

# Considérations quantitatives sur des coupes ultraminces de bactéries infectées par un bactériophage\*

Par JANINE SÉCHAUD, lic.ès sc., ANTOINETTE RYTER, lic.ès sc., et EDOUARD KELLENBERGER, Dr.ès sc.

(Laboratoire de Biophysique, Université de Genève)

PLANCHE 207

(Reçu le 21 octobre 1958)

## ABSTRACT

A quantitative relationship has been established between the number of particles, for example bacteriophages, counted in ultrathin sections of bacteria and the total number present in the whole bacterial cells. The factor  $F$  relating particles counted per section with the total number of these particles per entire bacterium could be arrived at by two methods, which proved to give results in close agreement. The first involves knowledge of the average volume of a bacterial section in proportion to the average volume of a whole bacterium; if the mean number of appearances of the same particle on consecutive sections is also known,  $F$  may then be calculated. The thickness of sections and, therefore, their volume, as well as the average number of times a single particle is sectioned could be learned by examination of serial sections. By counting the relative number of T2 phage particles which had been intersected once or twice, and relating this proportion to the known phage dimensions, the thickness of the sections was determined to be about 400 Å.

The second measurement of  $F$  could be made in a particular case of late phage development where the number of particles per cell was countable or titratable directly in the bacterial lysate, this number being compared with the number seen in sections of the bacteria just before lysis.

The different sources of errors are discussed. The statistical error is under 20 per cent, while the systematic errors are higher and cannot yet be indicated precisely. After a very cautious estimation of the upper limits, we can state, however, that the counts made with this method are certainly reliable to well within a factor of two.

## INTRODUCTION

Depuis que des méthodes sûres de fixation et d'inclusion de bactéries ont été développées (14), les coupes ultraminces sont appelées à fournir d'utiles renseignements sur la multiplication intracellulaire du bactériophage (8). Lorsque des bactéries infectées par des bactériophages sont ouvertes artificiellement à différents stades de développement du phage, elles fournissent des lysats qui contiennent des phages et différents constituants phagiques en quantités dépendant du stade de développement. Ces lysats ont été

étudiés quantitativement aux points de vue physiologique, chimique et morphologique (4, 5, 9). Certains des constituants phagiques, comme les têtes de phages vides, posaient cependant un problème. Existaient-ils tels quels dans la bactérie, ou étaient ils produits par la rupture de phages immatures fragiles (9)? Les coupes ultraminces devaient permettre, et nous ont permis, de clarifier ce point (10). Mais pour pouvoir associer des particules visibles sur les coupes à certains constituants du lysat, il nous fallait connaître la relation quantitative qui existe entre le nombre de particules contenues dans les bactéries entières et leur nombre visible sur les coupes de ces bactéries.

Dans le présent travail nous exposerons deux

\* Ces recherches ont été effectuées grâce à l'appui du Fonds national suisse pour la Recherche scientifique.

méthodes employées pour obtenir cette relation numérique. Ces méthodes présentent un intérêt plus général car elles sont susceptibles d'être appliquées à d'autres systèmes.

Au départ, nous devons considérer deux faits importants : 1°, le nombre des phages formés dans une bactérie varie beaucoup d'une cellule à l'autre (3), ce qui implique l'observation d'un nombre suffisamment élevé de cellules qui seule donnera une moyenne significative; 2°, le dénombrement, à l'aide de coupes sériées, de toutes les particules contenues dans une cellule posait un problème technique pratiquement insoluble car il eût fallu des rubans d'une cinquantaine de coupes successives pour saisir le volume entier de la bactérie. Nous avons alors décidé d'aborder ce problème par un échantillonnage. Un "échantillon" est formé de plusieurs bonnes coupes, choisies au hasard, et présentant chacune 20 à 30 bactéries. Sur cet "échantillon" nous pourrions déterminer un nombre moyen de particules par coupe de bactérie. Pour obtenir ensuite la relation numérique entre cet échantillonnage sur coupes et le nombre moyen de particules contenues dans les bactéries entières, nous avons suivi deux voies différentes. La première voie est le calcul des volumes moyens respectifs d'une coupe de bactérie et d'une bactérie entière. En établissant le rapport de ces deux valeurs, on peut déterminer la relation cherchée si l'on connaît le nombre moyen d'apparitions d'une même particule sur des coupes successives. Pour mesurer ce dernier, et pour calculer l'épaisseur moyenne des coupes, dont dépend leur volume, nous avons fait une étude statistique sur des coupes sériées. La seconde voie, totalement indépendante de la première, est un étalonnage expérimental, praticable seulement si l'on peut connaître d'une autre façon le contenu moyen des cellules; on relie alors directement ce contenu à la valeur donnée par l'échantillon. Nous l'avons suivie en choisissant un stade tardif du développement du bactériophage, où l'on trouve dans le lysat une grande quantité de phages complets et, proportionnellement, peu d'autres constituants phagiques. Le problème de l'identification de ces constituants est alors négligeable.

