

Applications de la Mole à l'identification de composés puriques et de sels minéraux sur coupes histologiques

par Michel Truchet, Micheline Martoja *, Roger Martoja et Christiane Ballan-Dufrançais

(Université Pierre-et-Marie Curie, Laboratoire d'histophysiologie fondamentale et appliquée, ERA n° 570 du CNRS, 12, rue Cuvier, 75005 Paris et * Institut Océanographique, 196, rue Saint-Jacques, 75005 Paris)

Application of the Mole microprobe to the identification on histologic cross-section of puric components and mineral salts

The identification, at the cellular or tissue level, of organic or mineral molecules, is necessary to explain certain aspects of the physiology or pathology of cells and organisms. But, except in some rare cases, the cytochemical techniques reveal either functions which are common to several types of molecules, or elements which are part of undeterminable chemical combinations. The Mole microprobe should enhance these insufficient methods as we have demonstrated its value in the following studies :

1. Identification of puric components :

Numerous animals accumulate their excretion products in specialized tissues, under form of « concretions ». These concretions may contain some puric waste (uric acid, salts from uric acid, guanine, allantoin, etc...) which cannot be distinguished with any cytochemical technique. With the Mole microprobe their identification has been relatively easy; the following concretions have thus been determined, even when mixed

with accumulation structures : uric acid, potassium urate, sodium urate, guanine, xanthine (1).

2. Identification of mineral salts :

The accumulation of copper by animals, which are a part of the human food chain, is at present time an important subject because it could be the consequence of an environmental contaminate. Consequently, it is important to determine with precision the origin of the metal, as well as its chemical form. The microprobe has permitted determination that a portion of the copper accumulated by marine molluscs is due to the degradation of an endogenous metalloprotein, and that the metal has the form of copper sulfide (2).

At the moment, we are researching the pathological mineralizations induced by mercury in the kidneys of rabbits; apatite and calcitic were identified without any difficulty (3).

La composition des êtres vivants peut être déterminée par l'analyse chimique classique dont le défaut majeur est de détruire l'architecture de la matière vivante. Or, de nombreux processus physiologiques ou pathologiques ne peuvent être parfaitement compris que si les constituants chimiques identifiés sont replacés

dans leur cadre morphologique. La nécessité de connaître leur localisation à l'échelle de la cellule ou de l'organite, a conduit à la mise au point de méthodes « non destructives ». Les premières ont été les méthodes *cytochimiques* qui essaient de concilier les avantages de l'histologie et de la chimie mais doivent subir les impératifs de l'une et de l'autre. Ce compromis entraîne de nombreux inconvénients, le principal étant le manque de spécificité qui caractérise la plupart d'entre elles. Dans le cas de macromolécules organiques, cette absence de spécificité tient au fait que les réactions décèlent une fonction commune à plusieurs types de molécules ou même plusieurs fonctions. Ainsi, une méthode très courante repose sur l'oxydation périodique et révèle toutes les molécules contenant le groupement glycol-2,3, comme le glycogène, le galactogène, des glycoprotéines.

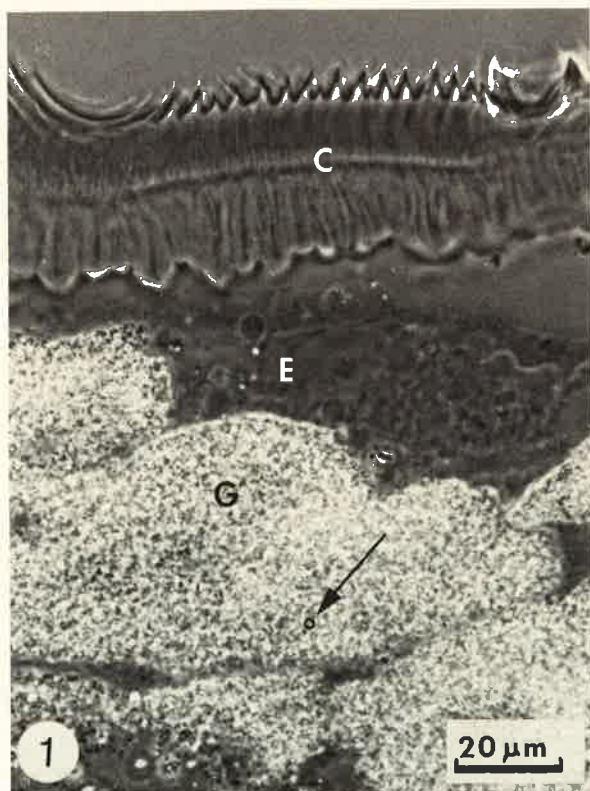


Figure 1. Araignée.

