

Indices biochimiques et milieux marins. Journées du GABIM, Brest, 18-20 Nov. 1981
Publi. CNEEXO (Actes Colloq.) n. 14, 1982, p.131 à 138

CONTRIBUTION A L'ANALYSE *IN VIVO* DE CERTAINES ALGUES
PAR MICROSONDE M.O.L.E.

par

B. DE BETTIGNIES +, P. DHAMELINCOURT +, J.C. MERLIN +, F. WALLART+,M. WARTEL ++
+ L.A.S.I.R., CNRS, L.P. 264, Université des Sciences et Techniques de Lille I
59655 Villeneuve d'Ascq
++ Groupe de Recherches de Chimie Marine

R E S U M E

— La microsonde moléculaire à laser (M.O.L.E.) permet l'analyse de très petites quantités de matières isolées ou incluses dans un milieu complexe et présente un intérêt particulier pour l'étude *in situ* et *in vivo* des constituants cellulaires de certains microorganismes marins.

Après avoir exposé le principe de la M.O.L.E., nous présentons deux applications dans lesquelles l'observation des spectres de diffusion a permis de caractériser et de localiser certains constituants cellulaires. —

A B S T R A C T

— The laser Raman Microprobe M.O.L.E. allows the analysis of very minute quantities of matter wheter this matter is isolated or included in a complex medium.

This technique is of particular interest for *in situ* and *in vivo* studies of cellular components inside particular marine microorganisms.

After a frief explanation of the MOLE principle, two examples of direct characterization and location of cellular components are presented. —

M O T S - C L E S : Microsonde M.O.L.E, Raman et fluorescence, *in vivo*, *Pyrocystis Lunula*, *Botryococcus Braunii*.

K E Y W O R D S : M.O.L.E. Microprobe, *in vivo*, Raman and fluorescence
Pyrocystis Lunula, *Botryococcus Braunii*

INTRODUCTION

L'analyse ponctuelle par effet Raman est une technique analytique récente mise au point au L.A.S.I.R. (DELHAYE M., DHAMELINCOURT P., 1975). Un faisceau de photons générés par un laser excite l'échantillon ; l'analyse de la lumière diffusée permet l'identification et la localisation des différents édifices polyatomiques présents dans un échantillon.

1. PRINCIPE DE L'EFFET RAMAN

L'analyse spectroscopique de la lumière diffusée par des molécules irradiées par un faisceau de lumière monochromatique de fréquence ν_0 , montre qu'une fraction importante des photons possèdent la même fréquence que le rayonnement excitateur, c'est la diffusion Rayleigh. Pour une faible partie des photons diffusés on observe un changement de fréquence : c'est l'effet Raman. Une diminution de fréquence ($\nu_0 - \nu_i$) correspond à l'effet Raman Stokes, une augmentation de fréquence ($\nu_0 + \nu_i$) correspond à l'effet Raman anti-Stokes. Les fréquences ν_i sont indépendantes de la fréquence de la radiation excitatrice et sont égales aux fréquences des mouvements de vibration des édifices polyatomiques contenus dans le milieu irradié (DELHAYE M., MERLIN J.C., 1975).

Le diagramme obtenu en portant l'intensité du rayonnement diffusé par la partie Stokes (qui est la plus intense) en fonction de la fréquence constitue le spectre Raman ; l'origine coïncide avec la fréquence ν_0 .

Comme les spectres infrarouges, chaque spectre Raman est unique, il permet de caractériser les espèces chimiques polyatomiques et d'en préciser leur structure.

Si la fréquence excitatrice se situe au voisinage d'une bande d'absorption électronique, on observe une forte exaltation de l'intensité de certaines raies du spectre, ce phénomène est appelé "effet Raman de résonance". Cette exaltation qui peut atteindre 10^4 permet l'étude de solution très diluées et l'analyse d'un groupement polyatomique particulier au sein d'un milieu complexe non résonant.