La détermination de l'épaisseur de la coupe présente un intérêt en soi-même, puisque sa connaissance est importante pour certaines interprétations. Par deux méthodes physiques, l'ellipsométrie (12) et l'interférométrie (1), on

arrive à des valeurs sensiblement plus élevées que celles admises jusqu'à présent. Notre méthode statistique, qui est une extension de celle décrite par Morgan *et al.* (11), apporte une confirmation de ces valeurs plus élevées.

#### Matériel et méthodes

Les bactéries *Escherichia coli* souche B-Berkeley, le bactériophage T2r, ainsi que les méthodes et milieux de culture ont déjà été décrits (8).

La préparation des lysats pour le comptage des particules au microscope électronique a été effectuée par filtration sur gélose collodionnée avec une suspension de particules de latex de polystyrène de concentration connue comme référence (7).

La fixation et l'inclusion dans un polyester (vestopal W) ont été faites suivant les conditions standard établies par Ryter et Kellenberger (14).

Des rubans de coupes ont été recueillis sur des grilles Athène type Sjöstrand ou New 100, recouvertes d'un film mince de formvar (0,25 pour cent en chloroforme sur lame de verre) doublé d'un film de carbone très mince obtenu par évaporation. On trouve facilement 4 ou 5 coupes consécutives dans le même champ.

Le microtome utilisé a été fabriqué dans notre laboratoire (6). Nous avons employé un microscope électronique RCA type EMU-2D avec diaphragmes Canalco dans le condenseur (260  $\mu$ ) et l'objectif (50  $\mu$ ).

Pour décalquer les micrographies des coupes successives de bactériophages, on s'est servi de feuilles de celluloid gélatinées utilisées dans les arts graphiques ("typafol", Typon, Berthoud, Suisse), ou de film photographique vierge fixé.

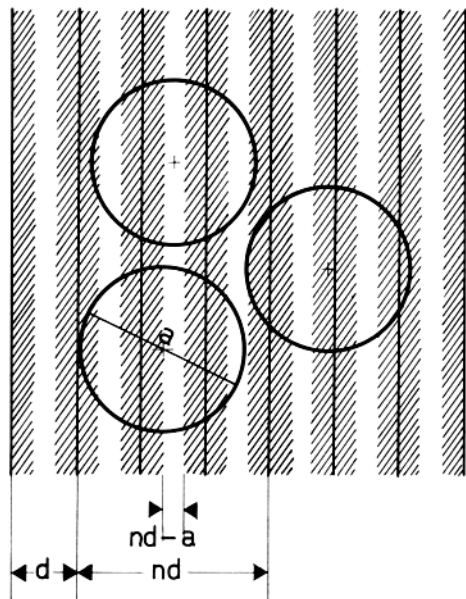
#### RÉSULTATS

##### (1) Théorie et définitions:

Considérons des coupes successives d'épaisseur  $d$  et une sphère de diamètre  $a$  (Schéma 1).

Si  $(n - 1)d \leq a < nd$ , des tranches de sphère apparaîtront sur  $n$  ou sur  $(n + 1)$  coupes. Par exemple, si  $a < d$ , la sphère sera visible sur 1 ou 2 coupes; si  $d \leq a < 2d$ , la sphère sera visible sur 2 ou 3 coupes.

Quelles sont les probabilités respectives de la sphère d'apparaître sur  $n$  et  $(n + 1)$  coupes? Le Schéma 1 permet de répondre immédiatement. On constate en effet que le centre de la sphère, qui peut se trouver avec la même probabilité n'importe où de 0 à  $d$ , doit se trouver dans la bande blanche de largeur  $nd - a$  pour que la sphère ne soit visible que sur  $n$  coupes. La probabilité  $p_n$  de ce dernier événement est donnée par le rapport des cas favorables aux cas possi-



SCHEMA 1. Représentation de coupes parallèles d'épaisseur  $d$  à travers des sphères de diamètre  $a$ , avec  $a$  compris entre  $(n - 1) d$  et  $nd$ . Si le centre d'une sphère se trouve dans une région hachurée, la sphère sera visible sur  $(n + 1)$  coupes. Si le centre se trouve dans une région blanche, la sphère se rencontrera sur  $n$  coupes.

bles et vaut donc

$$p_n = \frac{nd - a}{d}$$

De même, la sphère est visible sur  $(n + 1)$  coupes si son centre se trouve dans les régions hachurées et l'on a

$$p_{(n+1)} = \frac{a - (n - 1)d}{d}$$

Le rapport des probabilités  $p_{n+1}/p_n$  est égal à la limite du rapport  $R$  du nombre de sphères visibles sur  $(n + 1)$  coupes au nombre de sphères visibles sur  $n$  coupes, lorsque le nombre de sphères considéré devient suffisamment grand.

$$\frac{p_{n+1}}{p_n} = \frac{a - (n - 1)d}{nd - a} = R$$

De là, on tire  $d$ , qu'on peut ainsi calculer après avoir mesuré  $a$  et  $R$ .