Coupe de 7 microns d'épaisseur montrant sous la cuticule (C) et l'épithélium (E), des guanophores (G) remplis de petites concrétions. ○ Aire d'impact de la sonde.

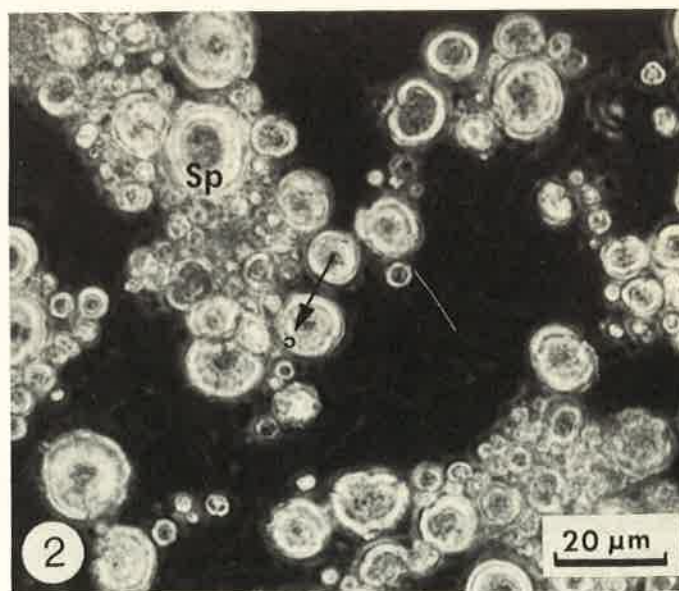


Figure 2. Tissu adipeux de Blatte.

Coupe de 7 microns d'épaisseur, montrant les volumineuses concrétions en forme de sphérocristaux (Sp). ○ Aire d'impact de la sonde.

Dans le cas des sels minéraux, les réactions cytochimiques donnent souvent des résultats périodiques pour les éléments d'un même groupe de la classification périodique. Récemment, les méthodes *histophysiques* utilisant les « microanalyseurs élémentaires » (1), ont permis à la fois d'identifier les éléments de façon élective et de les localiser avec une précision allant jusqu'à l'organite. Toutefois, elles ne donnent pas d'indication sur la composition moléculaire des dépôts minéraux

alors que, bien souvent, l'extrême complexité de ceux-ci exclut la moindre hypothèse basée sur la seule composition élémentaire.

La microsonde moléculaire doit pallier ces insuffisances. Quelques exemples montreront qu'elle est applicable à l'analyse de coupes histologiques, au moins quand les molécules à identifier atteignent une certaine concentration dans le volume à analyser.

I. Identification de molécules organiques (2)

De nombreux animaux, surtout Invertébrés, accumulent certains de leurs produits d'excrétion dans des tissus spécialisés. Les méthodes biochimiques montrent que ce sont des composés puriques variés, acide urique, guanine, xanthine ou allantoïne, mais elles n'indiquent ni leur localisation, ni les sels qu'ils peuvent former. Quant aux méthodes cytochimiques, elles précisent qu'ils sont souvent amalgamés en concrétions (Figures 1 et 2), mais elles ne peuvent les distinguer les uns des autres en raison des similitudes de leurs formules chimiques. Nous avons donc analysé, par sonde Mole, les organes suivants :

1. Tégument de Poissons et d'Araignées : le spectre Raman confirme la présence de guanine (Figure 3).

2. Tégument de Criquet : les spectres Raman mettent en évidence un mélange d'acide urique, d'urate de potassium et d'urate de sodium

dans des cristaux qui étaient supposés constitués d'urate de potassium.

3. Tissu adipeux et utricule de Blatte : on considérait qu'il s'y accumulait de la xanthine et de l'acide urique peut-être sous forme de sels. La xanthine n'apparaît pas sur le spectre Raman mais, en revanche, on constate que l'acide urique coexiste avec ses sels de sodium et de potassium (Figure 4).