L'analyse par spectrométrie Raman est relativement rapide, non destructrice et peut se faire aussi bien à l'air libre que sous atmosphère contrôlée, sans préparation particulière de l'échantillon. C'est une technique bien adaptée à la microanalyse.

2. PRINCIPE DE LA MICROSONDE M.O.L.E.

La microsonde moléculaire à laser (DHAMELINCOURT P., 1979) associe dans un même appareil : un microscope optique classique, un filtre optique à réseaux holographiques concaves possédant un très faible taux de lumière parasite, un système de détections monocanale et multicanale.

Cette association permet différents types de fonctionnement : deux de ces modes sont particulièrement utilisés :

2.1. Microspectromètre Raman (Fig. 1)

En utilisant le dispositif d'éclairage en fond clair, l'objectif du microscope focalise le faisceau laser sur l'échantillon et recueille la lumière diffusée qui est analysée par le filtre optique. Le détecteur est un photomultiplicateur (microspectromètre) ou un tube intensificateur d'images suivi d'une caméra de télévision (microspectrographe). Le spectre Raman obtenu permet l'identification de toutes les espèces polyatomiques contenues dans le volume irradié (de l'ordre du μm^3).

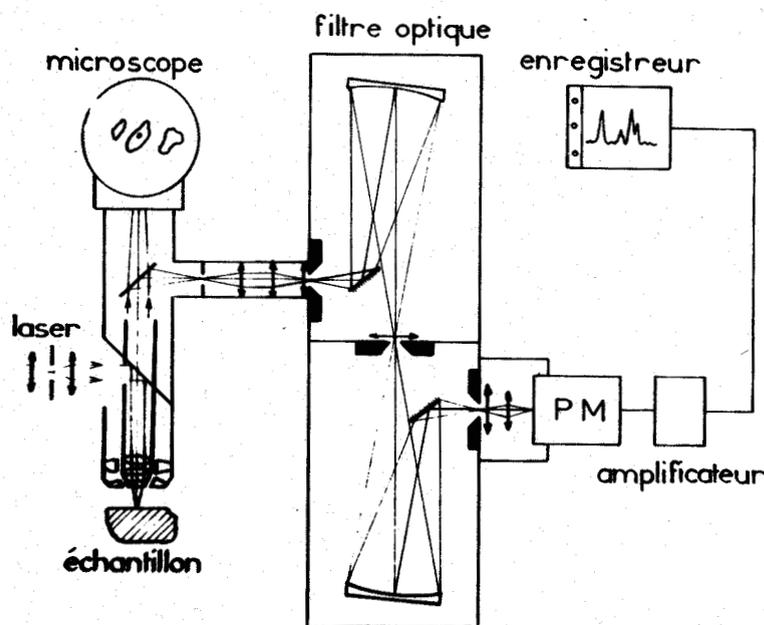


Fig. 1 : Mode microspectromètre Raman

2.2. Microscope Raman (Fig. 2)

L'échantillon hétérogène est éclairé globalement grâce à une optique annulaire associée au dispositif d'éclairage en fond noir. En isolant, grâce au filtre optique, une raie Raman caractéristique d'un des constituants de l'échantillon, on obtient à l'aide de la détection multicanale une image micrographique donnant la répartition de ce constituant à la surface de l'échantillon avec une résolution spatiale de l'ordre du μm .

Cette technique permettant d'obtenir des spectres de diffusion (vibration et fluorescence) et des images d'un objet à une longueur d'onde donnée est parfaitement adaptée à l'étude de la localisation d'espèces chimiques à l'intérieur d'une cellule, et a déjà trouvé de nombreuses applications dans le domaine de la microanalyse (DHAMELIN COURT P. et al., 1979). La localisation des espèces peut être réalisée *in situ* et *in vivo*, nous présentons les premiers résultats obtenus sur des microorganismes marins.

