

Structure calcitique inframicroscopique de grains de sécrétion microniques chez les myxomycètes

par M. Locquin* et H. Jaeschke-Boyer**

(* École Pratique des Hautes Études, Laboratoire de micropaléontologie, 8, rue de Buffon, 75005 Paris et ** Laboratoire d'application ISA Jobin-Yvon, 16, rue du Canal, Longjumeau)

Inframicroscopic calcitic structure of grains of micronic secretion in Myxomycetes

The Myxomycetes are mushrooms which produce three types of structures in their plasma phase: reproductive spores, fibrous capillaries for dissemination of the spores and secreted grains more or less mineralized. The order of the Physarales is divided into two families. In the Physaraceae the secretion grains are small calcareous spheres which were previously thought to be amorphous, but with the use of the polarizing microscope, were found to be crystalline. In the Didymiaceae secretion grains are acicular crystals twinned to stars or

sea-urchins. We re-examined these two types of calcareous grains with the Mole microprobe. Both of them show the characteristic peaks of calcite at 1 090, 715 and 280 cm⁻¹.

The small spheres of the Physaraceae are about 1,5 µ in diameter. Their partition wall, as measured with a transmission electron microscope, is only 0.05 to 0.08 µ wide. In spite of this extreme thinness, the Mole produced perfectly defined spectra of calcite.

Introduction

Les Myxomycètes sont des champignons appartenant à la subdivision *Myxomycotina* du règne des *Chitinobiontes* (Martin et Alexopoulos, 1969 et Locquin, 1975 et 1980). Ils sont connus depuis le Dévonien (Locquin, 1980). Leur plâsmode, sorte d'amibe gigantesque puisqu'il peut atteindre une surface de l'ordre du mètre carré, est mobile sur son support. Il élabore à son intérieur les spores reproductrices et des structures variées sur la fonction desquelles tous les auteurs ne sont pas d'accord. Il s'agit des capillites ou capillitiums, filaments stériles de formes et d'ornementations variées suivant les genres, et des inclusions plus ou moins minéralisées, appelées granules ou cristaux suivant que leur aspect évoque plus ou moins leur nature. On a séparé dans l'ordre des *Physarales* tous les

Myxomycètes contenant du carbonate de calcium, parfois en grande quantité : plus de 95 % du poids sec chez *Mucilago spongiosa* par exemple. Si la nature chimique des inclusions des *physarales* ne faisait aucun doute, du moins récemment, car certains auteurs avaient émis l'hypothèse que les cristaux de *Didymiaceae* étaient du sulfate de calcium, il n'y avait jusqu'ici aucune preuve de la nature du système cristallin. L'apparence morphologique très éloignée des inclusions des *Physaraceae* et des *Didymiaceae* ne laissait pas supposer une identité de système cristallin. La plupart des auteurs ont décrit les sphérules des *Physaraceae* comme étant composées de calcaire microgrenu et amorphe.

Accumulation des cations

Comme les insectes, les champignons peuvent concentrer considérablement les cations, même peu abondants dans leur environnement, même toxiques pour les plantes et les animaux supérieurs. Cette concentration se fait selon un processus analogue à celui mis en évidence chez les insectes par Marjota *et al.* (1975). Parmi ces cations le plus fréquent et le plus abondant est le calcium, sous forme de carbonate.

Nous avons choisi pour notre étude deux espèces communes en Europe et dans le monde : une appartenant aux *Physaraceae* : *Fuligo septica*, l'autre appartenant aux *Didymiaceae* : *Mucilago spongiosa*. Dans les deux cas leurs inclusions ont été préalablement observées en microscopie photonique en lumière naturelle et polarisée, en microscopie électronique à balayage, en microscopie électronique par transmission et en microscopie électronique à contraste de phase (Locquin, 1953, 1956).

En lumière polarisée, la nature cristalline de leurs inclusions ne fait aucun doute. La ténuité de la paroi des sphérules creuses de *Fuligo septica* rend la détermination du signe de la biréfringence peu aisée. Avec un compensateur elliptique de Brace-Köhler on peut établir que la biréfringence des sphérules est composite : biréfringence de forme, plus biréfringence de structure. L'ensemble est sphérique et donne le phénomène de la croix noire visible seulement en coupe optique équatoriale de la sphérule qui a en moyenne 1,6 µm de

diamètre. La biréfringence est négative par rapport à la surface des sphérules.

