

Comptes rendus  
hebdomadaires des séances  
de l'Académie des sciences /  
publiés... par MM. les  
secrétaires perpétuels

Académie des sciences (France). Auteur du texte. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences / publiés... par MM. les secrétaires perpétuels. 1960-11.

**1/** Les contenus accessibles sur le site Gallica sont pour la plupart des reproductions numériques d'oeuvres tombées dans le domaine public provenant des collections de la BnF. Leur réutilisation s'inscrit dans le cadre de la loi n°78-753 du 17 juillet 1978 :

- La réutilisation non commerciale de ces contenus ou dans le cadre d'une publication académique ou scientifique est libre et gratuite dans le respect de la législation en vigueur et notamment du maintien de la mention de source des contenus telle que précisée ci-après : « Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale de France » ou « Source gallica.bnf.fr / BnF ».

- La réutilisation commerciale de ces contenus est payante et fait l'objet d'une licence. Est entendue par réutilisation commerciale la revente de contenus sous forme de produits élaborés ou de fourniture de service ou toute autre réutilisation des contenus générant directement des revenus : publication vendue (à l'exception des ouvrages académiques ou scientifiques), une exposition, une production audiovisuelle, un service ou un produit payant, un support à vocation promotionnelle etc.

[CLIQUER ICI POUR ACCÉDER AUX TARIFS ET À LA LICENCE](#)

**2/** Les contenus de Gallica sont la propriété de la BnF au sens de l'article L.2112-1 du code général de la propriété des personnes publiques.

**3/** Quelques contenus sont soumis à un régime de réutilisation particulier. Il s'agit :

- des reproductions de documents protégés par un droit d'auteur appartenant à un tiers. Ces documents ne peuvent être réutilisés, sauf dans le cadre de la copie privée, sans l'autorisation préalable du titulaire des droits.

- des reproductions de documents conservés dans les bibliothèques ou autres institutions partenaires. Ceux-ci sont signalés par la mention Source gallica.BnF.fr / Bibliothèque municipale de ... (ou autre partenaire). L'utilisateur est invité à s'informer auprès de ces bibliothèques de leurs conditions de réutilisation.

**4/** Gallica constitue une base de données, dont la BnF est le producteur, protégée au sens des articles L341-1 et suivants du code de la propriété intellectuelle.

**5/** Les présentes conditions d'utilisation des contenus de Gallica sont régies par la loi française. En cas de réutilisation prévue dans un autre pays, il appartient à chaque utilisateur de vérifier la conformité de son projet avec le droit de ce pays.

**6/** L'utilisateur s'engage à respecter les présentes conditions d'utilisation ainsi que la législation en vigueur, notamment en matière de propriété intellectuelle. En cas de non respect de ces dispositions, il est notamment passible d'une amende prévue par la loi du 17 juillet 1978.

**7/** Pour obtenir un document de Gallica en haute définition, contacter [utilisation.commerciale@bnf.fr](mailto:utilisation.commerciale@bnf.fr).

**MÉMOIRES ET COMMUNICATIONS**

DES MEMBRES ET CORRESPONDANTS DE L'ACADÉMIE.

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE. — *L'observation de la matière vivante au moyen d'un microscope électronique fonctionnant sous très haute tension.*

Note de MM. **GASTON DUPOUY**, **FRANTZ PERRIER** et **LOUIS DURRIEU**.

En utilisant un microscope électronique fonctionnant sous une tension très élevée (650 kV à 1 MeV), il est possible d'observer et de photographier la matière vivante, par exemple des bactéries. Celles-ci se trouvent placées dans une cellule porte-objet étanche, fermée par deux fenêtres transparentes aux électrons et suffisamment résistantes pour supporter l'effet de la pression quand on introduit la cellule dans le vide.

Le microscope électronique est actuellement parvenu à un tel degré de perfectionnement qu'il donne des images d'une étonnante beauté. Son utilisation, dans divers domaines de la Science, a permis de parcourir toute une nouvelle étape vers la vision de l'infiniment petit.

Avec les meilleurs instruments le pouvoir de résolution est si élevé qu'on peut observer et photographier, dans un objet, des détails dont la taille est inférieure à 10 Å; les grossissements utiles correspondants sont de l'ordre de 1 million.

