

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 : *Pyrocystis 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.

Les techniques permettant d'obtenir des spectres résolus dans le temps et des images d'un objet à une longueur d'onde donnée sont parfaitement adaptées à l'étude de la localisation de réactions enzymatiques à l'intérieur d'une cellule. La localisation *in situ* et *in vivo* d'une réaction enzymatique relève de la notion de compartiment cellulaire, c'est-à-dire de l'existence de pools métaboliques évoluant en fonction du temps et du milieu extérieur. Un exemple de ce genre de problème est celui posé par la bioluminescence des algues appartenant aux Dinoflagellés.

L'émission de lumière observée par stimulation chimique, mécanique ou électrique de ces cellules est un éclair dont la durée varie de 100 msec. à 2 sec. Eckert (1) a montré, par microscopie de fluorescence, l'existence de microsources de lumière à l'intérieur du cytoplasme de *Noctiluca miliaris*. La dimension de ces sources fut estimée à 3 μm de diamètre. Cette observation a été à l'origine de la théorie des scintillons : organites cellulaires spécifiques de la bioluminescence des Dinoflagellés.

La bioluminescence n'étant qu'une fluorescence stimulée lors de la réaction d'oxydo-réduction du substrat (la luciférine) catalysée par l'enzyme (la luciférase), un appareil tel que la Mole était susceptible d'apporter des informations sur les sites lumineux grâce aux spectres de fluorescence et Raman de résonance.

La photo 1 est un cliché d'une cellule de *Pyrocystis lunula*. La dimension de la cellule est de 100 μm , environ.

La photo 2 présente un cliché d'une autre algue, *Pyrocystis fusiformis*, de dimension voisine.

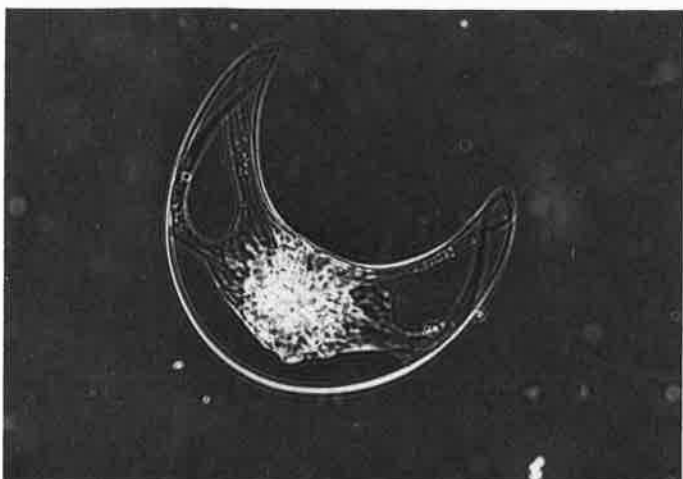


Photo 1



Photo 2

Le spectre d'émission de bioluminescence, obtenu *in vitro*, est donné sur la photo 3. Son maximum est situé à 475 nm et varie peu d'une espèce à l'autre.

En excitant à 457,9 nm, on peut observer le spectre d'émission du cytoplasme. Sur ce spectre (photo 4) on distingue un pic majeur,

