

Certain features are seen more easily using this method than with conventional ones. We have been interested to observe lesions produced by photocoagulation. Such lesions are much more visible by transillumination. Figure A is a photograph of the retina showing the fovea and a lesion taken by the conventional direct illumination method; Figure B is a picture of the same field using the same camera, but taken by indirect illumination. Although certain features, such as the choroidal vessels, are not quite as clear in the latter photograph due to their decreased contrast, the lesion itself is much more easily visible, not only because of its own higher contrast with respect to the other features, but also because there is no light reflex around the lesion to mask its characteristics.

We believe that this method may be useful in teaching and general laboratory work since it allows the easy observation of the interior of the eye and the pecten. Little training and equipment are required. This method can also be used to supplement ordinary ophthalmoscopic examinations for the detection of retinal lesions or features ordinarily shadowed by the pecten.

Résumé. Une nouvelle méthode d'examen visuel facile du fundus des oiseaux est décrite ici. Elle utilise la transillumination de la tête. Cette méthode rend possible la photographie avec des appareils conventionnels. Elle n'exige pas une dextérité spéciale, et grâce à elle, certaines caractéristiques peuvent être mises en évidence d'une façon plus nette qu'avec d'autres techniques.

M. L. WOLBARSH, P. E. STOPP,
and J. E. GOODSON

Naval Medical Research Institute⁵, Bethesda
(Maryland USA), March 31, 1964.

⁵ The opinions or assertions expressed herein are the private ones of the authors and are not to be construed as official or reflecting the views of the Navy Department or the Naval Service at large.

Nouveau procédé original de préparation de cellules vivantes par dissociation du foie de rat

Dans des notes antérieures¹⁻³, nous avons décrit les principaux résultats des recherches que nous avons entreprises sur les méthodes d'isolement de cellules «libres» à partir du foie de rat.

Dans une première série de travaux¹, nous avons effectué une étude critique des différentes méthodes qui avaient été décrites jusqu'à présent et montré que, seul, le procédé de LONGMUIR et REES⁴ (dissociation dans une solution tamponnée de phosphates à pH 5) répondait au premier critère que nous avions fixé: fournir rapidement et en grandes quantités des cellules parfaitement dissociées. Malheureusement, la méthode ne satisfaisait pas à un second critère concernant l'intégrité morphologique et biochimique des cellules isolées. En effet, l'observation

au microscope électronique montre de profondes altérations des noyaux et des mitochondries (Figure 2). En outre, bien que les cellules respirent (Figure 1), elles sont incapables de survivre dans le milieu nutritif TC 199 de

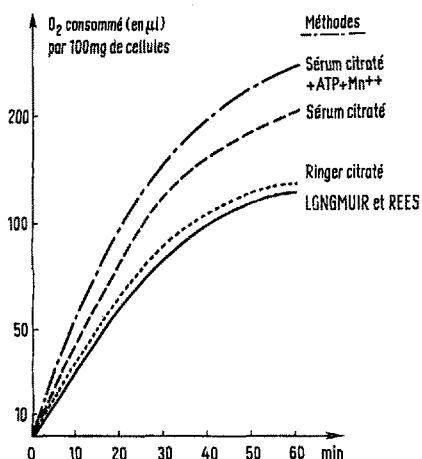


Fig. 1. Courbes de respirations données par des quantités égales de cellules isolées à partir du foie de rat par différentes méthodes. Le milieu d'incubation est 40 mM en succinate de sodium.

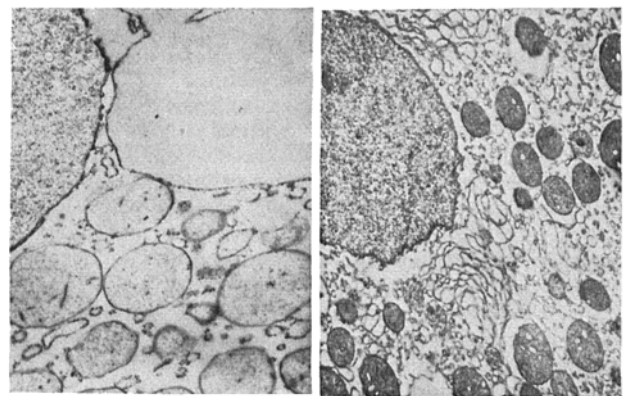


Fig. 2. Aspect morphologique au microscope électronique Siemens Elmiskop-I d'une partie de cellule de foie de rat isolée par la méthode de LONGMUIR et REES⁴.

Fig. 3. Aspect morphologique au microscope électronique Siemens Elmiskop-I d'un fragment de cytoplasme d'une cellule isolée par la «méthode au Krebs-Ringer citraté-hyaluronidase».

