

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

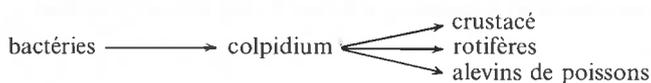
Beaucoup de protozoaires ciliés ont une grande activité endocytique (1, 2). Ils ingèrent à la fois des aliments et des particules inertes. Ils ont ainsi la faculté de concentrer des polluants insolubles si ceux-ci se trouvent à l'état de particules suffisamment petites pour être absorbées.

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.

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.

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.

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

constitue un handicap non négligeable au niveau du temps et du coût de l'analyse.

Les apatites sont aisément identifiables en Raman grâce à la vibration ν_1 de l'ion phosphate aux environs de 960 cm^{-1} (figure 3). L'oscillation de cette raie entre 963 et 959 cm^{-1} selon les échantillons mérite une étude plus approfondie.

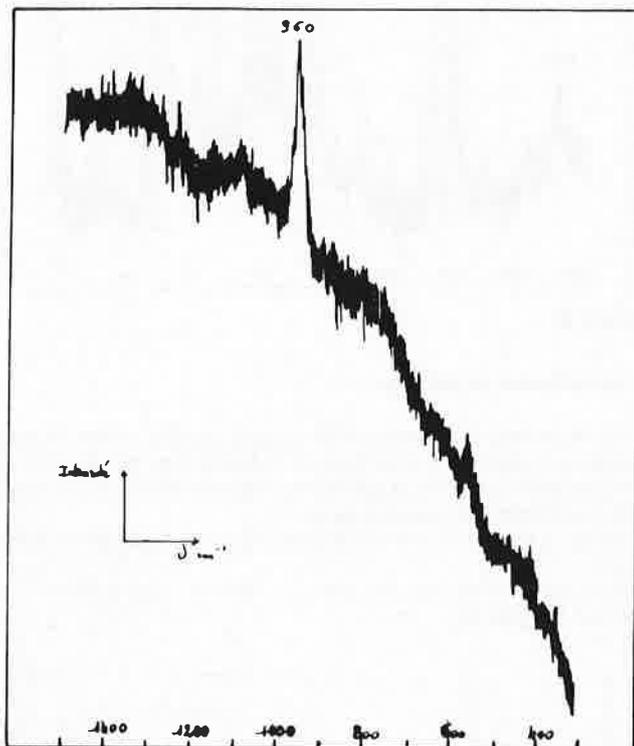


Figure 3.

La struvite et la newbéryite sont les deux représentants principaux des phosphates magnésiens.

La première est un phosphate ammoniomagnésien hexahydraté; sa formation témoigne d'une alcalinisation du milieu urinaire sous l'action de bactéries uréasiques essentiellement du genre *Protéus*. La raie phosphate de la struvite se situe à 944 cm^{-1} , ce qui la distingue aisément des autres phosphates rencontrés dans les calculs.

Le second phosphate magnésien est la newbéryite ou hydrogénophosphate de magnésium trihydraté. Sa parenté structurale avec la brushite est grande comme en témoigne d'ailleurs la position de sa vibration de valence symétrique à 983 cm^{-1} .

c) Les purines

Elles comportent principalement l'acide urique sous deux formes cristallines (anhydre et dihydraté), l'urate acide d'ammonium et l'urate acide de sodium.

La distinction entre acide urique anhydre et dihydraté semble, à l'heure actuelle, très difficile par la Mole à cause de l'échauffement relativement important de l'échantillon entraînant rapidement une déshydratation complète de la forme hydratée. Nous n'avons donc pu obtenir jusqu'à présent que le spectre de l'acide urique anhydre (figure 4).

En tant que molécules organiques, les oxypurines donnent de nombreuses vibrations en spectroscopie Raman.

