

current is passed through the electrolyte between the Pt electrode and a carbon rod. The potential difference has to be 1 to 1.5 V. The immersed tip of the platinum wire is dissolved (the process is slower than with tungsten) until in the end the contact with the nitrite solution is suddenly broken, resulting in a very fine tapered point. The tapering of the point depends on the surface tension of the electrolyte. The point becomes short and pencil-like at high surface tension, but, when surface tension lowering agents are added, it tapers more gradually.

After electropolishing, the electrode is rinsed in water, alcohol, and dried.

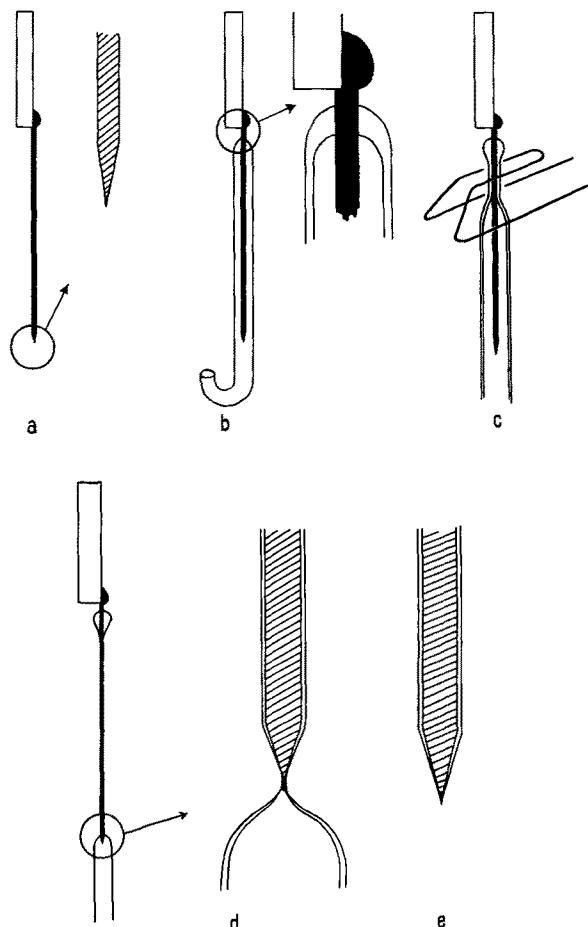


Fig. 1. (a) Platinum wire with electropolished point, soldered to a thicker copperwire, (b) a pyrex capillary with a hook on one end is fixed, (c) by heating the element a thin film of glass is drawn around the platinum, (d) when a tip of suitable size is not yet fused to the glass, the rest of the capillary is broken off, (e) in the vicinity of the tip the glass layer is very thin.

### Technique d'inclusion et d'ultramicrotomie, destinée à l'étude du développement des organelles dans une cellule isolée<sup>1</sup>

**Introduction.** L'étude, par coupes ultra-minces, des modifications structurelles qui se déroulent dans les cellules au cours de leur développement, pose certains problèmes de localisation. On peut comparer ces problèmes à ceux que rencontre, en embryologie, l'étude de la genèse d'organes et de systèmes d'organes. Dans l'un et

Thin walled pyrex tube of about 3 mm diameter is heated over a gas flame and drawn to capillaries of less than  $\frac{1}{2}$  mm diameter. Under a dissecting microscope, a short length of the capillary is slid over the platinum wire and fixed to the metal at the upper end by melting with a microburner. At the other end, the capillary is bent to a hook (Figure 1b).

In order to obtain a thin and tight insulating layer, the glass is now heated and drawn out over the electrode in the following way: The electrode is clamped in a holder, which can be moved up and down with a rack and pinion (Figure 2d), and a small weight (Figure 2c) is hooked on. An electric heating filament (Figure 2a) (made of 0.3 mm nichrome wire) is put around the upper end of the electrode and heated, under visual control with a dissecting microscope, to a bright red. The heating current is drawn from a 6.3 V transformer (Figure 2e), which is fed from the mains over a variac (Figure 2f) by which the heating current can be regulated. When the pyrex glass softens, the capillary is drawn out by the weight, the glass forming a thin layer around the electrode (Figure 1c). By raising the electrode with the rack and pinion support, one can draw a thin layer of glass over the whole length of the electrode. In the vicinity of the tip, the heating current is diminished to slow down the process so that one is able to stop heating just when a tip of suitable size is not yet bonded to the glass (Figure 1d). A sharp pull at the hook of the capillary breaks the glass just around the tip, where it forms a very thin layer. The tip region is now briefly heated to ensure a good and smooth bond between the glass and the platinum. The result (Figure 1e) is an electrode with a very fine tip and a smooth and sturdy but thin insulation.