Pour obtenir d'excellentes images on doit, il est vrai, fortement diaphragmer la lentille objectif. Mais l'instrument possède alors une grande profondeur de foyer, ce qui facilite la mise au point et favorise l'observation stéréoscopique des objets.

Cependant le microscope électronique présente de graves limitations, qui restreignent encore le domaine de ses applications. Ce sont, en particulier, la nécessité d'introduire les objets dans le vide et le fait que le pouvoir de pénétration des électrons est trop faible dans la plupart des cas. Nous allons examiner cela d'un peu plus près.

*a.* Les électrons doivent cheminer dans un vide aussi poussé que possible, afin de n'être ni freinés, ni diffusés par des chocs avec les molécules gazeuses. Quand on introduit de la matière vivante (bactéries, cellules, etc.) dans le corps vide de l'instrument, celle-ci se dessèche : les parois des cellules éclatent sous l'effet du vide. *On ne peut observer que des objets morts.*

Une telle observation a néanmoins fourni des renseignements fort utiles, car la morphologie et les structures internes des objets observés restent décelables aux forts grossissements. C'est pour cela que la cytologie, la bactériologie, la virologie ont pu faire ces dernières années des progrès considérables, grâce au microscope électronique.

b. Un autre point névralgique en microscopie électronique est le faible pouvoir de pénétration des électrons : des bactéries dont l'épaisseur est seulement égale à  $1 \mu$  sont pratiquement très peu transparentes à des électrons de 50 kV par exemple.

c. Les examens histologiques ne peuvent se faire dans des conditions convenables qu'en réalisant, avec des microtomes spéciaux, des coupes dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques centaines d'angströms.

Dans le même ordre d'idées, la lamelle porte-objet de la microscopie classique est remplacée par un film très mince en collodion, en graphite, etc. de l'ordre de quelques centièmes de micron d'épaisseur.

Pour toutes ces raisons il avait été jusqu'ici impossible de photographier du matériel biologique vivant avec le microscope électronique.

La présente Note a pour objet de montrer que nous avons résolu, pour la première fois, ce difficile problème en utilisant un microscope électronique fonctionnant sous une tension exceptionnellement élevée.

Notre microscope est prévu pour des tensions pouvant atteindre 1 500 kV (1,5 MeV). Pour l'instant nous travaillons le plus souvent à 750 kV. Cependant nous avons déjà pu fonctionner un peu au-delà de 1 million de volts.

Il est bon de rappeler que, pour ces tensions accélératrices, les électrons sont fortement relativistes : leur vitesse peut atteindre une fraction notable de celle de la lumière.

Dans ces conditions, à la différence de potentiel  $V$  servant à accélérer les électrons il faut substituer *la différence de potentiel effective relativiste*  $V^*$ , qui est notablement plus élevée. On sait, en effet, que

$$V^* = (1 + 0,9785 \cdot 10^{-6} V) V.$$

Le tableau ci-dessous donne, pour différentes valeurs du potentiel accélérateur  $V$ , les valeurs correspondantes de  $V^*$ , de la longueur d'onde  $\lambda$  de l'onde associée aux électrons, et de  $\beta = v/c$ , où  $v$  et  $c$  sont respectivement la vitesse des électrons et celle de la lumière.

$V$ .....	50 kV	500 kV	750 kV	1 MeV	1,5 MeV
$V^*$ .....	52,45 kV	744,6 kV	1,300 MeV	1,978 MeV	3,702 MeV
$\lambda$ (Å).....	0,0536	0,0142	0,01075	0,00872	0,00637
$\beta = \frac{v}{c}$ .....	0,413	0,863	0,914	0,942	0,967

On voit, en particulier, que pour la tension de travail de 750 kV la différence de potentiel effective relativiste est de 1,3 MeV; pour 1 million de volts, elle atteint sensiblement 2 MeV : l'effet relativiste est donc très important.

Avec des électrons de cette énergie des lames de collodion, de carbone, etc. de 600 Å sont très transparentes, et les objets d'une épaisseur de  $1 \mu$  le deviennent suffisamment pour être directement observables par transmission.

*La cellule porte-objet.* — Les remarques précédentes nous ont conduits à substituer au porte-objet habituel une petite boîte *étanche*, ou *cellule porte-objet* (fig. 1), à l'intérieur de laquelle est disposé le matériel biologique à observer.

