

MICHEEL, VAN DE KAMP und WULFF⁴ haben gezeigt, dass die von MOGGIDGE *et al.*² erhaltene Verbindung α -1, 3, 4, 6-Tetraacetyl-D-glucosamin-hydrobromid ist und im IR-Spektrum keine charakteristischen Amidbanden besitzt. Im IR-Spektrum⁵ des von uns erhaltenen Chlorides wurden nun bei 3,10 μ (N-H), 6,07 μ (O = C-N) und 6,48 μ (Amid-II) die zu erwartenden Banden gefunden, was eindeutig für das Vorliegen eines Amides spricht.

Demnach entsteht aus β -Pentaacetyl-D-glucosamin mit HBr in Eisessig das Hydrobromid des 1,3,4,6-Tetraacetyl-D-glucosamins, während mit ätherischer HCl das 1-Chlor-3, 4, 6-N-tetraacetyl-D-glucosamin erhalten wird.

CH. J. MOREL

Pharmakologische Laboratorien der J. R. Geigy AG., Basel, den 17. Juli 1956.

Summary

Treating β -Pentaacetyl-D-glucosamin with ethereal hydrochloric acid leads to 1-Chloro-3, 4, 6-N-tetraacetyl-D-glucosamin, whose structure is proved by infra-red spectra and transformation to known products.

⁴ F. MICHEEL, F. P. VAN DE KAMP und H. WULFF, Chem. Ber. 88, 2011 (1955).

⁵ Die IR-Spektren verdanken wir Herrn Dr. E. GIROD, aufgenommen in Nujol, Perkin-Elmer, Mod. 21.

Fixation et inclusion du matériel nucléaire de *Escherichia coli*

Dans les coupes ultra-minces de bactéries, le noyau se présente soit entièrement rempli par une structure fine¹, soit sous forme de « vacuole nucléaire » contenant une ou plusieurs masses denses disposées au hasard². Des figures de finesse intermédiaire ont été observées³. Dans un travail précédent⁴ nous avons postulé l'hypothèse que ces structures nucléaires internes n'étaient pas significatives, c'est à dire qu'elles ne sont pas en rapport direct avec la constitution du noyau de la cellule vivante mais qu'elles ne sont que des formes de coagulation. Nous avons depuis lors étudié l'influence du pH et de certains cations sur la coagulation du nucléoplasme durant la fixation.

Cette étude a été faite sur des cellules de *Escherichia coli* cultivées en milieu tryptoné, traitées à l'auroéomycine (1 h avec 4 γ /ml). Ce traitement permet d'obtenir une forme nucléaire simple et identique pour la totalité des cellules de la culture tout en les laissant toutes survivantes.

L'étude de l'influence du pH durant la fixation a été faite en employant de l' OsO_4 dissout à raison de 2%

dans du tampon Michaelis ajusté à des pH allant de 6,0 à 8,0. On ajoute 4 ml d'acide osmique de pH désiré dans 40 ml de culture en tryptone de *E. coli* traitée à l'auroéomycine, ce qui donne une concentration d' OsO_4 de 0,2%

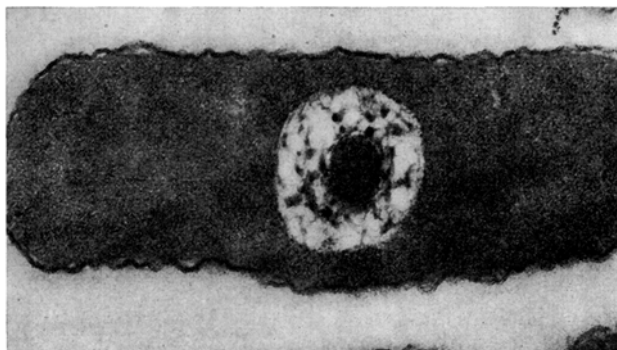


Fig. 1. *E. coli* K 12 S traité à l'auroéomycine; fixé OsO_4 2% pH 7,2; inclus dans le méthacrylate. Le matériel nucléaire est assez grossièrement précipité. Grossissement 50000 \times .

et un pH encore très voisin de celui de la culture avant fixation. On centrifuge et l'on reprend le culot dans 1 ml du même fixateur que l'on laisse en contact pendant 16 h à 20°. On lave en tampon du même pH que celui du fixa-