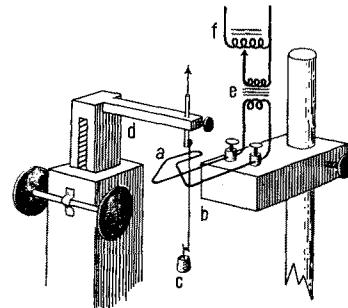


Fig. 2. Set-up for insulating the electrode. (a) heating filament, (b) electrode, (c) weight, (d) rack and pinion support, (e) heating transformer 6.3 V, (f) Variac.

**Zusammenfassung.** Es wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, glasisolierte Platinelektroden mit beliebig feiner Spitze herzustellen.

C. M. BALLINTIJN

*Zoological Laboratory of the University of Groningen (Netherlands), April 25, 1961.*

l'autre cas, une démonstration satisfaisante du cours du développement implique deux nécessités: d'une part un contrôle précis du stade évolutif au moment de la fixation, d'autre part la connaissance exacte de l'orientation de l'objet et du plan de coupe. Le nombre élevé d'objets qui

<sup>1</sup> Travail effectué dans le cadre d'une recherche faite en collaboration avec les Instituts d'Histologie et de Biophysique, grâce à une subvention de «Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz».

doivent être examinés et comparés, si l'on veut reconstituer valablement les faits, nécessite une technique rapide et facile. Pour autant l'intégrité parfaite des structures étudiées ne doit pas être compromise.

Ces exigences n'avaient pas encore, à notre connaissance, trouvé de solution dans le domaine de l'ultramicrotomie. Les descriptions faites étaient basées jusqu'ici pour la plupart sur des coupes orientées au hasard.

Une technique a été mise au point, qui permet de faire des coupes dans un plan défini d'une cellule, isolée à un stade précis de son cycle. Nous l'avons appliquée à l'étude du développement des organelles cytoplasmiques chez *Paramecium bursaria*, cellule de 100 à 130  $\mu$  de longueur. Les coupes étaient faites selon un plan équatorial. La comparaison de coupes séries permet la reconstitution dans l'espace des structures observées.