Le spécimen à examiner est ainsi placé dans l'air, sous la pression atmosphérique normale et avec un degré hygrométrique convenable, c'est-à-dire *dans des conditions permettant aux cellules de vivre*.

Les deux pièces métalliques  $P_1$  et  $P_2$  portent deux faces bien planes, parallèles, au faisceau d'électrons que l'on orientera perpendiculairement. Elles sont ajustées dans  $G$ , qui les guide et assure leur centrage. Deux ouvertures cylindriques  $O_1$  et  $O_2$ , de très petit diamètre, forment une sorte d'étroit pertuis, à travers lequel passent les électrons.

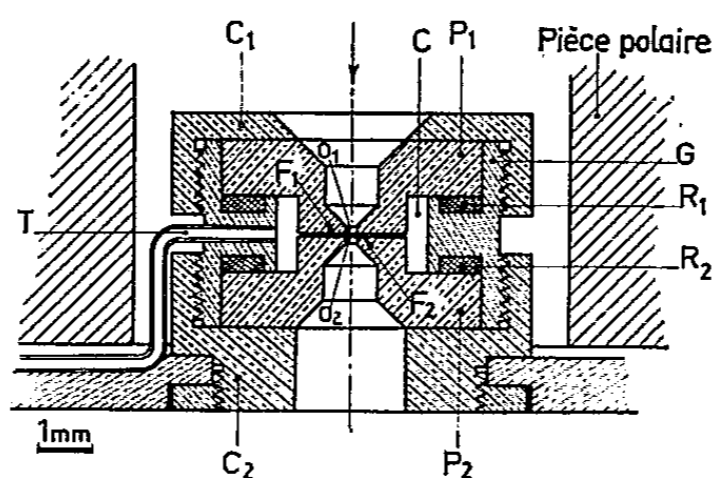


Fig. 1. — Vue en coupe de la cellule porte-objet spéciale.

Deux joints circulaires  $R_1$  et  $R_2$ , en matière plastique, sont exactement coupés avec un emporte-pièce pour venir se loger dans deux gorges  $G_1$  et  $G_2$ , pratiquées dans  $G$ . Ils sont destinés à assurer l'étanchéité.

Deux coiffes  $C_1$  et  $C_2$  se vissent sur  $G$  et jouent un double rôle : elles maintiennent en place tout l'ensemble et viennent plus ou moins comprimer  $R_1$  et  $R_2$ .

La cavité cylindrique  $C$  entourant  $P_1$  et  $P_2$  forme une chambre remplie d'air en réserve.

Les faces planes et parallèles de  $P_1$  et  $P_2$  sont finement marbrées par rodage. On recouvre chacune d'elles d'un film très mince de parlodion-carbone, de  $600 \text{ \AA}$  d'épaisseur. Ces lames, après séchage, apparaissent tendues comme des peaux de tambour sur les ouvertures  $O_1$  et  $O_2$ ; elles constituent ainsi deux fenêtres  $F_1$  et  $F_2$ , transparentes aux électrons. (fig. 2).

On peut régler l'épaisseur de la lame d'air définie par la distance des deux fenêtres  $F_1$  et  $F_2$ , en comprimant plus ou moins les joints élastiques : nous l'avons fait varier de 2 à  $10 \mu$  environ.

Il importe de réduire autant que possible la longueur du trajet des électrons dans l'air, à l'intérieur de la cellule porte-objet, afin de diminuer la diffusion et la dispersion des vitesses des électrons.

Enfin nous prévoyons une liaison permanente de l'intérieur de la cellule porte-objet avec une atmosphère d'air humide, par un canal métallique  $T$

de section transversale minuscule, dont le diamètre intérieur n'excède pas 0,15 mm. La figure 3 représente une vue « éclatée » de la cellule, qui précise la disposition de ses diverses parties.

La construction de la cellule porte-objet comporte de nombreuses difficultés : l'une d'elles résulte du peu de place disponible, soit dans l'entrefer de l'objectif, soit dans le canal axial des pièces polaires. Son volume extérieur global est de l'ordre de  $1/10^6$  de centimètre cube seulement.

