

ISSN 0567-6576

# **Bulletin des Académie & Société Lorraines des Sciences**

ANCIENNE  
SOCIÉTÉ DES SCIENCES DE NANCY

fondée en 1828

Etablissement d'utilité publique  
(Décret ministériel du 26 avril 1968)

**BULLETIN TRIMESTRIEL**

TOME 34 - NUMERO 1  
1995

## AVIS AUX MEMBRES

### COTISATIONS.

Les Membres des Académie & Société Lorraines des Sciences acquittent une cotisation annuelle. Celle-ci est fixée à 110 francs en 1994.

Le paiement de la cotisation donne droit au service du bulletin, et permet de bénéficier de ventes à tarif réduit. La remise accordée aux Membres des Académie & Société Lorraines des Sciences ne peut atteindre ou dépasser 50 % du prix de vente de la publication. Son taux, proposé par le Conseil, est ratifié en simple Assemblée générale annuelle (Statuts, Titre I, Art. III).

Tout règlement est à adresser, de préférence par chèque, à l'ordre du Trésorier des Académie & Société Lorraines des Sciences, Biologie végétale 1<sup>er</sup> Cycle, BP 239, 54506 Vandœuvre Cédex.

Chèque bancaire ou chèque postal au compte 45 24 V Nancy.

### BULLETIN.

Pour la vente exceptionnelle de numéros isolés ou anciens s'adresser au Trésorier ou au Secrétaire Général, 8, rue des Magnolias, Parc Jolimont-Trinité, 54220 Malzéville.

Afin d'assurer une parution régulière du Bulletin, les Membres ayant présenté une communication sont invités à remettre leur manuscrit en fin de séance au Secrétaire Général. A défaut, ces manuscrits seront envoyés à son adresse ci-dessus, dans les quinze jours suivant la séance. Passé ce délai, la publication sera ajournée à une date indéterminée.

Les corrections d'auteurs sur épreuves devront obligatoirement être faites dans les huit jours suivant la réception des épreuves, faute de quoi ces corrections seront faites d'office par la Rédaction, sans qu'il soit admis de réclamations. Les demandes de tirés à part non formulées en tête des manuscrits ne pourront être satisfaites ultérieurement.

Les clichés sont à la charge des auteurs.

Dans la mesure des possibilités financières, 20 tirés à part gratuits sont offerts aux auteurs. Des exemplaires payants supplémentaires peuvent être obtenus. S'adresser au Trésorier ou au Secrétaire Général.

Il n'y a pas de limitation de longueur ni du nombre des publications. Toutefois, les publications des travaux originaux restent subordonnées aux possibilités financières de la Société. En dernier lieu, le Conseil est souverain.

Il est précisé une nouvelle fois, en outre, que les observations, théories, opinions, émises par les auteurs dans les publications de l'Académie & Société Lorraines des Sciences, n'impliquent pas l'approbation de notre Groupement. La responsabilité des écrits incombe à leurs auteurs seuls.

Toute publication en tant que « note » doit être présentée par un membre titulaire de l'Académie. Il n'y a pas de « comité » de lecture pour l'agrément d'impression.

BULLETIN

**des ACADEMIE & SOCIETE  
LORRAINES DES SCIENCES**

(Ancienne Société des Sciences de Nancy)  
(Fondée en 1828)

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE DE NANCY  
SECTION SCIENCES

Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY  
FRANCE

<u>S O M M A I R E</u>	Pages
BAUTZ A., DOURNON C. L'animal dans l'espace. De la préparation des vols habités à l'acquisition de connaissances fondamentales en biologie gravitationnelle. Les projets "Torcol" et "Fertile".....	3
MATHIOT B., COLIN S., KELLER J.M. Transformations ultrastructurales d'hybridomes murins au cours de la mort cellulaire dans un milieu de culture sans sérum.....	17
PARGNEY J.C., JALADE M. Etude cytologique des formations fongiques en stromas se développant à la surface des racines des plants truffiers.....	27
Procès-verbaux:	
séance du 10 novembre 1994.....	45
séance du 15 décembre 1994.....	50
séance du 12 janvier 1995.....	53
séance du 08 février 1995.....	55

**L'ANIMAL DANS L'ESPACE.  
DE LA PREPARATION DES VOLS HABITES  
A L'ACQUISITION DE  
CONNAISSANCES FONDAMENTALES  
EN BIOLOGIE GRAVITATIONNELLE.  
LES PROJETS "TORCOL" ET "FERTILE".**

Alain BAUTZ et Christian DOURNON

Laboratoire de Biologie expérimentale-Immunologie,  
Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté des Sciences, B.P. 239,  
54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France.

Note acceptée pour publication le 17 février 1995.

**RESUME :** L'envoi d'animaux dans l'espace correspondait au départ à une phase d'évaluation globale des risques liés à un vol spatial. L'expérimentation démontra alors, à partir des données biomédicales brutes obtenues, que les mammifères et l'homme pouvaient supporter les conditions extrêmes du vol. Puis se développa une recherche fondamentale en biologie gravitationnelle et en radiobiologie spatiale avec le lancement de nombreuses espèces non conventionnelles. Le but était de reconnaître et de comprendre les effets des accélérations, de la microgravité et des rayonnements cosmiques sur les organismes vivants. Actuellement, avec la préparation des missions spatiales de longue durée, les problèmes concernant la reproduction et le développement des organismes animaux dans l'espace sont particulièrement étudiés. Dans notre laboratoire, avec le modèle *Pleurodeles waltl*, nous préparons deux projets soutenus par le CNES : l'expérience TORCOL - IBIS pour la mission PHOTON 10 prévue en février 1995, et l'expérience FERTILE pour la mission CASSIOPEE sur la station orbitale MIR prévue en juin 1996.

**Mots clés :** Espace, expérimentation animale, *Pleurodeles*, TORCOL - IBIS, FERTILE - MIR.

**ABSTRACT :** **Animals in space. From the manned spaceflight preparation to a gravitational biological research. The experiences TORCOL - IBIS and FERTILE.** The animal presence in space started by a global evaluation of the spaceflight risks. The embarked animals were at that time mammalians. Later a fundamental research in

Note présentée à la séance du 12 janvier 1995 par M. le Président KELLER.

gravitational biology and in spatial radiobiology was developed. For this goal, numerous non-mammalian species were spatialized. The effects of accelerations, microgravity and cosmic radiations were analyzed. Actually, reproduction and development of the live organisms in space are particularly studied, with the objective to prepare the long duration missions. In our laboratory, two experiences on the amphibian urodele *Pleurodeles waltl* are prepared, the TORCOL - IBIS and the FERTILE - MIR projects.

**Key words :** Space, animal experimentation, *Pleurodeles* , TORCOL - IBIS, FERTILE - MIR.

## INTRODUCTION

Depuis très longtemps l'homme a rêvé de partir à la conquête de l'espace, de l'explorer et d'y séjourner. Ce rêve est resté utopique jusqu'au début du vingtième siècle.

En effet, si l'espace est tout proche de la Terre (en simple kilométrage, deux heures de voiture suffiraient actuellement pour s'y rendre), il n'est pas si facile que cela à atteindre. Tout d'abord, il y a l'importante force de gravitation qui nous maintient au sol. Il faut atteindre la vitesse de 11 km/s (soit près de 40 000 km/h), la "vitesse de libération", pour échapper à l'attraction de notre planète. Ensuite, il n'y a pas d'air dans l'espace, pas d'atmosphère. Il faut donc disposer d'un véhicule qui puisse se propulser dans le vide. Seules les fusées peuvent le faire et atteindre une vitesse suffisante pour se libérer de la gravité.

Le rêve millénaire du voyage interplanétaire devient une possibilité en 1903 lorsque le professeur de mathématiques soviétique Constantin Tsiolkovsky établit pour la première fois les lois du mouvement d'une fusée considérée comme un corps de masse variable, dans l'espace sans pesanteur ou dans un champ de pesanteur. Dans son manuscrit "L'espace libre" publié en 1914, il énonce les principes de la propulsion par réaction dans le vide.

Envoyer un engin dans l'espace étant théoriquement possible, les progrès techniques vont être rapides et considérables dans les décennies qui suivent. Les fusées mises au point sont de plus en plus puissantes. En 1949, Von Braun et ses collaborateurs américains réussissent le lancement d'une fusée à trois étages ; le dernier étage atteint une altitude de 400 km, pénétrant largement dans le domaine spatial. Avec la puissance de ce véhicule, la satellisation d'un objet artificiel devient envisageable. Huit ans plus tard les Soviétiques, avec Korolev, placent pour la première fois en orbite un satellite, Spoutnik 1. Il va tourner autour de la Terre durant trois mois, en émettant régulièrement son célèbre "bip-bip".

La conquête de l'espace par l'homme peut s'ouvrir. Mais l'homme pourra-t-il supporter les formidables accélérations des fusées et le voyage dans les capsules ? vivre dans ce nouvel environnement ? Le domaine spatial est un milieu aux contraintes exceptionnelles dans lequel l'homme sera soumis à la microgravité et au rayonnement cosmique.

Avant que l'homme ne s'engage lui-même dans un vol spatial, de multiples essais préalables sont tentés avec des modèles animaux proches physiologiquement de l'espèce humaine, des mammifères. Ainsi, dès le début, l'histoire de l'animal dans l'espace est liée à la réalisation de ce vieux rêve humain, à la préparation des premiers vols spatiaux habités, à la conquête d'autres planètes, comme celles de la Lune réussie le 21 juillet 1969 et de Mars dans le futur.

## I - LES GRANDES PREMIERES ANIMALES

### A - La première incursion dans l'atmosphère

Le 15 septembre 1783, depuis la cour du château de Versailles et pour la première fois dans l'histoire, des animaux s'élèvent dans les airs à l'aide d'un engin créé par la main de l'homme. Les frères de Montgolfier présentent leur ballon à air chaud et réalisent, sous le patronage de l'Académie et devant la Cour de France, la première expérience mondiale aéronautique avec des animaux. Le vol de l'aérostat "le Réveillon", d'une durée de 8 minutes et plafonnant à 470 m d'altitude, emporte en effet un canard, un coq et un mouton. Ces derniers n'avaient pas été choisis au hasard. Le mouton, en sa qualité de mammifère, est un animal proche de l'homme ; le coq n'est qu'un oiseau, mais...de basse-cour ; le canard, oiseau lui aussi, a prouvé sa résistance particulière lors de la plongée dans l'étang ; il pourrait faire preuve de la même qualité en "haute" atmosphère.

Les sujets expérimentaux supportent le vol sans problème. Et malgré un atterrissage assez violent dans les bois de Vaucresson, la première expérience de physiologie aéronautique ayant donné satisfaction, Pilâtre de Rozier et le Marquis Laurent d'Arlandes obtiennent du Roi l'autorisation de tenter la première ascension humaine en ballon le 21 novembre 1783.

Ce contrôle physiologique animal historique précédant les premiers essais de navigation aérienne par l'homme, n'est-il pas l'ébauche de la méthode de travail qui s'est imposée plus tard pour tenter la conquête de l'air et de l'espace ?

L'histoire de l'aéronautique et de la conquête spatiale est ainsi jalonnée de premières animales précédant les premières humaines.

### B - Une approche très prudente de l'espace

Elle correspond à une première phase "d'évaluation globale des risques". Il faut voir si les organismes animaux et humains peuvent supporter les conditions du vol spatial : les accélérations, les radiations cosmiques et la microgravité. Les animaux alors retenus sont des espèces dites "conventionnelles" de mammifères physiologiquement proches de l'espèce humaine.

Dès la fin de la deuxième guerre mondiale, au début de l'année 1948, les Etats-Unis effectuent des tirs balistiques avec des fusées dérivées des "V2" récupérées en Allemagne. Ces fusées emportent essentiellement des singes rhesus (*Macaca mulatta*) à quelques dizaines de kilomètres d'altitude. En 1951, pour la première fois aux Etats-Unis, une fusée Aerobee emporte un singe et onze souris à 72 km d'altitude.

Dans le même temps, l'Union Soviétique réalise des tirs analogues avec des fusées emportant des chiens. Elle réussit également la première satellisation autour de la Terre d'un engin fabriqué par l'homme, Spoutnik 1, le 4 octobre 1957. Ces essais aboutissent chez les Soviétiques au vol de "Laïka" la plus célèbre des chiennes de l'espace. Elle effectue le 3 novembre 1957, dans Spoutnik 2, le premier vol en orbite autour de la Terre. Elle ne peut pas être ramenée sur Terre après une semaine passée dans l'espace. En août 1960, deux chiennes, Strelka et Belka, accompagnées de quarante-deux rongeurs, des rats et des souris, passent une journée complète en orbite ; après 18 révolutions et 704 000 km de parcours les

animaux sont récupérés sur Terre. D'autres chiennes moins célèbres, Chernushka le 9 mars 1961 et Zvesdoshka le 21 mars 1961 précèdent le vol du premier homme dans l'espace Youri Gagarine le 12 avril 1961. Dans sa cabine Vostok 1, Gagarine effectue une révolution autour de la Terre en 1h 48. Les 6 et 7 août 1961, Titov effectue 17 révolutions en 25 heures de vol.

Pendant ce temps, les Etats-Unis jouent la carte des chimpanzés. Les guenons Able et Baker sont les premiers animaux revenus vivants de l'espace après qu'un vol balistique de 15 minutes les ait emmenées à 500 km d'altitude. Ham, en janvier 1961, précède Alan Shepard pour le premier vol américain suborbital en mai 1961. Enos (2 révolutions en novembre 1961) précède John Glenn pour le premier vol américain vraiment orbital (3 révolutions en février 1962). L'utilisation des chimpanzés est ensuite abandonnée pour protéger cette espèce en voie de disparition et pour des raisons pratiques, l'animal étant de taille trop importante.

De 1961 à 1967, la France réalise quelques vols balistiques avec des rats, des chats et des singes. Cette période est marquée par le pionnier de la physiologie spatiale en France, le Médecin Général Robert Grandpierre (1903-1984). Lorrain d'origine, né à Toul, il crée en 1946 à la Faculté de Nancy avec le Professeur Franck et le Doyen Merklen, le premier enseignement civil de Médecine aéronautique sanctionné par un diplôme en France. Suite aux premiers vols spatiaux humains, le Professeur Grandpierre développe une expérimentation animale pour comprendre les mécanismes d'action de la microgravité et les effets des ions lourds du rayonnement cosmique sur les organismes vivants.

Le 22 février 1961, la France procède au premier lancement, depuis Hammaguir dans le sud algérien, d'une fusée-sonde Véronique emportant dans sa pointe le rat Hector, pour un vol balistique à 150 km d'altitude. Deux autres rats, Castor et Pollux, sont envoyés les 15 et 18 octobre 1962. Les études neurophysiologiques vestibulaires engagées sont poursuivies sur d'autres modèles de mammifères. Le 18 octobre 1963, c'est la chatte Félicette qui est emportée par une fusée Véronique. La France utilise ensuite un lanceur plus puissant, assurant plus de 5 minutes de microgravité de bonne qualité, la fusée Vesta. En 1967, deux tirs avec succès emportent chacun un singe macaque (*Macaca nemestrina*), les guenons Martine et Pierrette.

L'approche du vol spatial a été très prudente et nombre des expériences de l'époque font aujourd'hui sourire. Il faut cependant bien comprendre que l'effet des différents facteurs caractéristiques du vol spatial était totalement inconnu à cette époque. Les moyens techniques et les méthodes scientifiques étaient extrêmement simplifiées, la miniaturisation était encore un rêve, les capacités de télémétries étaient limitées.

Parallèlement aux tirs de fusées, des expériences en ballons - sondes se sont développées pour essayer de mesurer l'effet des radiations sur les organismes vivants.

L'intérêt scientifique et médical de l'animal dans l'espace est alors essentiellement l'obtention de données biomédicales. Celles-ci mettent en évidence des modifications physiologiques sur le système cardio-vasculaire, le système neuro-sensoriel, l'immunologie, les problèmes musculaires et osseux .... Ces modifications sont constatées ; pour les comprendre, il faut des expériences sur les animaux, expériences au sol et en vol.

## II - ESSOR DE LA BIOLOGIE GRAVITATIONNELLE ET DE LA RADIOBIOLOGIE SPATIALE.

### A- Des dizaines d'espèces animales embarquées

C'est le deuxième âge de l'expérimentation animale en biologie spatiale, phase qui continue encore maintenant. Les modèles animaux sont utilisés pour mesurer les effets de la microgravité et des rayonnements cosmiques sur les principales fonctions des organismes vivants.

Petit à petit les Rongeurs, principalement des rats, remplacent les chiens. Les singes rhésus et les singes-écureuils se substituent aux chimpanzés.

Les expériences menées avec des espèces conventionnelles de mammifères confirment et précisent les premières observations faites sur l'homme. Un exemple : les expériences sur les satellites Biocosmos montrent que la perte osseuse observée au cours des vols spatiaux est due chez le rat, pour l'essentiel, à une baisse de la formation et non à une augmentation de la résorption osseuse, contrairement à ce qui est observé lors d'une immobilisation au sol (DEMETS, 1993).

Pour répondre aux questions plus fondamentales, les chercheurs ont réussi à faire partir plusieurs dizaines d'espèces animales différentes (Tableau I).

**Tableau I : Vols spatiaux des espèces dites "non conventionnelles".** Pour chaque vol sont précisés entre parenthèses le pays lanceur du véhicule, la date et la durée de la mission (d'après KREISS, 1993).