S'il est très difficile de reconnaître l'acide de ses sels, les mélanges de ces derniers peuvent être plus difficiles à analyser. Il existe cependant des décalages suffisants dans la position de quelques raies principales ou secondaires pour permettre une différenciation, d'autant plus que

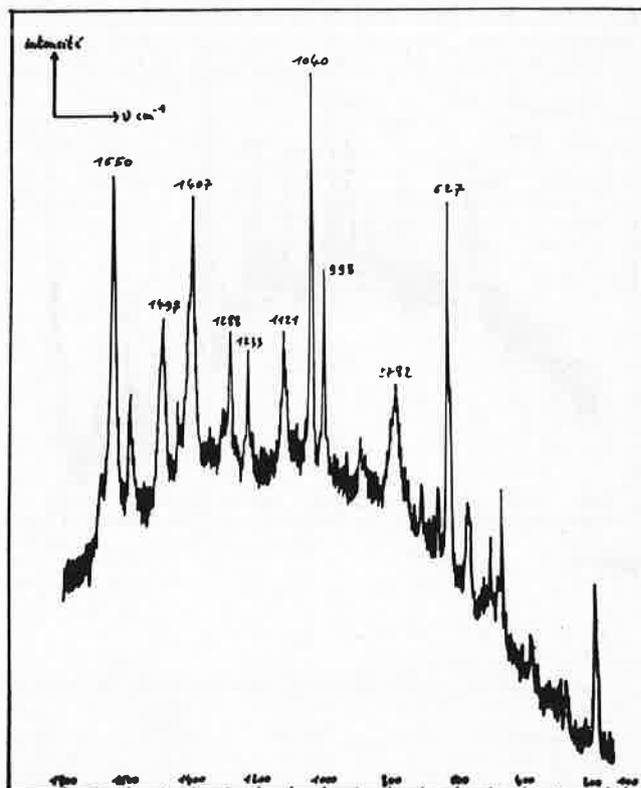


Figure 4.

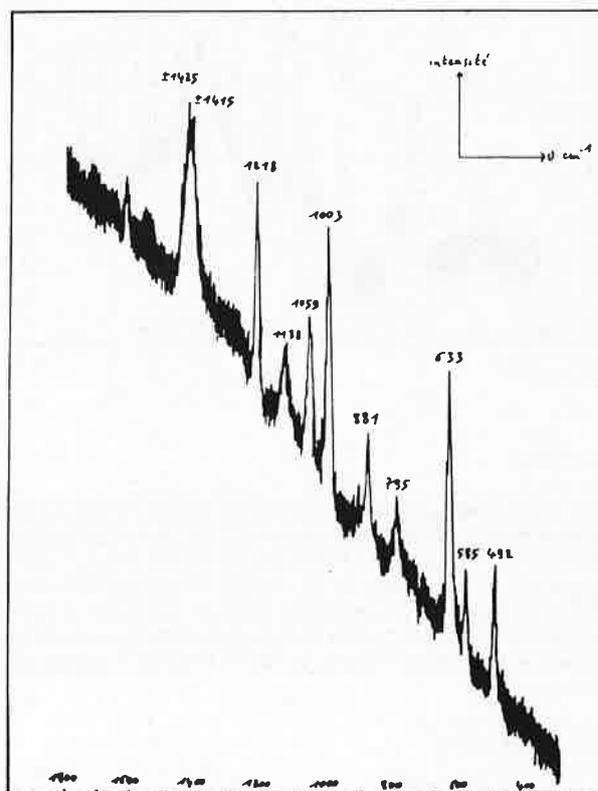


Figure 5.

la microsonde permet d'isoler des cristaux purs de chaque composé. Il est ainsi possible de distinguer avec la sonde moléculaire les sels monoammonique (figure 5), monosodique (figure 6) et monopotassique (figure 7) de l'acide urique.