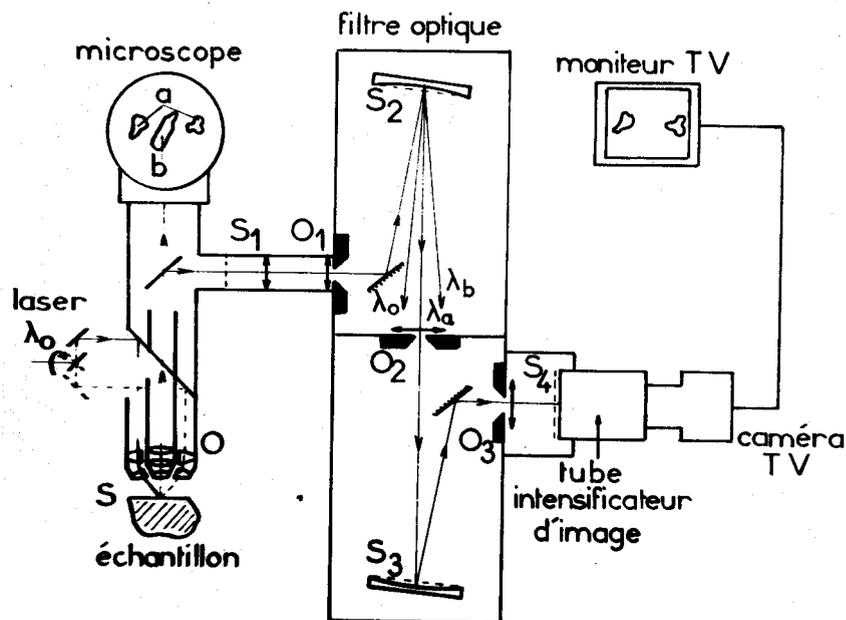


Fig. 2 : Mode microscope Raman

3. ETUDE DE *PYROCYSTIS LUNULA**

Pyrocystis lunula est un dinoflagellé bioluminescent. Les cellules étudiées proviennent d'une souche prélevée dans la "Baie des Anges" à Nice et cultivée en salle thermostatée à 18°C (LECUYER B., et al, 1979).

Par illumination d'une seule cellule par la radiation 457,9 nm d'un laser à Argon, on peut observer le spectre d'émission du cytoplasme (Fig. 3). Sur ce spectre on distingue une bande très intense centrée à 674 nm, correspondant à l'émission de fluorescence de la chlorophylle, et une bande beaucoup plus faible mais très large que nous avons pu décomposer en 3 composantes : 600, 542 et 518 nm. Cette fluorescence, dont le maximum est centré dans la région des 500 nm est identique à celle observée pour la luciférine purifiée.

* Etude réalisée en collaboration avec DUPAIX A., ARRIO B., LECUYER B., FRESNEAU C., VOLFIN P. (ERA 118, Université de Paris Sud, Orsay).

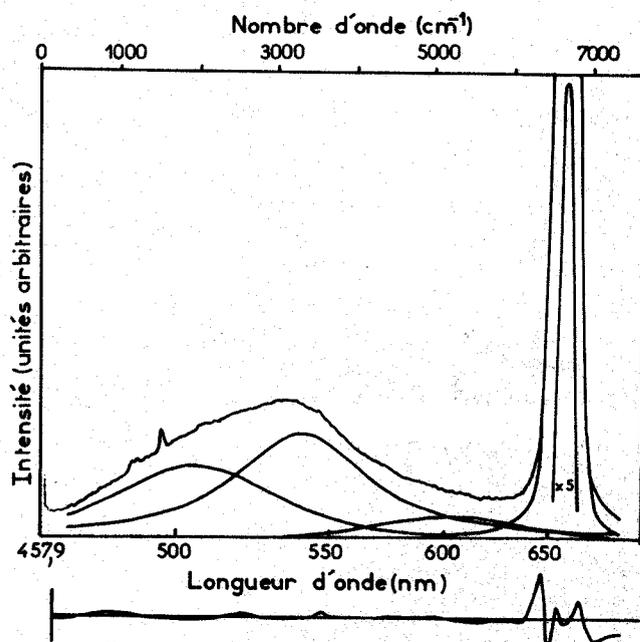


Fig. 3 : Spectre de diffusion du cytoplasme d'une cellule de *Pyrocystis lunula* irradié par une radiation 457,9 nm.