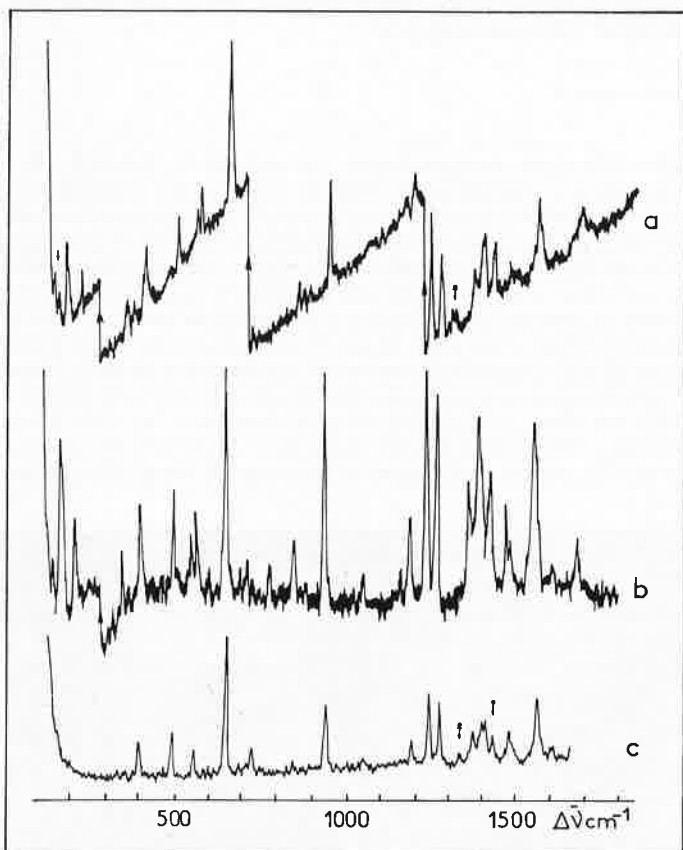


Figure 3. Spectres obtenus sur le guanophore d'Araignée (a), un échantillon de guanine pure (b) et un guanophore de Poisson (c). Toutes les raies caractéristiques de la guanine, déterminées sur le spectre de référence, se retrouvent pour les deux animaux; on remarquera particulièrement la raie de vibration intermoléculaire à 142 cm^{-1} qui apparaît bien chez l'Araignée (↓). En revanche, on observe des raies à 1320 (‡) et à 1450 (†) qui n'appartiennent pas à la guanine et qui doivent représenter un composé d'accompagnement présent dans les concrétions des deux animaux.

Aucun des spectres n'a été corrigé pour la fluorescence; on notera donc que celle-ci est absente dans le spectre de guanophore de Poisson; cet inconvénient grave n'est donc pas entièrement lié au mode de préparation des coupes histologiques.