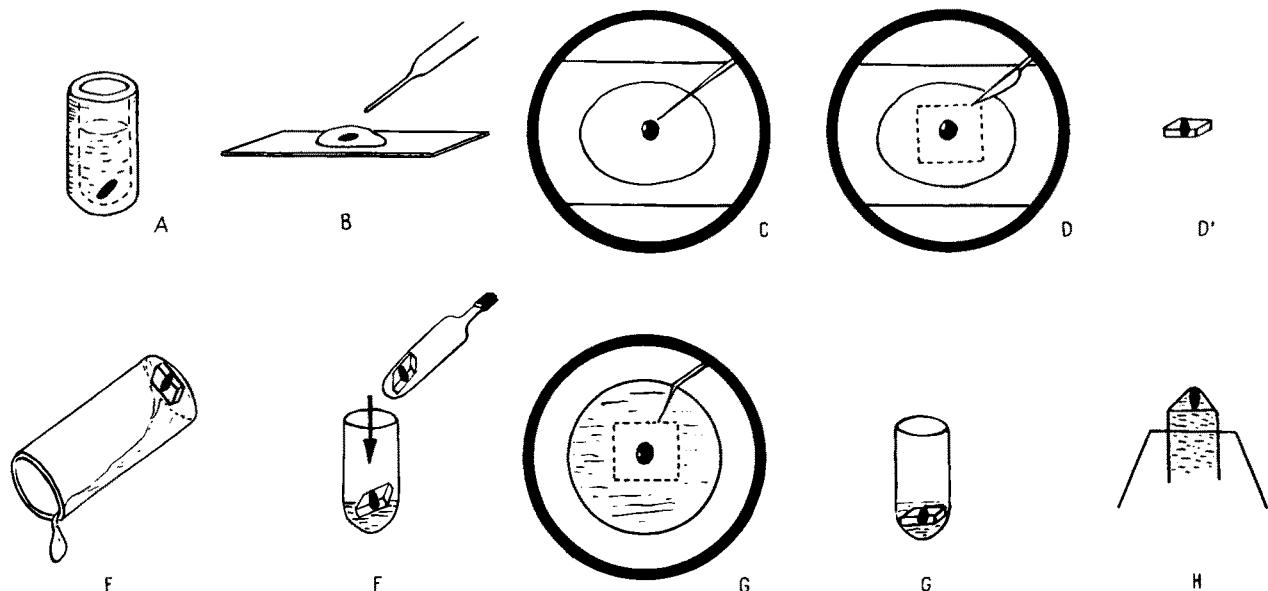


Fig. 1. Méthode d'orientation, lors de l'inclusion d'une cellule isolée (voir texte).

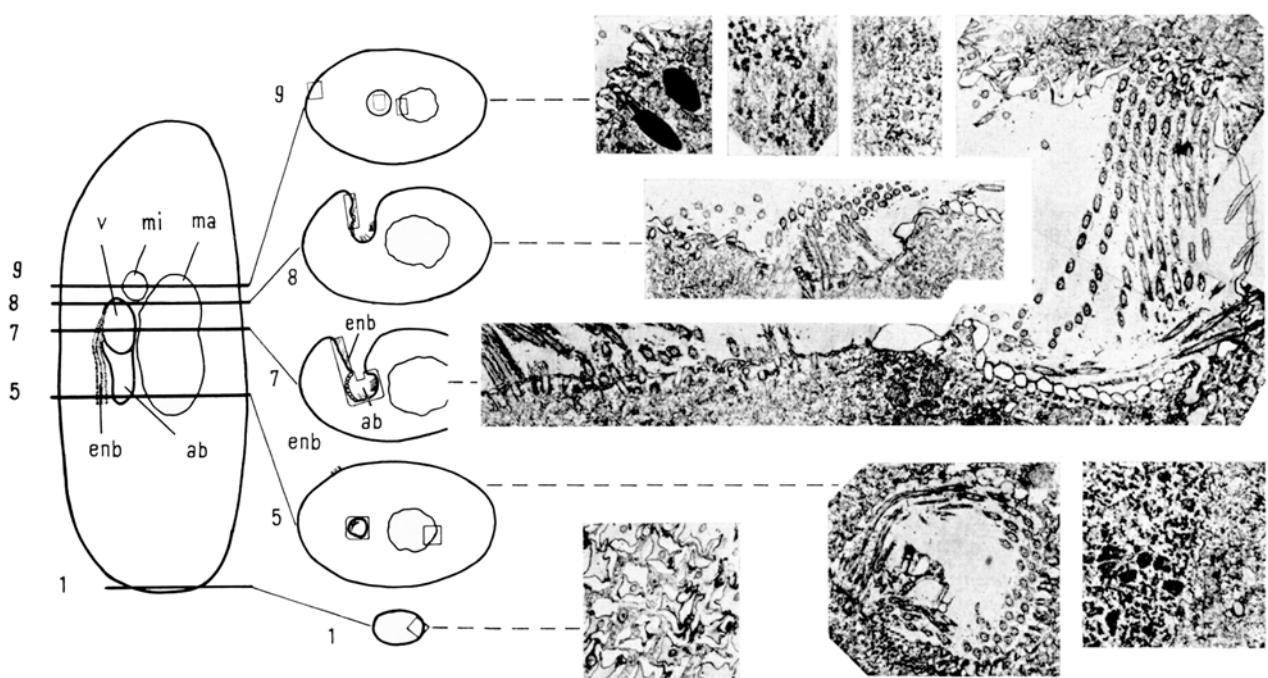


Fig. 2. *Paramecium bursaria*. Reconstitution d'après les coupes orientées. Les traits épais horizontaux et les schémas 1, 5, 7, 8 et 9 représentent les zones coupées. Celles-ci sont en réalité constituées chacune de nombreuses coupes séries; seule une portion d'une coupe de chaque zone est reproduite ici. Il ressort avec évidence de ces figures que l'ébauche de la nouvelle bouche se forme à l'extérieur de l'ancienne, et que c'est à partir de sa portion antérieure que débute son invagination. ab: ancienne bouche; enb: ébauche de la nouvelle bouche; ma: macronucleus; mi: micro-nucleus; v: vestibule, région pelliculaire entourant l'ancienne bouche. Le contour de chaque micrographie est représenté en traits fins sur le schéma correspondant.