$$d = \frac{a(R + 1)}{nR + (n - 1)}$$

Si maintenant, nous désirons déterminer le nombre  $V$  de ces sphères se trouvant dans un volume  $V$  en connaissant le nombre moyen  $y$  de sphères apparaissant sur une coupe de surface  $s$  (avec  $s \cdot d = \text{volume de la coupe} < V$ ), il nous faut établir la relation suivante:

$$V = F \cdot y$$

$F$  dépend du rapport entre le volume  $V$  qui nous intéresse et le volume de la coupe; il dépend également du nombre moyen  $m$  de fois où apparaîtrait la même sphère sur des coupes présentant le volume  $V$  en entier. Une sphère apparaissant sur  $n$  coupes avec la probabilité  $p_n$  et sur  $(n + 1)$  coupes avec la probabilité  $p_{n+1}$ , on a

$$m = p_n \cdot n + p_{n+1} \cdot (n + 1) = \frac{nd - a}{d} \cdot n + \frac{a - (n - 1)d}{d} \cdot (n + 1)$$

$$m = \frac{d + a}{d}$$

Finalement, on obtient:

$$F = \frac{V}{s \cdot d} \cdot \frac{1}{m} = \frac{V}{s \cdot d} \cdot \frac{d}{d + a}$$

Si  $F$  peut être déterminé expérimentalement, cette formule permet de calculer  $d$ :

$$d = \frac{V}{F \cdot s} - a$$

Pour appliquer ces calculs à la réalité, il faut se souvenir que la théorie considère qu'un morceau de n'importe quelle épaisseur est visible sur une coupe; ce qui n'est certainement pas le cas en pratique. Il y a une épaisseur limite, que nous appellerons  $\epsilon$ , et qui dépend certainement du contraste relatif de la particule et probablement de l'épaisseur de la coupe. Les calculs restent valables, à condition de remplacer  $a$ , diamètre réel de la sphère, par  $a - 2\epsilon$ , diamètre efficace.

Comme nous allons le voir, le phage T2 qui était à notre disposition ne cadre pas exactement avec la théorie; la tête du phage est oblongue. Une théorie est possible pour ce cas; elle nécessite de nombreux calculs. Nous verrons plus loin qu'il est inutile de faire cet effort maintenant, car certaines données doivent encore être acquises expérimentalement.

TABLEAU I  
Apparition des mêmes Phages sur des Coupes successives

Phages visibles	1 fois	2 fois	3 fois
Série 1.....	12	17	6
“ 2.....	5	6	—
“ 3.....	12	20	3
“ 4.....	26	31	3
“ 5.....	4	15	—
Somme.....	59 ± 8*	89 ± 10*	12 ± 3,5*
Proportion du total.....	0,37 ± 0,05 = U	0,56 ± 0,06 = V	0,07 ± 0,02 = W

Les séries 1, 2, et 3 étaient formées de 4 coupes successives, les séries 4 et 5 de 5 coupes successives. Les première et dernière micrographies de chaque série n'ont servi qu'à déterminer le nombre d'apparitions des phages se trouvant sur les coupes médianes.

\* La déviation standard indiquée est donnée par  $\sqrt{N}$ .

(2) *Épaisseur des coupes:*

Pour établir l'épaisseur des coupes, nous avons examiné des séries de 4 ou 5 coupes successives de bactéries *E. coli* B contenant des bactériophages T2, et déterminé si un phage se retrouve ou non sur plusieurs coupes.

Nous avons montré ailleurs (13) que le matériel coupé en polyester ne fait ni saillie ni dépression à la surface de la coupe; il n'y a donc pas d'arrachement ni de perte de matériel, qui auraient pu fausser notre détermination.

Les coupes constituant le petit ruban paraissent toutes grises à la surface de l'eau de flottage et peuvent donc être considérées comme des coupes fines; elles permettraient des micrographies de haute résolution (Fig. 1).

Si les phages sont en général facilement visibles sur les micrographies, l'identification d'un même phage d'une coupe à l'autre s'avère par contre très difficile. Le seul procédé utilisable consiste à décalquer à l'encre de couleur chaque micrographie fortement agrandie sur une feuille transparente de cellulose gélatinée (2). Les calques de couleurs différentes ainsi obtenus permettent par superposition de suivre les phages d'une coupe à l'autre et de déterminer d'après la couleur résultante le nombre de coupes sur lesquelles apparaît un phage donné.

Nous avons constaté (Tableau I) qu'un phage se retrouve souvent sur 2 coupes et parfois sur 3. Il se trouve aussi assez souvent sur 1 seule coupe, ce qui s'explique par la forme polyédrique oblongue de sa tête; nous ne pouvons donc pas appli-

quer directement la théorie développée plus haut. Cependant, les dimensions extrêmes, mesurées sur des phages inclus dans le polyester, sont 710 et 525 A; le rapport de ces dimensions, 710/525 = 1,36, ne dépasse pas beaucoup l'unité; ceci rend admissible la résolution du problème par des approximations.

En première approximation et en admettant  $\epsilon = 50$  A, on peut déduire que l'épaisseur des coupes est comprise entre 610 et 425 A. En effet, le fait que des phages puissent être contenus dans une seule coupe nous donne la limite inférieure et le fait que le même virus peut se trouver sur 3 coupes exige que l'épaisseur soit inférieure à 610 A. Mais  $\epsilon$ , qui est l'épaisseur minimum donnant un contraste juste perceptible n'est que mal connu et pourrait être plus fort. Les limites de  $d$  calculées pour d'autres valeurs de  $\epsilon$  se trouvent dans la dernière colonne du tableau II.