#### PROTOZOAIRES

<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Cilié)	Biocosmos 1667 (URSS 07/85; 7j) Biocosmos 1887 (URSS 10/87 ; 13j)
<i>Paramecium tretaurelia</i> (Cilié)	Salyut 5 (URSS de 09/77 à 11/81) Salyut 6 (URSS 1979; 73j) STS 61 A Spacelab D1 (USA 10/85; 7j)
<i>Euglena sp.</i> (Flagellé)	China 20 (Chine 08/87; 5j) China 21 (Chine 09/87; 7j)

#### CNIDAIRES

<i>Aurelia aurita</i> (Méduse)	Biocosmos 2044 (URSS 09/89; 14j) SLS 1 (USA 06/91; 8j) Station MIR
--------------------------------	--

#### PLATHELMINTHES TURBELLARIES

<i>Dugesia tigrina</i> (Planaire)	Biocosmos 1887 (URSS 10/87; 13j) Biocosmos 2044 (URSS 09/89; 14j)
-----------------------------------	--

#### NEMATODES

<i>Caenorhabditis elegans</i>	STS 42 IML 1 (USA 01/92; 8j)
-------------------------------	------------------------------

#### CRUSTACES

<i>Artemia salina</i> (Artémie)	Biosatellite II (USA 09/67; 2j) Station Salyut 7 (URSS 05/82; 40j) STS 37 (USA 04/91; 8j) STS 43 (USA 1991; 8j)
---------------------------------	--

## ARACHNIDES

*Araneus sp.* (Araignée)

Skylab 3 (USA 07/73)

## INSECTES

*Carausius morosus* (Phasme)

STS 61 A Spacelab D1 (USA 10/85; 7j)  
Biocosmos 1887 (URSS 10/87; 13j)  
Biocosmos 2044 (URSS 09/89; 14j)  
STS 42 IML 1 (USA 01/92; 8j)

*Tribolium confusum*

Biosatellite II (USA 09/67; 2j)  
Biocosmos 605 (URSS 10/73; 20j)

*Habrobracon juglandis*

Biosatellite II (USA 09/67; 2j)

*Drosophila melanogaster* (Drosophile)

Vostok 1 (URSS 04/61. 2h)  
Vostok 2 (URSS 08/61; 1j)  
Vostok 3 (URSS 08/62; 4j)  
Vostok 4 (URSS 08/62; 3j)  
Vostok 5 (URSS 06/63; 5j)  
Vostok 6 (URSS 06/63; 3j)  
Voskhod 1 (URSS 10/64; 1j)  
Biosatellite II (USA 09/67; 2j)  
Biocosmos 782 (URSS 11/75; 19,5j)  
Biocosmos 936 (URSS 08/77; 18,5j)  
Biocosmos 1129 (URSS 09/79; 18,5j)  
Station Salyut 6 (URSS; 8j)  
Biocosmos 1667 (URSS 07/85; 7j)  
Biocosmos 1887 (URSS 09/87; 13j)  
STS 61 Spacelab D1 (USA 10/85; 7j)  
Biocosmos 2044 (URSS 09/89; 14j)  
STS 42 IML 1 (USA 01/92; 8j)

*Apis mellifica* (Abeille)

STS 3 (USA 03/82; 8j)

## ECHINODERMES

*Paracentrotus lividus* (Oursin)

Maser 4 (Pays-Bas 03/90; 7min)  
Biocosmos 2229 (URSS 12/92; 12j)

## POISSONS

*Fundulus heteroclitus*

Skylab 3 (USA 07/73)  
Biocosmos 782 (URSS 12/75; 19,5j)

*Pæcilia reticulata*

Biocosmos 782 (URSS 12/75; 19,5j)  
Biocosmos 1514 (URSS 12/83; 5j)  
Biocosmos 1887 (URSS 09/87; 13j)  
Biocosmos 2044 (URSS 09/89; 14j)  
Station MIR

## AMPHIBIENS

*Xenopus laevis* (Anoure)

STS 61 Spacelab D1 (USA 10/85; 7j)  
Texus 17 (Pays-Bas 05/88; 7min)  
Maser 3 (Pays-Bas 04/89; 7min)  
STS 42 IML 1 (USA 01/92; 8j)  
Spacelab J (USA 09/92; 7j)  
Spacelab D2 (USA 04/93; 10j)

<i>Rana pipiens</i> (Anoure)	Gemini 8 (USA 03/66; 10h) Gemini 12 (USA 11/66; 3j) Biosatellite II (USA 09/67; 2j)
<i>Rana catesbiana</i> (Anoure)	OFO (USA 11/70)
<i>Hyla japonica</i> (Anoure)	Station MIR (URSS 1990; 8j)
<i>Pleurodeles walil</i> (Urodèle)	Biocosmos 1667 (URSS 07/85; 7j) Biocosmos 1887 (URSS 09/87; 13j) Biocosmos 2044 (URSS 09/89; 14j) Biocosmos 2229 (URSS 01/93; 12j)
<b>OISEAUX</b>	
<i>Coturnix japonica</i> (Caille)	Biocosmos 1129 (URSS 09/79; 18,5j) Station MIR (URSS 03/90; 20j)
<i>Gallus domesticus</i> (Poulet)	STS 29 (USA 03/89; 5j)

Pratiquement tous les échelons du règne animal sont concernés , dans un but principal : étudier l'influence de la microgravité et du rayonnement cosmique sur les différentes étapes du développement d'un individu, de sa conception jusqu'à sa mort. Car si la fiabilité des lanceurs et la relativement bonne connaissance que nous avons de la physiologie spatiale autorisent les missions de courte et moyenne durées sans connaître les angoisses des pionniers des années soixante, de nombreuses zones d'ombres demeurent, notamment en biologie du développement. Ces espèces non conventionnelles sont également de bons modèles pour étudier la morphogénèse et la mise en place des comportements moteurs.

Outre la relative simplicité pour les héberger et les nourrir, les différentes espèces embarquées possèdent chacune des caractéristiques propres, dignes d'intérêt pour les scientifiques ; on peut citer entre autres :

- la mouche drosophile qui est depuis de nombreuses années une référence en matière de génétique,
- les œufs d'oursin et de grenouille facilement manipulables et au développement parfaitement connu,
- la méduse *Aurelia* dont le système d'équilibration est proche de celui des animaux supérieurs,
- le ver *Cænorhabditis elegans* dont on connaît précisément la destinée de chaque cellule, de l'œuf à l'adulte,
- le guppy, poisson bien connu des aquariophiles, qui se reproduit facilement et rapidement, à organogénèse bien établie.

Les études concernant les animaux "non conventionnels" s'inscrivent dans la dynamique de la biologie spatiale, où chaque secteur (biologie animale, végétale et cellulaire) progresse dans la même optique de nous faire mieux comprendre et appréhender cet environnement d'apparence si hostile et mystérieux.

## B - Les grands programmes avec des animaux

### a - Le programme Biocosmos (URSS)

L'Union Soviétique a poursuivi durant 20 ans, un programme d'expérimentation animale utilisant des satellites automatiques Cosmos. Depuis 1973, l'Institut des Problèmes Biologiques et Médicaux de Moscou a organisé 10 vols de ces satellites (Tableau II). Dès le départ, ce programme a été ouvert à la coopération, d'abord avec les pays amis à l'époque de la guerre froide, puis à la France et aux Etats-Unis.

Lors du dernier vol Cosmos 2229 ou Bion 10, une dizaine de scientifiques français et une quinzaine de scientifiques américains ont pu travailler ensemble à Moscou, aux côtés de leurs collègues soviétiques. Le Laboratoire de Biologie expérimentale-Immunologie de l'Université Henri Poincaré-Nancy 1 a participé à cette mission spatiale pour laquelle 15 Pleurodèles femelles adultes avaient été embarqués (DOURNON *et al.*, 1994 a et b ; BAUTZ *et al.*, 1994 a).

**Tableau II : Les vols du programme Biocosmos** (de gauche à droite : le numéro du vol, le début et la durée de la mission, les animaux embarqués).

<b>Cosmos 605</b>	10/1973	(20j)	insectes, rats
<b>Cosmos 690</b>	10/1974	(20j)	rats
<b>Cosmos 782</b>	11/1975		drosophiles, poissons, rats
<b>Cosmos 936</b>	08/1977	(18,5j)	drosophiles, rats
<b>Cosmos 1129</b>	09/1979	(18,5j)	drosophiles, cailles (œufs),rats
<b>Cosmos 1514</b>	12/1983	(5j)	poissons, rats, singes rhésus
<b>Cosmos 1667</b>	07/1985	(7j)	protozoaires, drosophiles, pleurodèles, rats, singes rhésus
<b>Cosmos 1887</b>	09/1987	(12,5j)	protozoaires, planaires, phasmes, drosophiles, poissons, pleurodèles, rats, singes rhésus
<b>Cosmos 2044</b>	09/1989	(13j)	méduses, planaires, phasmes, drosophiles, poissons, pleurodèles, rats, singes rhésus
<b>Cosmos 2229</b>	12/1992	(12j)	insectes, pleurodèles, rats, singes rhésus

### b - Les Biosatellites (Etats-Unis)

Au milieu des années 1960, les Etats-Unis mettent en place un programme de Biosatellites automatiques emportant des plantes, des invertébrés et des cellules animales. Le premier lancement en décembre 1966 est un échec, la charge utile n'ayant pas pu être récupérée. Le Biosatellite II lancé en septembre 1967 emporte des oeufs de grenouille, des artémies, des drosophiles et autres insectes ; le vol écourté dure 45h. La mission de Biosatellite III en juin 1969 doit être également raccourcie ; un singe *Macaca nemestrina* est à bord..

### c - Le programme SLS (Spacelab Life Sciences)

La NASA a conçu un système adapté au laboratoire Spacelab de la

navette américaine et dédié à l'expérimentation animale. Ce système, le Research Holding Animal Facility (RHAF) est susceptible d'accueillir différents habitats animaux. Les astronautes occupant la navette pour des séjours d'une à deux semaines, peuvent intervenir sur les animaux et les expériences.

Deux RHAF volent pour la première fois sur SL 3 en avril 1985. L'un emporte des rats, l'autre des singes-écureuils.

Après la catastrophe de Challenger le 28 janvier 1986, la NASA décide d'engager un programme de vols du Spacelab dédié aux sciences de la vie. Le premier vol, SLS 1, se déroule en juin 1991. En septembre 1993, pour le vol SLS 2, huit équipes françaises peuvent participer aux expériences portant sur des rats.

#### **d - La station orbitale MIR (URSS)**

Le complexe orbital MIR est une station spatiale permanente dont le premier module a été lancé en 1986. Elle est desservie régulièrement tous les 3 mois par des vaisseaux automatiques Progress pour le matériel et le ravitaillement, tous les 6 mois par des véhicules habités Soyouz. Elle est occupée en permanence par trois cosmonautes qui se relayent périodiquement.

La station devient régulièrement le cadre d'expériences sur des espèces animales très diverses (méduses, poissons, amphibiens, oiseaux.....). Citons l'expérience, en mars 1990, avec des cailles *Coturnix japonica*. Sur 43 œufs mis à incuber, 21 se développent, dont 8 jusqu'à l'éclosion. Les jeunes cailles présentant un manque de coordination motrice et une incapacité à se nourrir sont sacrifiées par les cosmonautes.

### **III - INTERET SOUTENU DE L'ANIMAL DANS L'ESPACE**

#### **A - Pourquoi faut-il continuer à envoyer des animaux dans l'espace?**

Malgré plus de trente ans de présence de l'homme dans l'espace (à ce jour, près de trois cent hommes et femmes y ont déjà séjourné) de nombreuses questions sur l'adaptation de l'organisme à la microgravité au cours de vols habités de courte ou moyenne durées, et au rayonnement cosmique au cours de séjours de longue durée, demeurent sans réponse. Après avoir démontré que les mammifères, puis les hommes, peuvent vivre dans cet environnement nouveau, les scientifiques et les médecins veulent connaître les conséquences néfastes de ces vols, pour mieux les prévenir. Pour répondre à ces questions, ils doivent continuer à utiliser les mêmes méthodes que celles communément mises en œuvre au sol ; l'expérimentation animale reste une méthode parmi d'autres.

Cependant l'expérimentation animale ne se justifie pas uniquement comme une substitution de l'observation humaine. La reproduction, le développement embryonnaire, la croissance postnatale, le vieillissement, la mise en place des comportements (nage, construction d'alvéoles ou de toiles) sont autant de domaines qui nécessitent l'utilisation de modèles animaux particuliers dont les comportements sont parfaitement connus au sol. Après plus de 30 ans d'études, il n'existe aucune preuve irréfutable que la microgravité perturbe les processus fondamentaux de l'embryogenèse et du développement en général. Pour tous ces domaines, l'éthique ou des contraintes techniques interdisent l'utilisation de sujets humains.

Depuis quelques années, les scientifiques tentent de substituer les études sur des cultures cellulaires aux expériences animales. De nombreux progrès ont été réalisés dans ce domaine mais en l'état actuel il n'est pas possible de réduire les réactions d'un organisme entier à ce qui est observé avec une population cellulaire isolée. Un organisme se définit justement par les interactions entre des populations cellulaires spécialisées qui interagissent entre elles par l'intermédiaire de médiateurs électriques (nerfs, muscles...) ou chimiques (hormones, nutriments, cytokines, neurotransmetteurs...). Un changement concernant quelques cellules suffit à modifier le comportement de tout l'organisme. Cela est vrai au sol, c'est encore plus vrai pour des études en microgravité où de nombreuses fonctions sont perturbées en même temps.

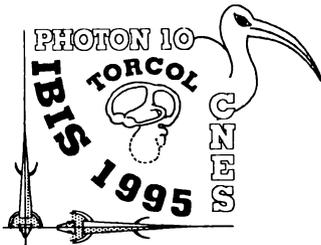
Le troisième âge de la recherche spatiale en biologie et en physiologie se met en place avec les stations orbitales et la construction de nouveaux modules dédiés à l'expérimentation animale. Ces modules serviront à effectuer des recherches sur le comportement à long terme des organismes. Les chercheurs souhaitent maintenant observer des cycles complets de génération, de la fécondation à la fécondation de la génération suivante. Si la microgravité a un effet sur la mise en place des schémas comportementaux, l'observation de la réadaptation à la pesanteur d'organismes nés en apesanteur apportera des informations nouvelles sur le fonctionnement du cerveau.

Pour réaliser les expériences de plus en plus complexes, les équipages devront intervenir dans les procédures expérimentales tant pour la maintenance que pour effectuer des mesures ou des prélèvements. Hommes et animaux devront cohabiter dans les mêmes stations orbitales.

## **B - Les projets soutenus du Laboratoire de Biologie expérimentale-Immunologie de l'Université Henri Poincaré-Nancy 1**

Deux projets de recherche proposés par notre laboratoire ont été retenus et sont actuellement soutenus par le Centre National d'Etudes Spatiales de l'Agence française de l'espace (CNES).

### **a - Le projet TORCOL**



L'expérience TORCOL, "Triton en Orbite : Recherches Concernant l'Oreille interne et la Ligne latérale", a comme objectif l'étude du développement embryonnaire et larvaire des systèmes baro- et gravi-sensibles chez un Vertébré, le Pleurodèle (Amphibien, Urodèle). Sur Terre, ces structures contribuent à la perception de la gravité et des mouvements, ainsi qu'à la localisation des obstacles dans l'eau.

Notre but est de vérifier si la pesanteur intervient dans l'organogenèse de structures qui permettent plus tard à l'individu de se positionner et de se localiser par rapport à la gravité elle-même. C'est probablement au cours des périodes très précoces de l'ontogenèse que la gravité, ou son absence, pourrait intervenir et entraîner des modifications structurales et fonctionnelles lors de la différenciation des systèmes cellulaires impliqués.

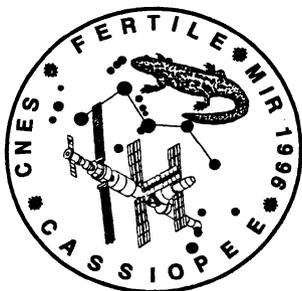
Le support technologique de l'expérience est l'Instrument de Biologie Spatiale (IBIS) développé par le CNES. IBIS sera embarqué à bord d'une capsule

recupérable russe PHOTON. Le lancement de PHOTON 10, différé par rapport aux prévisions initiales de l'automne 1994, est actuellement programmé pour février 1995. La durée prévue du vol orbital est de 14 jours. L'instrument comporte un plateau microgravité et une centrifugeuse permettant de recréer en orbite un champ gravitationnel comparable à celui existant sur Terre. Cet équipement permet la comparaison des réponses des systèmes biologiques soumis à des conditions d'environnement spatial qui ne diffèrent qu'au niveau du paramètre gravité.

Des embryons bloqués par le froid au stade du jeune bourgeon caudal seront embarqués. Leur développement sera réactivé au cours du vol en orbite par une température de 22°C. Des embryons seront fixés à différents stades de développement. Il est prévu que des embryons et des larves vivants reviennent sur Terre.

Des contrôles réalisés au sol assurent la faisabilité de l'expérience TORCOL (BAUTZ *et al.*, 1994 b et c).

### b - Le projet FERTILE



Au cours du développement embryonnaire précoce des Amphibiens, plusieurs processus ont été décrits comme pouvant être dépendants de la gravité terrestre : la rotation d'équilibration, la migration du pronoyau femelle, l'orientation des premiers plans de clivage, la symétrisation de l'individu (BAUTZ *et al.*, 1994 d). Cette dépendance n'a encore jamais pu être prouvée car il n'existe aucune technique permettant de supprimer la gravité terrestre pendant plusieurs heures, plusieurs jours. Il faut accéder à l'espace.

Actuellement, nous préparons en collaboration avec le CNES et le Centre de Biologie du Développement CNRS de Toulouse, l'expérience FERTILE : Fécondation et Embryogénèse Réalisées chez le Triton *In vivo* dans L'Espace.

L'objectif de l'expérience FERTILE est d'obtenir la fécondation naturelle et le développement précoce d'un Vertébré en microgravité, le Triton *Pleurodeles waltl* (GUALANDRIS-PARISOT *et al.*, 1994). Trois femelles inséminées seront embarquées dans la station MIR. La ponte sera déclenchée en vol orbital par une injection d'hormone. Les œufs pondus seront répartis en plusieurs lots pour le développement en microgravité, pour le développement dans une centrifugeuse 1G et pour la fixation. Il est prévu que des embryons et des larves vivants, et les femelles du vol, reviennent sur Terre. Plusieurs campagnes de vols paraboliques avec la Caravelle "Zéro G" du CNES ont permis de tester le comportement, en microgravité et hypergravité, du matériel biologique : œufs, larves, adultes (BAUTZ *et al.*, 1992) et expérimental : conteneurs de transport, de ponte....

L'expérience FERTILE doit être réalisée lors de la mission CASSIOPEE à bord de la station orbitale MIR. Le vol d'une durée prévue de 16 jours est programmé pour juin 1996 avec à bord la première spationaute française, Claudie André-Deshaye.

