

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).

II. Identification de particules intracellulaires de pesticides dans des protozoaires ciliés par microsonde Raman

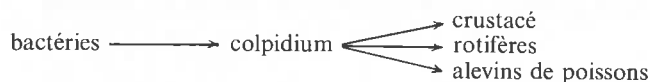
Beaucoup de protozoaires ciliés ont une grande activité endocytique (1, 2). Ils ingèrent à la fois des aliments et des particules inertes. Ils ont ainsi la faculté de concentrer des polluants insolubles si ceux-ci se trouvent à l'état de particules suffisamment petites pour être absorbées.

On peut se poser deux questions :

- Est-ce que les particules observées sont bien le pesticide additionné ?
- Y-a-t-il une modification de la structure chimique ou cristalline dans la vacuole digestive du cilié ?

C'est à ces deux questions que nous avons répondu en utilisant la microsonde Raman (3, 4, 5, 6).

Les cellules utilisées sont des colpidium campylum (protozoaciliata-tetrachymenidae). Ce cilié fait partie de chaînes alimentaires du type detritivore.



Les expériences ont été conduites avec deux pesticides différents le dichloro-4,4' diphényle (PCB) et β endosulfan.

Du point de vue pathologique, le PCB provoque un syndrome de dégénérescence hépatique, son accumulation dans les chaînes alimentaires marines a été mise en évidence, expliquant ainsi des intoxications chez les guillemots.

Nous avons utilisé deux méthodes :

- humide : une préparation est montée de manière classique entre lame et lamelle, la recherche est facile mais des courants dus à l'effet thermique local du laser peuvent être gênants ;
- sèche : pas de courant, mais de nombreuses cellules sont détruites.

Il a été possible d'obtenir les spectres intravacuolaires des pesticides avec l'une ou l'autre méthode.

La comparaison des spectres expérimentaux et des témoins montre leur parfaite similitude. Toutes les fréquences sont retrouvées (tableau I). On peut donc en conclure que les vacuoles contiennent le pesticide dans l'état où il a été absorbé.

Tableau I. Comparaison des spectres de l'endosulfan et du dichloro-4,4' diphényle témoin et après inclusion intracellulaire. Intensité des raies : W, Weak ; VW, Very weak ; S, Strong ; V.S., Very strong ; M, Medium.

Endosulfan	Endosulfan dans <i>Colpidium</i>	Dichloro-4,4 diphényle	Dichloro-4,4' diphényle dans <i>Colpidium</i>
112 W	112	227 M	227
135 W	135	272 VW	272
145 M	145	307 M	307
160 M	160	372 W	372
167 M	167	420 W	420
182 M	182	540 W	540
332 W	332	628 M	628
375 W	375	770 S	770
407 S	407	1 017 W	1 017
437 W	437	1 098 W	1 098
480 W	480	1 185 W	1 185
692 W	692	1 285 S	1 285

Nous pensons que la spectrométrie Raman peut être une méthode très intéressante pour l'étude des changements de structures chimiques pouvant intervenir dans des inclusions intracellulaires durant le cycle d'une cellule.

Bibliographie

- (1) D. Dives, F. Erb et H. Leclerc, Toxicité et bioaccumulation d'isomères de polychlorobiphényle par le protozoaire cilié *Colpidium campylum*, *Europ. J. Toxicol.*, 1976, 9 (2), 105.
- (2) D. Dives and L. Rasmussen, Growth studies on *Colpidium campylum* under axenic conditions, *J. Protozool.*, 1978, 25 (3-1), 42.
- (3) Y. Moschetto, G. Fleury et M. Delhaye, Aspect prospectif de l'application de la spectrométrie Raman à la détection d'éléments figurés biologiques, III^e Colloque de Pont-à-Mousson, 1975.

- (4) P. Dhamelincourt, Laser molecular microprobe, *Lasers Chemistry* (1977).
- (5) P. Dhamelincourt, Principe and realisation of an optical microscope using Raman effect, *Microscopic Acta*, May 1977.
- (6) P. Dhamelincourt, Étude et réalisation d'une microsonde moléculaire à effet Raman, Thèse, Lille, 1979.

La microsonde Mole et l'analyse des calculs urinaires. Perspectives et réalités

par M. Daudon *, H. Jaeschke-Boyer **, M. F. Protat * et R. J. Reveillaud *

(* Laboratoire CRISTAL, Service de médecine 2, Centre Hospitalier, 92211 Saint-Cloud et ** Laboratoire d'applications de la Mole, Instruments S.A., Division Jobin-Yvon, 16, rue du Canal, 91160 Longjumeau)

Molecular microprobe and analysis of kidney stones : perspectives and realities.

Renal lithiasis affects several millions of people worldwide, children and adults alike; with considerable variables in the relative frequency of the disease depending upon the countries under consideration. The causes of this disease are various, and they have been traced to dietary habits, anatomic or metabolic anomalies, some neurological or infectious problems, and even to the application of some therapeutics.

A precise analysis of the calculi with appropriate methods is an obligatory step in order to identify the pathogenic mechanism. One of

the techniques which is most adapted to this routine analysis is infrared spectrophotometry, which permits differentiation of most of the chemical and mineral species. But, in spite of the range of etiologies and the quality of the investigation techniques used up to now, the cause of almost one lithiasis out of two is not discovered.

In order to have a better approach of the fine organization of the calculi, it is necessary to probe on a smaller scale. In this field, the Mole microprobe constitutes a first quality technique which opens new