¹ E. SEGARD, J. MONTREUIL, A. COLBEAU, A. DUPONT, A. DEMAÏLLE, C. MANGEZ, L. ADENIS et J. DRIESSENS, C.R. Soc. Biol. 156, 1102 (1962).

² E. SEGARD, J. MONTREUIL, A. COLBEAU, A. DUPONT, A. DEMAÏLLE, L. ADENIS et J. DRIESSENS, C.R. Acad. Sci. 255, 1479 (1962).

³ E. SEGARD, J. MONTREUIL, A. COLBEAU, A. DUPONT, A. DEMAÏLLE, C. MANGEZ, L. ADENIS et J. DRIESSENS, C.R. Soc. Biol. 157, 130 (1963).

⁴ I. S. LONGMUIR et W. REES, Nature 177, 997 (1956).

MORGAN, MORTON et PARKER⁵ et de synthétiser des acides nucléiques, puisqu'on ne décèle aucune radioactivité après incubation des hépatocytes en présence de phosphates radioactifs.

Dans une seconde série de travaux, nous avons tenté d'améliorer les qualités morphologiques et biochimiques des cellules isolées en nous plaçant dans des conditions plus «physiologiques» de pH et de composition du milieu de dissociation. Divers essais nous ont permis de mettre au point une première technique que nous avons appelée: «méthode au Krebs-Ringer citraté-hyaluronidase»^{2,3}. La dissociation est effectuée dans une solution de Krebs-Ringer sans calcium contenant du citrate de sodium (0,025 M) et 8 unités de hyaluronidase testiculaire par ml. Elle fournit des cellules qui, observées au microscope électronique, montrent un noyau d'aspect normal et des mitochondries légèrement gonflées dont certaines sont intactes et d'autres très vacuolisées. Entre ces deux formes extrêmes, on observe tous les stades intermédiaires de la dégénérescence mitochondriale décrits par ROULLIER⁶. En outre, l'ergastoplasme est bien visible, mais les vésicules ergastoplasmiques sont toujours dilatées (Figure 3). Cette amélioration de la morphologie des cellules s'accompagne d'une légère augmentation de l'activité respiratoire (Figure 1) et d'une reprise de la biosynthèse des acides ribonucléiques (moyenne de 25 000 coups/min/mg de phosphore ribonucléotidique dans les conditions expérimentales résumées dans ⁷).

Ce procédé marque un progrès très net sur celui de LONGMUIR et REES⁴ sans être toutefois pleinement satisfaisant. Aussi, avons-nous été amenés à remplacer la solution saline par du sérum, dans une seconde méthode que nous appelons «méthode au sérum citraté»^{2,3}. La dissociation du foie est effectuée dans du sérum de boeuf citraté (concentration finale en citrate: 0,029 M). Les cellules ainsi préparées révèlent, à l'observation au microscope électronique, des noyaux altérés, dans lesquels la chromatine est condensée par endroits, et des mitochondries intactes, mais légèrement gonflées. Le cytoplasme présente un aspect sensiblement normal avec des vésicules cytoplasmiques à peine gonflées (Figure 4). L'amélioration sensible de la morphologie des cellules se traduit immédiatement, par rapport aux cellules isolées par les deux méthodes précédentes, par une augmentation de l'activité respiratoire (Figure 1) et de la synthèse des acides ribonucléiques, l'incorporation du radiophosphate étant 2 à 3 fois supérieure à la précédente.

Ces résultats mettent en évidence une relation étroite entre la morphologie de la cellule et son activité métabolique. Aussi, à la suite de l'observation de LEHNINGER⁸ selon laquelle l'addition d'ATP et d'ions Mn^{++} aux milieux d'incubation de tissus augmente l'activité respiratoire de ces derniers, avons-nous pensé qu'il s'agissait peut-être là d'une action protectrice du mélange ATP- Mn^{++} sur les structures cytoplasmiques. C'est pourquoi, dans notre méthode définitive, que nous appelons «méthode au sérum citraté-ATP- Mn^{++} », nous avons ajouté de l'ATP et des sels manganéux au sérum citraté (1 mM d'ATP, 1 mM de $MnCl_2$, 30 mM de citrate trisodique dans 40 ml de sérum de boeuf) dans l'espoir d'observer une amélioration de la morphologie et de l'activité métabolique des cellules isolées.