## **POUR CONCLURE .....**

En 1865, Jules Verne imaginait dans le voyage "De la Terre à la Lune" toute une petite ménagerie accompagnant les pionniers sur la Lune. Il est amusant de constater que c'est à l'occasion de la dernière mission lunaire Apollon 17 en décembre 1972 que pour la première fois des hommes et des animaux ont volé ensemble dans l'espace, cinq souris et trois hommes. Elles n'ont pas aluni. Pour une fois, l'animal n'a pas précédé l'homme dans les progrès de la conquête spatiale.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **\* Ouvrages généraux consultés et non cités en référence dans le texte**

L'animal dans l'espace, 1993. Dossier CNES extrait du journal interne CNESQUISPASSE?, 74, 1-20.

L'astronautique soviétique, 1992. LARDIER C. - Armand Colin.

L'espace et la vie, 1988. PLANEL H. - Larousse.

L'exploration de l'espace, 1990. Time - Life.

La Lettre du CNES, N° 131 (déc.1990) à 140 (nov.1992).

Microgravity News from ESA , Vol.2, N°2 (july 1989) à Vol.7, N°2 (aug.1994).

Mutations microgravité, Novespace, Vol.5, N°2 ( mars 1991) à Vol.8, N°6 (nov. 1994).

Vie et œuvre du Médecin Général Grandpierre, 1993. Plaquette éditée par le Service de Santé des Armées.

### **\* Articles originaux cités dans le texte**

BAUTZ A., GRINFELD S., HOUILLON C., DUPRAT A.M. et DOURNON C., 1992 - Intérêt des vols paraboliques d'avion pour l'étude de l'influence de la microgravité et de l'hypergravité sur la fécondation et le développement de *Pleurodeles waltl* (Amphibien Urodèle). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **117**, 168-169.

BAUTZ A., RUDOLF E., AIMAR C., MITASHOV V., HOUILLON C. et DOURNON C., 1994 a - Expression d'une protéine liée au sexe, la peptidase-1, chez des Pleurodèles femelles soumises à un vol orbital et recherche d'anomalies génétiques dans leurs descendance. *Bull. Acad. Soc. Lorr. Sci.* , **33**, 149- 158.

BAUTZ A., AIMAR C., HOUILLON C. et DOURNON C., 1994 b - Systèmes cellulaires baro- et gravi-sensibles. Expérience T.O.R.C.O.L. sur I.B.I.S. "Sciences Physiques et Sciences de la Vie : Quatre années de recherche scientifique dans l'espace, 1990-1994", CNES , 491- 492.

BAUTZ A., AIMAR C., DURAND D. et DOURNON C., 1994 c - Systèmes cellulaires baro- et gravi-sensibles céphaliques chez *Pleurodeles waltl*. Faisabilité de l'expérience TORCOL - IBIS 1994 en microgravité. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, sous presse.

BAUTZ A., DURAND D. et DOURNON C., 1994 d - Développement embryonnaire du Pleurodèle (Amphibien, Urodèle) et environnement spatial : influence de l'hypergravité, de la gravité et de la microgravité sur la symétrisation de l'individu. *Actes du 26 ème Colloque SFECA*, Nancy, 6pages, accepté.

DEMETS R., 1993 - Biobox experiments indicate : *in vitro* bone formation is suppressed under microgravity conditions. *Microgravity news from esa* , 6, n°2, 220- 223.

DOURNON C., RUDOLF E., BAUTZ A., AIMAR C., MITASHOV V. and HOUILLON C., 1994 a - "Experience Triton" on Bion 10 : study of peptidase-1 expression in embarked *Pleurodeles* females and detection of genetic abnormalities in their progeny. *ESA SP- 366*, 171- 175.

DOURNON C., BAUTZ A., RUDOLF E., AIMAR C., MITASHOV V. and HOUILLON C., 1994 b - Functional transplantations of ovaries from salamanders submitted to a space flight. *J. Appl. Physiol.*, soumis.

GUALANDRIS-PARISOT L., GRINFELD S., FOULQUIER F., DUPRAT A.M., HOUILLON C., AIMAR C., DOURNON C. et BAUTZ A., 1994 - Fécondation et embryogenèse réalisées chez le triton *in vivo* dans l'espace (Projet FERTILE). " *Sciences Physiques et Sciences de la Vie: Quatre années de recherche scientifique dans l'espace, 1990-1994*", CNES, 483-486.

KREISS D., 1993 - Poissons, Oiseaux, Araignées, Grenouilles, ont aussi pris un ticket pour l'Espace. in *L'Animal dans l'Espace, CNESQUISEPASSE?*, 74, 17-18.

## **TRANSFORMATIONS ULTRASTRUCTURALES D'HYBRIDOMES MURINS AU COURS DE LA MORT CELLULAIRE DANS UN MILIEU DE CULTURE SANS SERUM**

Béatrice MATHIOT\*, Suzanne COLIN\*\*, Jean-Marie KELLER\*\*.

\* PHARMANIM - 25 rue de Saurupt - 54000 Nancy

\*\* Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement - Université de Nancy I  
- Faculté des Sciences - B.P. 235 - 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex

Note acceptée pour publication le 23 février 1995.

### **RESUME**

L'observation en microscopie électronique d'hybridomes, mis en culture dans un milieu sans sérum, montre que la dégénérescence cellulaire peut se faire selon deux processus distincts.

Certaines cellules subissent un phénomène d'apoptose, véritable mort physiologique et programmée, caractérisé par une déformation cellulaire, des bourgeonnements membranaires, une condensation des organites et une fragmentation du noyau.

D'autres cellules, par contre, se nécrosent par destructuration de leur cytoplasme et de leur noyau et disparition de leur membrane plasmique, cette nécrose correspondant à la mort "pathologique" des cellules.

### **MOTS CLES**

Hybridome, anticorps monoclonaux, milieu sans sérum, nécrose, apoptose, microscopie électronique.

Note présentée à la séance du 9 mars 1995 par M. le Président KELLER.

# ULTRASTRUCTURAL TRANSFORMATIONS OF MURINE HYBRIDOMAS DURING CELL DEATH IN A SERUM-FREE MEDIUM

## ABSTRACT

Electron microscopy of hybridoma cells cultured in serum-free medium shows that the cellular death can follow two modalities.

Some cells undergo an apoptosis phenomenon named "programmed" or "physiological" cell death and characterized by a cellular oedema, membrane blebbing, condensation of cytoplasmic organelles and nuclear fragmentation.

Other ones, in contrast, necrose themselves by destructureation of their cytoplasm and nucleus and disappearing of the plasma membrane, this necrosis corresponding to the "pathological" cell death.

## KEY-WORDS

Hybridoma, monoclonal antibody, serum-free medium, necrosis, apoptosis, electron microscopy.

## INTRODUCTION

La demande croissante en anticorps monoclonaux pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques (dans le cadre de la pathologie anti-cancéreuse notamment), justifie l'importance accordée aux cellules productrices de ces molécules ultra-spécifiques: les hybridomes.

Depuis l'obtention des premiers hybridomes par KÖHLER et MILSTEIN en 1975, les techniques de cultures cellulaires n'ont cessé de s'améliorer dans un même but: augmenter la productivité des hybridomes. La recherche s'est alors orientée sur 2 axes: l'amélioration des techniques de culture (bioréacteurs en batch, en perfusion, fibres creuses, systèmes de dialyse (MATHIOT et al., 1993),...) et la mise au point de nouveaux milieux de culture, si possible totalement dépourvus de sérum afin d'éviter notamment les contaminations microbiennes (MATHIOT, 1992).

Cependant en dépit de l'amélioration des conditions de culture, les cellules sont amenées à dégénérer après une période de croissance et de production. Cette mort cellulaire peut se faire selon diverses modalités.

La connaissance des mécanismes intimes de la mort cellulaire et notamment des modifications morphologiques associées par le biais de la microscopie électronique, permettra d'améliorer cette technologie en retardant ce processus.

## MATERIELS ET METHODES

### . Souche cellulaire

Les cellules utilisées dans ce travail sont des hybridomes murins qui appartiennent à la souche A 49. Ils ont été obtenus au laboratoire INSERM Unité 284 par fusion de cellules du myélome murin Sp2/O et de cellules spléniques de souris Balb/C préalablement immunisées avec des suspensions d'hématies du groupe sanguin A.

Ces hybridomes produisent des immunoglobulines de classe M dirigées contre les antigènes de surface d'érythrocytes humains du groupe sanguin A.

### . Conditions de culture

Ces cellules ont été mises en culture dans le milieu BM-O. Ce milieu est constitué du mélange volume/volume de 2 milieux de base synthétiques (DMEM et HAM's F-12) auquel ont été ajoutés: 50  $\mu$ M de 2-mercaptoéthanol, 0,01 % (p/v) de Pluronic F 68 et 50  $\mu$ M d'éthanolamine. Ce milieu n'a pas été supplémenté en sérum de veau foetal, ni en substitut de sérum. Le milieu a été additionné de 20 mM de tampon Hepes.

Les hybridomes ont étéensemencés à une concentration de  $10^5$  cellules/ml dans des boîtes de culture en polystyrène de 75  $\text{cm}^2$  de surface disponible puis placés à l'étuve à 37°C.

Les prélèvements ont été réalisés au 2ème jour de culture.

### . Microscopie électronique à transmission (M.E.T.)

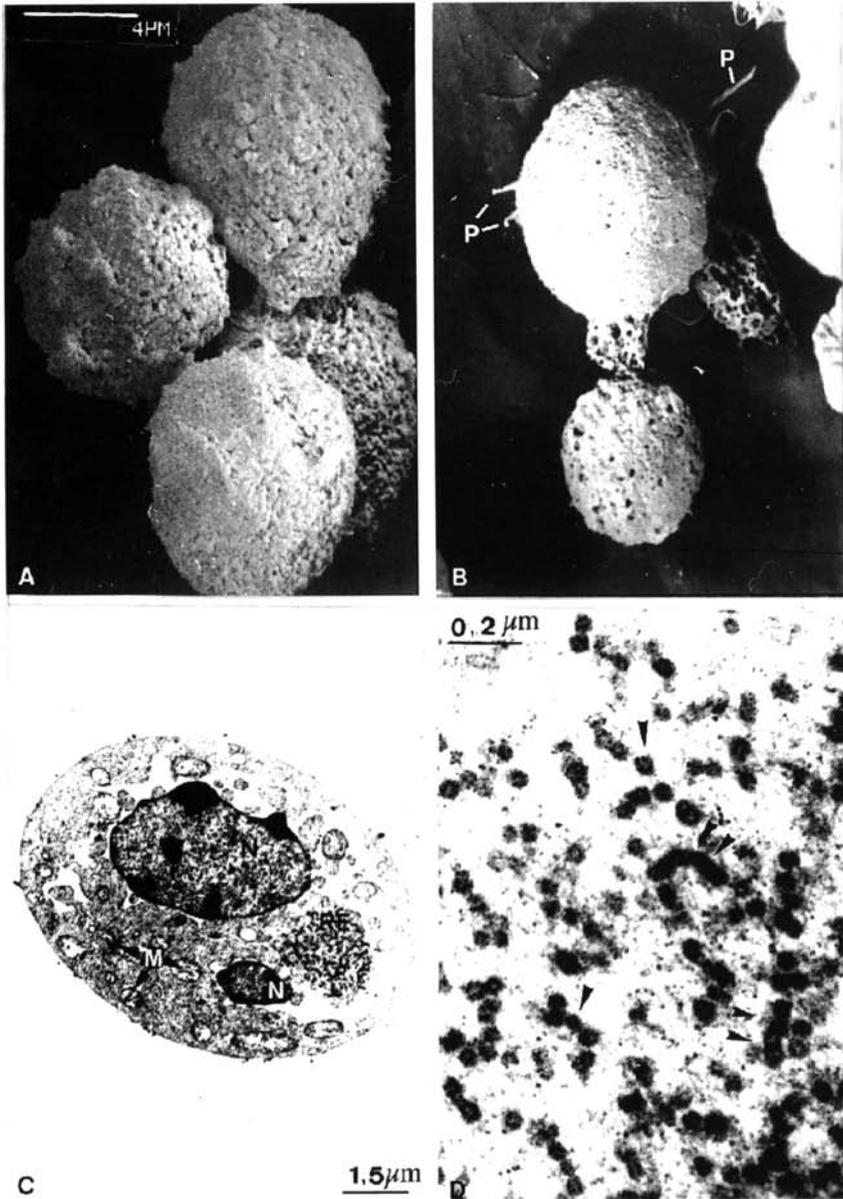
Les cellules A 49 sont fixées dans le glutaraldéhyde à 2,8% dans le tampon cacodylate 0,1M pH 7,4 (préparation extemporanée) pendant 30 minutes à +4°C, puis lavées dans le tampon cacodylate à 0,1M.

Après une post-fixation de 30 minutes à +4°C dans une solution de tétr oxyde d'Osmium à 1% dans le tampon cacodylate à 0,1M pH 7,4, les hybridomes sont deshydratés dans des bains successifs d'alcool de concentration croissante pendant 5 minutes chacun: 30°, 50°, 70°, 95° (2 bains) et 100° (2 bains). Enfin 2 bains de 5 minutes d'oxyde de propylène complètent cette deshydratation.

Les échantillons subissent alors une imprégnation progressive dans un mélange araldite Epon/oxyde de propylène volume/volume pendant une nuit à +4°C précédant une inclusion dans la résine araldite Epon.

Après 48 heures de polymérisation à l'étuve à 60°C, des coupes fines (70 à 80 nm) sont réalisées sur un ultramicrotome REICHERT OMU<sub>2</sub>, puis récupérées sur des grilles de cuivre et contrastées dans des bains successifs d'acétate d'uranyle (solution à 5% dans l'eau) et de citrate de plomb.

Ces coupes sont ensuite observées au microscope électronique à transmission ZEISS EM 9S-2.



**Figure 1:** Hybridomes A49 en culture (jour 2)

**A-B:** vue en M.E.B.; **C-D:** vue en M.E.T.

**P:** pseudopode, **N:** noyau, **M:** mitochondrie, **RE:** réticulum endoplasmique (détail en D: flèches).

### **. Microscopie électronique à balayage (M.E.B.)**

Les hybridomes sont fixés dans le liquide de Clarke (alcool 100° et acide acétique 3 volumes/1 volume) durant 2 heures à température ambiante.

Ils sont ensuite deshydratés pendant 15 minutes dans des bains successifs d'alcool: 70° (2 bains), 95° (3 bains), 100° (3 bains) puis dans 3 bains de 10 minutes d'oxyde de propylène.

Après une dessiccation sous vide léger, les cellules sont collées sur des supports de cuivre ou d'aluminium et métallisées à l'or (or palladium) avant d'être observées grâce à un microscope électronique à balayage HITACHI S 2500.

## **RESULTATS**

### **. Hybridomes en phase exponentielle de croissance**

Les hybridomes observés ont une forme généralement arrondie ou ovoïde (Figure 1A). Leur membrane plasmique est ornée de digitations cellulaires de type pseudopodes (Figure 1B).

Leur cytoplasme présente une certaine hétérogénéité aux électrons caractérisée par de grandes plages optiquement vides où se trouvent quelques mitochondries provenant des parties plus denses du cytoplasme. Toutes portent des crêtes qui s'interrompent dans une matrice optiquement vide (Figure 1C).

Ces cellules contiennent un noyau bien marqué à nucléoplasme peu dense garni de chromatine éparse diffuse qui s'agrège par endroits en blocs, appliqués contre l'enveloppe nucléaire sauf au niveau de ses pores. Une particularité est à noter: sur la quasi-totalité des clichés, la coupe est réalisée de telle sorte que le noyau semble être réparti en deux entités arrondies.

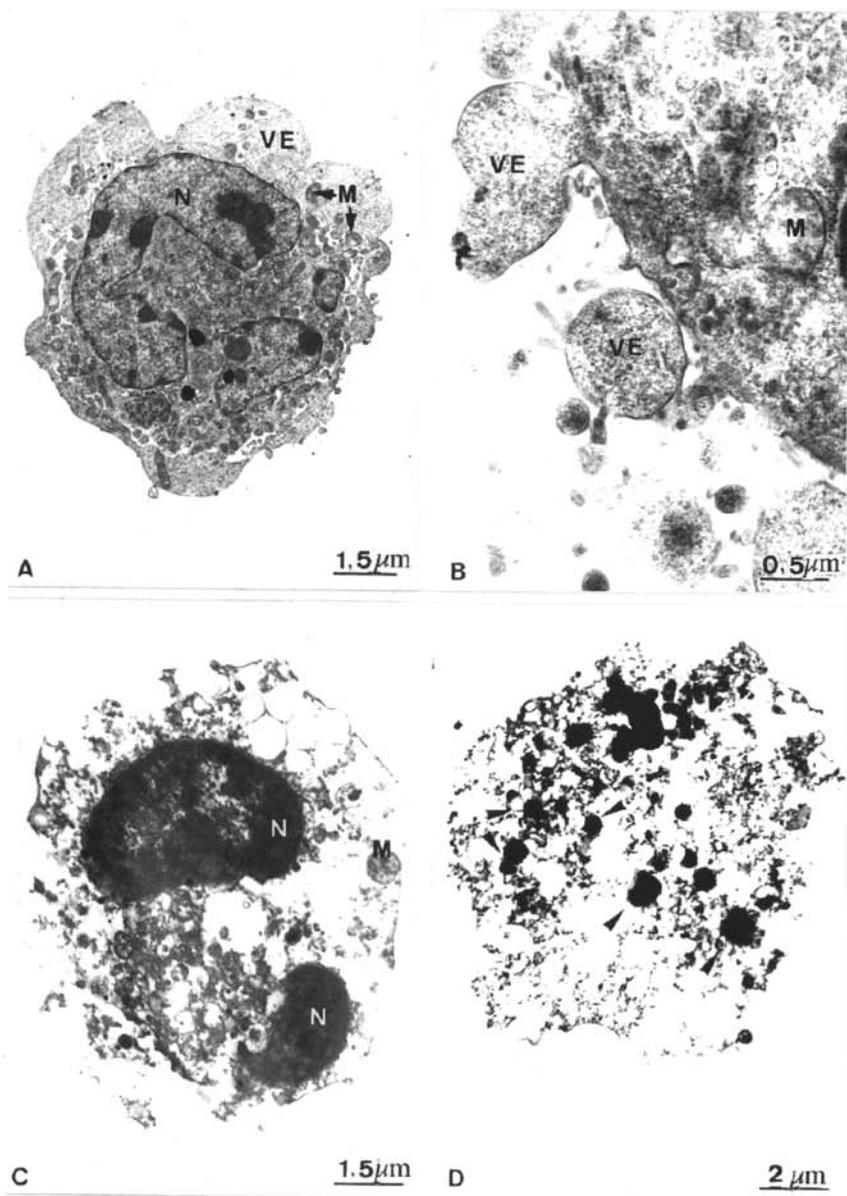
Du réticulum endoplasmique rugueux est également visible; il se présente sous la forme de tubes coupés transversalement, vraisemblablement disposés en faisceaux regroupés dans une région du cytoplasme (Figure 1D).

