des proplastides réels je m'en suis convaincu des préparations que j'ai faites de la radicule qui a déjà point, un peu plus, de la cosse séminale, dans la grandeur de ca 1 cm. Là j'ai trouvé dans les cellules des véritables leucoplastes qui se fixaient avec les mélanges de F l e m m i n g et de C a r n o y et qui avaient la forme des chondriocentes telle que la décrit pour ce stade W a g n e r lui-aussi (W a g n e r 1929, 1930).

Les proplastides se laissent facilement constater au stade où le germe perce la cosse séminale. Mais aux stades qui précèdent celui-ci, je n'ai pas pu constater la présence des plastides. W a g n e r (1929, 1930) à, à vrai dire décrit des mitochondries qui pourraient être la même chose que les grains que j'appelle proplastides: des mitochondries dans le germe des graines sèches et au plus primitif stade de la germination, mais je doute que les mitochondries soient un élément réel du cytoplasme, et je les considère plutôt comme des produits artificiels parce que, dans les graines sèches, tous les éléments cellulaires se colorent si faiblement qu'il serait impossible de constater de si menus éléments même s'ils existaient. C'est à cause de cela que la question me s'était imposée d'où est-ce que les proplastides ne se montrent qu'à partir du moment où le germe perce la cosse séminale? Naissent-ils »de novo« ou étaient-ils cachés quelque part? La théorie de M o t t i e r et de V o u k sur l'origine plastidogénique des aleurones m'a conduit à l'idée que les plastides

se trouvent, à ce stade de l'évolution de l'embryon dans les grains d'aleurone. J'ai été confirmé dans cette idée aussi par le fait que les bords des grains d'aleurone sont très intensivement colorables avec plusieurs couleurs et surtout avec le violet de Gentiana, avec l'hématoxyline ferrique et avec la fuxine acide.

Au contraire les travaux de P. Dangeard (P. Dangeard 1921-1, 1921-2) et de Guillaumond (Guillaumond 1924) et leur critique de l'étude de Mottier réveillaient en moi des doutes sérieux sur une pareille conception de mes préparations.

Le bord chromatique qui se trouve autour des grains d'aleurone dans les cellules de la radicule lors de leur désorganisation pourrait représenter les endochromidies ou les »corpuscules métachromatiques« décrits par P. A. Dangeard (1931). Dangeard dit que, sous l'influence des fixateurs ou du rouge neutre, il se sépare des vacuoles le contenu qui y est liquéfié à l'état colloïdal soit sur les bords des vacuoles, soit dans les vacuoles elles-mêmes. Ce sont des corpuscules métachromatiques qui se colorent avec l'hématoxyline ferrique. D'après sa conception les grains d'aleurone ne sont autre chose que les vacuoles deshydratées. Guillaumond (1924 e 1933) n'admet pas qu'il y ait des corpuscules métachromatiques ailleurs que chez les champignons. D'après ses idées à lui, les précipitations vacuolaires qui se développent chez les plantes supérieures sous l'influence des fixateurs sont d'un autre caractère.

Bien qu'il m'eût été difficile à croire qu'il se puissent produire des précipitations telles que naissent dans les vacuoles dans les grains d'aleurone qui ont seulement commencé à recevoir l'eau lors de la germination des graines, j'ai pourtant tâché de tirer au clair si les formes que j'ai obtenues dans mes préparations sont véritablement naturelles, ou si elles sont dues au changement de la phase colloïdale qui se produit par suite de la fixation. C'est pour cela que j'ai fait mes recherches des grains d'aleurone aussi dans le cotylédon où les cellules sont beaucoup plus grandes et où il est facile d'obtenir à l'aide de la main des coupes accessibles à l'observation exacte. Les observations sur les coupes du cotylédon, ont été faites dans l'huile, dans la glycérine, dans la solution 5% de la canne à sucre, dans l'eau et dans le mélange des égales parties du blanc d'oeuf et de la glycérine. J'ai accompli des réactions microchimiques, des colorations vitales et j'ai fixé les cotylédons.