Il faut, d'autre part, que les fenêtres de la cellule, bien que d'une épaisseur infime, soient assez résistantes pour ne pas éclater sous l'effet de la pression quand on place l'ensemble dans le vide.

Après divers essais, nous avons adopté comme diamètre des ouvertures  $O_1$  et  $O_2$  :  $d = 0,1$  mm. Dans ces conditions, la force exercée par la pression atmosphérique sur la surface de chaque fenêtre n'atteint pas 8 cg.

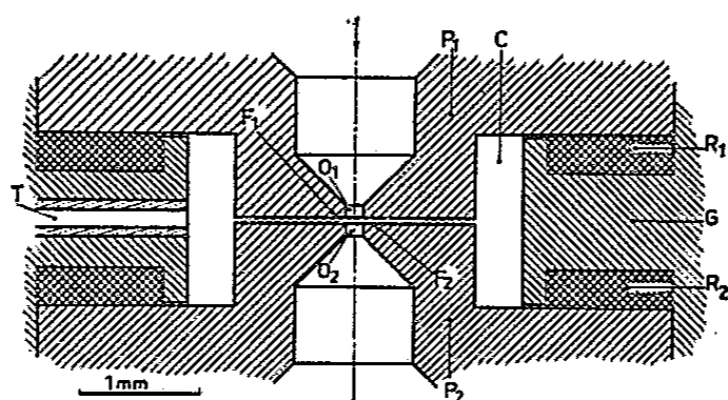


Fig. 2. — Vue plus détaillée des fenêtres porte-objet.

Le centrage des pièces doit être effectué avec une grande précision pour assurer une coaxialité aussi parfaite que possible des deux fenêtres de la cellule.

*Marche d'une expérience.* — Nos premières expériences portent sur l'observation de bactéries vivantes. Celles-ci sont initialement placées sur  $F_1$  ou  $F_2$ , parfois sur  $F_1$  et  $F_2$  simultanément. Avec un microscope optique nous pouvons ainsi mettre successivement au point sur chacune des deux fenêtres et mesurer l'épaisseur de la lame d'air comprise entre elles.

Les divers éléments de la cellule porte-objet sont ensuite assemblés : la cellule se trouve prête pour l'observation.

Avant de soumettre les bactéries à l'action du rayonnement, nous nous sommes assurés qu'elles ne meurent pas au cours d'un séjour plus ou moins prolongé dans la cellule.

Pour cela nous avons découpé un morceau de chaque film porte-objet de dimensions inférieures au diamètre des trous  $O_1$ ,  $O_2$ . Nous nous servons comme « emporte-pièce » d'un fil de tungstène de  $5/100^e$  de millimètre de diamètre. Le fil, tendu verticalement, est porté à  $2\ 000^{\circ}$  C. Il devient ainsi bien rectiligne sur 2 ou 3 cm de longueur.

Puis on le coupe avec des ciseaux et on le dispose verticalement sous la platine d'un microscope, à la place du condenseur, sur un support

approprié. Le pertuis de la cellule porte-objet est ensuite parfaitement centré sur l'axe du fil de tungstène. On soulève alors lentement la monture du condenseur, et le fil vient crever successivement les deux fenêtres  $F_1F_2$ , emportant la partie centrale de chacune d'elles.

On casse avec des pinces le fil porteur de bactéries et on le recueille dans le bouillon de culture.

Au cours de ces diverses opérations, effectuées sans démonter la cellule, les précautions classiques d'asepsie ont naturellement été prises.

Ces essais préliminaires ont montré que *les bactéries restent vivantes après leur séjour dans la cellule d'observation.*

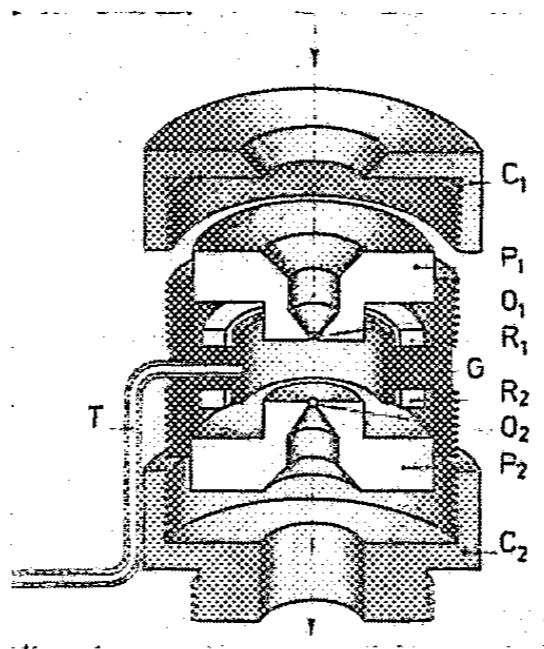


Fig. 3. —Vue « éclatée » du porte-objet spécial.