Pour des calculs plus précis, nous avons essayé plusieurs voies. Etant donné les deux dimensions extrêmes du phage, la meilleure voie semble consister en une séparation du total des phages en deux populations de particules de diamètre moyen différent. Une première population, représentant la fraction  $q$  du total, n'apparaît que sur une ou deux coupes. La seconde population—fraction  $1 - q$  du total—apparaît sur 2 ou 3 coupes. Nous nous sommes arrêtés à  $q = 0,9$ , ce qui veut dire que la première population comprend tous les phages dont le grand axe est incliné de moins de 70° par rapport au plan de coupe. En mesurant graphiquement les dimensions correspondant aux

TABLEAU II  
Valeurs de  $d$  calculées pour différentes valeurs de  $\epsilon$

$\epsilon$	$d_1$	$d_2$	$d_3$	Limites
0	980	1270	420	$525 < d < 710$
50	810	1020	360	$425 < d < 610$
100	635	780	300	$325 < d < 510$
150	470	575	240	$225 < d < 410$
200	295	350	185	$160 < d < 310$
Précision	$\pm 9,5\%$	$\pm 17\%$	$\pm 12\%$	

Les valeurs  $d_1$ ,  $d_2$ , et  $d_3$  ont été calculées à partir des fréquences  $U$ ,  $V$ , et  $W$  indiquées dans le Tableau I, au moyen de formules données dans le texte. La précision indiquée a été calculée par propagation des déviations standard de  $U$ ,  $V$ , et  $W$ . Les limites sont données par les conditions suivantes:

$$525 - 2\epsilon < d < 710 - 2\epsilon$$

et 
$$\frac{710 - 2\epsilon}{2} < d$$

Toutes les dimensions sont en A.

différents angles, nous avons calculé une dimension moyenne  $A_1 = 575$  A pour cette classe. Pour l'autre, qui comprend donc les phages formant un angle supérieur à  $70^\circ$  avec le plan de coupe, nous avons posé le diamètre maximum  $A_2 = 710$  A. Grâce à l'artifice des 2 populations de particules sphériques différentes, on peut employer les formules calculées plus haut.

En désignant par  $u$ ,  $v$ , et  $w$  les probabilités d'apparaître sur 1, 2, ou 3 coupes, et par  $a_1$  et  $a_2$  respectivement  $A_1 - 2\epsilon$  et  $A_2 - 2\epsilon$ , on obtient:

$$u = q \frac{d - a_1}{d}$$

$$v = q \frac{a_1}{d} + (1 - q) \frac{2d - a_2}{d}$$

$$w = (1 - q) \frac{a_2 - d}{d}$$

$$d_1 = \frac{q \cdot a_1}{q - u}$$

$$d_2 = \frac{q \cdot a_1 - (1 - q)a_2}{v - 2(1 - q)}$$

$$d_3 = \frac{(1 - q)a_2}{w + (1 - q)}$$

En introduisant dans ces formules  $q = 0,9$ , et pour  $u$ ,  $v$ , et  $w$  respectivement les fréquences  $U$ ,

$V$ , et  $W$  déterminées d'après les données du Tableau I on obtient:

$$d_1 = 1,7 a_1$$

$$d_2 = \frac{9a_1 - a_2}{3,6}$$

$$d_3 = 0,59 a_2$$

Le Tableau II donne les valeurs numériques de  $d_1$ ,  $d_2$ , et  $d_3$  calculées pour des  $\epsilon$  variant de 0 à 200 A.

Dans ce tableau, nous pouvons comparer les valeurs de  $d$  calculées pour les différents  $\epsilon$  avec les limites indiquées dans la dernière colonne. Nous voyons alors que  $\epsilon$  doit être égal ou supérieur à 150 A. En effet, pour  $\epsilon = 150$  A, les valeurs de  $d_1$  et de  $d_2$ , compte tenu de la précision de leur détermination, se trouvent tout juste à l'intérieur des limites. L'épaisseur de la coupe serait donc d'environ 400 A ou même inférieure.

(3) *Relation numérique entre le nombre moyen de particules visibles sur une coupe de bactérie, déterminé au moyen d'un échantillon, et le nombre des particules contenues dans les bactéries entières:*

L'“échantillon” que nous allons utiliser pour déterminer le nombre moyen de particules par coupe de bactérie est formé de 5 micrographies à faible grossissement, montrant chacune 20 à 30 bactéries et prises chacune sur des coupes et sur des groupes de bactéries différents. Nous compterons les bactéries et les particules présentes dans les bactéries sur 5 micrographies et calculerons le nombre moyen de particules par coupe de bactérie. La première chose à connaître est la reproductibilité de cet échantillonnage. Un calcul simple dans le cas de particules sphériques montre en effet que le nombre de particules visibles est directement proportionnel à l'épaisseur, qui pourrait évidemment varier d'une coupe à l'autre. Le Tableau III, expérience 2, nous montre que pour des échantillons formés d'une seule coupe, la dispersion des valeurs est de 14 pour cent, ce qui donne une dispersion d'environ 6 pour cent pour la valeur moyenne obtenue avec un échantillon de 5 coupes. Nous constatons ainsi que l'épaisseur des coupes choisies comme bonnes est très constante. Cette manière d'échantillonner est donc parfaitement utilisable; de plus, il est justifié d'attribuer à ces coupes l'épaisseur que nous avons déterminée sur d'autres de même apparence.