### **. Différents processus de mort cellulaire**

Deux figures de dégénérescence cellulaire peuvent être observées:

- certaines cellules se déforment (Figure 2A), émettent des digitations de deux types: des pseudopodes et des vésicules d'exocytose (Figure 2B). Les différents organites sont toujours visibles malgré des dégradations importantes comme celles que l'on peut observer dans les mitochondries qui perdent leurs crêtes. Le noyau se densifie et a tendance à se fragmenter. Par contre, ces cellules conservent l'intégrité de leur membrane plasmique.

- d'autres cellules au contraire dégèrent par perte de la plupart de leurs organites, disparition de la membrane plasmique, augmentation du volume cellulaire, apparition de grandes plages optiquement vides dans le cytoplasme et noyau fortement dense aux électrons (Figure 2C). Des masses noires, en nombre



**Figure 2:** Vue en M.E.T. d'hybridomes A49 en culture (jour 2)  
**A-B:** apoptose; **C-D:** nécrose  
 N: noyau, M: mitochondrie, VE: vésicule d'exocytose (détail en B).

assez élevé et visualisées par des flèches sur la figure 2D, peuvent être interprétées comme des lysosomes.

## DISCUSSION

Dans cette étude microscopique, l'utilisation d'hybridomes issus de cultures non synchronisées (jour 2 de culture), permet d'observer les cellules aux différents stades de leur développement: d'une part, des cellules en phase exponentielle de croissance, d'autre part, des cellules en train de dégénérer.

Les hybridomes en phase de croissance (Figure 1C) présentent une forme plus ou moins arrondie, une membrane plasmique intacte et des pseudopodes ayant vraisemblablement un rôle de communication et d'échanges intercellulaires. A ce stade, les cellules présentent les organites cytoplasmiques habituels notamment des mitochondries avec des crêtes bien différenciées, signe d'une activité métabolique intense, et de nombreux ribosomes fixés sur du réticulum indiquant une importante synthèse protéique. Cependant le regroupement du réticulum endoplasmique rugueux en faisceaux réguliers dans une région de la cellule et observé sur la plupart des clichés n'est pas encore élucidé. Quant aux plages cytoplasmiques optiquement vides, elles seraient attribuées à des vésicules, ou citernes de réticulum endoplasmique, particulièrement abondantes chez des hybridomes sécrétants (AL-RUBEAI et al., 1990). Enfin, le nombre important de coupes qui sembleraient toutes passer par les deux entités nucléaires serait en faveur non pas de l'existence de deux noyaux distincts, mais plutôt d'un seul noyau plurilobé.

Quant aux cellules vieillissantes, on constate que deux populations bien distinctes coexistent dans une même culture, faisant penser à deux processus particuliers de mort cellulaire.

Certaines cellules émettent des vésicules d'exocytose en même temps qu'elles se déforment, que le noyau déjà plurilobé semble se fragmenter par invagination, que les organites cytoplasmiques se condensent, tout en restant intacts, puis disparaissent peu à peu (diminution de l'importance du réticulum endoplasmique), la membrane plasmique restant intacte (Figure 2A). A un stade ultime, ces cellules sont amenées à se fragmenter totalement et à disparaître dans le milieu de culture. De tels événements sont caractéristiques de l'apoptose ou mort programmée des cellules ou encore appelée mort physiologique. Ce phénomène fut déjà décrit en 1972 par KERR et al. dans des tissus *in vivo* sans que ne soient élucidés les facteurs régulateurs de l'apoptose.

A l'heure actuelle, un certain nombre de gènes sont connus pour être impliqués dans l'induction ou la répression de l'apoptose (ELLIS et al., 1991; WILLIAMS et SMITH, 1993). Or la plupart d'entre eux interviennent également

dans les processus de prolifération tumorale: le gène Bcl-2 est connu comme un gène inhibiteur de l'apoptose et la surexpression de ce gène s'oppose au "suicide" des cellules anormales dans l'organisme, il en résulte une accumulation de cellules tumorales (BARR et TOMEI, 1994; HENGARTNER et HORVITZ, 1994; YIN et al., 1994). Au contraire, les gènes P53 et C-myc seraient des inducteurs d'apoptose pour éliminer les cellules tumorales. On parle pour le gène P53 de "facteur suppresseur de tumeur". Sa mutation au cours des cancers entraîne une inhibition de l'apoptose et par la même favorise la multiplication des cellules anormales (WILLIAMS et al., 1992). La relation entre apoptose et cancer se justifie d'autant mieux ici que l'on est en présence de cellules hybrides dont l'une des deux cellules mères est une cellule myélomateuse.

Il est à noter aussi que l'expression des gènes de l'apoptose peut dépendre de facteurs externes comme des variations de la composition du milieu nutritif (PERREAULT et LEMIEUX, 1993), de la présence ou l'absence de facteurs de croissance (FAIRBAIRN et al., 1993) ou d'interactions cellulaires (RAFF, 1994).

A l'inverse, d'autres hybridomes ne semblent pas se déformer mais présentent une dissolution nucléaire et cytoplasmique en même temps que la membrane plasmique perd son intégrité; les cellules sont en train de perdre leurs constituants dans l'espace extracellulaire: ce sont des cellules nécrosées (Figure 2C). En même temps, l'augmentation de la perméabilité membranaire favorise l'entrée d'eau extracellulaire ce qui conduit à une sorte d'"oedème" cellulaire (REID et al., 1993). Cette nécrose, contrairement à l'apoptose, est une mort "pathologique" provoquée par exemple par un événement métabolique comme la disparition de certains éléments de croissance ou par de mauvaises conditions de culture (variations de température).

On pourrait donc supposer que les hybridomes qui se nécrosent et évitent ainsi la voie de l'apoptose sont, soit des cellules particulièrement sensibles aux modifications de l'environnement, soit des cellules dont le gène Bcl-2 serait surexprimé et le gène P53 muté, empêchant la mort cellulaire programmée (comme ce qui se passe dans les cancers).

A l'inverse, les cellules qui empruntent la voie de l'apoptose sont des cellules dont le gène P53 serait exprimé normalement.

## CONCLUSION

Cette étude de la morphologie d'hybridomes par la microscopie électronique a permis de distinguer dans une même culture deux types de morts cellulaires. Une mort physiologique, génétiquement programmée (apoptose) et une mort "pathologique" (nécrose) provoquée par un événement thermique,

mécanique ou métabolique. Il est à noter que cette étude a été réalisée sur des cellules cultivées dans des conditions bien précises notamment dans des boîtes de culture et en présence d'un milieu totalement dépourvu de sérum. Il serait alors intéressant de comparer les modifications morphologiques accompagnant les morts cellulaires dans différents milieux de culture: la présence de certains composants, comme les surfactants, ne serait-elle pas à l'origine de certaines figures de nécrose ou d'apoptose ? De même, le choix de la méthode de culture n'influencerait-elle pas la mort cellulaire ? Est-ce que les cultures à grande échelle dans des bioréacteurs à hélice par exemple, par les forces de cisaillement engendrées, n'accéléraient pas la nécrose cellulaire ? Enfin n'est-il pas possible d'agir sur des gènes de régulation de l'apoptose afin de retarder *in vitro* le mécanisme de mort cellulaire programmée des cultures cellulaires ?

**Remerciements** à S. Heusser pour son aide amicale et à l'Unité INSERM 284 pour le prêt de la souche cellulaire.

## **BIBLIOGRAPHIE**

AL-RUBEAI M., MILLS D., EMERY A.N., 1990 - Electron microscopy of hybridoma cells with special regard to monoclonal antibody production. *Cytotechnology*, **4**, 13-28.

BARR P.J., TOMEI L.D., 1994 - Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology*, **12**, 487-493.

ELLIS R.E., YUAN J., HORVITZ H.R., 1991 - Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **7**, 663-698.

FAIRBAIRN L.J., COWLING G.J., REIPERT B.M., DEXTER T.M., 1993 - Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell*, **74**, 823-832.

HERNGARTNER M.O., HORVITZ H.R., 1994 - Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature*, **369**, 318-320.

KERR J.F.R., WYLLIE A.H., CURRIE A.R., 1972 - Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.

KÖHLER G., MILSTEIN C., 1975 - Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.

MATHIOT B., 1992 - Etudes de méthodes de culture et de milieux contenant des protéines humaines pour la production d'anticorps monoclonaux. Thèse de Génie Biologique. Université de Nancy I.

MATHIOT B., PERANI A., DUMAS D., MAUGRAS M., DIDELON J., STOLTZ J.F., 1993 - Increase of hybridoma productivity using an original dialysis culture system. *Cytotechnology*, **11**, 41-48.

PERREAULT J., LEMIEUX R., 1993 - Essential role of optimal protein synthesis in preventing the apoptotic death of cultured B cell hybridomas. *Cytotechnology*, **13**, 99-105.

RAFF M.C., 1994 - Cell death genes: *Drosophila* enters the field. *Science*, **264**, 668-669.

REID V.C., MITCHINSON M.J., SKEPPER J.N., 1993 - Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein to mouse peritoneal macrophages: an ultrastructural study. *Journal of pathology*, **171**, 321-328.

WILLIAMS G.T., SMITH C.A., McCARTHY N.J., GRIMES E.A., 1992 - Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends in cell biology*, **2**, 263-267.

WILLIAMS G.T., SMITH C.A., 1993 - Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, **74**, 777-779.

YIN X.-M., OLTVAI Z. N., KORSMEYER S.J., 1994 - BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, **369**, 321-323.

## **ETUDE CYTOLOGIQUE DES FORMATIONS FONGIQUES EN STROMAS SE DEVELOPPANT A LA SURFACE DES RACINES DES PLANTS TRUFFIERS.**

Jean-Claude PARGNEY\* et Michel JALADE\*\*

\* Université Henri Poincaré, Nancy I, Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie Forestière, Equipe Cytophysiologie des Symbioses Mycorhiziennes, BP 239, 54506 Vandoeuvre Cédex, France

\*\* Commissey, 89430 Tanlay, France

Note acceptée pour publication le 1er. mars 1995

### **RESUME**

Des proliférations fongiques forment des stromas à la surface de racines de noisetiers et de chênes portant des mycorhizes de truffe. L'étude cytologique de ces formations est réalisée en microscopie photonique et électronique. Deux types de stromas sont comparés : certains ont été récoltés sur des plants truffiers cultivés en pépinière, d'autres sont recueillis dans la nature sur des truffières. Des similitudes de structure, de morphologie et d'ultrastructure laissent envisager un développement comparable des stromas dans les deux situations. L'hypothèse d'une prolifération du mycélium truffier entraînant la formation des stromas est envisagée.

### **CYTOLOGICAL STUDY OF FUNGAL STRUCTURES FORMING STROMAS ON ROOTS OF TRUFFLE MYCORRHIZAL PLANTLETS.**

#### **ABSTRACT**

Fungal proliferations formed stromas on hazel and oak roots carrying truffle mycorrhizas. Cytological studies of stromas were obtained by light and electron microscopy. Comparison between stromas coming from truffle mycorrhizal plantlets in nursery and stromas collected on truffle fields has been carry out. Structural, morphological and ultrastructural similarities allow to envisage an identical development of stromas in nursery and field. The truffle origin of stromas could be envisaged.

Note présentée à la séance du 15 décembre 1994 par M. J.F. PIERRE.

## INTRODUCTION

Les champignons offrent une diversité de relations avec les autres êtres vivants. Leur hétérotrophie vis-à-vis du carbone nécessite obligatoirement un recours à une conduite nutritionnelle qui varie selon les espèces. Certaines ont un comportement exclusivement saprophyte ; d'autres s'associent à des végétaux ou des animaux vivants et la relation qui en découle est soit de type parasite, soit de type symbiote.

L'association mycorhizienne représente un bel exemple de relation symbiotique. Les mycorhizes nées de la symbiose entre champignons et racines sont de structures très variées. Toutefois les types de mycorhizes définies (ecto-, endo-, et ectendomycorhizes) ont, dans la nature, des limites moins tranchées que celles obtenues en culture contrôlées. Des dualités entre champignons existent et la constitution de mycorhizes complexes a été signalée dans diverses associations (cf. PREVOST et PARGNEY 1995).

La mycorhize représente un état d'équilibre entre une plante-hôte, un partenaire fongique principal et des organismes associés (bactéries, champignons minoritairement présents). Cet équilibre est précaire et toute modification du métabolisme de l'un des partenaires entraîne des changements profonds dans les relations plante-champignon qui peuvent conduire au parasitisme (LEI et DEXHEIMER 1989).

La diversité des aspects et des structures mycéliennes que développe un champignon au cours de son cycle traduit ses possibilités d'adaptation. Comme pour les autres végétaux, les champignons ont rarement à leur disposition les conditions propices leur permettant d'accomplir un développement continu. Des formes de survie apparaissent dans des situations défavorables. Les systèmes utilisés sont très divers et plus ou moins spécialisés : mycélium végétatif, fructifications, organes mycéliens spécialisés comme les sclérotes et les stromas (DURRIEU 1993).

La récolte dans la nature et en pépinière de racines portant à la fois des mycorhizes et des stromas nous a conduit à étudier ce type de proliférations et de comparer leur structure avec celle du symbiote fongique impliqué dans les mycorhizes voisines. Cette comparaison peut permettre d'envisager des hypothèses sur l'origine et la formation des stromas.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel

Les observations sont réalisées sur des racines de plants truffiers provenant de deux origines. Les uns sont des noisetiers (*Corylus avellana* L.) mycorhizés par la truffe du Périgord (*Tuber melanosporum* Vitt.) selon la technique de CHEVALIER *et al.* (1973) et de CHEVALIER et GRENTE (1978). Les plants mycorhizés sont cultivés dans des pots dans un mélange tourbe-vermiculite-craie broyée (1 : 1 : 1). Après plusieurs années de culture en pépinière (3 à 4 ans), certains plants présentent un système racinaire modifié, d'aspect squelettique. Celui-ci est constitué de quelques longues racines portant localement une multitude de mycorhizes extrêmement ramifiées et qui forment des glomérules compacts (PARGNEY et CHEVALIER, résultat inédit). Les zones racinaires voisines des glomérules des mycorhizes présentent des surfaces non lisses et boursoufflées. Des fragments de ces zones sont prélevés et traités pour être observés en microscopie photonique et électronique.

D'autres racines sont récoltées dans des truffières âgées de 10 ans sous des noisetiers (*Corylus avellana* L.) et sous des chênes (*Quercus robur* L.). Les mycorhizes qu'elles portent ont été identifiées comme étant des associations avec soit *Tuber melanosporum* Vitt., soit *Tuber uncinatum* Ch., selon les secteurs. La surface de certaines racines montre des zones non lisses et boursoufflées qui sont prélevées et préparées pour une étude cytologique.

### Technique de cytologie

Les racines à surface boursoufflée sont observées sous un stéréomicroscope. Elles sont ensuite sectionnées en très courts fragments de 1-1,5 mm de long pour être fixées par le glutaraldéhyde à 5 % dans du tampon cacodylate à 0,1 M et pH 7,2 (1 : 1). La fixation est effectuée à 4°C pendant 5 h. Après rinçage par le tampon, les échantillons sont post-fixés par le tétr oxyde d'osmium à 2 % dans le tampon (1 : 1) pendant 1 h à 4°C. Après rinçage, ils sont déshydratés par l'acétone, puis inclus dans de la résine Spurr.

Des coupes transversales aux racines sont effectuées. Les coupes semi-minces (10 à 20 µm d'épaisseur) sont recueillies sur lame de verre, colorées par le bleu de toluidine à 1 % dans 2,5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11,6) et observées au microscope photonique.

Les coupes minces (6 à 8 µm d'épaisseur) sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (REYNOLDS 1963). Elles sont observées au microscope électronique à transmission Zeiss 902.

## RESULTATS

Les racines présentent des surfaces ornementées de boursoufflures brunâtres, plus ou moins juxtaposées et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm (Fig. 1). Sur des échantillons prélevés dans la nature, les boursoufflures sont bien visibles sur des portions racinaires dépourvues d'un manchon cortical (Fig. 2). La surface des boursoufflures apparaît lisse lorsqu'elles sont encore peu développées (Fig. 1) et granuleuse sur des échantillons peu âgés (Fig. 3). Lors des prélèvements en truffière, de petits amas brunâtres, d'aspect identique à celui des boursoufflures de la racine voisine ont pu être observés ; ils en sont totalement détachés (Fig. 4).

Sur des coupes observées en microscopie photonique, les boursoufflures correspondent à des proliférations anarchiques de cellules à la surface de la racine (Fig. 5 et 6). De par leur taille et leurs parois, qui se colorent en bleu après utilisation du bleu de toluidine, ces cellules sont des hyphes qui se sont agrégées et forment des stromas à la surface racinaire. Des hyphes émergent à la surface des stromas (Fig. 7). Les stromas sont directement en contact avec les cellules racinaires. Certains ne sont reliés à la racine que par un étroit pédicelle (Fig. 8).

Les cellules les plus externes de la racine peuvent être envahies d'hyphes (Fig. 9). Les cellules sous-jacentes sont par contre remplies de matériel très sombre, certainement de nature polyphénolique. Cette couche de cellules est plus ou moins importante et elle n'est pas nécessairement continue sous la base du stroma. Du matériel polyphénolique est également présent dans les stromas (Fig. 6 et 10).