Les cristaux mâclés en croix ou en oursin de la *Didymiaceae* : *Mucilago spongiosa* sont des rhomboèdres ou des scalénoèdres. Le microscope électronique à balayage (figures 1 et 5), rend bien visible l'état de surface de ces inclusions, mais ne permet pas de déterminations du système cristallin.

Au microscope électronique par transmission l'épaisseur des cristaux est trop grande pour obtenir chez *Mucilago spongiosa* une image autre que celle de leurs contours, par contre la diversité des mâcles en croix, en V, en éventail, en oursin est bien visible sur la figure 2.

Seul le microscope électronique à contraste de phase (selon Locquin, 1953, 1956) permet une analyse fine de la structure des sphérules (figure 4). Entièrement vides, les sphérules de *Fuligo septica* ont une paroi très fine de l'ordre de 100 nm d'épaisseur. La surface des sphérules semble subtilement réticulée. Cette ornementation fait penser à des endosymbiotes oncogènes (Locquin, 1980). Il ne faut pas confondre ces sphérules avec des bactéries endosymbiotes communes chez les Myxomycètes et plus grosses (figure 5). Sur ces figures, au microscope électronique par transmission on pourrait presque douter de la présence de calcium tant le contraste est faible.

Inclusions minéralisées des *Physarales*, *Didymiaceae* (figures 1, 2, 3) et *Physaraceae* (figures 4, 5, 6).

Les figures 1 et 5 ont été obtenues au microscope électronique à balayage, la figure 2 au microscope électronique à transmission et la figure 4 au microscope électronique à contraste de phases. Les courbes des figures 3 et 6 ont été tracées à la Mole avec un faisceau laser condensé sur l'échantillon en une plage de l'ordre du micron.



Figure 1. Assemblage mâclé en étoile de cristaux de calcite, *Mucilago spongiosa*.

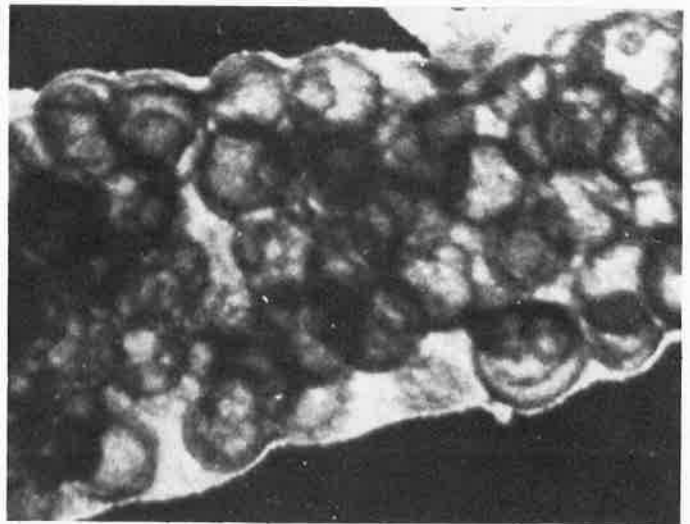


Figure 4. Sphérules creuses du capillitium des *Physaraceae*, ici : *Fuligo septica*. Ces sphérules sont empâtées dans une expansion du capillitium non minéralisée.



Figure 2. Assemblages mâclés en étoiles ou en oursins des mêmes.