Les grains d'aleurone des cotylédons des graines sèches restent longtemps inchangés dans l'huile et dans la glycérine. Ils montrent un grand globoïde, et dans le grain on aperçoit souvent le cristalloïde. Dans la canne à sucre on obtient une image pareille, mais le grain commence à s'y décomposer assez vite. L'eau commence bientôt à fondre les grains d'aleurone. Il ne fond que le centre, tandis que le bord reste indissous. Les grains d'aleurone se fondent particulièrement vite dans le mélange du blanc d'oeuf et de la glycérine. Mais les bords restent ici aussi indissous, il ne fond que le centre.

Dans les cotylédons gonflés, on peut suivre la désorganisation des grains d'aleurone à toutes les étapes. Dans la partie inférieure du cotylédon qui est plus près de la radicule, le processus de la désorganisation se poursuit beaucoup plus vite que dans le sommet du cotylédon. Dans le sommet du cotylédon les grains d'aleurone sont encore dans un repos parfait et dans les parties inférieures on n'en a trouvé plus de trace, mais on y trouve des chloroplastes déjà tout faits.

Les étapes de la désorganisation des grains d'aleurone sont partout caractérisées par des bords qui sont de différentes formes. Ces bords ne sont dus nullement au changement de la phase colloïdale, ce sont des produits naturels. Je les ai trouvés également dans tous les liquides possibles dans lesquels j'ai observé les coupes, et déjà au commencement de mes observations. J'ai tâché d'obtenir des coupes le plus vite possible sous le microscope pour constater éventuellement si le liquide, dans lequel j'observe les grains d'aleurone, avait quelque influence sur la formation des bords, mais je n'ai pu remarquer aucune influence.

Les bords des grains d'aleurone se fixent avec l'acide osmique et se teignent au grisjaune. Ils se fixent aussi par tous les autres liquides que j'ai employés. Avec l'oxide ils se teignent au brun. Avec le nitrate d'argent ils montrent la réaction de M o l i s c h.

Aux stades plus primitifs, les bords sont compactes, après ils se décomposent dans les grains de plus en plus menus. Parmi les couleurs vitales, ces grains se colorent avec Dahlia. A la fin on ne peut plus trouver de traces des grains d'aleurone dans les cellules des cotylédons, mais on y trouve des chloroplastes.

La figure 6, représente les bords des grains d'aleurone des cotylédons. Le cotylédon est fixé avec le mélange de C a r n o y, et coloré avec l'éosine.

Pour le moment, je peux tirer de mes recherches, dans ce compte rendu, la conclusion que, dans les graines sèches de la courge des plastes forment un tout avec les grains d'aleurone. Les plastes forment le bord des grains d'aleurone dans la désorganisation. Ce bord se décompose à la fin en menus proplastides qui, dans le cotylédons, se changent aussitôt en chloroplastes, et dans la radicule, en leucoplastes, qui, de leur côté, dans les racines développées qui poussent à la lumière, se changent en chloroplastes et, dans les ténèbres, restent des leucoplastes.

Le développement des grains d'aleurone chez la courge lors de la germination prouve la justesse de la conception de l'origine des grains d'aleurone plastidogénique, telle qu'elle a été émise par M o t t i e r (1921) et par V o u k (1925). Comment naissent les grains d'aleurone chez la courge et des détails plus précis sur leur désorganisation, voilà ce que je réserve pour une dissertation prochaine pour laquelle j'ai déjà fait tous les travaux préparatoires et fixé le matériel.

LITERATURE.