En microscopie électronique à transmission, les stromas prélevés dans la nature montrent une juxtaposition d'hyphes mortes colonisées secondairement par des microorganismes (Fig. 11 et 12). Certaines parois présentent une ligne médiane claire comparable à ce qui est observé chez les Ascomycètes au niveau des parois perforées (Fig. 12 et 13). Toutefois les coupes analysées n'ont pas permis de voir les grains de Woronin qui (évidemment) ont disparu lors de la dégénérescence des hyphes (cf. Fig. 24). A la périphérie du stroma, les hyphes montrent un aspect plus lâche (Fig. 14).

Des groupes d'hyphes vivantes ont pu être localisés çà et là dans le stroma (Fig. 13). Elles renferment des noyaux, des globules peu denses contenus dans le cytoplasme et des vacuoles avec des masses très sombres. Ces hyphes sont limitées par une paroi formée d'une strate externe et dense et d'une couche interne et claire. Les groupes

d'hyphes vivantes sont inclus dans des cavités d'hyphes mortes du stroma ce qui entraîne la juxtaposition des parois d'hyphes vivantes et de celles du stroma.

A la surface de la racine, les hyphes du stroma ont envahi les cellules en lysant partiellement les parois et le matériel polyphénolique (Fig. 15). Les cellules sous-jacentes riches en polyphénols peuvent encore contenir des hyphes. Les cellules plus internes n'en renferment plus. Ces cellules, alignées, sont produites par différenciation d'une assise méristématique sous-jacente assimilable à un phellogène. Les cellules qui en sont issues ne sont cependant pas de simples cellules de liège puisqu'elles accumulent en plus des polyphénols dans leur cavité. Des cellules racinaires, plus ou moins aplaties et à contenu polyphénolique sont présentes à différents niveaux du stroma entre les hyphes (Fig. 16). Sur des coupes favorables, on peut observer des images de pénétration d'hyphes du stroma à l'intérieur des cellules après lyse partielle de la paroi (Fig. 17). Les polyphénols apparaissent alors plus ou moins altérés (Fig. 17). Des contacts étroits entre la paroi fongique et les composés polyphénoliques sont bien visibles (Fig. 18). A la périphérie du stroma, les hyphes sont plus lâches et entourent du matériel granuleux polyphénolique et des restes de parois cellulaires (Fig. 14).

Les stromas observés sur des racines de plants élevés en pépinière (Fig. 19) montrent un certain nombre d'analogies avec ceux récoltés dans la nature. Cependant nous n'avons pas observé à l'intérieur, d'amas d'hyphes vivantes comparables à celles qui envahissent localement les hyphes des stromas recueillis dans les truffières. Si dans les échantillons observés, les hyphes du stroma sont souvent mortes, celles en contact avec la racine montrent un contenu vivant (Fig. 20). Des hyphes vivantes sont également présentes dans les composés polyphénoliques des cellules sous-jacentes (Fig. 21). Toutefois certaines renferment un contenu cytoplasmique dense (Fig. 22).

Les hyphes vivantes en contact avec les cellules racinaires montrent des masses globuleuses peu denses et limitées par un cytoplasme granuleux (Fig. 20, 21 et 23). Cet aspect est tout à fait comparable à la structure des hyphes qui sont présentes dans les mycorhizes portées par les racines (Fig. 24). Les cloisons qui séparent les articles des hyphes sont comparables dans les hyphes vivantes du stroma (Fig. 23) et dans les hyphes des mycorhizes voisines (Fig. 24) ; ce sont des cloisons typiques d'Ascomycètes. Dans les hyphes à contenu dense présentes dans les polyphénols (Fig. 22 et 25), les structures cytoplasmiques sont difficilement observables. Cet aspect est

comparable à celui d'hyphes se développant dans les cellules polyphénoliques de l'apex des mycorhizes de truffe (Fig. 26).

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les stromas prélevés dans les deux situations ont montré qu'ils sont constitués de matériel fongique qui malheureusement n'a pu être observé à l'état vivant. La structure de certaines parois évoque celle décrite dans les hyphes des Ascomycètes et notamment dans le mycélium truffier en association mycorhizienne (PARGNEY et LEDUC 1990). Les perforations qui caractérisent ce type de cloisons, n'ont pu être identifiées avec certitude par absence des corps de Woronin disparus lors de la dégénérescence des hyphes.

Les hyphes vivantes, présentes à la base des stromas récoltés en pépinière, sont tout à fait comparables à celles que l'on observe dans les mycorhizes associées à la racine portant les stromas. Dans ces mycorhizes, le mycélium truffier renferme un cytoplasme modifié, riche en réserves lipidiques et glycoprotéiques (PARGNEY et CHEVALIER, résultat inédit). Ce type d'hyphes est présent localement dans le manteau apical des mycorhizes âgées, rarement dans le réseau de Hartig et se développe dans les polyphénols et les cellules de l'apex racinaire (PARGNEY et CHEVALIER, résultat inédit). Ces hyphes sont des formes latentes du mycélium truffier et sont susceptibles de mycorhizer de nouvelles racines.

L'envahissement des cellules racinaires par les hyphes du stroma n'est pas sans rappeler la capacité nutritionnelle saprophytique que peut développer le mycélium truffier. La prolifération d'hyphes de *Tuber brumale* Vitt. à l'intérieur des cellules du rhizoderme et du parenchyme cortical des racines longues de *Corylus avellana* L. et de *Pinus sylvestris* (Pers.) Desv. est décrite lors de synthèses axéniques de mycorhizes par CHEVALIER (1973) ; un tel type d'infection n'est pas imputable aux conditions artificielles du milieu puisque le même phénomène est signalé sur des noisetiers maintenus en serre et inoculés par *Tuber brumale* Vitt. ou *Tuber melanosporum* Vitt. (CHEVALIER 1973). La capacité saprophytique du mycélium truffier s'exprime aussi dans la mycorhize au niveau de l'apex puisqu'il a été montré que les hyphes de *Tuber uncinatum* Ch. et *Tuber melanosporum* L. lysent les parois des cellules de la coiffe et altèrent partiellement les polyphénols qui y sont accumulés (BRIMONT 1991, PARGNEY et BRIMONT 1994). BARRY (1992) a également montré que le mycélium de *Tuber melanosporum* Vitt. mis en culture par repiquage de la gleba de l'ascocarpe, présente un comportement saprophytique. De même, les hyphes émergeant du périidium des ascocarpes de *Tuber melanosporum* Vitt., *Tuber aestivum* Vitt. et

*Tuber uncinatum* Ch. et qui assurent l'autonomie de ces fructifications, ont une capacité saprophytique leur permettant de proliférer dans les fragments racinaires et les vieilles mycorhizes qu'elles peuvent piéger (BARRY *et al.* 1993).

La pénétration des hyphes dans les composés polyphénoliques s'accompagne d'une augmentation de la densité électronique de leur cytoplasme qui devient comparable en intensité à celle des polyphénols adjacents. Ceci suggère que du matériel polyphénolique est absorbé par le champignon et qu'en s'associant avec des protéines cytoplasmiques il contribue à augmenter la densité électronique du cytoplasme fongique. De telles observations sont signalées également dans les apex des mycorhizes de truffes (PARGNEY et BRIMONT 1994). Comme dans les mycorhizes, la totalité des composés polyphénoliques produits par les cellules racinaires n'est pas utilisée par le champignon. Ces composés ne semblent pas être un obstacle au développement fongique. Dans les mycorhizes d'autres champignons montrent une capacité saprophytique vis-à-vis des polyphénols : *Pisolithus tinctorius* L. (PICHE *et al.* 1983, MASSICOTTE *et al.* 1990), *Amanita muscaria* L. ex Fr. (KOTTKE et OBERWINKLER 1986), *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. et *Paxillus involutus* Fr. (PARGNEY et GOURP 1991).

La présence de cellules polyphénoliques et de polyphénols plus ou moins altérés entre les hyphes, à différents niveaux du stroma, laisse supposer la dynamique de la colonisation de la racine par le champignon. L'installation des hyphes à la surface doit stimuler la production de cellules à partir du phellogène. Cette différenciation s'accompagne d'une accumulation importante, dans les cellules, de polyphénols. Elle contribue à la formation, à la périphérie de la racine, d'une assise subéreuse très riche en polyphénols. Le comportement saprophytique du champignon entraîne une lyse partielle des parois et des composés polyphénoliques. La pénétration des hyphes contribue à une desquamation de ce cortex dont les fragments sont incorporés au stroma. L'activité du phellogène est ainsi constamment stimulée par l'activité fongique.

Le matériel desquamé n'est cependant pas entièrement lysé. Puisqu'il correspond à des cellules de type suber, les constituants pariétaux de ces cellules peuvent limiter la dégradation des parois par le champignon. Les parois subérifiées se caractérisent par l'abondance d'acides dicarboxyliques et de phénols qu'elles renferment (ROBERT et ROLAND 1989). Le réseau polyphénolique rappelle celui de la lignine et comme elle, la subérine est difficilement altérable. Bien que les champignons ectomycorhiziens présentent des activités polyphénoloxidasés (GILTRAP 1982, RAMSTEDT et SÖDERHÄLL 1983), ils n'ont peut-être pas la capacité de lyser totalement ce type de parois.

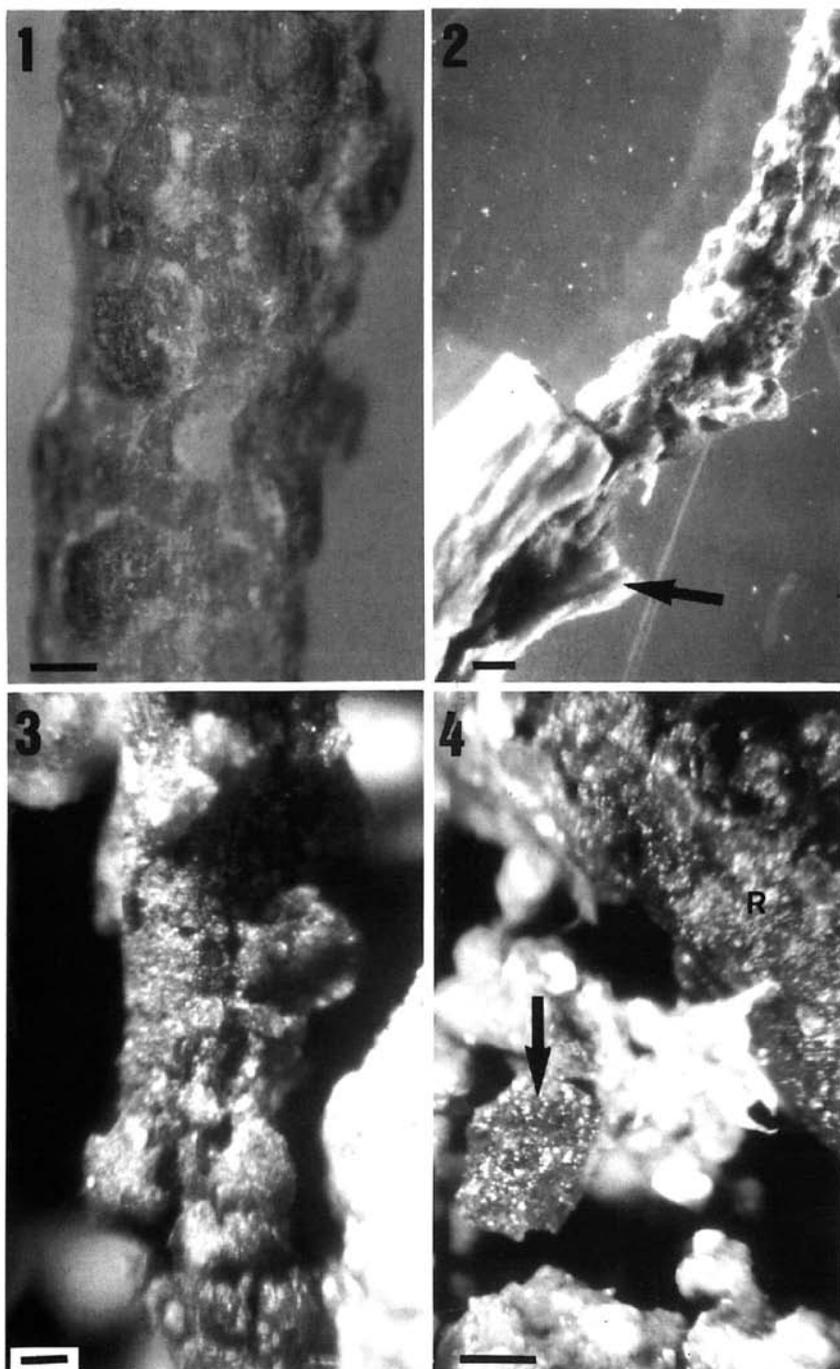
La présence dans les stromas prélevés dans la nature de quelques hyphes vivantes groupées dans les cavités d'hyphes mortes laisse supposer un développement secondaire de ce type de mycélium au sein du stroma. La structure de leur paroi, l'aspect de leur cytoplasme indiquent qu'il s'agit d'un champignon différent de celui qui constitue le stroma, et différent du mycélium de truffe observé tant au niveau des mycorhizes actives (PARGNEY et LEDUC 1990) que des mycorhizes inactives (PARGNEY et CHEVALIER, résultat inédit). Dans ces deux types d'associations, les hyphes de truffe ne renferment jamais de globules aussi denses dans leurs vacuoles. Cependant, au cours de son cycle, le mycélium truffier peut déposer des masses globuleuses opaques aux électrons dans les vacuoles de la partie sommitale des asques au cours de l'ascosporogénèse (PARGUEY-LEDUC *et al.* 1988), et dans les enclaves cytoplasmiques issues du réticulum endoplasmique au niveau des paraphyses (PARGUEY-LEDUC *et al.* 1991).

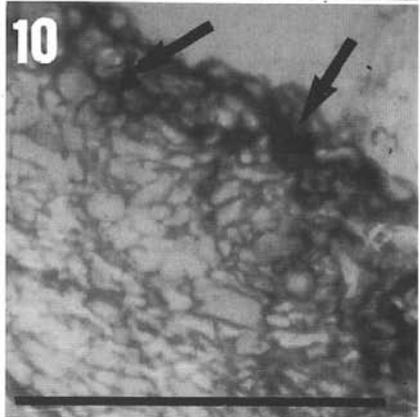
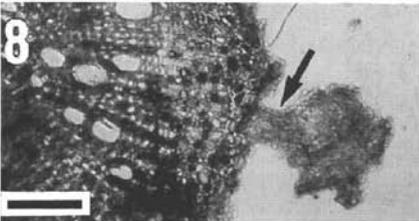
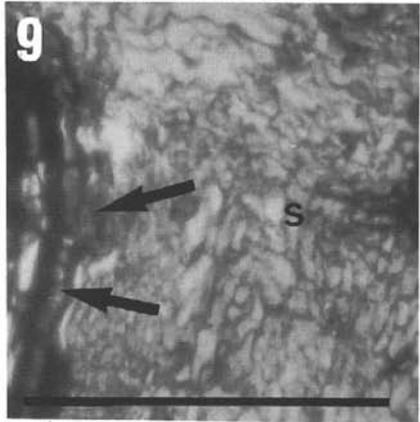
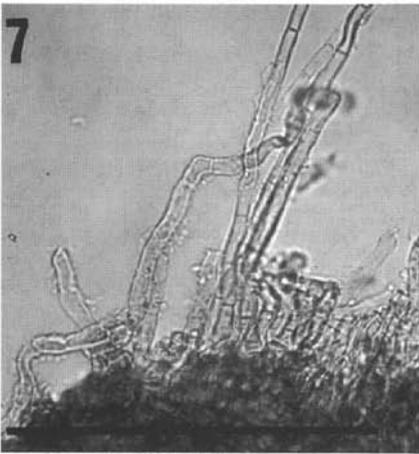
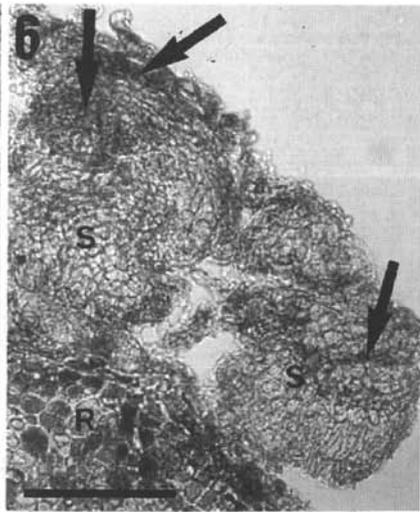
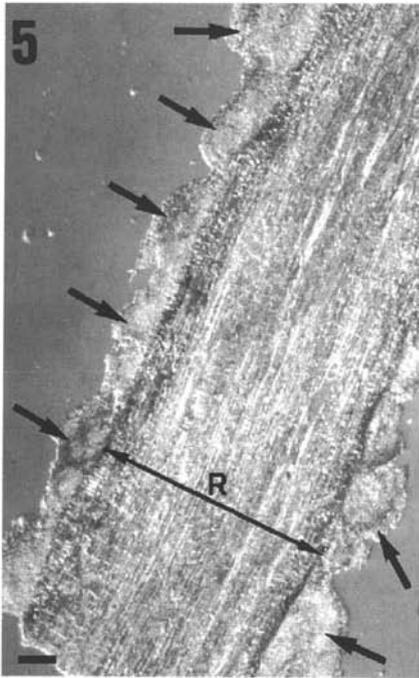
En conclusion, si l'origine des stromas n'a pu être clairement définie, des observations permettent d'envisager l'implication du mycélium truffier : aspect de certains cloisons, présence d'hyphes latentes à la base des stromas en association avec les polyphénols de l'assise subéreuse, proximité des mycorhizes de truffe et des stromas. Si ces critères sont bien visibles dans le matériel récolté en pépinière, les stromas observés dans la nature n'ont pu nous apporter beaucoup de renseignements sur leur origine. Les similitudes de structure et de morphologie des stromas prélevés en pépinière et dans les truffières nous permettent cependant de les rapprocher et d'envisager qu'il s'agit de formations identiques se développant non pas sur de jeunes racines comme lors de la formation des mycorhizes, mais sur des racines plus âgées. Les plants élevés en pépinière nous renseignent sur l'âge de ces racines (3 à 4 ans). De telles formations n'ont pas été observées sur des plants plus récemment mycorhizés.