TABLEAU III  
Echantillonnage

	Nb. de coupes de bact.	Nb. total de phages	Phages/coupe de bact.	Ph. infectieux/bact.	Ph. morphologiquement complets/bact.	Doughnuts/bact.	Surface totale des coupes de bact.	Surf. moy. d'une coupe de bact.
Exp. 1 Total sur 8 micrographies	162	2263	~14	160	200	30	—	—
Exp. 2								
Micrographie 1	29	426	14,7				~24 $\mu^2$	0,83 $\mu^2$
2	29	383	13,2				23	0,79
3	28	394	14,1				26	0,93
4	39	401	10,3				30	0,77
5	19	258	13,6				17	0,89
Total	144	1862	12,9 $\pm$ 0,8*	180	—	— (50‡)	~120 $\mu^2$	0,83 $\pm$ 0,03*
Coupes trop épaisses 1	31	654	21					
2	16	415	26					
Total	47	1069	22,8 $\pm$ 2,6*					

Les micrographies de différents groupes de bactéries, prises sur des coupes différentes, ont été faites à un grossissement électronique de  $\times 4,000$ . Les comptages et l'évaluation de la surface ont été faits sur des agrandissements photographiques à  $\times 16,000$ .

Exp. 1: ~14 phages visibles par coupe de bactérie correspondent à  $230 \pm 70$  particules, dont 1 phage visible correspond à ~16 phages/bactérie.

Exp. 2:  $12,9 \pm 0,8$  phages visibles par coupe de bactérie correspondent à  $230 \pm 70$  particules, donc 1 phage visible par bactérie coupée correspond à ~18 phages/bactérie.

\* La variation indiquée est la déviation de la moyenne  $\sigma' = \sqrt{\frac{\Delta^2}{n(n-1)}}$ .

‡ Nombre moyen de doughnuts obtenu par de nombreuses expériences.

Le jugement à vue, sur l'écran du microscope électronique, de coupes "bonnes," qui est très constant pour un opérateur, variera peut-être quelque peu d'une personne à l'autre. Pour obtenir des indications sur l'influence maximum de ce choix sur les résultats, nous avons fait des mesures sur des coupes jugées nettement trop épaisses par plusieurs observateurs, et que tous auraient rejetées à coup sûr lors d'un choix de coupes dans des conditions normales. Nous obtenons alors une valeur seulement 1,8 fois plus élevée qu'avec de "bonnes" coupes (Tableau III). Cette observation nous montre que même lors d'un choix tout à fait défavorable et bien au-delà des variations imputables au facteur subjectif, l'échantillonnage reste encore valable bien en deçà des limites d'un facteur de deux.

Dans la relation

$$\frac{\text{Nombre de particules}}{\text{bactérie entière}} = F \cdot \frac{\text{Nombre de particules}}{\text{coupe de bactérie}},$$

l'échantillon nous donne le nombre de particules par bactérie coupée. Il reste à déterminer  $F$ .

(a) Détermination de  $F$  par le calcul.—On peut arriver au facteur  $F$  en calculant quelle partie du volume bactérien apparaît sur une coupe. Pour cela il nous faut connaître le volume moyen des bactéries d'une culture faite dans des conditions bien définies. La coupe ne permet pas de déterminer facilement la longueur moyenne des bactéries parce que nous devrions considérer non seulement la distribution des longueurs réelles des bactéries, mais également l'orientation de l'axe des bactéries par rapport à la coupe. Par

contre, le diamètre est facile à déterminer sur les coupes quand on admet que le corps bactérien est cylindrique. Par conséquent, nous avons mesuré la longueur des bactéries au contraste de phase, sur des préparations entre agar et couvre-objet; l'influence du flou optique est ici négligeable ( $0,2 \mu$  sur environ  $3 \mu$ ). Dans l'expérience considérée (Tableau III), la longueur moyenne des bactéries était de  $3,4 \mu$ , et le diamètre moyen d'environ  $0,7 \mu$ . Le volume moyen sera donc, en assimilant la bactérie à un cylindre terminé par des demi-sphères,

$$V = \pi \frac{D^2}{4} \left( L - \frac{D}{3} \right) \approx 1,2 \mu^3$$

La surface totale de 144 coupes de bactéries, dans l'expérience 2 du Tableau III, déterminée par mesure des diamètres des ellipses dessinées par les bactéries coupées, était d'environ  $120 \mu^2$ . Donc une coupe de bactérie a une surface moyenne d'à peu près  $0,8 \mu^2$ . Son épaisseur étant posée égale à  $400 \text{ \AA}$ , son volume vaut environ  $0,03 \mu^3$ . Cette coupe représentera donc à peu près  $1/40$  du volume moyen d'une bactérie.