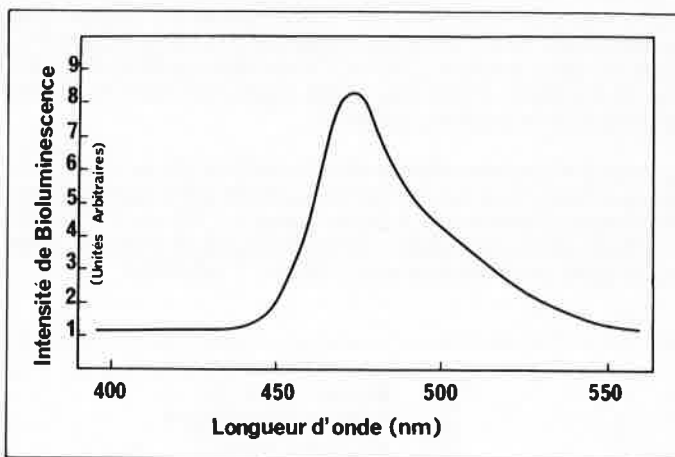


Photo 3

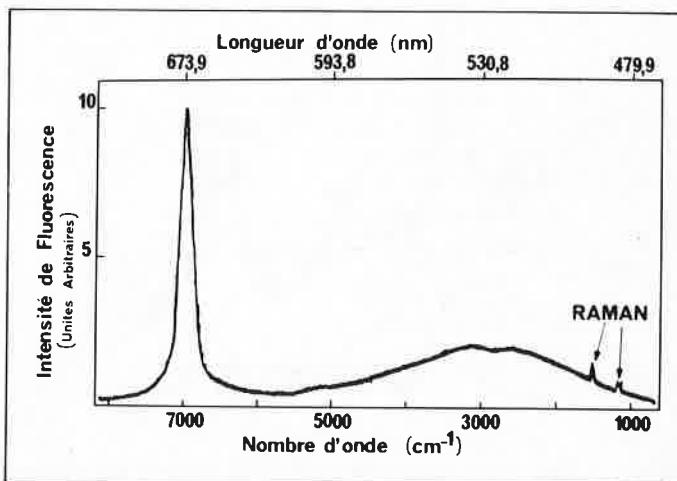


Photo 4

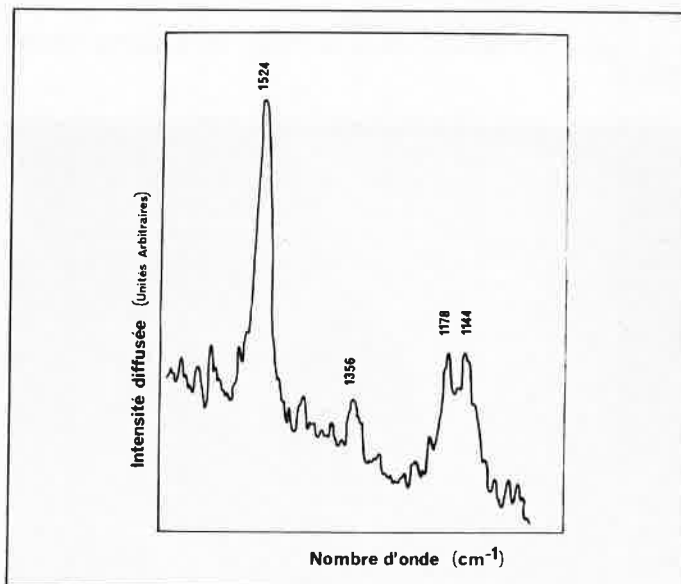


Photo 5

centré à 674 nm, correspondant à l'émission de fluorescence de la chlorophylle et une bande moins intense, mais très large, présentant au moins 2 maxima à 540 et 520 nm qui pourraient être attribués à la luciférine oxydée. On observe également, perchées sur cette bande de fluorescence, deux bandes Raman caractéristiques des caroténoïdes. La photo 5 présente le détail du spectre Raman de résonance dans la région comprise entre 1600 et 1000 cm^{-1} . La bande centrée à 1524 cm^{-1} peut être attribuée à la vibration d'élongation des doubles liaisons conjuguées. La bande centrée à 1160 cm^{-1} est caractéristique de la vibration d'élongation des simples liaisons C-C. L'une des raies, centrée à 1356 cm^{-1} et de faible intensité, n'a pu être encore attribuée. Cette raie existe également dans le spectre infrarouge de la luciférine purifiée.