On observe également, perchées sur cette bande de fluorescence de faibles bandes Raman dont le détail est présenté sur la figure 4. Ces raies, caractéristiques des caroténoïdes présents dans le cytoplasme peuvent être attribuées aux vibrations d'élongation des doubles liaisons C=C conjuguées (1524 cm^{-1}) et d'élongation des simples liaisons ($1144\text{--}1178 \text{ cm}^{-1}$) (RIMAI C., et al, 1973, CAREY P.R., 1978). Ces caroténoïdes bénéficient d'un fort effet de résonance et sont les seuls composés, parmi les constituants du cytoplasme, à donner une diffusion Raman observable.

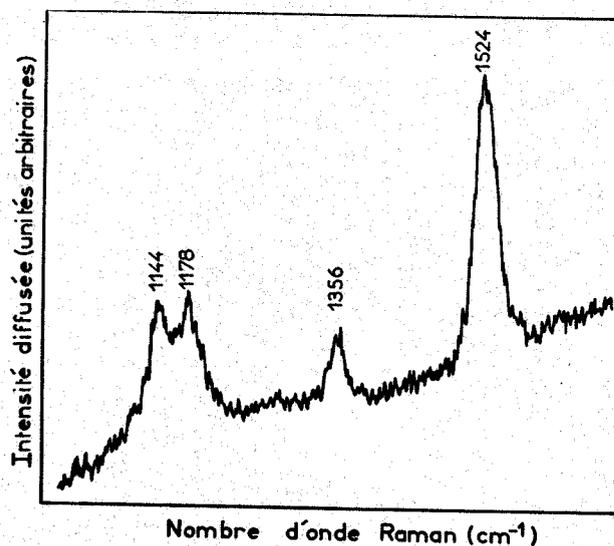


Fig. 4. Spectre Raman de résonance des caroténoïdes présents dans le cytoplasme d'une cellule de *Pyrocystis lunula*.