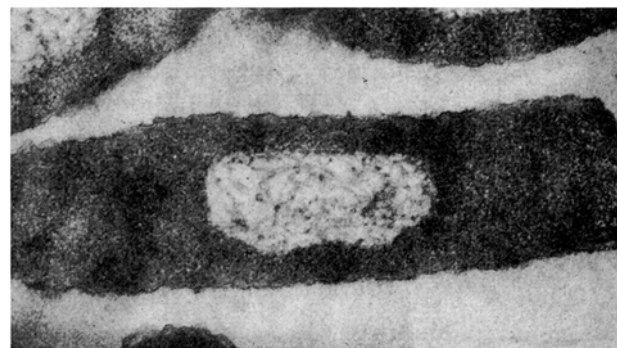


Fig. 2. Mêmes bactéries que celles de la figure 1, mais inclus au polyester. Le nucléoplasme est un peu plus fin. Grossissement 50000 \times .

teur et on reprend le culot dans une goutte d'agar 1,5% au même pH. L'agar est déposé sur une lame de verre, refroidi et découpé en petits cubes de 1 mm³. On procède ensuite à la deshydratation dans l'acétone en vue de l'enrobage soit au méthacrylate soit au polyester⁵ (l'alcool n'étant pas miscible au polyester). Nous avons constaté sur des séries comparatives que la deshydratation à l'acétone n'entraîne aucun changement du matériel biologique par rapport à celle à l'alcool.

L'inclusion au méthacrylate produit très souvent des gonflements et des déformations des cellules surtout lorsque le pH du fixateur est supérieur à 6. Ces artefacts ne se produisent jamais avec le polyester.

Les bactéries fixées aux pH 7,2 à 8,0 offrent toujours un nucléoplasme relativement grossier (fig. 1, dans le méthacrylate; fig. 2, dans le polyester). Au pH 6,0 le nucléoplasme est toujours beaucoup plus fin et l'adjonction de cations (0,01 M Mg et 0,0001 M Ca) au fixateur permet d'obtenir des résultats plus constants (fig. 3). Si l'on ajoute des ions La (0,03 M sous forme de nitrate) à

⁵ E. KELLENBERGER, W. SCHWAB et A. RYTER: Exper. même fascicule.

¹ G. B. CHAPMANN et J. HILLIER, J. Bact. 66, 362 (1953).

² A. BIRCH-ANDERSEN, O. MAALØE et F. SJØSTRAND, Biochim. biophys. Acta 12, 395 (1953).

³ J. R. G. BRADFIELD, Nature 173, 184 (1954). – G. PIEKARSKI, G. M. PONTIERI, Zbl. Bakt. I Orig. 165, 242 (1956). – O. MAALØE et A. BIRCH-ANDERSEN, Bact. Anatomy (Cambridge University Press 1956), p. 261.

⁴ E. KELLENBERGER et A. RYTER: Sch. Z. Path. Bakt. 18, 1122 (1955).

la place de Ca et Mg, on obtient des résultats similaires mais plus marqués; le cytoplasme est composé de grains assez nettement délimités qui sont probablement comparables aux grains de PALADE⁶ et le nucléoplasme formé de

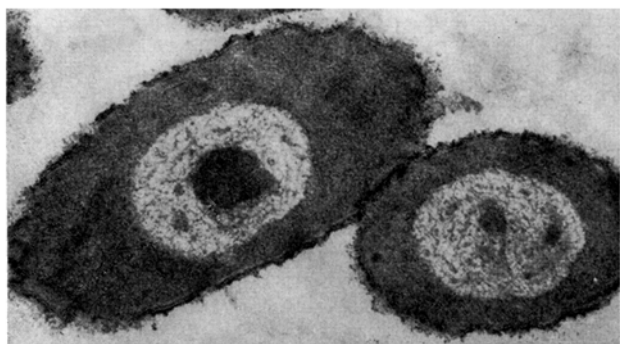


Fig. 3. *E. coli* K 12 S traité à l'aureomycine; fixé OsO_4 2% pH 6,0; inclus au polyester. Le matériel nucléaire est très finement précipité. Grossissement 50 000 \times .

«filaments» très fins d'un diamètre de 50 à 70 Å (fig. 4). Ces observations en accord avec celles d'autres auteurs⁷ nous prouvent qu'il est absolument indispensable de continuer des expériences systématiques sur la fixation

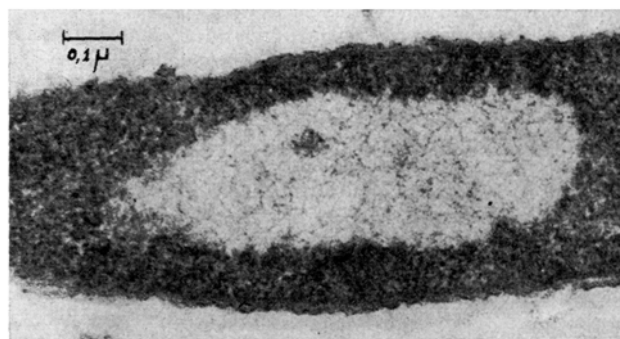


Fig. 4. Mêmes bactéries que celles de la figure 3, fixées au pH 6,0 avec adjonction de 0,03 M de $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. Le noyau est formé de «filaments» d'environ 40 à 70 Å de diamètre. Grossissement 75 000 \times .

et l'inclusion du matériel bactérien avant de discuter l'existence de mitoses avec fuseau et centrosomes⁸.