Le complexe protéine-caroténoïde-chlorophylle de ces algues a été purifié et nous avons retrouvé sur la poudre le même spectre Raman de résonance à l'exception de la raie centrée à 1356 cm^{-1} . Ceci peut être expliqué soit par l'absence de luciférine dans la préparation soit par la faible intensité de la raie 1356 cm^{-1} . (Photo 6.)

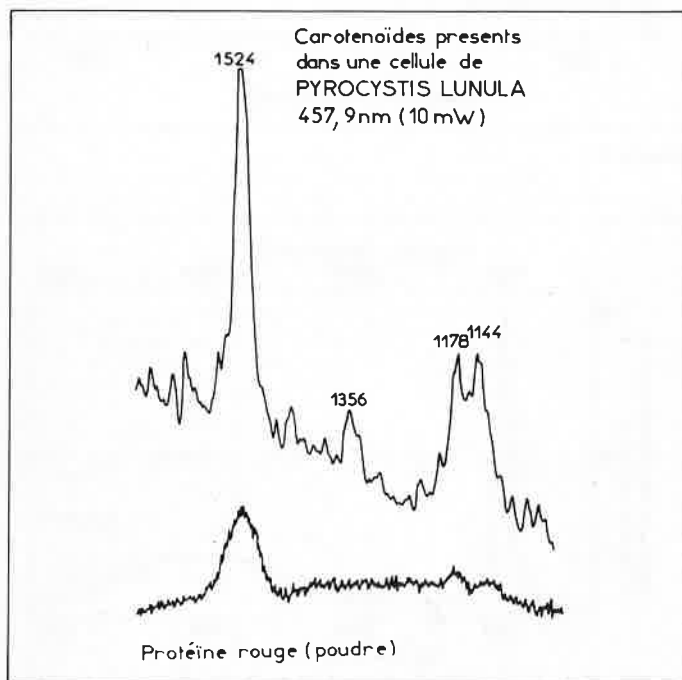


Photo 6

Les clichés suivants montrent la localisation des différentes fluorescences et diffusion Raman :

● la photo 7 présente la cellule de *Pyrocystis lunula* en lumière blanche,

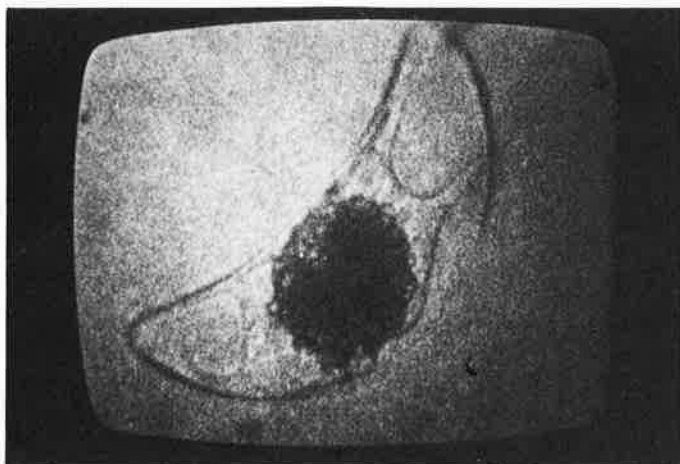


Photo 7

● la photo 8 montre la localisation de la fluorescence à 674 nm de la chlorophylle (excitation 457,9 nm),
 ● les photos 9, 10 et 11 montrent l'image de la même cellule à 480, 520 et 540 nm.

On remarque que les fluorescences observées à 480, 520 et 540 nm correspondent à une zone bien délimitée du cytoplasme, située dans la même région que l'appareil photosynthétique caractérisé par la fluorescence chlorophyllienne à 674 nm.