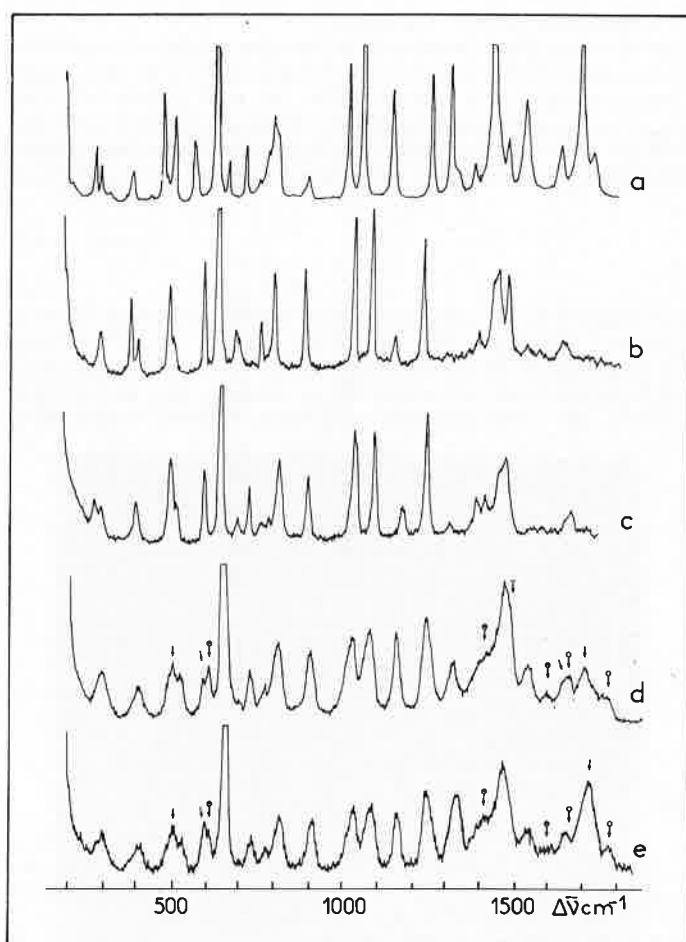


Figure 4. Spectres d'acide urique pur (a), d'urate de sodium pur (b), d'urate de potassium pur (c), de sphérocrystal de tissu adipeux de Blatte (d) et de sphérocrystal d'utricule de Blatte (e). Les spectres de référence présentent de grandes similitudes entre eux de 200 à 1300 cm^{-1} , et des différences entre 1400 et 1700 cm^{-1} : les principaux pics de l'acide urique font défaut dans les urates; ceux-ci présentent chacun un doublet qui permet de les identifier, ainsi qu'une raie vers 1650 cm^{-1} , faible, et décalée d'un sel à l'autre. Ces différents caractères permettent de reconnaître, au niveau des sphérocristaux, un mélange d'acide et d'urates. Si l'on se réfère à la raie 1680 , il semble y avoir plus d'acide urique dans les utricules que dans les tissus adipeux. L'épaulement situé vers 1640 sur le spectre de tissu adipeux permet d'identifier l'urate de sodium, plus difficile à reconnaître sur le spectre d'utricule. ↓ ac. urique; † urate de Na; ‡ urate de K; † urates de Na et K.

4. Rein d'Escargot : l'organe était censé contenir de l'acide urique peut-être sous forme de sels, de la guanine et de la xanthine. La spectrographie Raman confirme la présence d'acide urique et de xanthine mais non celle de guanine. Il existe de l'urate de potassium ; par contre, il est impossible de se prononcer entre urate et xanthate de sodium.

La microsonde Mole montre donc qu'au sein d'une même structure coexistent plusieurs composés puriques souvent sous forme de sels. Malgré quelques difficultés d'interprétation ou l'impossibilité d'identifier certains composés, sans doute trop peu concentrés, elle apporte des données qu'aucune méthode n'était susceptible de fournir, jusqu'à présent.

II. Identification de sels minéraux

1. Rein des Mammifères (3) : lors d'une étude expérimentale sur les effets cytologiques du mercure, nous avons provoqué la calcification des cellules du rein, déjà connue (Figure 5). A la microsonde Mole, les cristaux présentent les raies les plus caractéristiques de l'apatite et de la calcite (4) (Figure 6). L'importance de la minéralisation a permis d'identifier également l'apatite par diffraction des rayons X, sur une poudre isolée à partir du rein ; dans les cas où la calcification serait moindre, la microsonde Mole devrait permettre à elle seule de déterminer la composition moléculaire des calculs intracellulaires.

2. Cellules « conjonctives » du Bigorneau (5) : L'accumulation de cuivre par des animaux entrant dans la nourriture humaine est un sujet de préoccupation, dans la mesure où elle pourrait être la conséquence d'une pollution de l'environnement. Or, les dosages effectués chez les Bigorneaux indiquent une teneur très élevée dont il importe de déterminer l'origine. A l'examen histologique, le tissu conjonctif de ces animaux apparaît pourvu de nombreuses cellules à granulations gris-noir où la microsonde électronique révèle de fortes concentrations de cuivre et de soufre (Figure 7). L'étude ultrastructurale montre que ces cellules filtrent, à partir de l'hémolymphe, des protéines qui sont dégradées dans des lysosomes où s'accumulent le