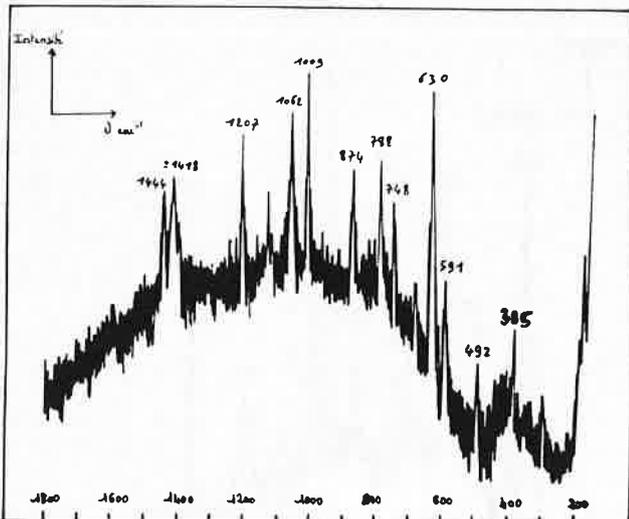


Figure 6.

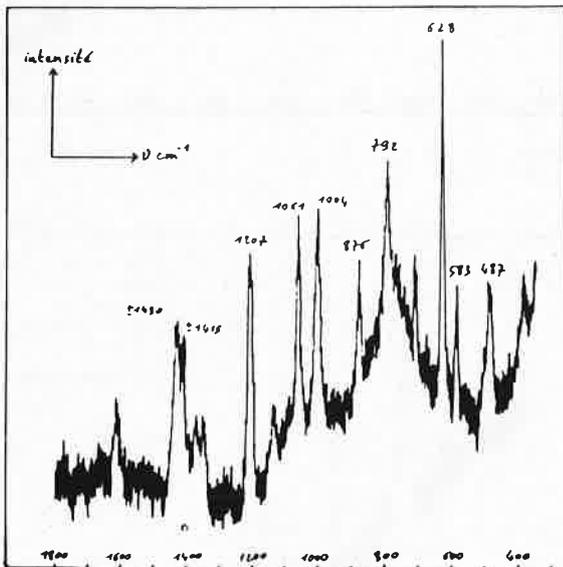


Figure 7.

d) La cystine

On la rencontre dans 2 % des lithiases; elle résulte d'une incapacité rénale à réabsorber certains aminoacides filtrés par le glomérule. La cystine étant le moins soluble d'entre eux cristallise dans les urines et peut conduire à la formation de calculs. Son identification par spectroscopie Raman ne présente aucune difficulté grâce aux nombreuses raies obtenues sur le spectre, certaines d'entre elles étant particulièrement intenses comme la raie à 499 cm^{-1} (figure 8).

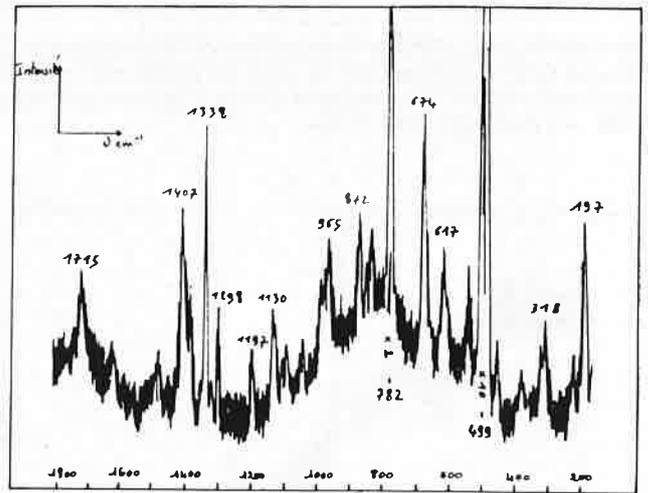


Figure 8.

e) Le carbonate de calcium

Parmi les autres corps susceptibles de participer à la composition des calculs, on peut citer le carbonate de calcium dont les deux variétés allotropiques, calcite et aragonite, ont été mises en évidence dans les lithiases biliaires ou pancréatiques.

Seule, la calcite a été retrouvée dans les calculs urinaires jusqu'à présent.

Elle est caractérisée par ses raies à $1\ 086\text{ cm}^{-1}$ et surtout 713 et 282 cm^{-1} (figure 9).