Pour obtenir  $F$  il faut encore tenir compte du nombre moyen  $m$  d'apparitions d'un même phage sur des coupes qui représenteraient le volume entier de la bactérie. Dans le cas des phages T2,  $m$  doit être déterminé à partir des données du Tableau I en posant

$$m = U \cdot 1 + V \cdot 2 + W \cdot 3$$

on obtient

$$m = 1,65$$

Donc:

$$F = 40 \cdot \frac{1}{m} = 40 \cdot \frac{1}{1,65} = 24 \quad \text{ceci pour } d = 400 \text{ \AA}$$

Si  $d$  est plus petit, la valeur de  $F$  augmente de façon proportionnelle.

(b) *Détermination de  $F$  par un étalonnage expérimental.*—Si nous étudions des bactéries contenant une grande quantité de phages finis, nous pouvons comparer le nombre des phages dans le lysat avec le nombre de phages par bactérie coupée donné par l'échantillonnage et obtenir ainsi une valeur expérimentale de  $F$ .

On effectue 2 prélèvements dans une culture de *E. coli* B-B infectée depuis 45 minutes par du phage T2r (avec inhibition de lyse), dont l'un est

fixé et inclus et l'autre lysé artificiellement au moyen de chloroforme (15). Le lysat a été analysé quantitativement en déterminant le nombre de particules capables de produire une plaque dans un gazon de bactéries et en comptant au microscope électronique les différentes espèces de particules de nature phagique.

Le Tableau III montre les résultats de deux expériences indépendantes. Dans la première nous avons considéré seulement le total obtenu sur 8 micrographies prises sur 6 coupes différentes, paraissant toutes de la même bonne qualité. Nous trouvons qu'un phage visible sur une bactérie coupée correspond en moyenne à 16 phages par bactérie, donc  $F = 16$ . Dans la seconde expérience, où nous indiquons les valeurs obtenues pour chaque micrographie, prise chacune sur une coupe différente, nous trouvons  $F = 18$ , ce qui est légèrement inférieur à la valeur calculée de 24.

(c) *Précision de la détermination de  $F$ .*—La précision des valeurs obtenues dépend de deux facteurs: les erreurs statistiques, qui affectent la répétition des mesures sur un même objet et les erreurs systématiques qui proviennent de l'objet et des méthodes d'étude eux-mêmes.

Le calcul de  $F$  présente une erreur statistique de 5 pour cent environ qui est la dispersion de la valeur moyenne de la surface des coupes bactériennes (Tableau III). L'erreur statistique sur la détermination du volume moyen est certainement faible et négligeable vis-à-vis des erreurs systématiques. Celles-ci sont dues tout d'abord à l'épaisseur de la coupe que nous ne pouvons pas déterminer directement, mais dont nous jugeons subjectivement d'après la ressemblance avec des coupes que nous avons mesurées. Nous avons déjà vu que l'erreur introduite par ce jugement subjectif ne peut certainement pas atteindre un facteur de 2. Une autre erreur systématique est due à la mesure de la longueur moyenne des bactéries déshydratées et incluses. La contraction au cours de l'inclusion pouvant atteindre 20 pour cent (8), l'erreur sur le volume est également de 20 pour cent.

Pour la détermination de  $F$  par étalonnage expérimental, il faut tenir compte comme erreur statistique des 6 pour cent de dispersion de la moyenne des phages par bactérie coupée et de la dispersion des comptages du lysat, qui atteint 15 pour cent (7). L'erreur statistique de la méthode est donc d'environ 16 pour cent. Quant aux

erreurs systématiques, il y en a deux: la première est celle de la concentration en sphères de latex dans la suspension de référence, qui est déterminée à 15 pour cent près, ceci à cause du diamètre des sphères qu'on ne peut garantir à mieux que 5 pour cent (7). L'autre erreur dépend des pertes possibles durant l'obtention du lysat, par réadsorption ou rétention sur ou dans les parois bactériennes, ou par vidage de phages immatures et très labiles lors de la lyse. La réadsorption dans un lysat non dilué semble être faible; le nombre de phages qui pourraient être restés emprisonnés dans les débris bactériens est difficile à évaluer mais ne dépasse certainement pas quelque 20 à 30 pour cent, vu le rendement élevé dans les expériences considérées ici. Quant au vidage probable de phages immatures, qui donnerait les têtes de phages vides ou "doughnuts," nous en avons tenu compte en prenant comme particules contenues dans les bactéries la somme des phages morphologiquement intacts et des doughnuts.