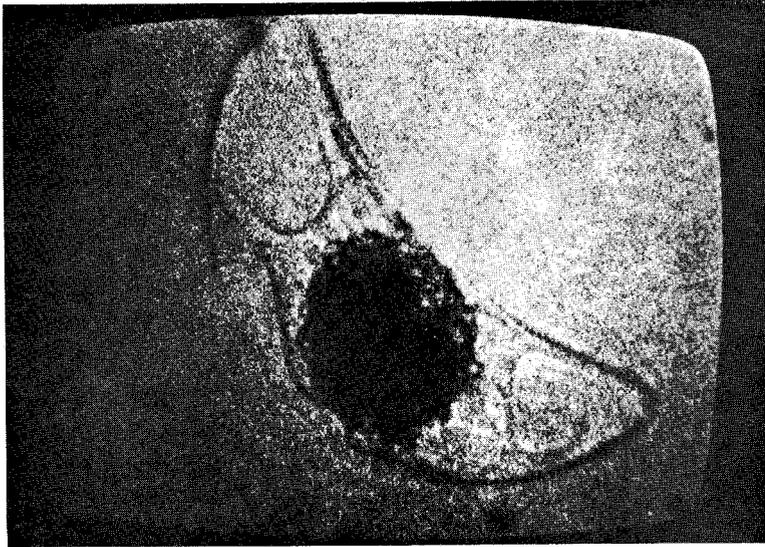


Photo I



Photo II

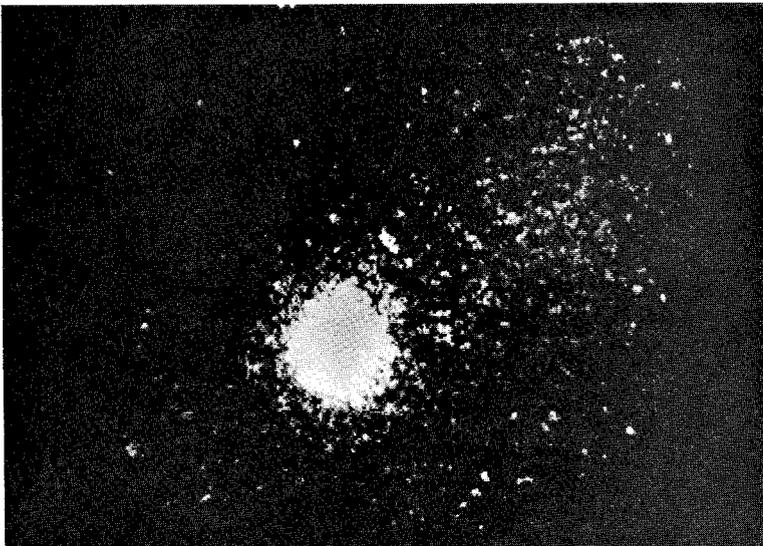


Photo III

Fig. 5. : Images micrographiques d'une cellule de *Pyrocystis lunula* obtenues sur l'écran vidéo de la M.O.L.E.

En utilisant ces différentes émissions il est possible de reconstituer les images micrographiques suivantes (Fig. 5).

- La photo 1 présente la cellule de *Pyrocystis lunula* observée en lumière blanche.
- La photo II montre la localisation de la fluorescence chlorophyllienne.
- La photo III montre l'image de la même cellule en utilisant l'émission de fluorescence à 540 nm.

On remarque que les fluorescences 674 et 540 nm se superposent et correspondent à une zone bien déterminée du cytoplasme où se situent à la fois l'appareil photosynthétique et l'émission de bioluminescence.

Dans tous les cas, nous avons vérifié par la reproductibilité de nos mesures que la radiation excitatrice (< 1 mW) n'avait pas d'effets néfastes sur le comportement de la cellule.

4. ETUDE DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII**

L'algue *Botryococcus braunii* (Fig. 6) a fait l'objet de nombreuses études car, génératrice d'hydrocarbures par photosynthèse, elle serait à l'origine de la formation de sédiments riches en hydrocarbures tels que des dépôts carbonifères, certaines roches à pétrole paléozoïques ainsi que des sédiments tertiaires.