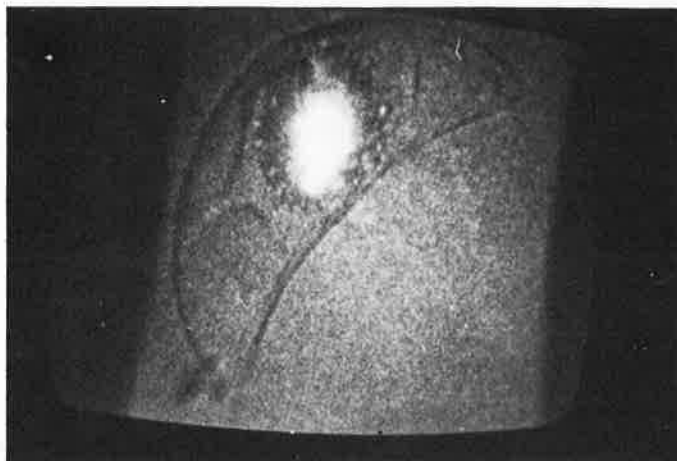


Photo 8

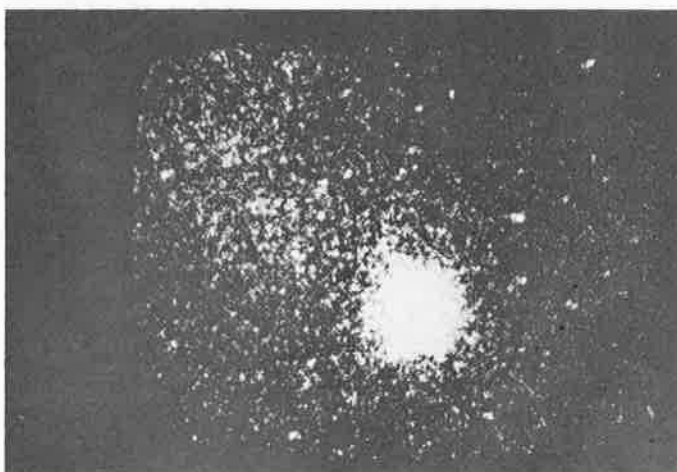


Photo 9



Photo 10

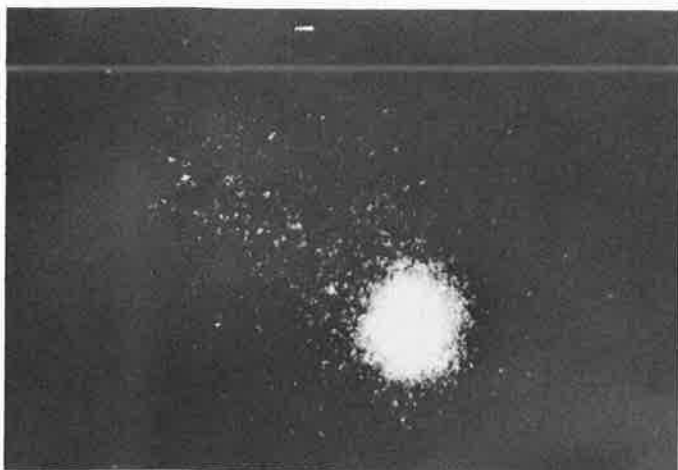


Photo 11

Les photos 12, 13 et 14 présentent la comparaison entre une cellule observée en lumière blanche (12), l'émission de fluorescence à $1\,450\text{ cm}^{-1}$ (13) et l'intensité de la raie Raman à $1\,524\text{ cm}^{-1}$ (14). Dans la