L'opération proprement dite comporte l'observation et la photographie des bactéries, dans la cellule porte-objet, avec un microscope électronique fonctionnant sous les tensions très élevées dont nous avons parlé.

La durée des poses nécessaires pour chaque photographie n'excède pas 2 à 3 s.

La section du faisceau d'électrons est légèrement supérieure au diamètre des trous des diaphragmes  $O_1, O_2$ .

Les bactéries se trouvent naturellement soumises à l'action des électrons et à celle des rayons X, qui sont produits aux points d'impact sur chaque diaphragme du pertuis.

On retire la cellule porte-objet du corps du microscope et l'on prélève les bactéries pour les mettre dans un bouillon de culture approprié en se limitant, comme précédemment, à celles qui sont situées dans la partie centrale.

Nous avons opéré sur *Corynebacterium diphtheriæ*, *Bacillus Anthracomorphe* et *Bacillus Subtilis*.

Le résultat obtenu est le suivant : *les bactéries sont restées vivantes après irradiation*, et elles ont pu se reproduire.

Des études plus poussées devront être faites pour savoir si l'action prolongée des électrons et celle des rayons X très pénétrants qu'ils pro-

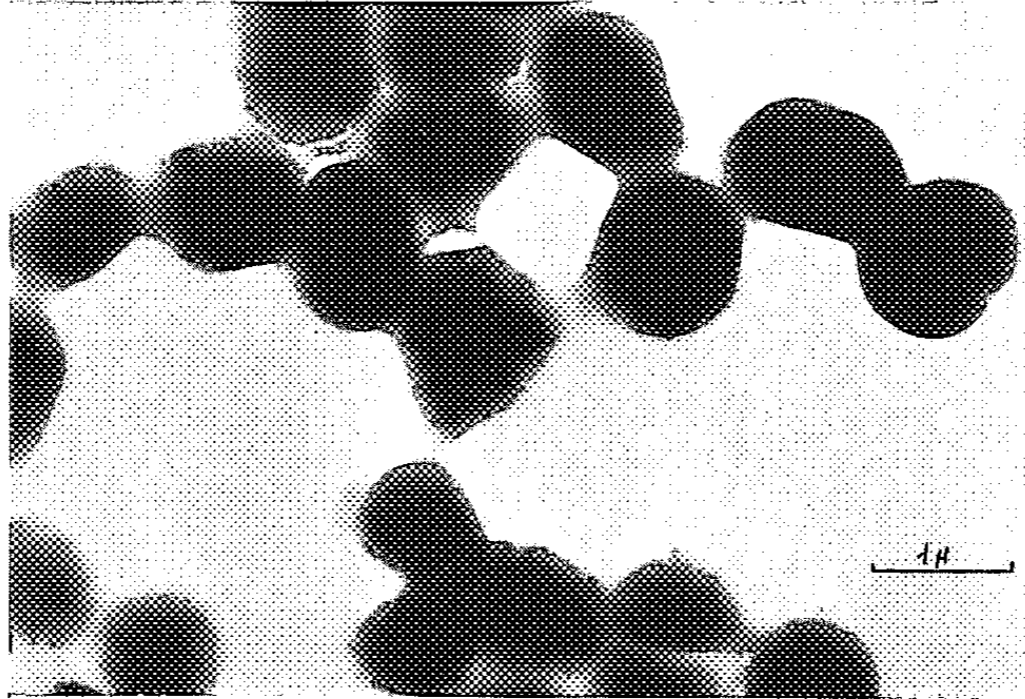


Fig. 4. — *Staphylocoques* montrant des structures internes.  
Tension de travail : 750 kV.