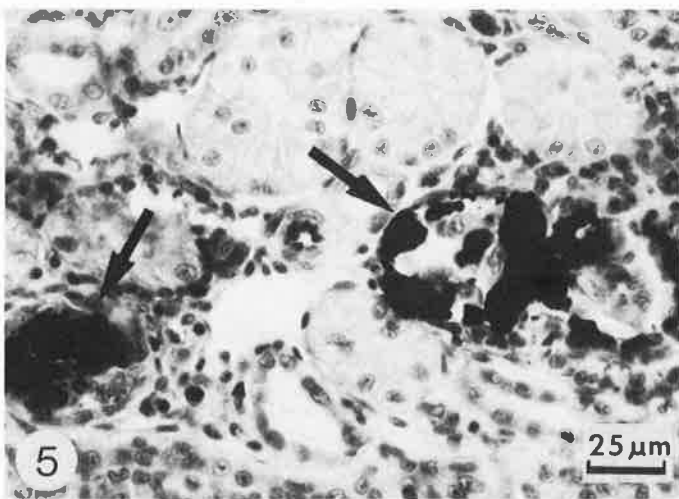


Figure 5. Rein de Lapin intoxiqué par HgCl_2 . Coupe de 7 microns d'épaisseur. Certains néphrons (flèches) sont calcifiés.

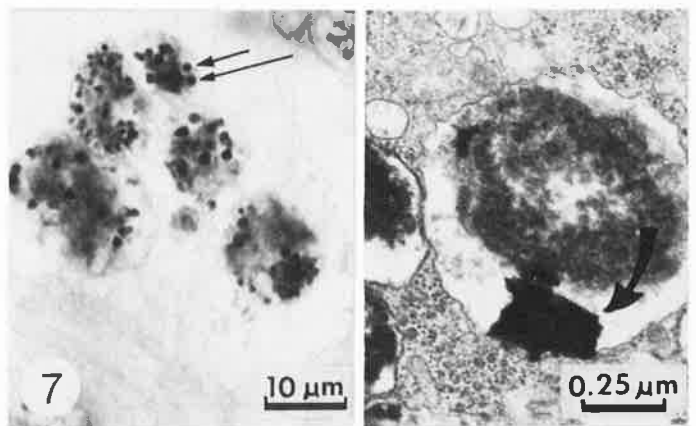


Figure 7. Cellules conjonctives de Bigorneau.

A gauche, coupe de 7 microns d'épaisseur montrant les nombreuses granulations (flèches). A droite, micrographie électronique montrant l'ultrastructure d'une granulation (lysosome) qui renferme le précipité analysé (flèche).