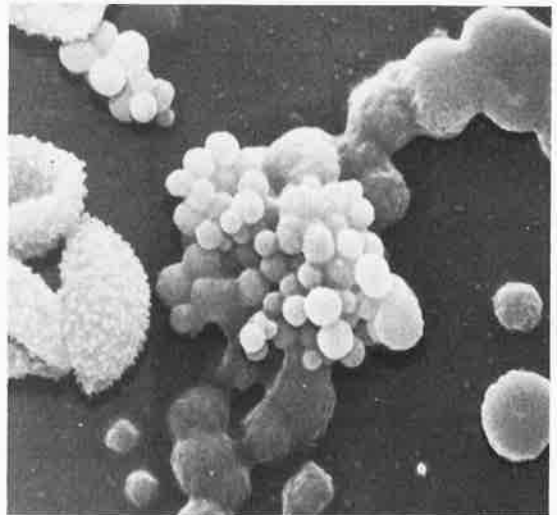
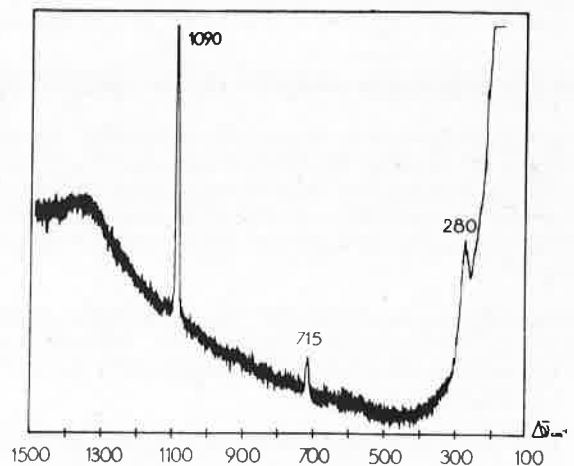
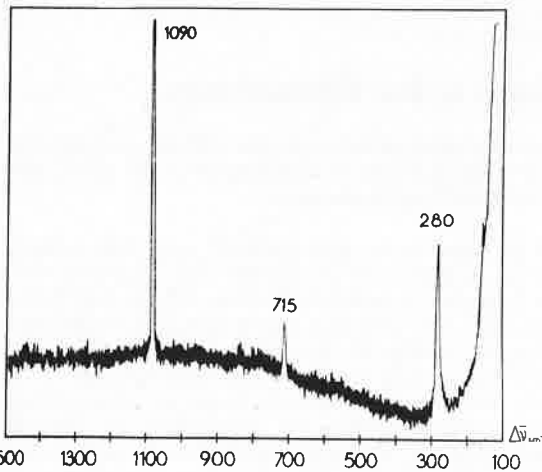


Figure 5. Spores, bactéries, symbiotes et sphérules des mêmes, examinée au microscope électronique à balayage. Les spores ornées sont à gauche de la figure, les bactéries de plusieurs tailles sont faiblement rugueuses et les sphérules sont presque lisses en amas au centre de la figure.



Figures 3 et 6. Spectres Raman obtenus sur cristaux de *Didymiaceae* (3) et *Physaraceae* (6). Les raies 1 090 et 715 cm^{-1} sont dues à CO_3^{2-} et 280 cm^{-1} au réseau calcitique.

Analyse à la Mole

L'analyse à la Mole met en évidence, dans les deux cas, chez *Fuligo septica* comme chez *Mucilago spongiosa*, de la calcite repérée par les pics caractéristiques à 1 090, 715 et 280 cm^{-1} . Il ne fait plus pour nous aucun doute : c'est bien de la calcite qui constitue les inclusions minérales des *Physarales*. Le prétendu calcaire microgrenu, amorphe, des *Physaraceae* est en fait une sphérule creuse à paroi protéique ou protéo-glucidique incrustée de microcristaux de calcite, ces microcristaux étant orientés selon une structure d'ensemble sphérique négative.

Conclusion et bibliographie

L'analyse spectrographique Raman-laser, à l'aide de la Mole Jobin-Yvon, permet de mettre en évidence la nature calcitique des inclusions minéralisées des *Myxomycetes Physarales*, bien que la dimension des organites analysés soit de l'ordre de 1,6 μm .

Voies bibliographiques

En plus de la bibliographie générale sur la Mole éditée à l'occasion des premières journées d'étude sur les applications de la Mole, on consultera :

- Delaye M. et Merlin J.-Cl. : Introduction à la spectrométrie Raman ; Méthodes physiques en biologie, Roscoff, juin 1974, 1975.
- Locquin M. : Premiers essais de contraste de phases en microscopie électronique ; *Zeits. Wiss. Mikroskopie u. Mikr. Techn.*, 1953, **62**, (3) 220.
- Locquin M. : Observation d'objets épais en cytologie végétale au

Nous pouvons confirmer la présence de protéines et de glucides dans cette paroi car les sphérules donnent une réaction xartha-protéique positive, une réaction APS positive et une désamination oxydative-Schiff positive (Locquin, 1980).