En considérant les erreurs, surtout systématiques, de la détermination expérimentale de  $F$ , nous pouvons affirmer qu'elle est valable bien à l'intérieur d'un facteur de deux. Il est à prévoir que la valeur réelle soit plutôt plus élevée que la valeur déterminée, tout d'abord parce que la suspension de latex de référence conduit à des titres plutôt bas comme il semble ressortir des comparaisons entre nombre de phages morphologiquement déterminé et nombre de particules actives; et ensuite parce que le nombre de particules phagiques trouvées dans le lysat—s'il n'est pas juste—peut être seulement trop petit puisqu'il n'a pu se produire que des pertes.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Par ellipsométrie, Peachey (12) a mesuré une épaisseur d'environ 500 A pour des coupes de méthacrylate grises sur l'eau. Par la méthode de Tolanski, Bachmann et Sitte (1) obtiennent une valeur un peu plus faible. Ces valeurs sont en accord également avec les estimations de Bergold effectuées sur des coupes de virus d'insectes (communication personnelle). Par les estimations à partir des phages T2, nous arrivons à une valeur de 400 A environ. Dans ce cas, l'épaisseur minimum d'une portion de phage ayant encore suffisamment de contraste pour être visible serait de 150 A. Que cette valeur ne soit pas beaucoup trop élevée ressort du fait que la queue du phage,

également protéique, et d'un diamètre de 180 A, n'est jamais visible sur des coupes de phages intracellulaires.

Si l'on calcule le facteur  $F$  à partir d'une épaisseur de 400 A, on obtient 24, valeur supérieure de peu aux valeurs de 16 et 18 déterminées expérimentalement. Avec une épaisseur inférieure à 400 A, le facteur calculé serait encore plus élevé. Or une limite supérieure de  $F$  est fournie par la précision de la détermination expérimentale, qui exclut pratiquement un  $F$  atteignant le double de la valeur déterminée, soit 36. Ce  $F = 36$  correspondrait à une épaisseur d'environ 260 A; cela impliquerait une valeur d'environ 200 A pour  $\epsilon$ , qui est encore compatible avec l'expérience, mais qui paraît peu vraisemblable quand on la compare avec l'épaisseur de la coupe elle-même.

Une précision plus élevée de la détermination de  $d$  par l'analyse statistique sur des coupes sériées devrait être obtenue avec des particules sphériques pour lesquelles la théorie développée pourrait être appliquée sans restriction et sans employer des approximations quelque peu arbitraires. Des études au moyen du phage T5 sont actuellement en cours.

Le comptage de particules sur les coupes nous apprend incidemment que l'appréciation subjective au microscope électronique d'"une bonne coupe de polyester" nous fait choisir des coupes ne variant pas de plus de 15 pour cent dans leur épaisseur. Il semble que ce choix d'"une bonne coupe" doive dépendre de certaines conventions, de l'opérateur, et peut-être du microscope employé. Néanmoins des coupes qui ont environ 1,8 fois l'épaisseur "standard" ont été jugées "trop épaisses" par tous les opérateurs du laboratoire, unanimement. Il ressort de cela que la distribution des épaisseurs normalement employées est peu étendue. Les coupes utilisées dans notre laboratoire, dans le cas du polyester, doivent se situer entre les limites de 300 à 600 A. L'épaisseur "standard" utilisée devrait donc être déterminée par chaque opérateur ou chaque laboratoire au moins. La dispersion autour de cette épaisseur serait ensuite à peu près négligeable.

Quant à la relation quantitative  $F = 16-24$  que nous avons établie entre le nombre moyen de phages visibles par coupe bactérienne et le nombre de phages par bactérie entière, elle n'est valable évidemment que pour des phages T2 ou d'autres particules de dimensions identiques se



trouvant dans des bactéries de dimensions égales à ce que nous avons mesuré. Cependant la formule générale indiquée permettra de calculer  $F$  dans d'autres conditions pourvu que les particules considérées soient sphériques.

Nous avons vu que les erreurs statistiques de la méthode ne dépassent pas 15 à 20 per cent. Cette méthode est donc du même ordre de précision que les méthodes usuelles employées pour l'étude des phages. Les erreurs systématiques, cependant, sont plus importantes.

En tenant largement compte de ces imprécisions, nous pouvons affirmer qu'un comptage effectué par échantillonnage sur coupe est juste à l'intérieur d'un facteur de 2. Que ce facteur soit nettement une limite supérieure prudente est démontré par la concordance des valeurs de  $F$  obtenues par le calcul et par l'expérience d'éta-lonnage. Il s'avère également que la valeur de  $F$  déterminée est plutôt trop petite que trop grande, puisque nous nous sommes servis de l'épaisseur maximum compatible avec nos mesures.

La précision obtenue est en tout cas suffisante pour certaines investigations du développement du bactériophage que nous décrirons ailleurs (10).