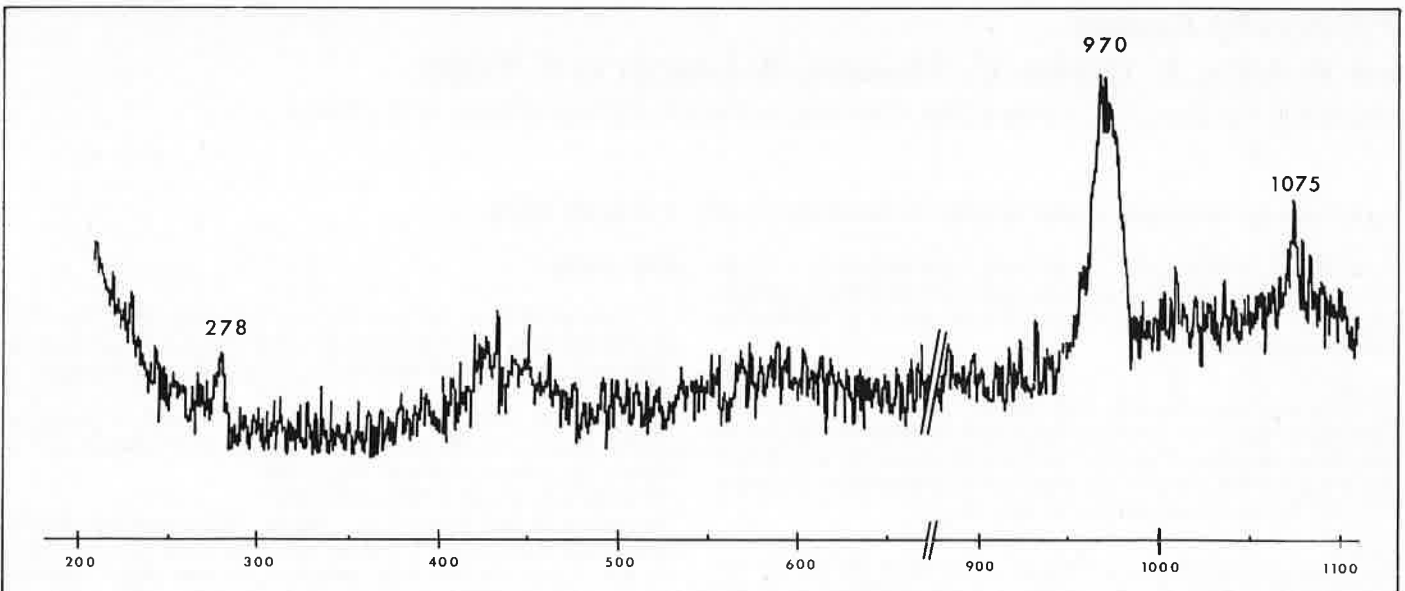
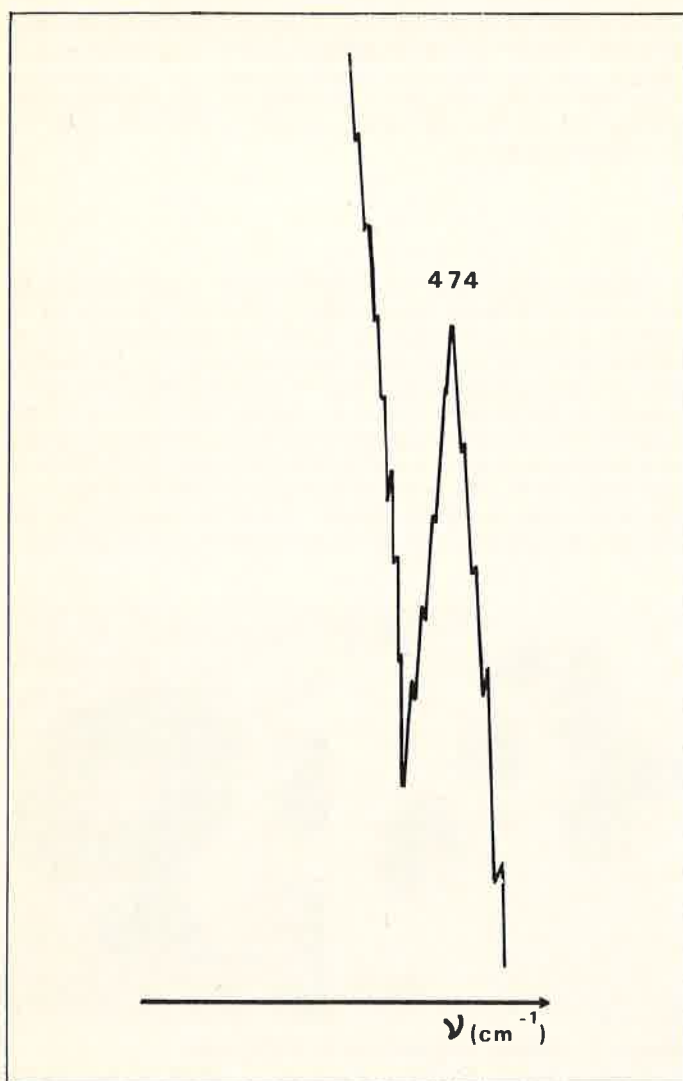


Figure 6. Spectre d'un néphron calcifié.

On observe à 970 cm^{-1} une raie intense qui correspond à la vibration d'élongation symétrique du groupement P-O, et à 1075 cm^{-1} une raie moins intense du même type de vibration du carbonate C-O. Ces raies majeures permettent d'identifier phosphate et carbonate de calcium. La présence d'une raie à 278 cm^{-1} permet de rapporter à la calcite, et non à l'aragonite, le carbonate de calcium. Apatite et calcite sont donc les constituants majeurs de ces calculs rénaux.



cuivre et le soufre. Le spectre Raman présente, quant à lui, une raie caractéristique du sulfure cuivrique CuS (Figure 8). Des arguments tirés de la cytophysiologie comparée autorisent à affirmer que le sulfure cuivrique provient de la dégradation de l'hémocyanine, cupro-protéine qui, chez les Mollusques, assure le transport de l'oxygène respiratoire. Une partie au moins du cuivre accumulé par le Bigorneau n'est donc, en aucune manière, liée à une pollution. Outre l'intérêt écologique de cette constatation, la microsonde Mole met en évidence des faits originaux relatifs au catabolisme de l'hémocyanine : le sulfure de cuivre est l'homologue de la ferritine, produit de dégradation de l'hémoglobine chez les Vertébrés.