Si les stromas sont des proliférations du mycélium truffier, ils représenteraient une phase du cycle du champignon dont le rôle reste à définir. L'observation d'hyphes vivantes constituant le stroma, la mise en culture de ces hyphes et leur identification par voie immunologique permettraient de confirmer cette hypothèse.

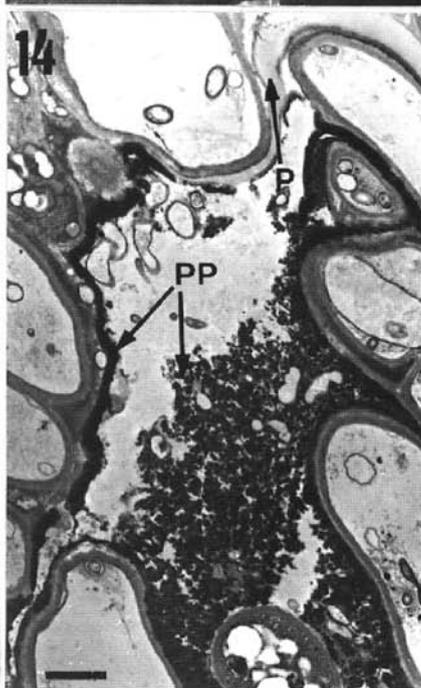
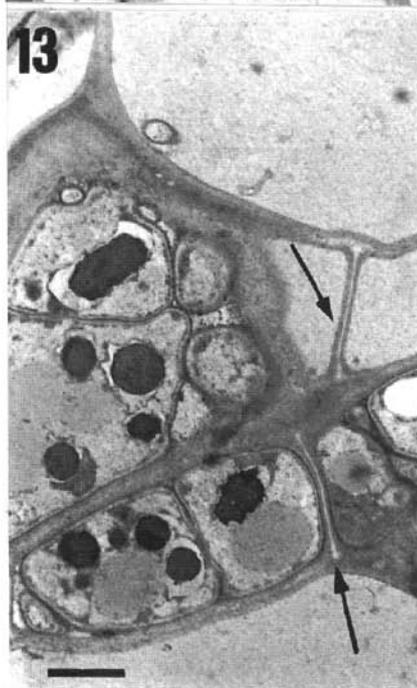
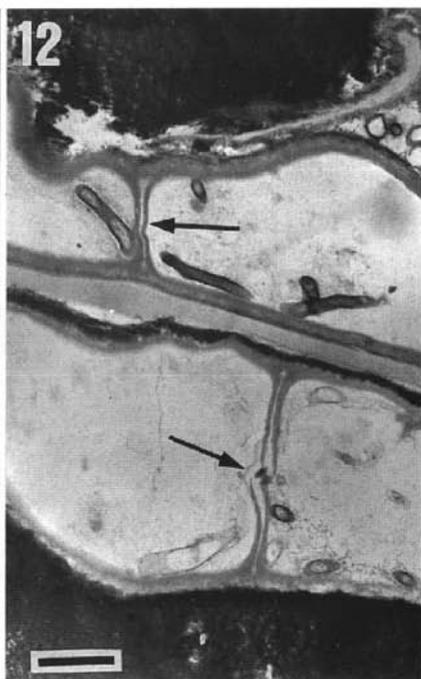
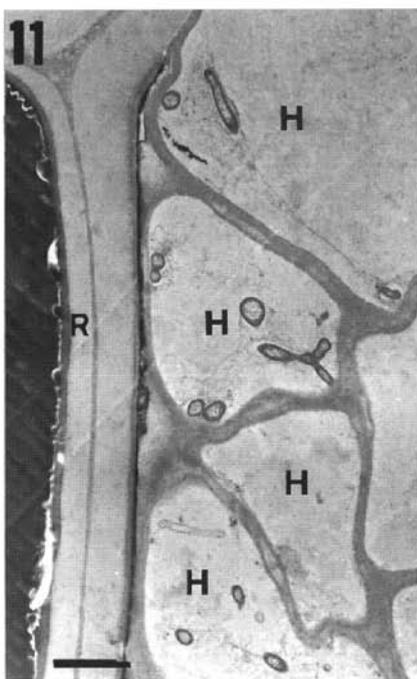
## Légendes

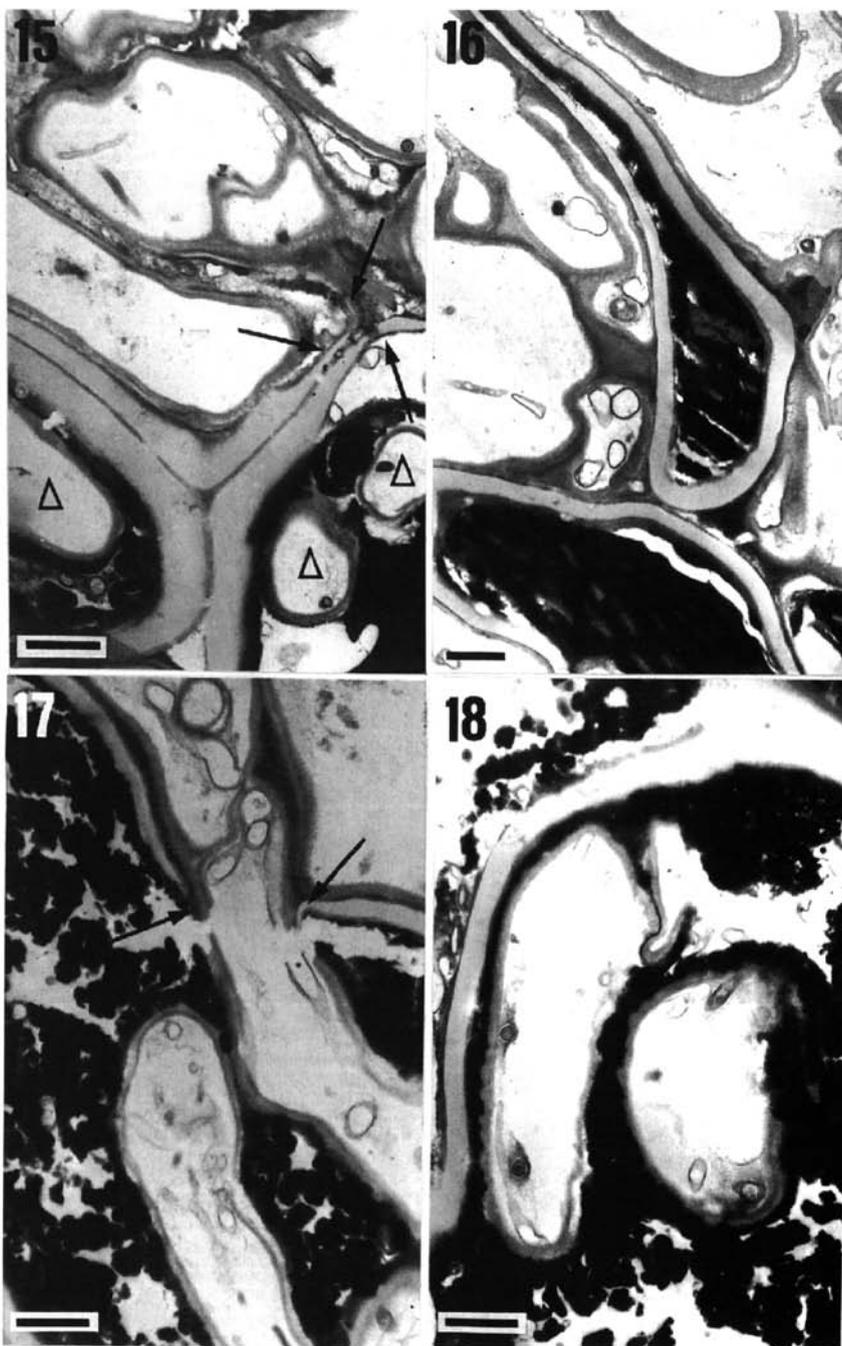
- Fig. 1 à 4 : Racines prélevées en truffière et observées sous la loupe binoculaire. Echelle = 0,2 mm
- Fig. 1 : Stromas lisses.
- Fig. 2 : Zone à stromas bien visibles après désquamation du manchon cortical racinaire (flèche).
- Fig. 3 : Stromas granuleux.
- Fig. 4 : Amas granuleux (flèche) détaché des stromas de la racine voisine (R).
- Fig. 5 à 10 : Racines et stromas observés en microscopie photonique. Echelle = 0,1 mm.
- Fig. 5 à 8 : Matériel prélevé en truffière.
- Fig. 9 à 10 : Stromas recueillis en pépinière.
- Fig. 5 : Coupe longitudinale d'une racine (R) portant une succession de stromas (flèches).
- Fig. 6 : Détail de stromas (S) sur une coupe transversale de racine (R). Les flèches indiquent la présence de dépôts polyphénoliques dans les stromas.
- Fig. 7 : Hyphes émergeant de la surface d'un stroma.
- Fig. 8 : Stroma relié à la racine par un court pédicelle (flèche).
- Fig. 9 : Base d'un stroma (S) dont les hyphes envahissent les cellules polyphénoliques racinaires (flèches).
- Fig. 10 : Zone externe d'un stroma renfermant des dépôts polyphénoliques (flèches).

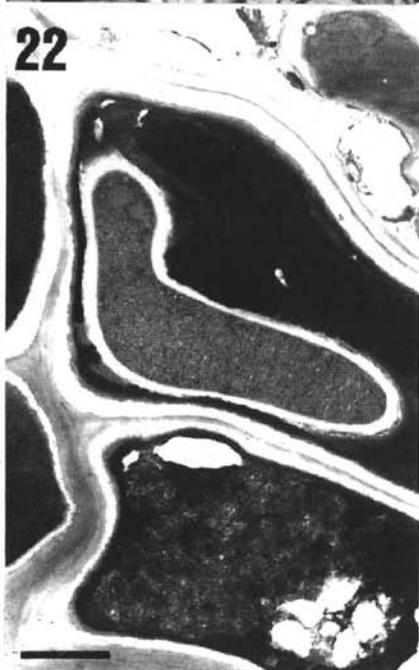
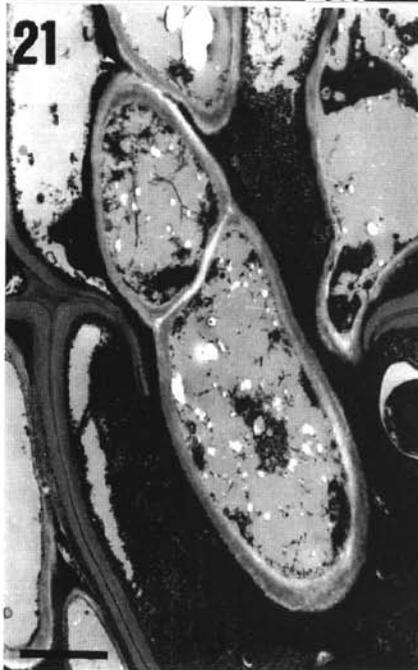
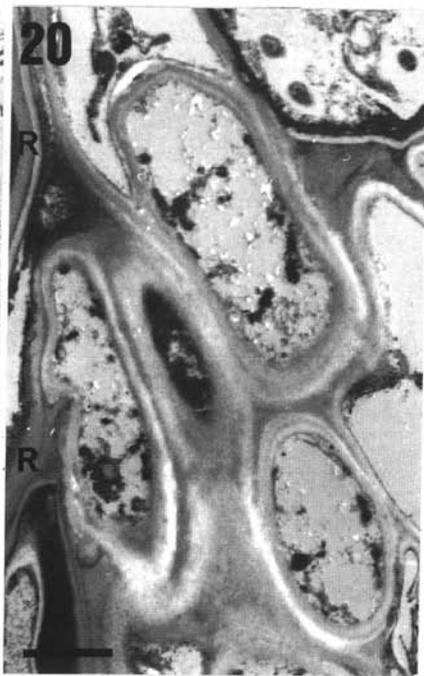
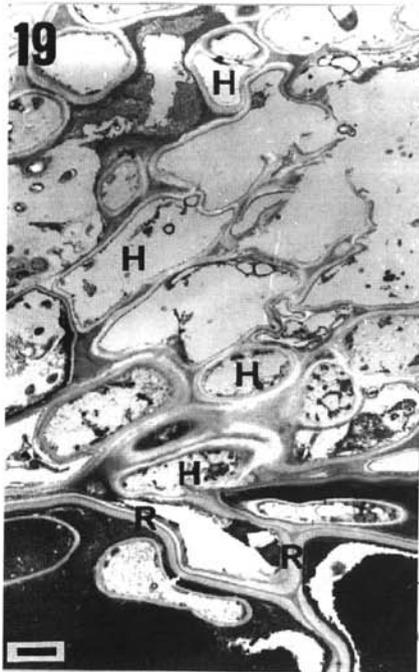


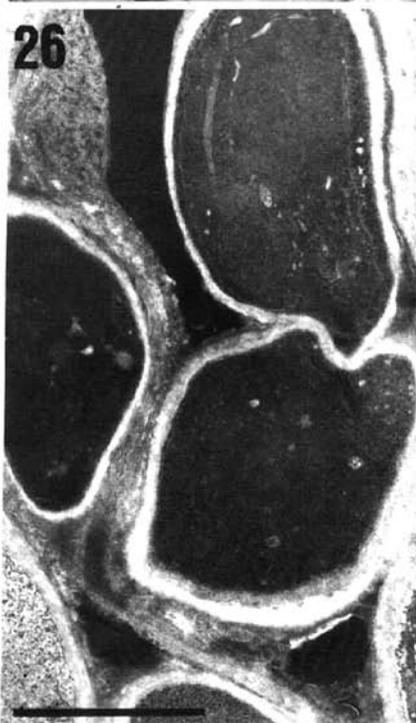
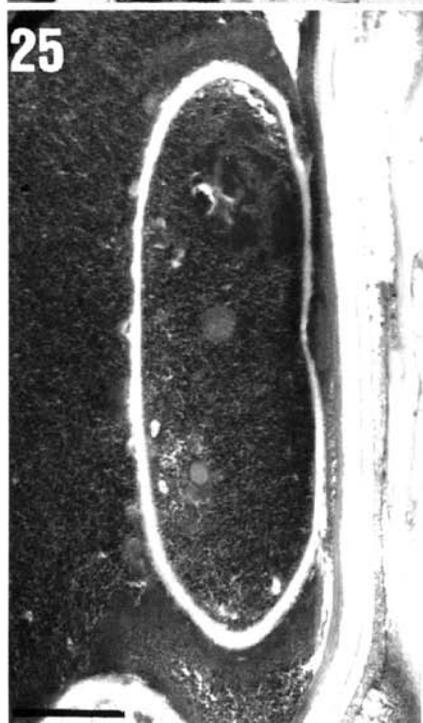
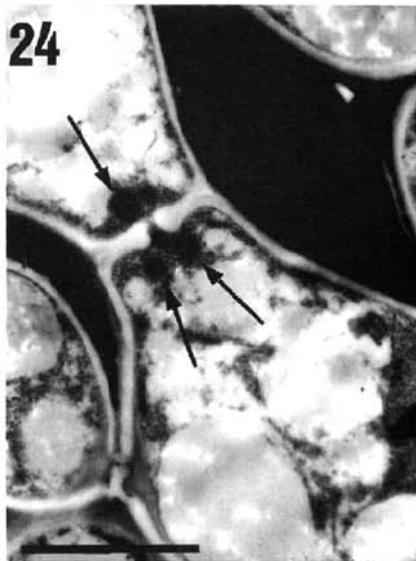


- Fig. 11 à 18 : Stromas recueillis en truffière et observés en microscopie électronique à transmission. Echelle = 2  $\mu$ m.
- Fig. 11 : Hyphes du stroma (H) à la surface racinaire (R).
- Fig. 12 : Cloisons des hyphes du stroma (flèches) évoquant les parois perforées des Ascomycètes. Des micro-organismes ont colonisé secondairement les hyphes du stroma.
- Fig. 13 : Hyphes vivantes contenues dans les hyphes mortes du stroma. Les cloisons de type Ascomycète visibles (flèches) appartiennent aux hyphes du stroma.
- Fig. 14 : Zone externe d'un stroma montrant du matériel polyphénolique (PP) et des restes de paroi cellulaire (P) entre les hyphes d'aspect plus lâche.
- Fig. 15 : Surface racinaire avec hyphes du stroma ayant dégradées partiellement les parois cellulaires (flèches) et les polyphénols contenus dans les cellules ( $\Delta$ ).
- Fig. 16 : Cellules polyphénoliques compressées par les hyphes à l'intérieur d'un stroma.
- Fig. 17 : Hyphes du stroma ayant perforé une paroi de cellule polyphénolique (flèches) avant pénétration.
- Fig. 18 : Hyphes dans des polyphénols montrant des contacts étroits entre les polyphénols et les parois.
- Fig. 19 à 26 : Stromas recueillis en pépinière et observés en microscopie électronique à transmission. Echelle = 2  $\mu$ m.
- Fig. 19 : Aspect des hyphes du stroma (H) à la surface de la racine (R), x 2500.
- Fig. 20 : Hyphes vivantes à la base du stroma et en contact avec la racine (R), x 6000.
- Fig. 21 : Hyphes vivantes dans les polyphénols de cellules racinaires externes, x 6000.
- Fig. 22 : Hyphe à contenu dense dans les polyphénols d'une cellule racinaire externe, x 6000.
- Fig. 23 : Détail d'une hyphe vivante ayant pénétré dans une cellule polyphénolique : la cloison séparant deux articles est bordée par des corps de Woronin (flèche), x 12000.
- Fig. 24 : Détail d'hyphes vivantes présentes dans les mycorhizes issues de la racine portant le stroma (Fig. 23) : une cloison d'Ascomycète avec ses corps de Woronin (flèches) est bien visible, x 12000.
- Fig. 25 : Détail d'une hyphe à contenu dense à l'intérieur de polyphénols, x 7500.
- Fig. 26 : Détail d'hyphes à contenu dense et ayant envahies des cellules polyphénoliques dans des mycorhizes de truffes, x 13000.