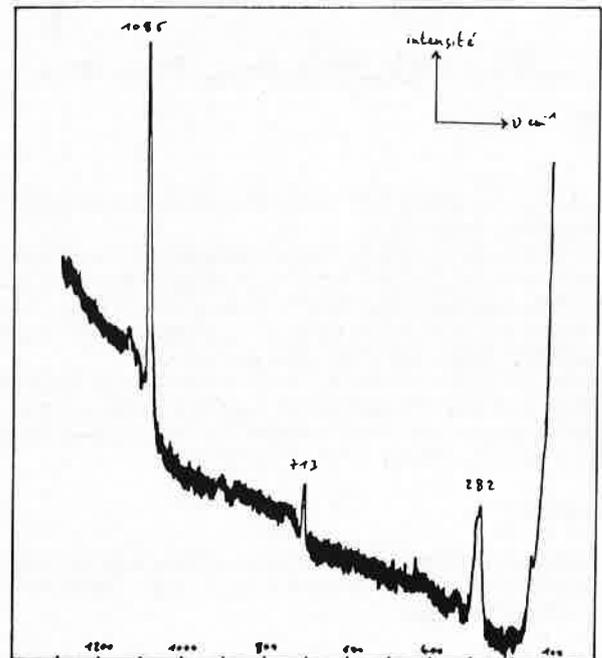


Figure 9.

3. Les urines

Une autre approche possible de la maladie lithiasique est l'étude du sédiment urinaire en quête d'une différence entre les urines des malades et celles des sujets normaux. On sait déjà que les urines de sujets lithiasiques exercent une moindre action inhibitrice que les urines normales sur la cristallisation de milieux artificiels. Cela traduit la présence ou l'absence de corps capables d'empêcher ou au contraire de favoriser la croissance ou l'agrégation des cristaux urinaires. Parmi les molécules susceptibles d'une telle intervention,

l'urate de sodium a été récemment accusé de favoriser la cristallisation et la croissance de l'oxalate de calcium par formation d'un gel qui adsorberait des mucopolysaccharides acides considérés comme inhibiteurs de la cristallisation oxalique (7).

Il sera certainement intéressant d'analyser par la Mole soit le sédiment urinaire obtenu par filtration sur membrane puis séchage, soit le culot de centrifugation humide dans la mesure où l'approche

technologique le permettra. De même, la microsonde moléculaire devrait permettre d'étudier les agrégats cristallins observés dans les urines lithogènes et pratiquement absents des urines normales, de déterminer la composition des cristaux et particules microscopiques présentes dans les divers échantillons; tout cela devrait contribuer à une meilleure connaissance des sédiments urinaires et ouvrir sur une

différenciation efficace des urines normales et pathologiques. D'importantes applications médicales pourraient en découler comme par exemple un dépistage précoce des sujets potentiellement lithiasiques ou encore l'instauration de traitements protecteurs adaptés à chaque situation.

Bibliographie

- (1) M. Daudon, M. F. Protat et R. J. Reveillaud., Analyse des calculs par spectrophotométrie infrarouge. Avantages et limites de la méthode, *Ann. Biol. Clin.*, 1978, **36**, 475.
- (2) M. Delhay et P. Dhamelincourt., Raman microprobe and microscope with laser excitation, *J. Raman Spectrosc.*, 1975, **3**, 33.
- (3) W. H. Boyce, Organic matrix of human urinary concretions, *Am. J. Med.*, 1968, **45**, 673.
- (4) R. S. Malek et W. H. Boyce, Intranephronic calculosis: its significance and relationship to matrix in nephrolithiasis, *J. Urol.*, 1973, **109**, 551.

- (5) C. Y. C. Pak, Physicochemical basis for the formation of renal stones of calcium phosphate origin: calculation of the degree of saturation of the urine with respect to brushite, *J. Clin. Invest.*, 1969, **48**, 1914.
- (6) E. L. Prien Jr., Calcium oxalate renal stones, *Am. Rev. Med.*, 1975, **26**, 173.
- (7) C. Y. C. Pak, O. Waters, L. Arnold, K. Holt, C. Cox et D. Barilla, Mechanism for calcium nephrolithiasis among patients with hyperuricosuria: supersaturation of urine with respect to monosodium urate, *J. Clin. Invest.*, 1977, **59**, 426.