En conclusion, dans les conditions où elle est actuellement appliquée à l'analyse de coupes histologiques, la microsonde Mole est capable d'identifier des molécules organiques ou minérales avec une spécificité jamais atteinte auparavant. La fluorescence émise par les tissus constitue malheureusement dans bien des cas, un handicap limitant l'emploi de la méthode.

Bibliographie

- (1) F. Maurice, L. Meny et R. Tixier, *Microanalyse et microscopie électronique à balayage*. Éd. Physique, Orsay, 1978.
- (2) C. Ballan-Dufrançais, M. Truchet et P. Dhamelincourt. *Biol. Cell.*, 1979, **36**, 51.
- (3) R. Martoja, C. Raynaud et M. Truchet, en préparation.
- (4) M.T. Vemec-Peyré et H. Jaesche-Boyer, *CR. Acad. Sci. D*, 1978, **287**, 607.
- (5) M. Martoja, V. Tan Tue et B. Elkaim. *J. Exp. mar. Biol. Ecol.*, 1980, **43**, à paraître.

Figure 8. Segment de 450 à 500 cm^{-1} du spectre des concrétions du Bigorneau.

En dépit d'une pente de fluorescence exceptionnellement abrupte, un pic se détache nettement à 474 cm^{-1} . L'analyse d'un échantillon de sulfure cuivrique montre le même pic, dû à une vibration intermoléculaire S-S. En raison des conditions défavorables de l'enregistrement, l'intensité du pic indique que la concentration du sulfure doit être très élevée dans le volume analysé ; de ce fait, la taille du précipité doit être importante, ce que confirme l'examen au microscope électronique (figure 7).

Études spectroscopiques *in vivo* de cellules végétales bioluminescentes : *Pyrocystis Lunula*

par B. Arrio, A. Dupaix, C. Fresneau, B. Lecuyer et P. Volfin

(Institut de Biochimie, E.R. 118 du CNRS, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91405 Orsay)

« *In vivo* » spectroscopic studies of plant bioluminescent cells : *Pyrocystic lunula*

According to DeSa and col. (1) and some other authors (2 - 3), the emission of light in dinoflagellated algae like *Noctiluca miliaris*, *Gonyaulax polyedra* and *Pyrocystis lunula*, should be localized in cellular organelles.

Nevertheless, this particular material has not yet been identified without ambiguity by electron microscopes in integral cells nor in subcellular fractions obtained by zonal centrifugation. The existence of microsomes, which would be the center of the light emission, continues to be the object of contradictory articles (4 - 9).

The scanning and imaging techniques are of particular interest for obtaining information on the localization of intra-cellular constituents and the observation of enzymatic reactions.

We wish to present here the first results that we obtained in this field with the Mole on the *Pyrocystis lunula* cells.

Bibliography

- (1) DeSa R., Hasting J.W. and Vatter A.E., *Science*, 1963, **141**, 1269.
- (2) Afselius B.A. and Halyarson M., 1964, *Third european regional Conference on electron microscopy*, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 175.
- (3) Eckert R., 1966, *Excitation and luminescence in Noctiluca miliaris* in « *Bioluminescence in Progress* ». F.H. Johnson and Y. Haneda eds, Princeton Univer. Press, 269.
- (4) Eckert R., *Science*, 1965, **147**, 1140.
- (5) Sweeny B. and Bouck G.B., 1966, in « *Bioluminescence in Progress* », F.H. Johnson and Y. Haneda eds, Princeton Univer. Press, 331.
- (6) Lee J. and Wissous M.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, **30**, 105.
- (7) Schmitter R.E., *J. Cell. Sci.*, 1971, **11**, 147.
- (8) Fogel M., Schmitter R.E. and Hastings J.W., *J. Cell. Sci.*, 1972, **11**, 305.
- (9) Henry J.P. and Hastings J.W., *Mol. Cell. Biochem.* 1974, **3**, 81.