## BIBLIOGRAPHIE

- BARRY D., 1992 - Croissance et fonctionnement d'un ascocarpe au stade adulte de *Tuber melanosporum* et *Tuber aestivum*. Etude structurale des hyphes externes et approche expérimentale de leur fonctionnement. Thèse, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier, France
- BARRY D., CALLOT G., JANEX-FAVRE M.C., PARGUEY-LEDUC A., PARGNEY J.C., 1993 - Morphologie et structure des hyphes externes du péridium des *Tuber* à écailles : évolution au cours du développement de l'ascocarpe. *Can. J. Bot.*, 71, 609-619.
- BRIMONT A., 1991 - Etude cytologique de quelques ectomycorhizes de Truffes (*Tuber melanosporum* Vitt., *Tuber uncinatum* Chat.) et d'un compétiteur de la Truffe (*Sphaerospora brunea* A & S) : structure, différenciation et évolution des composés taninifères. DEA de Biologie Forestière, Université de Nancy I.
- CHEVALIER G., 1973 - Synthèse axénique des mycorhizes de *Tuber brumale* Vitt. à partir de cultures pures du champignon. *Ann. Phytopathol.*, 5, 163-182.
- CHEVALIER G., GRENTE J., 1978 - Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne : production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). Mushroom Science, X Part II Proceedings of the tenth international congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Bordeaux, France, pp 483-505.
- CHEVALIER G., GRENTE J., POLLACSEK A., 1973 - Obtention de mycorhizes de différents *Tuber* par synthèse à partir de spores en conditions gnotoxéniques et à partir de culture pure de mycélium en conditions axéniques et gnotoxéniques. *Ann. Phytopathol.*, 7, 355-356.
- DURRIEU G., 1993 - Ecologie des champignons. Ed. Masson, Paris.
- GILTRAP N.J., 1982 - Production of polyphenol oxidases by ectomycorrhizal fungi with special reference to *Lactarius* spp. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 78, 75-81.
- KOTTKE I., OBERWINKLER F., 1986 - Root-fungus interactions observed on initial stages of mantle formation and Hartig net establishment in mycorrhizas of *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) Hooker on *Picea abies* (L.) Karst in pure culture. *Can. J. Bot.*, 64, 2348-2354.
- LEI J., DEXHEIMER J., 1989 - Experimental study of pine ectomycorrhizae : ectomycorrhizal organization after girdling of the hypocotyl. *Ann. Sci. For.*, 46, 741-744.

- MASSICOTTE H.B., PETERSON R.L., ACKERLEY C.A., MELVILLE L.H., 1990 - Structure and ontogeny of *Betula alleghanniensis-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.*, 68, 579-593.
- PARGNEY J.C., BRIMONT A., 1994 - Production of concentrated polyphenols by the root cap cells of *Corylus* associated with *Tuber* : ultrastructural study and element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging. *Trees* (sous presse).
- PARGNEY J.C., CHEVALIER G., 1995 - Localization of latent hyphae in old truffle mycorrhizae : ultrastructural, cytochemical and microanalytical studies. *Trees*, résultat inédit.
- PARGNEY J.C., GOURP V., 1991 - Contribution à l'étude des mycorrhizes de *Pinus pinaster* Soland. : ultrastructure des associations obtenues avec deux Basidiomycètes (*Hebeloma cylindrosporum* Romagn. et *Paxillus involutus* Fr.). *Phytomorphology*, 41, 161-173.
- PARGNEY J.C., LEDUC J.P., 1990 - Etude ultrastructurale de l'association mycorrhizienne Noisetier/Truffe (*Corylus avellana/Tuber melanosporum*). *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 137, 21-34.
- PARGUEY-LEDUC A., JANEX-FAVRE M.C., MONTANT C., 1988 - L'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes) : structure de la glèbe. I. Les veines fertiles. *Atti del II Congresso Internazionale sul Tartufo*, Spoleto, 101-109.
- PARGUEY-LEDUC A., JANEX-FAVRE M.C., MONTANT C., 1991 - L'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes) : structure de la glèbe. II. Les veines stériles. *Cryptogamie, Mycol.*, 12, 165-182.
- PICHE Y., PETERSON R.L., HOWARTH M.J., FORTIN J.A., 1983 - A structural study of the interaction between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and *Pinus strobus* roots. *Can. J. Bot.*, 61, 1185-1193.
- PREVOST A., PARGNEY J.C., 1995 - Comparaison des ectomycorhizes naturelles de Hêtre (*Fagus sylvatica*) et deux Lactaires (*Lactarius blennius* var. *viridis* et *Lactarius suldulcis*). I. Caractéristiques morphologiques et cytochimiques. *Ann. Sci. For.*, 52, 1-16.
- RAMSTEDT M., SÖDERHÄLL K., 1983 - Protease, phenoloxidase and pectinase activities in mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 81, 157-161.
- REYNOLDS E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electro-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208-213.
- ROBERT D., ROLAND J.C., 1989 - Biologie végétale. Caractéristiques et stratégie évolutive des plantes. in *Organisation cellulaire*, Ed. Doin, Paris, tome 1.

PROCES-VERBAL DE LA SEANCE DU 10 NOVEMBRE 1994

(Séance solennelle de rentrée)

--:--:--:--

A 17h10, le Président J.M. KELLER, ouvre la séance en présence de 52 personnes dans la Salle du Conseil de l'Hôtel du District de l'Agglomération nancéienne.

Ont signé le registre :

Mmes. PATARD, BERNA, DERAY.

Mlles. MATHIOT, COLIN.

MM. PUEYO, CORNEVAUX, TOMMY-MARTIN, BERNA, MERCIER, COMBREMONT, ORY, CHOUVIAC, FLECHON, DETRE, PENTENERO, HEYDORFF, DOSSMANN, MAUBEUGE, VALCK, RAUBER, WINGERT, GALOTTE, GNEMMI, MICHEL, HECKMANN, FOSSARD, CUVELIER, KAYL, PETIT, CHRETIEN, CLAUDON, DELIVRE, BOURGOIN.

Etaient excusés :

Mmes. KELLER-DIDIER, CLEVENOT.

Mlle. HEUSSER.

MM. STEPHAN, COUDRY, LEHR, PICHEREAU, WENTZEL.

Le Président souhaite la bienvenue à M. DELMER, le conférencier du jour, remercie M. CHONE, Président du District, M. BEGORRE, Vice-Président du District, chargé des questions scientifiques, ainsi que ses collaborateurs, salue les présences de M. MERCIER, président de l'Académie Stanislas, du Général TOMMY-MARTIN, Vice-Président, du colonel BRONOEL, représentant le Général BATTLO, Gouverneur militaire de Nancy. Il présente les excuses de M. Gérard LEONARD, député maire de St. Max, de Mme DIDIER, présidente de l'Ordre des pharmaciens, de M. COUDRY retenu par sa convalescence.

En quelques mots, M. CHONE dit sa joie d'accueillir les Académie et Société Lorraines des Sciences, assemblée dans laquelle il retrouve des visages familiers et des personnalités éminentes. Il les remercie pour leur action qui fait la fierté de Nancy, remercie M. DELMER, car Belgique et Lorraine ont subi souvent la même histoire, jusque dans les profondeurs du sous-sol.

C'est au Secrétaire général, M. P.L. MAUBEUGE, qu'il appartient de présenter le conférencier. Le texte de son allocution est reproduit à la suite du présent procès-verbal.

M. DELMER présente alors une conférence intitulée : "Exemple d'une richesse nationale : l'exploitation de la houille en Belgique, un bilan". Du Boulonnais à Aix-la Chapelle, s'étend une lande ou vallée houillère qui se prolonge jusqu'à la Campine. Son exploitation qui a provoqué la richesse de la partie francophone de la Belgique, ne sera bientôt plus qu'un souvenir.

A). Histoire des Charbonnages belges.

Le charbon affleurant au fond des vallées, son exploitation a été précoce : au XI<sup>e</sup> siècle et même dès l'époque romaine. Cette exploitation était réglementée par les princes-évêques de Liège et les seigneurs du Hainaut qui accordaient des permis par couches. Dès 1830, début des statistiques fiables, ce sont 2 milliards 600 millions de tonnes qui ont été extraites.

B). La sédimentation et la formation des couches. Le charbon qui n'a pas de formule chimique, n'a pas de solvant, mais renferme des gaz dans ses cavités. Il a été déposé dans la grande forêt carbonifère par une sédimentation fluviale dont la stratigraphie a été marquée par 4 invasions marines et par de nombreuses éruptions volcaniques.

C). La structure tectonique. Le synclinal qui arque le front varisque de l'orogénie hercynienne n'est pas régulier par suite du charriage provoqué par la faille du Midi (100 km.). Il présente en profondeur la superposition d'un massif imbriqué, surmonté d'un massif charbonnier riche et régulier. Le Paléozoïque, ou toit du houillier, a bougé, provoquant des fosses et des dômes qui se sont répercutés à travers les couches de charbon. Des séismes, des sources chaudes sulfatées utilisées en géothermie, traduisent une certaine activité interne.

D). Comment s'explique la disparition brutale, vieille de 10 ans ? Par des causes externes : les banques regardant plutôt vers l'atome n'aident plus les sociétés indépendantes qui n'investissent plus. Par des causes internes : du fait du coût de la main d'oeuvre (3/4 du prix du charbon), la mécanisation a été développée mais n'est pas adaptée aux gisements les plus riches à trop fort pendage..

En Conclusion, M. DELMER souligne que le progrès a permis une diminution des accidents (moins nombreux que dans le bâtiment), a limité la silicose et que, contrairement au temps de Zola, le métier de mineur était un beau métier.

Après les remerciements du président, un débat s'instaure entre M. DELMER et MM. COMBREMONT, PENTENERO et MAUBEUGE sur la fin du charbon en Belgique et bientôt en Lorraine. Le charbon peut encore être utilisé dans les chaudières comme à la centrale E. HUCHET à Carling sous forme de Schlams (déchets), mais la gazéification souterraine, difficile dans les structures complexes, est trop chère. Par contre, le pétrole n'est pas de prix excessif, le nucléaire est bon marché et le charbon également dans certains pays, même dans ceux à main d'oeuvre chère (Pennsylvanie). Quant au gaz, il vaut mieux le rechercher en périphérie du bassin qu'au travers de celui-ci : ainsi, le gaz de Groningue est-il du grisou. Enfin, dernière note pessimiste : la remise en route d'une mine de charbon est pratiquement impossible.

Le président lève la séance à 19 heures.

Allocution de M. P.L. MAUBEUGE à l'intention  
de M. DELMER.

-:-:-:-:-

Cher Maître,

Vous avez fait vos Humanités gréco-latines au Collège Saint-Michel à Bruxelles. Ingénieur civil des Mines, Université Catholique de Louvain 1940. Ingénieur aux Charbonnages André Dumont à Waterschei (Campine), vous passez l'examen d'entrée au Corps des Mines et débutez au service d'arrondissement à Mons, le 1er. mai 1942. Vous êtes transféré au Service Géologique le 1er. mars 1943. Chargé de la Direction du Service Géologique depuis 1962. Promu au grade d'Inspecteur général des Mines le 19 juillet 1974.

Titulaire de la prestigieuse médaille Léopold von Buch de la Deutsche Géologische Gesellschaft en 1978.

Nommé membre associé de l'Académie Royale de Belgique le 8 janvier 1983, puis membre titulaire le 11 janvier 1992.

Auteur d'environ 150 notes de stratigraphie, de tectonique et d'hydrologie mathématique. Tel est le résumé de votre carrière scientifique et professionnelle.

Est-il nécessaire de souligner, outre votre formation culturelle linguistique francophone, votre chaude position pour un maintien de langue française aux rives septentrionales de la forêt de Soignes ? Dans une hybride coupure administrative du pays belge maintenant partagé en trois communautés linguistiques, la capitale y a, par force des choses, un statut particulier. Mais vous y aviez une obligation, vu votre siège à l'Académie Royale de Belgique, la prestigieuse académie thérésienne où le français est le véhicule officiel d'expression. Ce qui nous rappelle avec mélancolie que du temps de Frédéric le Grand, une autre compagnie, en Prusse, avait le français comme langue unique de culture et même chose à l'Académie Impériale à St-Pétersbourg. Triste déchéance d'une époque actuelle où des scientifiques se croient obligés, pure fantaisie à prétextes fallacieux, à mon avis, non isolé, pour, citoyens français, utiliser l'anglais -et quel anglais- dans leurs travaux.

Venu à titre personnel, vous êtes cependant un messager de l'illustre fondation thérésienne ; et je vous soulignerai aussi combien l'adresse officielle de celle-ci nous avait frappés et honorés, nous, groupuscule insignifiant devant tant d'éclat, lors de notre 150ème. anniversaire, en célébration officielle.

Il convient de dire aussi que, pendant des lustres, vous fûtes le Directeur du Service Géologique de Belgique, un des plus fameux services du genre en Europe et inexistant en France ; la curieuse création du B.R.G.M. dans l'impossibilité d'y suppléer, vu ses finalités financières et mixtes. Là, le français a toujours régné ; on y a vu, avec de nouvelles générations, contaminées elles aussi, l'irruption de l'anglais au prétexte que le malheureux flamand était langue peu usitée en Sciences. Je suis certain que vous voyez en cette fin de 1994, avec consternation et arrachement du coeur, la disparition de ce non moins prestigieux

Service où ont brillé tant de grands géologues belges se consacrant évidemment à votre bassin carbonifère et aux célébrissimes affleurements du Carbonifère inférieur des rives de la Meuse, née en Lorraine et chantée par Péguy. Mais le Tertiaire des grandes plaines du Nord y a été beaucoup étudié, lien obligatoire avec les géologues français vu le Tertiaire des environs de Paris. Une décision administrative raye, d'un décret, une gloire scientifique institutionnelle de la Belgique. Comme a été rayée furtivement une armée nationale des citoyens au profit de gens de métier, les éternelles casernes rouges disparaissant soudain des lisières de Bruxelles sous les coups rageurs des engins bouteurs ; et la bureaucratie européenne occupant un espace écologique vide d'uniformes pour y implanter sa bureaucratie galopante dans des formes géométriques tuant la vue inoubliable de la marée des toits d'ardoise. On en sait quelque chose au quartier du Parc Léopold où était votre service, avec ses perspectives du dernier étage.

Vous avez aussi retrouvé le français comme organe véhiculaire de culture et d'expression de la Société belge de Géologie et de Paléontologie où, des lustres aussi, vous fûtes secrétaire général. Encore une personne morale ébranlée par une assez incompréhensible réforme, même si deux sociétés spécialisées étaient de trop dans un pays devenu trop petit en Europe. Là aussi, en quelques années, l'anglomanie a sévi dans les publications des jeunes géologues ; à telle enseigne qu'il est réflexions cocasses ça et là, de voir un bulletin publiant maintenant à plus de 75% en anglais, subventionné par la Communauté française de Belgique et la Province de Brabant, avec couronnement par des fascicules de plusieurs centaines de pages totalement écrites en anglais. Certes, cela est plus lu que du Flamand, mais il n'y a que trois langues officielles en Belgique ; certes une seule aussi en France mais... glissons. Nous, au moins, aux marches d'une frontière longtemps troublée, publions encore en français dans notre revue.

Forçant votre modestie, dirai-je combien unanimement, en Belgique et au delà, on a toujours loué votre grande courtoisie, je n'ose dire votre style vieille France à un Belge, votre disponibilité (votre présence ici en est la preuve), votre réceptivité immédiate, la ponctualité de votre action dans vos fonctions et votre grande loyauté, sans compter votre grande probité scientifique. (Hélas, tous les scientifiques ne sont pas loyaux et probes). Votre indéfectibilité dans vos relations amicales humaines est légendaire. Mais vous aviez été à l'école d'un père, de plus, haut fonctionnaire, serviteur de la chose publique en Belgique, près d'un état belge déjà agité pas ses problèmes internes de communautés. Rappelons qu'il fut le créateur du fameux canal Albert. Et les traditions créent des personnalités.

Je soulignerai simplement ici que votre oeuvre, bien connue dans le domaine scientifique, a été fondamentalement consacrée à l'étude du Carbonifère en Belgique. Et le Service géologique était avant tout créé justement vu l'existence d'un énorme bassin houiller, lieu de vos premières armes et sujet de votre présente conférence. C'est un Bassin défunt comme le Bassin français en train de finir d'expirer en Lorraine et, à défaut, le

formidable bassin du minéral de fer (la minette), sources de richesses nationales.

C'est cette minette qui, d'ailleurs, a valu un de nos tout premiers contacts. Je vois encore, à la libération, notre tournée dans les immenses bois de St. Mard et Lamorteau avec votre directeur de service d'alors : E. GROSJEAN. Était-ce en automne ou au printemps ? Mais je vois encore les dessous de bois, clarteux, jonchés de feuilles ; pour peu je reniflerais encore l'odeur d'humus. Les fumées de l'usine de cellulose de St. Mard, dont on a tant parlé dans les deux pays, ne traînaient pas encore aux confins d'une frontière. Outre les rares bûcherons, de moins rares douaniers soudain dans les lisières. Là se nouaient quelques-uns des fils professionnels entre nous pour presque un demi-siècle ; dont ma collaboration au Service. Et vous vous souvenez certainement de cette session extra-ordinaire des Sociétés belges de géologie en Lorraine il y a 40 ans, en septembre 1954. J'avais pu organiser avec un certain faste, les industries étant à l'aube de la prospérité naissante. Vous étiez donc déjà en Lorraine et à Nancy. Mais ce fut avec du dramatique : un matin, un membre ayant été trouvé mort dans son lit. Combien des autres participants ou membres, où nous avons bien des amis, sont encore ici bas ? Nous nous comptons... "Fugit irreparabile tempus" (le temps fuit, irréparable.) disait Virgile.

J'abuse, mon cher Maître, vous empêchant de parler ; mais me laisserez-vous encore exprimer publiquement mon admiration et mon estime, sans lesquelles il ne saurait y avoir l'amitié ?