- Arnold, Z.: 1925 Peklova hipoteza o mikogenom podrijetlu aleurona. (Peklos Hypothese über den mykogenen Ursprung des Aleurons). Acta Botanica Instituti botanici r. Univ. Zagreb. Vol. I, 1925, p. 32.
- Bowen, R. H.: 1929 Studies of the structure of plant protoplasm II. The plastidome and pseudochondriome. Zeitschr. f. Zellforsch. und mikr. Anat. Bd. 9.
- Dangeard, P.: 1921-1 Sur la formation des grains d'aleurone dans l'albume du Ricin. C. R. Ac. Sc. T. 172, p. 857.
- Dangeard, P.: 1921-2 Sur l'évolution des grains d'aleurone pendant la germination du Ricin. C. R. Ac. Sc. T. 173, p. 1401.
- Dangeard, P.: 1924 Nouvelles remarques sur la cytologie de l'albume de Ricin. Arch. d'anat. micr. T. XX, p. 461.
- Dangeard, P.: 1931 Memoire sur la terminologie des éléments cellulaires et son application à l'étude des Champignons. Le Botaniste, série XXII, fasc. 6, mai 1931.
- Guilliermond, A.: 1924 Nouvelles recherches sur les constituants morphologiques du cytoplasme de la cellule végétale. Arch. d'anat. micr. T. XX, p. 1.
- Guilliermond, A.: 1925 Observations sur l'origine des vacuoles. Cellule, 1925. (Ref. dans Bot. Ctbl., Bd. 8, 1926, H. 10/11).
- Guilliermond, A.: 1926 Appareil de Golgi et canalicules de Holmgren dans la plante de Pois; leur assimilation aux grains d'aleurone et au vacuome. C. R. Soc. Biol. T. XCIV No. 13, p. 993.
- Guilliermond, A. Mangenote G. et Plantefol, L.: 1933. Traité de cytologie végétale. Paris, Le François, 1933.
- Mottier, D. M. 1921 On certain plastids, with special reference to the protein bodies of Zea, Ricinus and Ionopholis. Annals of Botany, Vol. 35, p. 349.
- Vouk, V.: 1925 Über den plastidogenen Ursprung der Aleuronkörner. Acta Botanica Inst. Bot. r. Univ. Zagreb. Vol. I, 1925, p. 37.
- Wagner, N.: 1929 Le chondriome de l'embryon chez Cucurbita pepo dans la graine sèche et pendant la germination. C. R. Ac. Sc. T. 189, séance du 30 dec. 1929, p. 1902 et 1903, (avec 3 fig. dans le texte).
- Wagner, N.: 1930 Le chondriome des embryons des graines au cours de la maturation et de la germination. Arch. d'anat. micr. T. 26, p. 419.

TABLE DES FIGURES.

- Fig. 1 — Cellule de la radicule qui n'a pas encore percé la cosse séminale. Al — grains d'aleurone à l'étape de désorganisation. Fixé d'après Benda, teint avec la safranine, le violet de Gentiana et l'orangé. Les bords des grains d'aleurone sont colorés avec le violet de Gentiana.
- Fig. 2 — Cellules de la courge provenant de la radicule qui n'a pas encore percé la cosse séminale. N — noyau; Al — grains d'aleurone à l'étape de désorganisation. Fixé d'après Benda, coloré avec la safranine, avec le violet de Gentiana et l'orangé. Les nucleoles sont teints avec la safranine, et les bords des grains d'aleurone avec le violet de Gentiana.
- Fig. 3 — Cellules promeristemiques provenant de la radicule; germe de la radicule latérale. P — proplastides. L — leucoplastes. Méthode de Regaud.
- Fig. 4 — Cellule provenant de la radicule de la courge au stade de la gonflément. N — noyau, Al' — grains d'aleurone au premier stade de la désorganisation. Al — grains d'aleurone dans repos. Méthode de Regaud.
- Fig. 5 — Cellule provenant de la radicule qui vient de percer la cosse séminale. N — noyau, V — vacuoles, P — proplastides. Méthode de Regaud.
- Fig. 6 — Stade de la désorganisation complète des grains d'aleurone dans les cellules du cotylédon. Fixé avec le mélange de Carnoy, teint avec l'éosine.