La recherche d'un point précis d'une cellule dans le microscope électronique impose aux coupes une longue exposition au faisceau d'électrons. La sublimation du matériel d'inclusion peut alors entraîner des déplacements dans les structures fines, déplacements qui se traduisent par une forte diminution de la résolution. C'est en fait ce qui se produit avec les objets inclus au méthacrylate. Pour éviter ce phénomène, nous employons le Vestopal W (polyester)<sup>2</sup>, recommandé par RYTER et KELLENBERGER<sup>3</sup>, dont la stabilité dans le faisceau électronique est parfaite, en ce sens que la sublimation n'entraîne aucune diminution de volume, et maintient par conséquent les structures incluses dans leur position.

**Méthode.** (a) *Isolement et fixation.* Des cellules sont isolées à un stade précis et placées dans le liquide fixateur dans des tubes de verre à fond rond de 4 mm de Ø intérieur et de 10 mm de hauteur (Figure 1 A). La méthode et le moment de l'isolation, de même que le choix du fixateur, sont propres à chaque recherche. Dans le cas présent, nous observons une cellule isolée jusqu'à l'instant de sa division. Sachant que le temps de «génération» est de 12 h, on peut ensuite la fixer au moment voulu. L'aspect de la cellule, dans les 40 min qui précèdent la division, permet de déterminer le stade avec encore plus de précision pour cette brève période. Comme fixateur nous avons employé l' $\text{OsO}_4$  à 1% dans un tampon au véronal-acétate de Na (selon Michaelis) au pH 6.

(b) *Pré-inclusion et orientation dans l'agar.* Après la fixation, les cellules sont placées, au moyen d'une pipette de diamètre approprié, dans une goutte d'agar liquide (2% dans le tampon correspondant au fixateur) à 45°C, sur une lame porte-objet tenue prête sur une platine chauffante (Figure 1 B). Avec une fine aiguille de verre, et sous un microscope grossissant 10 à 20 fois, on oriente la cellule dans le plan désiré, en prenant comme futur plan de coupe le plan de la lame porte-objet (Figure 1 C). Puis on laisse refroidir l'agar quelques minutes dans une chambre humide (boîte de Petri). Enfin, l'agar est découpé tout autour de la cellule (prendre un petit scalpel) en un bloc carré de 2 mm de côté et de 1 mm de hauteur (Figure 1 D, D'). Ce bloc permet de manipuler facilement la cellule sans risquer de l'abîmer ou de la perdre.

Lorsque nous travaillons sur des cellules plus petites (Flagellés de 20–30 µ) qui sont difficiles à trouver dans le bloc de Vestopal lors de la taille de la pyramide, nous plaçons dans l'agar un petit morceau de feuille d'aluminium plié en pointe, de telle sorte que la pointe désigne la cellule. Ce fragment d'aluminium a en outre l'avantage de rendre le bloc d'agar bien visible pendant toutes les opérations d'inclusion.

(c) *Inclusion et orientation dans le Vestopal.* Nous avons légèrement modifié le mode d'inclusion au Vestopal W, que nous employons désormais de la façon suivante: Après un bain de 2 h dans l'acétate d'uranyle (0,5% dans le tampon) pour augmenter le contraste, suit une deshydratation progressive dans la série des acétones de 30 à 100%, qui se termine par un deuxième bain d'acétone sec, de 0,5 à 1 ml au maximum. On ajoute alors toutes les demi-heures une goutte de Vestopal W (avec 1% d'initiateur et 1% d'activateur). Il convient de bien mélanger et d'éliminer l'excédent de liquide, pour maintenir le volume initial. Après 10 à 12 adjonctions, le liquide est épais. On vide alors le récipient, en prenant soin que le bloc d'agar reste collé au fond (Figure 1 E). Après adjonction d'un nouveau ml de Vestopal, on laisse le récipient ouvert pendant une nuit à la température ordinaire. Le lendemain, le Vestopal est encore renouvelé pour quelques heures.