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une recherche subventionnée par le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique.

E. KELLENBERGER et A. RYTER

Laboratoire de Biophysique de l'Institut de Physique, Université de Genève, le 2 juin 1956.

Zusammenfassung

In Abhängigkeit vom pH der Fixierungsflüssigkeit und vorhandener Kationen zeigt der Bakterienkern in Dünnschnitten entweder eine grobe oder aber eine feine Innenstruktur. Die als Chromosomenstrukturen gedeuteten Koagulationsbilder werden erneut in Frage gestellt.

⁶ G. E. PALADE, J. Biophys. biochim. Cytol. 1, 59 (1955).

⁷ C. F. ROBINOW, *Bact. Anatomy* (Cambridge University Press 1956), p. 181.

⁸ E. D. DELAMATER, *Ann. Rev. Microbiol.* 8, 23 (1954).

L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotomie

L'inclusion au méthacrylate, introduite par NEWMANN, BORYSKO et SVERDLOW¹ est actuellement la méthode la plus répandue pour obtenir des coupes ultraminces². Elle présente cependant certains inconvénients: La polymérisation irrégulière du méthacrylate conduit à des duretés variables, à la formation de bulles plus ou moins nombreuses suivant le matériel inclus ainsi qu'à des gonflements très fréquents du tissu allant jusqu'à l'éclatement des cellules.

Ces difficultés nous ont conduits à chercher d'autres milieux d'enrobage et nous nous sommes arrêtés à un «polyester» préparé à partir de l'anhydride maléique estérifié avec l'alcool polyhydrique (glycérol, hydroabiétyl, etc.). Pendant cette estérification l'anhydride donne naissance à la forme *cis*, l'acide maléique, et à son isomère, l'acide fumarique, la forme *trans*. La co-polymérisation a lieu en présence de styrène et elle est amorcée par addition de 0,7 à 1% de catalyseur (peroxyde de benzoyle) et de 0,5% d'accélérateur (naphthénate de Co)³. Les propriétés physiques de cette résine dépendent de l'équilibre entre les formes *cis* et *trans* de l'ester. La polymérisation doit commencer lentement et finir rapidement pour éviter les tensions internes: on maintient le «polyester» à 4° pendant 24 h puis on élève lentement la température jusqu'à 60° C afin d'obtenir ces résultats.

La méthode d'inclusion dans ce «polyester» est identique dans les grandes lignes à celle dans le méthacrylate². Elle ne diffère que par une déshydratation à l'acétone à la place d'alcool éthylique, car le «polyester» est peu miscible à l'alcool. L'étude comparative entre ces deux déshydratations avec inclusion finale au méthacrylate nous a montré que ces séries parallèles donnent des résultats identiques. Le mélange d'esters monomères que nous avons employé est un liquide plus visqueux que le méthacrylate. Il se posait donc le problème de la pénétration à l'intérieur des cellules. Le passage brusque du tissu de l'acétone 100% au «polyester» pur provoque d'énormes contractions qui peuvent être presque totalement évitées si l'on introduit le tissu dans plusieurs mélanges d'acétone-«polyester» dont la proportion de «polyester» augmente progressivement.

Après fixation et lavage du tissu on déshydrate à l'acétone 25%, 50%, 75%, 95%, 100% pendant 30 à 60 min chacun. Puis on introduit 0,75% de catalyseur dans le «polyester» que l'on mélange ensuite en proportions variables avec l'acétone:

3 parties acétone sec — 1 partie «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;

1 partie acétone sec — 1 partie «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;

1 partie acétone sec — 3 parties «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;

«polyester» seul avec catalyseur + 0,5% d'accélérateur, 30–60 min.

Ces quatre passages doivent se faire à 4° pour éviter un début trop rapide de la polymérisation. Le tissu est déposé au fond de capsules sèches de gélatine, remplies

¹ S. B. NEWMAN, E. BORYSKO et M. SVERDLOW, J. Res. nat. Bur. Stand. 43, 183 (1949).

² F. S. SJÖSTRAND, Z. wiss. Mikr. 62, 65 (1954).

³ Les produits utilisés peuvent être obtenus au laboratoire Vinox, 10, avenue G. Werner, Genève, sous la désignation Vinox K3.