PROCES VERBAL DE LA SEANCE DU 15 DECEMBRE 1994

A 17 heures, le Professeur J.M. KELLER, Président, ouvre la séance en présence d'une quarantaine de personnes, dans la Salle du Conseil de l'Hôtel du District de l'Agglomération nancéienne.

Membres présents :

Mlle HEUSSER,  
Mmes MATHIOT, BERNA, COLIN, BAUDOT, PATARD, LIONEL-PELLERIN,

Mrs COMBREMONT, CHOUVIAC, VALCK, BERNA, TOMMY-MARTIN, PHILIPPON, PIERRE, LESUEUR, GEOFFROY, CUVELIER, HARTEMANN, WENZEL, GNEMMI, DOSSMANN, LEHR, CHRETIEN, CORNEVAUX, COUDRY, BOURGOIN, CHOLLOT, PICHÉREAU, COEURDEROY, CLAUDON, BAUDOT, MAUBEUGE, PARGNEY, FOSSARD, FURDIN.

Membres excusés :

Mmes KELLER-DIDIER, CLEVENOT, NONCLERCO,  
Mrs DETRE, HEYDORFF, HAUMARET, MEUNIER, FLECHON, STEPHAN, KISFALUDI, LEONARD, DELIVRE, NADLER.

Le président cite d'abord les noms des nouveaux membres de la Société : M. DAUBRESSE, Inspecteur d'Académie, présenté par M. COUDRY - le Colonel MAYNARD, médecin- chef de la base d'Ochey, présenté par le Général TOMMY-MARTIN et M. PIERRE, le professeur FURDIN du laboratoire de Chimie des Solides de l'Université de Nancy-I, présenté par Mrs PIERRE et JM. KELLER - le Docteur Marie-José LIONEL-PELLERIN, présenté par Mrs KELLER et BERNA - M. DELMER, Directeur du Service géologique de Belgique, a remercié pour l'accueil reçu à l'occasion de sa dernière conférence et sollicite son admission comme membre de la Société.

Le président donne la parole à M. GIROD, pour la première communication : "Modélisation architecturale du système visuel biologique pour la segmentation d'images monochromes", dont le texte figurera dans le bulletin. Il s'agit du travail d'une équipe d'automaticiens, réalisant un logiciel remplaçant les fonctions visuelles de l'oeil et du cerveau, plus lent sur calculateur mais plus précis que les algorithmes classiques.

Le président demande si ce système permettait de suivre les neurones. Le conférencier lui répond qu'il ne s'agit ici que de neurones artificiels, et à M. COMBREMONT, qui voudrait connaître les applications industrielles, il précise que le même système peut mesurer des pièces, non d'un seul type, mais de dimensions différentes.

Les deux communications suivantes sont présentées par M. MAUBEUGE :

- La première, intitulée "Globorilusopsis, nouveau genre : Survivance de Calyptoptomatidae au Jurassique", vient en complément d'un article du bulletin (N°3 - 1994), relatant la

découverte dans le Toarcien belge et luxembourgeois, d'un mollusque disparu depuis le Cambrien, c'est-à-dire depuis 350 millions d'années.

- La deuxième, intitulée "Stratigraphie - Première découvertes de faunes fossiles triasiques dans le Keuper supérieur de la Belgique et comparaisons avec la Lorraine". Dans les Marnes irisées de la Dolomie de Beaumont, des carottes du Service géologique de la Belgique montrent pour la première fois une faune triasique caractérisée.

La quatrième communication est due à M. PARGNEY. Elle s'intitule : "Etude cytologique des formations fongiques en stromas se développant à la surface des racines longues des plants truffiers". Associant à son travail le nom de Michel JALADE, trufficulteur de l'Yonne, l'orateur, à l'aide de nombreuses photos et coupes grossies, essaie d'analyser la composition de stromas ou formations granuleuses sur les racines des truffières et qui seraient en fait des hyphes entremêlées. Le président KELLER voudrait voir dans ces stromas de nouvelles truffes.

Ces communications sont suivies d'une longue mais remarquable conférence de Mlle HEUSSER Sandrine, ancienne élève de l'E.N.S de St-Cloud, professeur agrégé de Sciences naturelles, chargée de la préparation Agrégation et Capes, trésorière adjointe de notre société.

Cette conférence est intitulée : "La Grande Galerie du Muséum National d'Histoire Naturelle : témoin de l'évolution des idées scientifiques et muséologiques".

Dans un premier temps, la place de la Galerie de Zoologie au sein du Muséum National d'Histoire Naturelle a été évoquée, à travers un historique de l'établissement, nous conduisant du Jardin Royal des Plantes Médicinales du XVIIème siècle, à la restructuration de la Révolution Française, puis à nos jours. Le bâtiment, construit à la fin du XIXème siècle, inauguré en 1889, est destiné à accueillir les collections de Zoologie. Dans une perspective plus fonctionnelle, c'est-à-dire relative aux missions du Muséum, la Galerie de Zoologie se présente comme la concrétisation des trois vocations reconnues à l'établissement depuis ses origines, l'enrichissement et la conservation des collections, la recherche en Sciences de la Nature, la diffusion des connaissances.

Musée d'objets, elle est le témoin des idées muséologiques de l'époque mais aussi des idées scientifiques car la présentation des spécimens respecte les classifications.

Dans une seconde partie, les transformations à l'origine de la Grande Galerie ont été développées. Le déclin de la Galerie de Zoologie, conséquence des bombardements de la Seconde Guerre Mondiale, de la nécessité d'équiper les laboratoires du Muséum et des critiques à l'encontre de l'exposition provoque sa fermeture au public en 1965. Une rénovation est envisagée dès 1972, et débute avec la construction d'une Zoothèque souterraine entre 1979 et 1983. Après de multiples péripéties, le projet architectural de l'équipe Chemetov-Huidobro est réalisé, sur les bases scientifiques définies par la cellule de préfiguration. La Grande Galerie est structurée en trois actes illustrant l'Evolution et respectivement consacrés à la diversité

du vivant, l'Evolution dans ses faits, ses théories et ses mécanismes, les relations Homme - Nature.

De par le choix du thème, elle témoigne des idées scientifiques actuelles. Sa conception muséologique est également moderne : il s'agit d'un musée d'objets et d'idées.

Les caractéristiques de la Grande Galerie aujourd'hui en font un formidable outil d'éducation et de culture, très bien mis en valeur par le Service d'Animation Pédagogique et Culturelle qui en a la responsabilité.

Le président félicite Mlle HEUSSER pour son brillant exposé pédagogique. Félicitations auxquelles s'ajoutent celles de M. COUDRY qui demande si, dans la Grande Galerie, figurent des fossiles marquant le début de l'Evolution (le Coelacanthé par exemple). M. PARGNEY rappelle la dualité lors de la construction qui a opposé architectes, muséographes et scientifiques, les premiers disposant des crédits, imposant leurs vues. Mais des expositions temporaires permettent aux seconds de corriger dans le sens de leurs idées.

La matière de cette conférence était si riche qu'elle ne pouvait appeler beaucoup d'autres questions.

Le président lève la séance à 19H35.

## PROCES-VERBAL DE LA SEANCE DU 12 JANVIER 1995

Après l'Assemblée Générale annuelle des Académie et Société Lorraines des Sciences, le Président J.M. KELLER ouvre la séance mensuelle en présence de 49 personnes (dont 13 non membres) dans la Salle du Conseil de l'Hôtel du District de l'Agglomération nancéienne.

Parmi les membres de l'A.S.L.S., étaient présents:

- Mesdames COLIN S., HEUSSER S., BERNA M.T., STEPHAN F., LIONEL-PELERIN M.J., GRAND'EURY J.M., MATHIOT B.,
- Messieurs KELLER J.M., MAUBEUGE P.L., BERNA G., PHILIPON J.P., PENTENERO A., PUEYO G., BAUDOT P., BAUTZ A., CHERRRET G., FLECHON J., HARTEMANN P., BOURGOIN R., VALCK P., STEPHAN F., PERCEBOIS G., CLAUDON J.F., PICHÉREAU P., COMBREMONT G., CHOUVIAC C., PERRIN C., GNEMMI J., DOSSMANN J., FOSSARD J.M., CHRETIEN P., RAUBER G., PIERRE J.F., WENZEL G., CORNEVEAUX J., KISFALUDI G..

Etaient excusés:

- Mesdames BESSON S., KELLER-DIDIER C., WAGNER M.,
- Messieurs COUDRY G., HAUMARET B., DUPONT N. (Frère Basile), COURTOIS J.M., LESUEUR, GALOTTE L., CUVELIER A., ROUSSELOT, Général TOMMY-MARTIN,
- Parmi les représentants des autorités territoriales: Général BATTLO, gouverneur militaire de Nancy, LEONARD G., député-maire, premier vice-président du conseil régional de Lorraine, CHONE C., Président du District.

Avant de commencer la séance, le président a tenu à féliciter:

- Monsieur ARTOIS M. du Centre d'Etudes de la Rage qui a reçu la distinction de Chevalier du mérite agricole,
- Monsieur RAUBER G. élu Président de l'Ordre des médecins,
- Monsieur BEGORRE H. nommé Professeur des Universités,
- Monsieur CHONE C. nommé Chevalier de la Légion d'Honneur,
- Monsieur VILLERMAUX J. lauréat du Grand prix de l'Académie des Sciences 1994 dans la discipline Génie des procédés.

Nous joignons bien sûr nos félicitations à celles du Président.

## COMMUNICATIONS

Le Président a donné la parole à **Madame VALLET A.**, Docteur de l'Université de Bordeaux, pour la présentation de ses travaux réalisés sur l'araignée au laboratoire de biologie du comportement de Nancy. Cette première communication est intitulée: **"Morphologie des sensilles chémoréceptrices de *Tegenaria atrica* (Agelenidae)"**.

A la suite de cet exposé, Monsieur BAUDOT a relevé la sensibilité particulière des sensilles à la L-proline à la concentration de  $10^{-2}M$  alors qu'elles se montrent insensibles à des concentrations de  $10^{-3}M$  ou de  $10^{-1}M$ . D'après Madame VALLET, il existe pour cet acide aminé une concentration seuil de  $10^{-2}M$  avec au-delà un phénomène de saturation.

Monsieur KELLER a demandé si des expériences similaires avaient été réalisées chez l'adulte ou à d'autres stades de développement du juvénile. En fait, pour cette étude, seuls les 3 premiers stades de développement ont été étudiés.

**Monsieur PUEYO G.**, Conservateur de la bibliothèque de l'académie d'agriculture, nous a présenté dans une seconde communication **"Quarante années successives de relevés météorologiques en Ile-de-France à la fin du XVIIIème siècle par Louis Cotte"**.

A l'issue de cet exposé, Monsieur FLECHON a demandé quelles sont les plus grandes caractéristiques relevées à cette période. Monsieur PUEYO a précisé que ce sont les années de grande sécheresse ou de grand froid qui ont marqué le plus ces relevés.

## CONFERENCE

La conférence du jour a été présentée par **Monsieur BAUTZ A.**, Maître de conférences à l'Université de Nancy I sur le sujet: **"L'animal dans l'espace. De la préparation des vols habités à l'acquisition de connaissances fondamentales en Biologie gravitationnelle"**.

Après un historique sur les vols spatiaux depuis le premier SPOUTNIK en 1957 jusqu'à nos jours, Monsieur BAUTZ nous a présenté les projets actuels de vols habités par des animaux. Il nous a fait part du programme auquel le laboratoire de Monsieur DOURNON participe et qui concerne la reproduction de Pleurodèles dans l'espace.

Monsieur KELLER s'est interrogé sur la mortalité et la sensibilité au stress de rongeurs au décollage. Monsieur BAUTZ a reconnu l'existence de ce stress qui engendre un blocage psychologique de l'animal rendant difficile la reproduction dans l'espace. Il a ainsi montré l'intérêt de travailler sur un modèle non mammifère: les Pleurodèles.

Monsieur FLECHON a demandé quelles sont les modifications des rythmes biologiques en apesanteur. Les expériences de Monsieur BAUTZ ne portant pas sur ce domaine, ce dernier a fait remarquer cependant que la perte de la notion du temps était souvent notée.

Mademoiselle HEUSSER s'est intéressée à la reproduction en apesanteur des végétaux. Mais actuellement celle-ci pose de nombreux problèmes et n'a pas pu être encore obtenue.

Après avoir remercié les intervenants et le public, le Président fixe la prochaine réunion au 9 février et lève la séance à 19 heures 30.

## PROCES-VERBAL DE LA SEANCE DU 9 FEVRIER 1995

Le Président Jean-Marie KELLER ouvre la séance à 17 heures en présence de 60 personnes (dont 21 non membres) dans la Salle du Conseil de l'Hôtel du District de l'Agglomération nancéienne.

Parmi les membres de l'A.S.L.S., étaient présents:

- Mesdames COLIN S., BERNA M.T., PATARD M.T., LIONEL-PELERIN M.J., KAYL M., PIERRE I., MATHIOT B.,
- Messieurs KELLER J.M., MAUBEUGE P.L., BERNA G., Général TOMMY-MARTIN, WENZEL G., ORY P., PERCEBOIS G., COUDRY G., DOSSMANN J., CUVELIER A., KAYL R., GNEMMI J., CLAUDON J.F., STEPHAN F., BOURGOIN R., DETRE J., HARTEMANN P., FOSSARD J.M., CHOLLOT B., HADNI A., LEONARD J.M., RAUBER G., COMBREMONT G., CHOUVIAC C., CORNEVAUX J., MENARD G., PERRIN C., PARGNEY J.C., PIERRE J.F., CHRETIEN P., PHILIPON J.P., KISFALUDI G..

Etaient excusés:

- Mesdames NONCLERCQ G., KELLER-DIDIER C.,
- Messieurs DELIVRE J., DUPONT N. (Frère Basile).

### COMMUNICATION

Le Président J.-M. KELLER prend la parole pour la présentation de sa communication intitulée: "**Impact d'un facteur hypolipémiant, le clofibrate, sur l'ultrastructure des hépatomes humains (HepEBNA) et murins (Fao)**". Monsieur Keller a tenu à préciser que ces travaux ont été soutenus par l'A.R.C. et la Ligue contre le cancer.

Cette intervention n'a donné lieu à aucune question.

### CONFERENCE

La parole est ensuite donnée à **Monsieur BOULAY J.**, actuellement étudiant en DEA de biologie forestière, passionné et collectionneur de plantes carnivores, pour la présentation de sa conférence sur le sujet: "**Les plantes carnivores: généralités et essai de micropropagation**".

#### Résumé:

Les 570 espèces environ que comptent les plantes carnivores sont classées en 11 familles et 7 genres. Elles sont présentes sur les quatre continents dans des milieux pauvres en matières nutritives tels que les tourbières acides, les marécages, la forêt vierge, les tépuys (Vénézuéla).

Les plantes carnivores pallient cette carence trophique en se nourrissant de petits animaux qu'elles capturent. La taille des proies est très variable suivant l'espèce. Ainsi, si l'*Utricularia* se nourrit de puces d'eau, le *Nepenthes* peut capturer des proies de la taille d'un petit rat. Chaque famille a mis au point un système de capture spécifique, ce qui leur confère un attrait

scientifique particulier. De plus, certaines espèces, comme *Drosera rotundifolia*, sont actuellement encore utilisées dans l'industrie pharmaceutique.

Toutefois, du fait de cette adaptation extrême, le devenir de ces plantes est étroitement lié à celui de leurs biotopes actuellement menacés de disparition. C'est la raison pour laquelle la majorité d'entre elles sont protégées aussi bien au niveau national qu'au niveau international.

Une des solutions de préservation de ces espèces est la culture *in vitro*. Cette technique permet d'une part, la conservation d'espèces rares maintenues dans des conservatoires botaniques et d'autre part, elle permet la multiplication à grande échelle de la dionée et de certaines droséras, offrant ainsi au public quelques unes des plantes carnivores les plus spectaculaires.

A la suite de cet exposé, Monsieur BERNA s'est posé la question du devenir des débris chitineux des insectes capturés par ces plantes. Monsieur BOULAY a alors précisé que, pour certaines espèces, les pièges disparaissent et se reforment chaque année. Monsieur BERNA s'est interrogé aussi sur la rapidité de fermeture des pièges. Monsieur BOULAY a répondu que c'est un mécanisme encore mal connu qui ferait vraisemblablement intervenir la notion de potentiel d'action.

Monsieur BOURGOIN s'est intéressé au microbouturage de l'espèce *Nepenthes* en soulevant le problème de savoir de quel sexe sera le jeune plant, cette plante étant dioïque. Monsieur BOULAY a répondu que si on prélève un méristème d'une plante, le jeune plant obtenu sera du même sexe, ce qui pose le problème de la conservation des 2 sexes de cette espèce.

Monsieur MAUBEUGE s'est interrogé sur l'explication qui peut être donnée, du point de vue de l'évolution, des mécanismes particuliers des plantes carnivores. D'après Monsieur BOULAY, il s'agit en fait d'une adaptation de ces plantes à un environnement particulièrement hostile: ce serait un exemple de sélection naturelle.

Monsieur PERRIN a demandé si cette fonction digestive est indispensable ou superflue pour la vie de ces plantes et si une exploitation a été faite des sucs digestifs. Monsieur BOULAY a répondu que l'apport nutritif par les insectes est indispensable à la plante, notamment pour passer la période de repos. Il a aussi précisé que certaines de ces plantes ont une application médicinale mais qu'à l'heure actuelle ces sucs digestifs ne sont pas utilisés.

Monsieur KELLER a demandé si ces plantes avaient des prédateurs particuliers et si des animaux s'en nourrissent ou les évitent. Monsieur BOULAY a répondu que ces plantes ont, comme toute plante, des insectes parasites et que seulement quelques cas de troubles digestifs avaient été notés chez des vaches ayant consommé ces plantes. Monsieur KELLER s'est étonné également de la taille importante de certaines proies et a demandé si la plante sécrète une sorte d'anesthésique. Monsieur BOULAY a précisé que c'est seulement la taille du piège et sa structure plus ou moins visqueuse qui permettent ce genre de capture.

Après avoir remercié le conférencier et le public, le Président fixe la prochaine réunion au 9 mars et lève la séance à 19 heures.