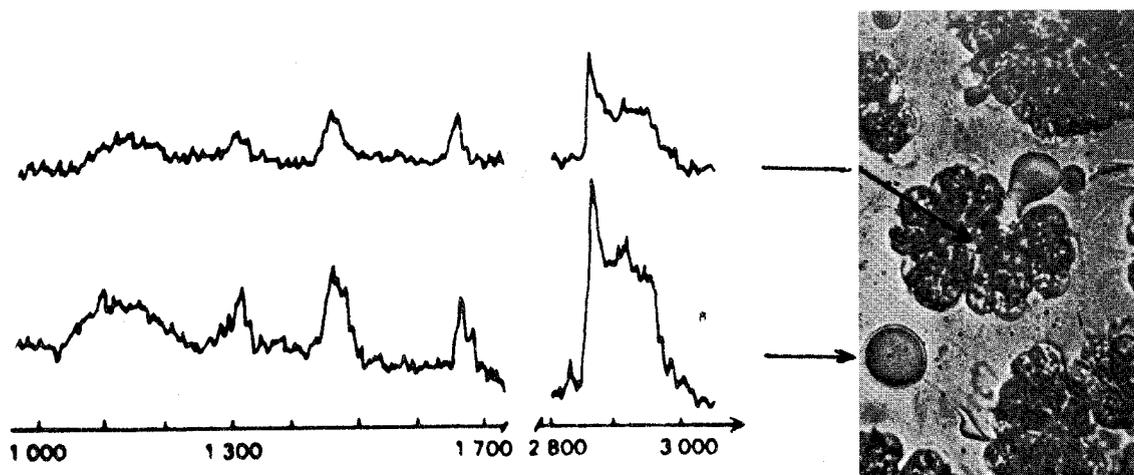


Fig. 6. Etude spectroscopique des sites d'accumulation des hydrocarbures générés par l'algue *Botryococcus Braunii*

A - Spectre *in situ* d'un globule externe

B - Spectre *in situ* d'une inclusion cytoplasmique

* Etude réalisée en collaboration avec LARGEAU C., CASADEVALL E., (ERA 685, ENSC Paris) et BERKALOFF C., (LA 311, ENS Paris).

Le spectre Raman obtenu à partir des microglobules situés à l'extérieur des algues (Fig. 6.A) est en tout point identique à celui obtenu directement à partir des vacuoles cytoplasmiques de l'algue (Fig. 6.B). L'analyse de ces spectres permet de confirmer la présence d'hydrocarbures éthyléniques à longue chaîne (élongation des doubles liaisons C=C vers 1660 cm^{-1}), par contre les hydrocarbures aromatiques (caractérisés par des raies à 1000 et 1600 cm^{-1}) ainsi que les hydrocarbures saturés (caractérisés par des raies à 3000 cm^{-1}) n'ont pu être détectés. Ces résultats sont en parfait accord avec les analyses réalisées à partir d'extraits d'algues (C. LARGEAU et al., 1980).

CONCLUSION

Les exemples que nous avons présentés montrent que la microsonde MOLE se révèle être un outil précieux pour l'étude des constituants cellulaires de micro-organismes et complète efficacement les différentes méthodes de microanalyse. Son emploi très commode, la possibilité de travailler à l'air libre ou en milieu aqueux, sans préparation particulière de l'échantillon rendent cet instrument très prometteur pour l'étude des milieux biologiques.

BIBLIOGRAPHIE

CAREY P.R., -1978- Resonance Raman spectroscopy in biochemistry and biology. Quarterly Rev. Biophys., 3, 309-370.

DELHAYE M. et DHAMELINCOURT P., -1975- Raman microprobe and microscope with laser excitation, J. of Raman Spectroscopy, 3, 33-43.

DELHAYE M., et MERLIN J.C., -1975- Introduction à la Spectrométrie Raman, Biochimie, 57, 401-415.

DHAMELINCOURT P., -1979- Etude et réalisation d'une microsonde moléculaire à effet Raman. Quelques domaines d'application. Thèse d'Etat, Université des Sciences et Techniques de Lille.

DHAMELINCOURT P., WALLART F., LECLERCQ M., N'GUYEN A.T., et LANDON D.O., -1979- Laser Raman Molecular Microprobe (MOLE), Anal. Chem., 51, 414-419.

FRESNEAU C., ARRIO B., BINET A., DUPAIX A., LECUYER B., et VOLFIN P., -1978- Purification and properties of the dinoflagellate luciferin isolated from *Pyrocystis lunula* in "Proceedings International Symposium on Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence", 620-636.

LARGEAU C., CASADEVALL E., BERKALOFF C., et DHAMELINCOURT P., -1980- Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus Braunii*, Phytochemistry, 19, 1043-1051.

LECUYER B., ARRIO B., FRESNEAU C., et VOLFIN P., -1979- Dinoflagellate luciferases : Purification of luciferases from *Gonyaulax polyedra*, *Pyrocystis Lunula* and *Pyrocystis fusiformis*, Arch. Biochem. Biophys., 196, 2, 371-384.