On place ensuite les blocs, au moyen d'une fine spatule, au fond d'une capsule de gélatine (inutile de sécher les capsules de gélatine), avec une goutte seulement de Vestopal (Figure 1 F). On oriente alors, sous le microscope, le bloc au fond de la capsule, afin que l'axe de la cellule soit parallèle à celui de la capsule (Figure 1 G, G'). Si la cellule est bien orientée dans l'agar, cela ne présente pas de difficulté. Pour éviter que le bloc ne se déplace après coup dans la capsule, nous laissons polymériser pendant 5 à 6 h à 65°C avant de remplir complètement les capsules de Vestopal et d'achever la polymérisation pendant 36 à 48 h.

(d) *Ultramicrotomie.* Le bloc de Vestopal étant placé bien axialement dans le porte-objet du microtome (Figure 1 H), les coupes passeront exactement dans le plan désiré. On fera des séries de coupes aux niveaux intéressants de la cellule («zones» 1, 5, 7 etc. de la Figure 2), en éliminant par des coupes épaisses les zones inutiles.

**Résultat.** La Figure 2 montre les résultats obtenus sur *P. bursaria*. Les «zones» indiquées (traits horizontaux épais) sont elles-mêmes composées de coupes séries. Nous ne montrons ici qu'une portion d'une seule coupe de chaque série.

Bien que les résultats détaillés fassent l'objet de publications à venir, disons d'emblée que la méthode décrite s'est révélée très fructueuse et a permis déjà d'utiles mises au point. Peu avant la division, l'ébauche de la nouvelle bouche (enb) se forme sur la paroi vestibulaire, à l'extérieur de l'ancienne bouche. Elle apparaît sous forme de trois rubans caractéristiques. Ainsi que l'avait déjà montré la microscopie à contraste de phase (EHRET et POWERS<sup>4</sup>), ces rubans sont composés de rangs de cinétosomes. Cette région est donc particulièrement favorable à l'étude de l'apparition de ces organelles et des cils qu'elles supportent. Pour sa part, le macronucleus subit des changements notables: les nucléoles et la composante chromatinienne varient dans leur structure et leur disposition. Cependant, ces transformations sont uniformes et simultanées dans l'ensemble du noyau, contrairement à ce que l'on observe chez d'autres Ciliés. Enfin, mentionnons que les trichocystes se développent à partir de corpuscules particuliers au sein du cytoplasme, et ne se divisent pas, comme on l'a admis longtemps<sup>5</sup>.

**Summary.** (1) Control of cell orientation and knowledge of the plane of sectioning are indispensable (but generally ignored) requirements for studies of the development of cellular constituents. (2) A simple technique that meets these requirements for the electron microscope is given. (3) As applied to *Paramecium*, it is shown that the ciliary complexes of the new gullet develop outside of the old one, and that invagination begins at the anterior end of the gullet anlage.

G. DE HALLER, CH. F. EHRET<sup>6</sup> et ROSMARIE NAEF

*Laboratoire de Protozoologie, Université de Genève (Suisse), le 21 juillet 1961.*

<sup>2</sup> MARTIN JAEGER, fournitures pour laboratoires, Vésenaz, Genève (Suisse).

<sup>3</sup> A. RYTER et E. KELLENBERGER, J. Ultrastr. Res. 2, 200 (1958).

<sup>4</sup> C. F. EHRET and E. L. POWERS, Int. Rev. Cytol. 1959, 97.

<sup>5</sup> Nous voudrions remercier ici pour leur aimable collaboration Madame E. DEBOURGOGNE et Monsieur E. BOY-DE-LA-TOUR, qui ont effectué les travaux de dessin et de photographie, ainsi que le professeur V. KIORTSIS, qui nous a accordé avec beaucoup de bienveillance, les locaux et toutes les facilités nécessaires à la réalisation de ce travail.

<sup>6</sup> Adresse actuelle: Argonne National Laboratory, Argonne (Illinois).