On comprend maintenant pourquoi la biréfringence est si faible : les quelque 100 nm d'épaisseur ne sont pas constitués uniquement de calcite, mais de matière organique imprégnée de calcite, dans une proportion qu'il ne sera pas facile de déterminer.

microscope électronique ; A.F.A.S. : Actes du Congrès de Caen (1953).

- Locquin M. : Le contraste de phases et le contraste interchromatique nouvelles méthodes d'observation en microscopie électronique ; *C.R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1713.
- Locquin M. : Les anisotropies biologiques et leurs méthodes d'étude ; *Bull. Micr. appl.*, 1956, **6** (2) 33.
- Locquin M. : Mycotaxia : Myxomycetes, Genera mundi, Paris, éd. aut. (1969).
- Locquin M. : De Taxia Fungorum, Vol. I A, Paris-Sens (1975).
- Locquin M. et Langeron M. : Manuel de Microscopie, Masson, Paris (1978).
- Locquin M. : Manuel de mycologie générale et structurale, Masson, Paris (à paraître en 1980).
- Martin G. W. et Alexopoulos A. C. J. : The Myxomycetes, Univ. Iowa Press, 1969.

Principes et exemples d'applications de la microsonde Raman dans le domaine biologique

par D. Dives*, J. M. Devynck**, G. Leroy**, D. Coustaut*** et Y. Moschetto**

(* U. 146 INSERM d'Écotoxicologie microbienne, Directeur H. Leclerc, C.E.R.T.I.A., 59650 Villeneuve d'Ascq, ** Centre de Technologie Biomédicale INSERM, 13-17, rue Camille Guérin, 59800 Lille et *** Laboratoire de biologie végétale, Faculté de Pharmacie, 3, rue du Professeur Laguesse, 59045 Lille Cedex)

Raman identification of intracellular particles of pesticides in ciliated protozoa.

Many ciliates have a very important endo-cytic activity. They absorb food and inert particles and they have the capacity to concentrate pollutant particles if they are sufficiently small. When observing inclusions with an optical microscope, we can ask the following questions :

- Are the observed inclusions a manifestation of added pesticide ?
- Is there a modification of the chemical or crystalline configuration in the vacuole of the ciliate ?

The Raman microprobe answers these two questions, without ambiguity and relatively rapidly, by comparison of the reference spectrum and the digestive vacuole spectrum.

The experiment was done with two pesticides : 4-4' dichlorodiphenyl and β endosulfan.

This method may be used for the study of any inclusion during the cell cycle.

I. Identification des constituants des parois végétales en fonction de leur différenciation.

On connaît l'importance industrielle et agricole de certains constituants de la paroi des cellules végétales telle la cellulose. Cependant de nombreuses lacunes subsistent dans nos connaissances : notamment l'identification rapide des principaux constituants (hémicellulose, callose, lignine) qui se déposent successivement dans le temps.

La callose des végétaux supérieurs (laminarine des algues brunes et la cellulose sont deux homopolymères de glucose qui ne diffèrent que par la liaison $\beta(1-4)$ qui caractérise la cellulose et $\beta(1-3)$ qui se trouve dans la laminarine.

Il nous a paru intéressant d'établir les spectres de substances

naturelles ou commercialisées (glucose, cellulose cristalline) et après extraction et purification des laminarines I et II afin d'utiliser ces spectres comme marqueur interne.

L'intérêt de l'emploi de cette méthode peut être compris dans l'exemple de la paroi d'un parenchyme âgé de moelle de sureau ; l'analyse du spectre obtenu à partir d'une simple coupe transversale est intéressante, non seulement par les précisions apportées sur les constituants classiques d'un tissu parenchymateux, mais surtout par la présence d'une autre substance caractérisée par une raie à 1 600 cm^{-1} et qui pourrait être de la lignine. Des expériences en cours permettent d'espérer une application de cette méthode physique en génétique appliquée (meilleure connaissance de gène S).