Analysis of archaean microfossils by the laser molecular microprobe

H. D. Pflug *, H. Jaeschke-Boyer ** and E. L. Sattler ***,

(* Geologisch-Paläontologisches Institut, Giessen, Germany, ** Laboratoire d'application Jobin-Yvon, Longjumeau, France et *** Strahlenzentrum der Universität Giessen, Germany)

Analyse de microfossiles archéens par la microsonde moléculaire à laser

La preuve de l'existence de microfossiles dans des roches archéennes est basée sur trois critères principaux. L'inclusion découverte doit évidemment montrer des structures d'organisme. Ensuite, il est nécessaire de s'assurer que cette inclusion est un composant primaire de la roche et non une contamination des temps ultérieurs. Cela limite l'étude aux lames fines ou polies de la roche qui montrent les inclusions découvertes dans leur position originale à l'intérieur de la matrice minérale. Troisièmement, il faut prouver que l'inclusion est une substance organique qui peut être ainsi différenciée des cristallites et des pseudofossiles inorganiques semblables. Dans la pratique, cette preuve devient un problème. La plupart des techniques d'analyse classiques nécessitent le broyage et le lessivage des échantillons de la roche. Les résultats obtenus sont représentatifs du bitume de la roche entière mais non spécifiques des microfossiles inclus.

L'analyse non destructive et individuelle des microfossiles dans la roche

est devenue possible avec la microsonde moléculaire Mole. Des microfossiles trouvés dans le Swartkoppie chert (Afrique du Sud, 3 400 millions d'années) et dans la Isua quartzite (SO Groenland, environ 3 800 millions d'années) ont été analysés ainsi. Des lames minces, non montées, de la roche ont été utilisées pour cette technique. Nos études montrent que les inclusions découvertes sur les roches archéennes renferment une variété de composés organiques qui sont manifestement d'origine biologique. Ils sont présents dans une forme fossilisée qui est en accord avec la forme métamorphique de la roche environnante.

Les résultats combinés des analyses morphologiques et chimiques montrent que des témoins de la vie sont présents dans les plus vieux sédiments connus sur terre. Ainsi, la vie doit remonter à beaucoup plus que 3 800 millions d'années.

1. Problem

Proof of microfossils in archaean rocks is mainly based on three criteria. The find must, of course, show organismic structures. Secondly, it must be made sure that the find is a primary constituent of the rock and not a contaminant of later times. This restricts the study to thin or cut sections of the rocks exhibiting the finds in their original position within the mineral matrix.

Thirdly, it must be proved that the find consists of organic substance, and is thus distinguished from crystallites and similar inorganic pseudofossils. In practice, this proof becomes a problem. Most of the conventional analytical techniques require powdering and leaching of the rock samples. Consequently the results obtained are representative for the whole-rock bitumen but not specifically for the enclosed microfossils.

Individual and non-destructive analysis of microfossils in rocks has proved possible by combined application of the electron microprobe

analyser, the X-ray microscope and the heating microscope. The results help decide whether a find consists of fossil organic substance or not, however, they give no information on the molecular species present in the microfossil body. The molecular microprobe Mole seems to fill that gap.

2. Occurrences

The discoveries described stem from two different localities of different ages. The microfossil *Ramsaysphaera* (Plate 1) occurs in the Swartkoppie chert of the Swaziland system in the Barberton mountain land (South Africa). According to the available radiometric data, the age of the chert is probably close to 3 400 million years (2). A still older fossil called *Isuasphaera* (Plate 2) has recently been detected in cherty layers of a quartzite, which are part of the Isua series in SW-Greenland, about 150 km north-east of Godthaab (8). The known radiometric data indicate an age of about 3 800 million years for the rock sequence. These sediments are the oldest known on earth.