Le mode opératoire est le suivant: Deux foies de rat, prélevés stérilement, sont plongés dans du sérum de boeuf stérile maintenu à 37°C. Ils sont découpés par petites portions, à l'aide d'une lame de rasoir, en fragments de quelques mm³ qui sont ensuite lavés plusieurs fois par décantation dans du sérum, puis incubés pendant 1 h à 37°C sous agitation lente dans 40 ml de sérum de boeuf

contenant 30 mM de citrate trisodique, 1 mM d'ATP, 1 mM de $MnCl_2$. Les fragments de tissu sont dissociés par aspirations et refoulements successifs à l'aide d'une pipette époutée ou d'un homogénéiseur *Ultra-Turrax*, type TP 18/2 (1 à 2 sec d'homogénéisation). La suspension est passée sur 4 épaisseurs de gaze chirurgicale. Le résidu est de nouveau dissocié dans une faible quantité du milieu de dissociation et la suspension est filtrée sur gaze et une nouvelle dissociation est effectuée sur le résidu. Les suspensions cellulaires sont réunies et centrifugées pendant 5 min à 150 g. Le sédiment est lavé 4 à 5 fois avec le milieu de dissociation et centrifugé chaque fois pendant 5 min à 50 g. Le temps de préparation des cellules est de l'ordre de 90 min et le rendement est de $1,5 \pm 0,3 \times 10^7$ cellules par g de foie frais.

Les résultats que nous avons obtenus ont entièrement confirmé l'hypothèse précédente. En effet, le microscope électronique montre que la morphologie de la cellule est préservée et que les mitochondries, en particulier, sont intactes et nullement gonflées (Figure 4). L'activité respiratoire des cellules est supérieure à celle des cellules isolées par les trois premiers procédés (Figure 1); les échanges de radiophosphate dans les acides ribonucléiques sont 10 fois supérieurs à ceux des cellules isolées par le procédé au «Krebs-Ringer citrate hyaluronidase». En outre, les cellules sont capables de synthétiser des protéines puisque, incubées en présence de ¹⁴C-aminoacides, elles donnent naissance à des protéines marquées que l'on peut mettre aisément en évidence par autoradiographie

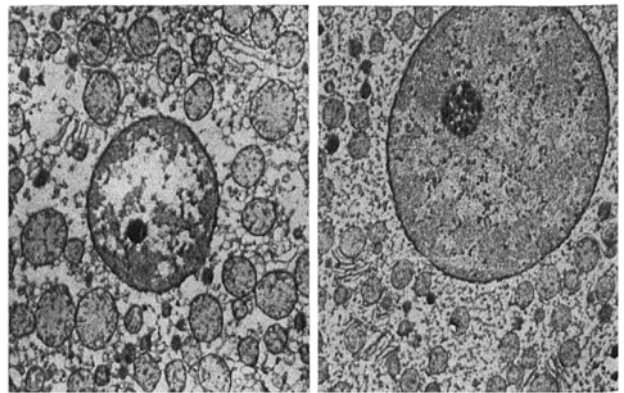


Fig. 4. Aspect au microscope électronique Philips EM 100 d'une portion de cellule du foie de rat isolée par la «méthode au sérum citraté».

Fig. 5. Aspect au microscope électronique Philips EM 100 d'une partie de cellule de rat isolée du foie par la «méthode au sérum citraté-ATP- Mn^{++} ».

⁵ J. F. MORGAN, H. J. MORTON et R. C. PARKER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 73, 1 (1950).

⁶ C. ROULLIER, *Int. Rev. Cytol.* 9, 277 (1960).

⁷ Les incubations sont effectuées dans un volume déterminé (50 ml) de solution de Krebs-Ringer contenant le même poids de cellules (5 g) et la même quantité de radiophosphate (1 mC). La radioactivité spécifique de chaque nucléotide est déterminée selon le procédé de P. BOULANGER et J. MONTREUIL, *Biochim. biophys. Acta* 9, 619 (1952).

⁸ A. L. LEHNINGER, *J. biol. Chem.* 234, 2465 (1959).

des électrophorogrammes des protéines cellulaires. Enfin, les cellules se maintiennent en survie dans le milieu nutritif de MORGAN et al. pendant des temps variant de 10 jours à 6 semaines suivant les préparations.

Conclusion. La méthode originale de dissociation du foie de rat dans du sérum citraté additionné d'ATP et de sels manganéux fournit rapidement et en quantités élevées des cellules vivantes morphologiquement intactes et métaboliquement actives. En outre, l'examen systématique au microscope électronique des cellules obtenues par 4 procédés différents et la détermination de critères biochimiques, comme la mesure de l'activité respiratoire et de l'incorporation des radiophosphates dans les acides nucléiques, montrent qu'il existe une relation étroite entre l'intégrité morphologique des cellules et leur activité métabolique. Cette observation prouve une fois de plus que le contrôle au microscope électronique doit nécessairement accompagner toute recherche entreprise sur la biochimie de la cellule.