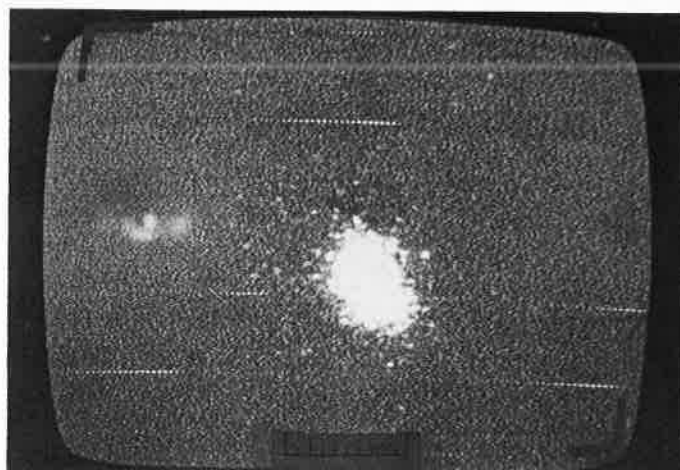


Photo 14

limite de résolution de l'appareil, on observe une plage de lumière et non pas des sources individualisées, ce qui signifie soit l'accolement des sources, soit l'absence de microsources.

Par excitation chimique, nous avons pu observer l'émission de bioluminescence (photo 15). Cette émission est localisée au même endroit que les différentes fluorescences observées précédemment.

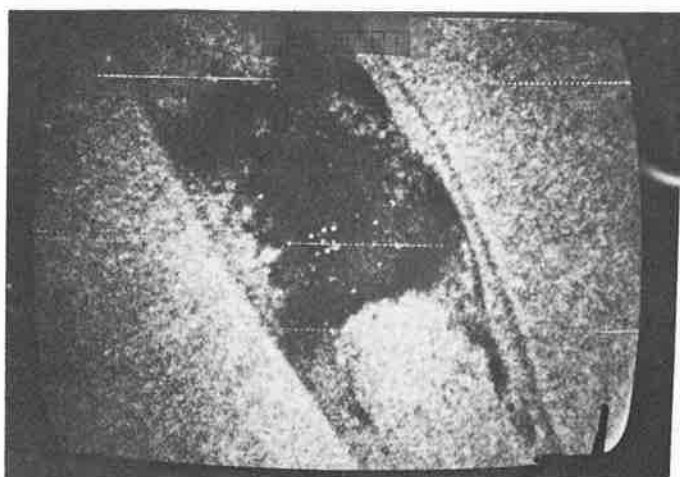


Photo 12



Photo 15

Toutes ces études montrent que la luciférine n'est pas un produit d'excrétion de la cellule de *Pyrocystis*. La bioluminescence et la fluorescence sont uniquement localisées dans le cytoplasme. Les images obtenues montrent une surface quasi continue strictement localisée et nous n'avons jamais observé de fluorescence ou de bioluminescence au niveau des vacuoles, de la membrane ou de la paroi cellulaire. La surface fluorescente caractéristique de la luciférine recouvre la zone où se situe l'appareil photosynthétique et ne semble pas constituée de sources lumineuses individualisées, dans la limite de résolution de la Mole.

Bibliographie

Eckert, R. and Reynolds, G.T. *J. Gen. Physiol.*, 1967, **50**, 1429.

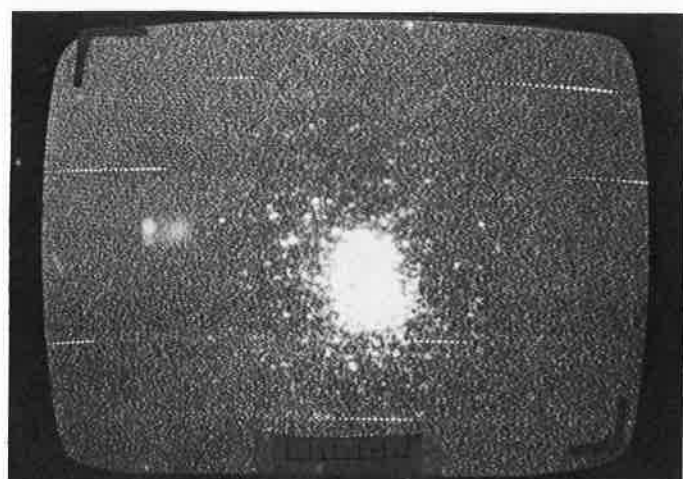


Photo 13