Fig. 5. — Bacille *Anthracomorpha* montrant des spores.  
Tension de travail : 750 kV.

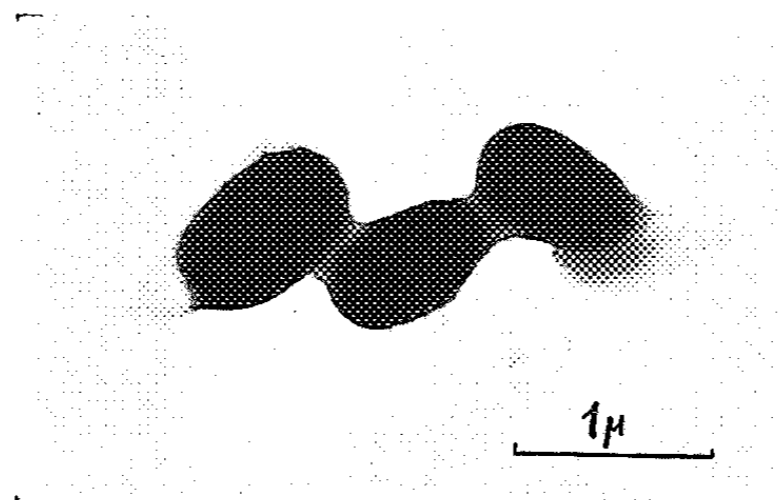


Fig. 6. — Bacille *Anthracomorpha* sur porte-objet spécial.



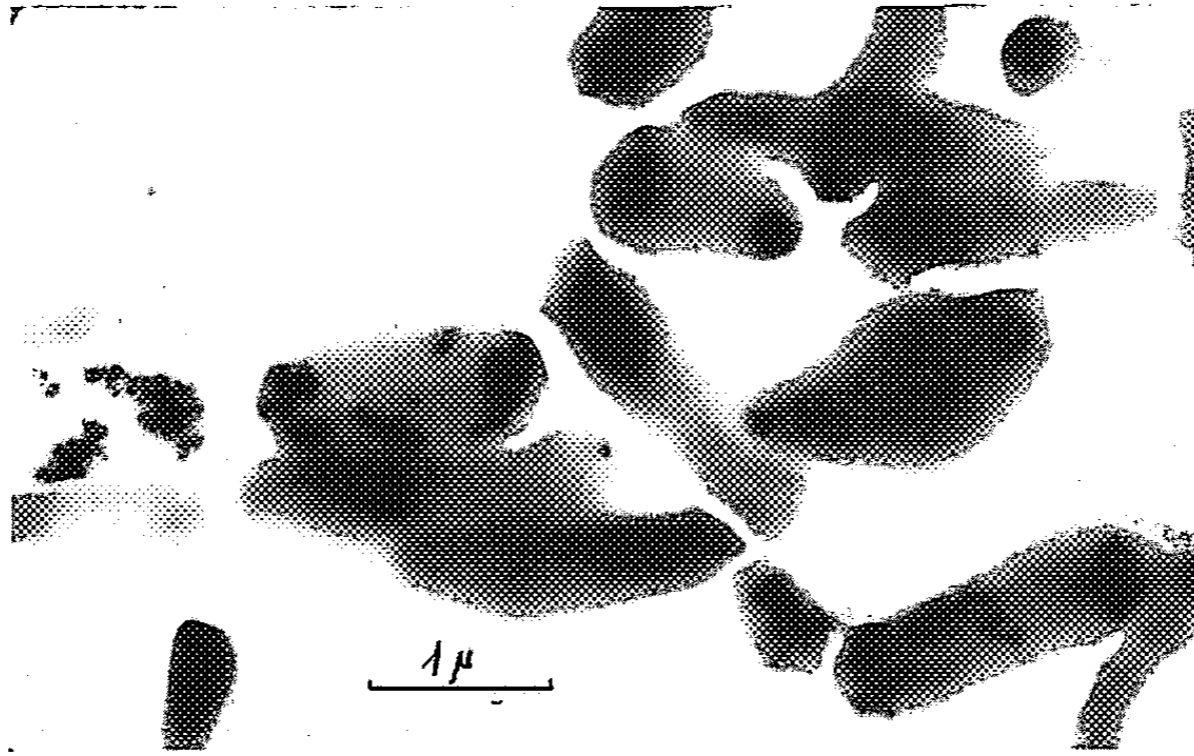


Fig. 7. — *Corynebacterium diphtheriæ*, sous 650 kV.