Summary. The authors describe a method for the isolation of hepatocytes by dissociation of rat livers in bovine serum containing sodium citrate, ATP and manganous ions. Moreover, they communicate the results of a comparative study of the morphology (studied by electron microscopy) and the metabolism (respiration and biosynthesis of RNA) of hepatocytes isolated by different methods.

E. SEGARD, J. MONTREUIL, ANNETTE COLBEAU, CLAIRE MANGEZ, A. DUPONT, A. DEMAILLE et J. DRIESSENS

Laboratoire des Hétéroprotéides du Service de Biochimie Cellulaire et Laboratoire de Microscopie Electronique du Service de Biologie Cellulaire de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille; Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille (France), le 10 Mars 1964.

Zur Einbettung biologischer Objekte in Acrylpolymerisaten

Die Acrylester bzw. ihre Polymerisate wurden als Einbettungsmedien für biologische Präparate schon vielfach erprobt^{1,2}. Derartige Kunstharzeinbettungen werden heute in Museen, Schulen usw. anstelle der früheren Flüssigkeitspräparate benutzt.

Acrylesterpolymerisate dienen auch häufig als Einbettungsmedium zum Schneiden mit dem Ultramikrotom. In speziellen Fällen, zum Schneiden harter Objekte, wie Insekten, wird eine derartige Einbettung auch für gewöhnliche Mikrotomschnitte angewendet³.

Bei diesen verschiedenen Verwendungszwecken zeigt es sich oft, dass die Polymerisation in der Nähe und im Innern der Objekte verzögert oder unterbunden wird. Im ausgehärteten Block lässt sich rund um den eingebetteten Gegenstand eine Zone feststellen, die sich durch eine niedrigere Lichtbrechung von ihrer Umgebung unterscheidet. Im Laufe der Zeit wird diese Zone undeutlicher, an ihrer Stelle entstehen aber häufig Blasen.

Derartige Zonen unvollständiger Polymerisation in der Umgebung eingebetteter Objekte treten besonders deutlich in Erscheinung bei Mollusken und Fischen, sowie bei verschiedenen isolierten Organen. Man findet sie aber auch bei anderem tierischem Material mehr oder weniger ausgeprägt; völlig frei von der Erscheinung bleiben tierische Einbettungspräparate nie.

Die Bildung dieser Zonen unvollständiger Polymerisation in der Umgebung tierischer Objekte ist zurückzuführen auf eine lokalisierte Polymerisationsinhibition. Sie wird verursacht durch biogene Amine. Die primären und sekundären Amine (etwa von Peptidseitenketten usw.) stören, während die tertiären Amine indifferent sind oder in einigen Polymerisationssystemen beschleunigen. So

haben HORNER und SCHWENK⁴⁻⁶ die Reaktionsmöglichkeiten von Peroxiden mit Aminen dargelegt.

Die störende Wirkung der Amine kann durch Acylierung und Salzbildung mit einem geeigneten Acylierungsmittel in einer speziellen Vorbehandlung beseitigt werden: eine 10prozentige Lösung von Acetanhydrid in Aceton lässt man nach dem Entwässern auf das Objekt einwirken. Andere Säureanhydride lassen sich ähnlich verwenden; von Säurechloriden jedoch ist abzuraten. Nach diesem Acylierungsbad wird das Objekt in monomerem Acrylester gewaschen und auf gewohnte Weise eingebettet.

Die bei der Acylierung entstehenden Amide und die als Nebenprodukte entstehenden Ammoniumsalze sind für die Vinylpolymerisation indifferent und erlauben eine vollständige Härtung des Harzes.

Summary. Inhibition of vinyl polymerization by embedding biological specimens is due to the presence of biogenic amines. This inhibition is eliminated by smooth acylation and salt formation, respectively, by means of acid anhydrides.

A. HOFER und E. LAUTENSCHLAGER

Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium, Basel (Schweiz), 12. März 1964.

¹ A. J. SPILNER, *Mod. Plastics* 31, 129 (1953).

² E. LAUTENSCHLAGER, im Druck.

³ W. RATHMAYER, *Exper.* 18, 47 (1962).

⁴ L. HORNER und E. SCHWENK, *Angew. Chem.* 61, 411, 458 (1949).

⁵ L. HORNER und E. SCHWENK, *Liebigs Ann.* 566, 69 (1950).

⁶ L. HORNER und E. SCHWENK, *J. Polym. Sci.* 18, 438 (1958).