## BIBLIOGRAPHIE

1. Bachmann, A., et Sitte, P., *Proc. IV. Internat. Conf. Electron Microscopy*, Berlin, 1958, sous presse.
2. Bang, B. G., et Bang, F. B., *J. Ultrastruct. Research*, 1957, **1**, 138.
3. Delbrück, M., *J. Bact.*, 1945, **50**, 131.
4. De Mars, R. I., Luria, S. E., Fisher, H., et Levinthal, C., *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 113.
5. De Mars, R. I., *Virology*, 1955, **1**, 83.
6. Kellenberger, E., *Experientia*, 1956, **12**, 282.
7. Kellenberger, E., et Arber, W., *Virology*, 1957, **3**, 245.
8. Kellenberger, E., Ryter, A., et Séchaud, J., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1958, **4**, 671.
9. Kellenberger, E., et Séchaud, J., *Virology*, 1957, **3**, 256.
10. Kellenberger, E., Séchaud, J., et Ryter, A., soumis à *Virology*.
11. Morgan, C., Ellison, S. A., Rose, H. M., et Moore, D. H., *Exp. Cell Research*, 1955, **9**, 572.
12. Peachey, L. D., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1958, **4**, 233.
13. Ryter, A., et Kellenberger, E., *J. Ultrastruct. Research*, 1958, **2**, 200.
14. Ryter, A., et Kellenberger, E., *Z. Naturforsch.*, 1958, **13b**, 597.
15. Séchaud, J., et Kellenberger, E., *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 102.

## EXPLICATION DE LA PLANCHE 207

FIG. 1. Coupes successives d'*E. coli* B-B infectées par du bactériophage T2r 30 minutes avant fixation.  $\times 27,000$ .

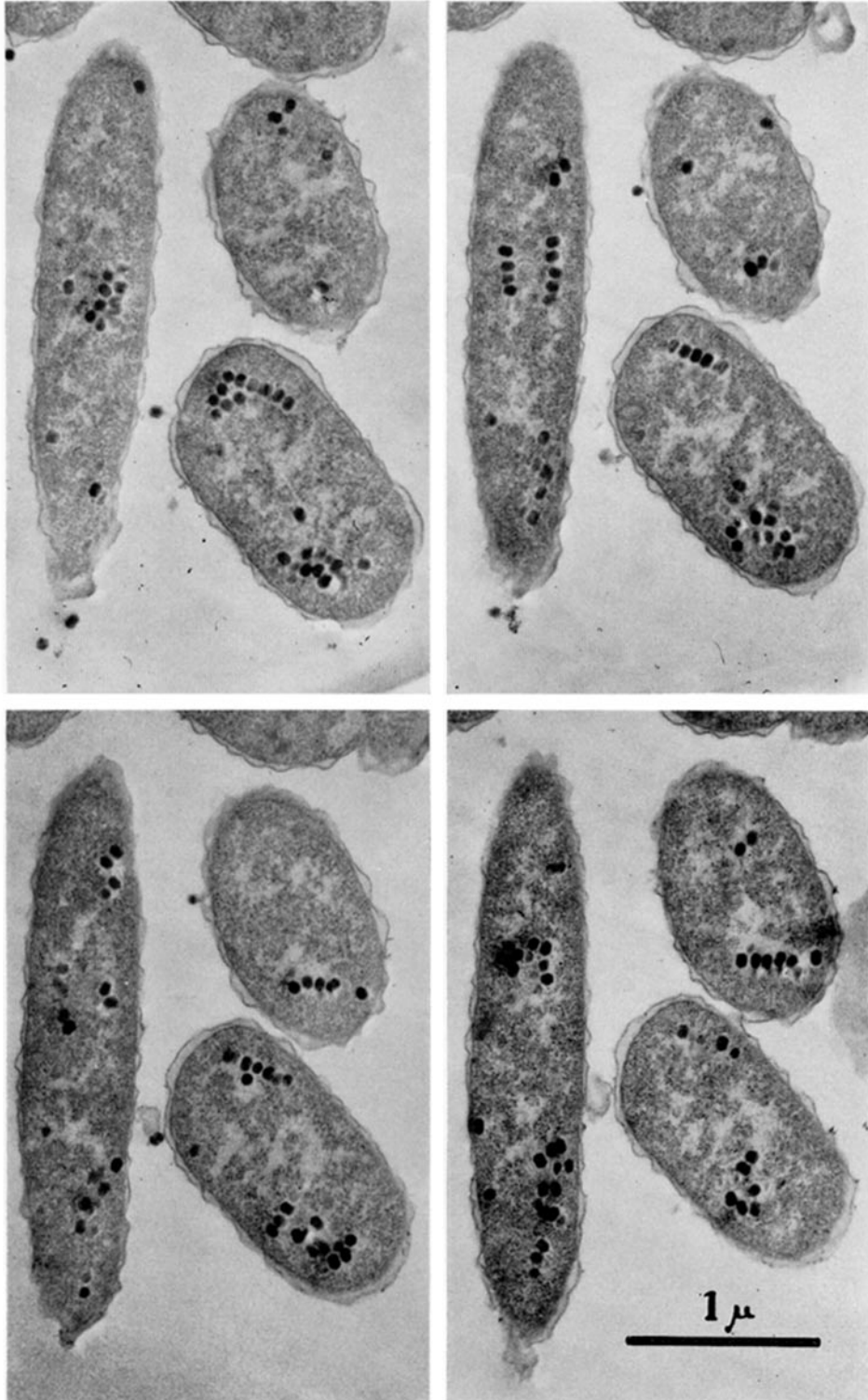


FIG. 1

(Séchaud *et al.*: Bactéries infectées par bactériophage)