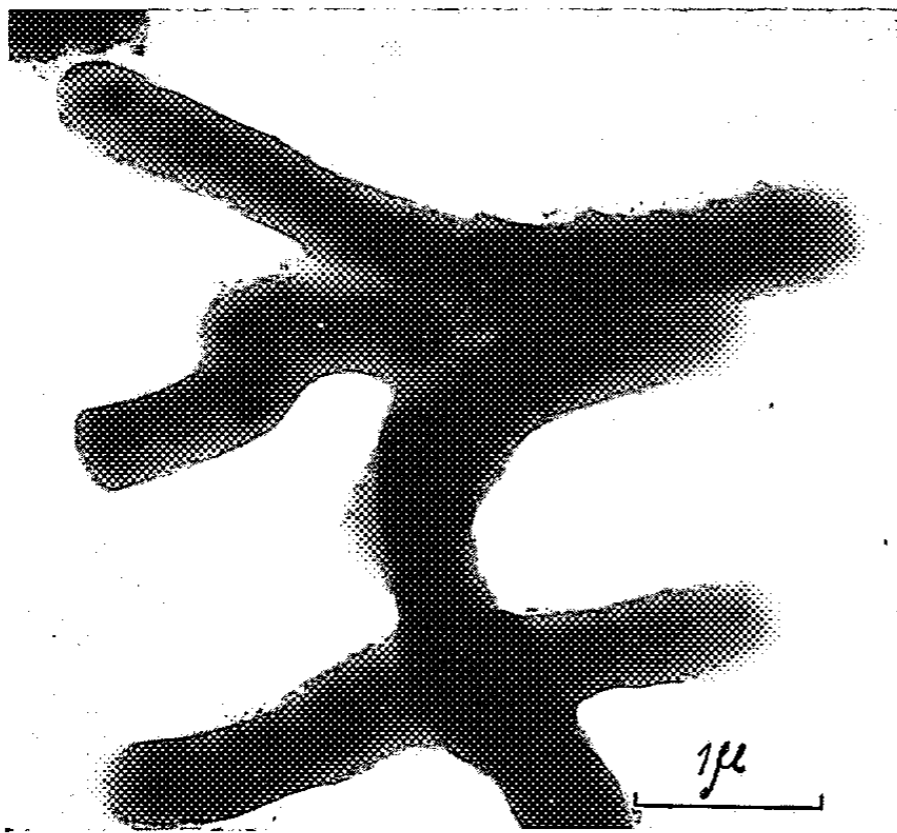


Fig. 8.

Fig. 8. — *Corynebacterium diphtheriæ*, sous 650 kV.



Fig. 9.

Fig. 9. — *Corynebacterium diphtheriæ* (souche ancienne), sous 750 kV.

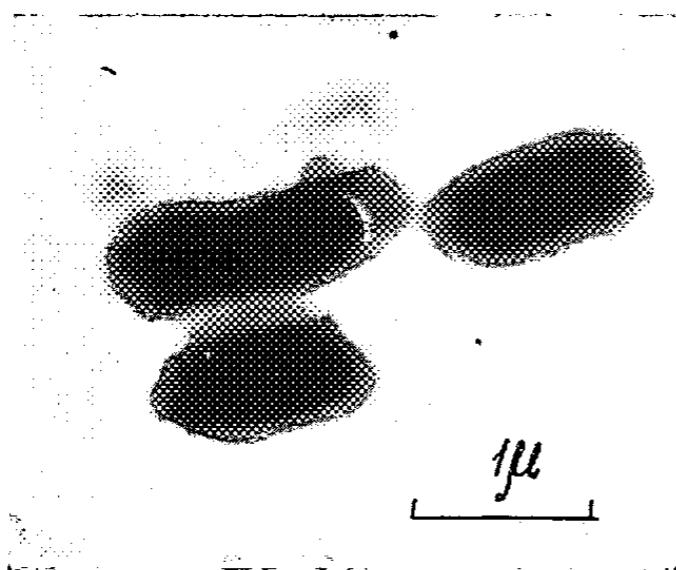


Fig. 10.

Fig. 10. — *Bacillus Subtilis*, sous 750 kV.

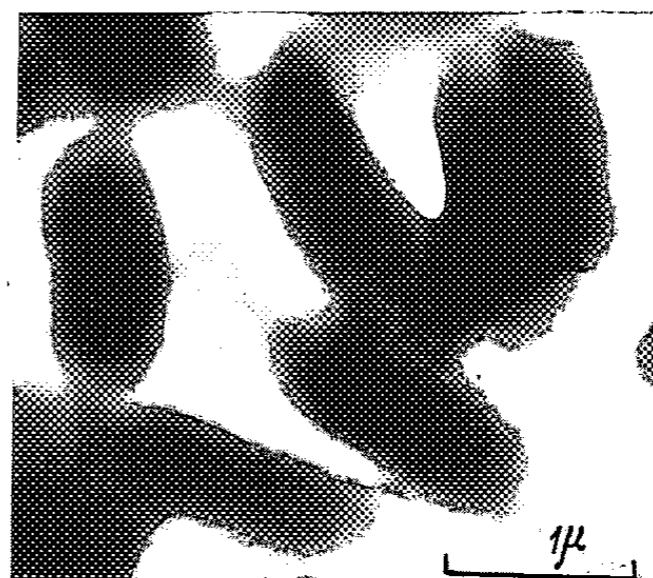


Fig. 11.

Fig. 11. — *Bacillus Subtilis* sur porte-objet spécial, 750 kV.

duisent provoquent des modifications morphologiques ou génétiques des bactéries.

La figure 4 représente des *Staphylocoques*. Ces bactéries sont particulièrement opaques en général; mais on peut discerner sur cette photographie des détails de structure interne : ceux-ci deviendront encore plus visibles sous des tensions de 1 million de volts.

La figure 5 montre des bactéries sporulées d'*Anthracomorphes*, ayant l'aspect d'une sorte de coquille avec son amande à l'intérieur. La photographie 6 est celle d'une autre souche d'*Anthracomorpha*, prise avec la cellule porte-objet.

Les figures 7 et 8 se rapportent à *Corynebacterium diphtheriæ* (Mitis). La photographie 9 représente une souche ancienne de cette bactérie observée dans le porte-objet spécial.

Enfin les photographies 10 et 11 concernent *Bacillus Subtilis*; l'une est prise sur un porte-objet usuel, l'autre dans la nouvelle cellule porte-objet.

Ce travail a été effectué avec la collaboration du Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Toulouse (Service de M. le Professeur Andrieu), qui nous a secondés dans cette tâche en nous fournissant le matériel à étudier, en indiquant à nos techniciens les précautions indispensables et en vérifiant par des méthodes éprouvées la survivance des bactéries examinées. Nous exprimons à M<sup>me</sup> Enjalbert notre particulière gratitude.

Nous comptons observer prochainement les étapes de la vie d'une bactérie en prenant des photographies à des intervalles de temps réguliers, et pendant plusieurs heures.

La méthode que nous avons mise au point permettra, sans doute, de mener à bien de nombreuses recherches d'un grand intérêt en Biologie et en Médecine.

*Remarques de M. LOUIS DE BROGLIE au sujet de la Note précédente.*

Il est naturel que je prenne un instant la parole après la magnifique Communication de M. Dupouy. M. Dupouy m'avait communiqué, il y a quelques jours, le texte de cette Communication et les clichés qui l'accompagnent. En en prenant connaissance, j'ai ressenti une grande admiration et un très vif enthousiasme. Le travail de M. Dupouy n'a pu être réalisé qu'au prix d'une extrême ingéniosité et seul un virtuose de la microscopie électronique tel que lui pouvait le mener à bien. Déjà de remarquables résultats sont obtenus. On va pouvoir, grâce à ce dispositif, mettre en évidence des détails de la structure des bactéries et même suivre leur évolution au cours du temps. Le travail de M. Dupouy me paraît d'une importance capitale et me semble ouvrir des domaines entièrement nouveaux à la Microscopie électronique et à ses applications biologiques ou microbiologiques.

(Laboratoire d'Optique électronique du C. N. R. S., Toulouse.)