

Institut d'Histologie et Embryologie de la Faculté de Médecine de Lisbonne (Portugal)
(Dir.: Prof. Dr. M. J. XAVIER MORATO)

L'ULTRASTRUCTURE DES PLAQUETTES SANGUINES

MISE EN ÉVIDENCE DU GLYCOGÈNE

Par

J. F. DAVID-FERREIRA* et KARIN DAVID-FERREIRA

Avec 7 Figures dans le Texte

(Reçu le 1 Février 1962)

Introduction

L'introduction de nouvelles méthodes de fixation (LUFT 1956; MOLLENHAUER 1959, 1960) d'inclusion (GLAUERT et GLAUERT 1958; BIRCH-ANDERSEN 1960; LUFT 1961) et de coloration (WATSON 1958a, 1958b) a permis récemment de grands progrès des techniques histologiques de la microscopie électronique. De ces progrès a résulté non seulement une amélioration des images obtenues mais aussi la mise au point de méthodes permettant la démonstration au microscope électronique du glycogène cellulaire. DROCHMANS (1960) a utilisé la coloration au permanganate de potassium pour étudier le glycogène isolé du foie par ultracentrifugation différentielle et pour mettre en évidence le glycogène dans les cellules hépatiques. MILLONIG et PORTER (1960) ont observé au microscope électronique cette substance sur des coupes de foie fixé à l'acide osmique à 1% (tampon phosphate) et sur des coupes colorées à l'hydroxyde de plomb. REVEL, NAPOLITANO et FAWCETT (1960) ont publié un travail sur l'identification du glycogène en plusieurs organes. Ces auteurs décrivent l'aspect du glycogène cellulaire avec des méthodes différentes de fixation (acide osmique, permanganate de potassium), d'inclusion (méthacrylate et Araldite) et de coloration (hydroxyde de plomb).

Au cours des recherches sur l'ultrastructure des plaquettes nous avons appliqué à l'étude de ces éléments quelques unes des nouvelles techniques. Les observations faites ont permis: la révision de l'ultrastructure des plaquettes, l'étude de la distribution du glycogène dans ces éléments, et une analyse des techniques employées.

Dans ce travail nous présentons les résultats obtenus.

Matériel et Méthodes

Les observations présentées dans ce travail ont été réalisées sur des coupes de plaquettes de sang humain normal.

Les plaquettes ont été isolées à partir de sang humain obtenu par ponction veineuse; immédiatement après son prélèvement le sang auquel on ajoute le 1/9 de son volume de citrate de sodium à 3,8% est centrifugé pendant 20 min à 500 tours minute. La couche de plasma surnageant est décantée et centrifugée de nouveau pendant 15 min à 4000 tours minute. Le culot est alors introduit dans le fixateur et après quinze minutes coupé en petits morceaux. La durée de la fixation a été d'une heure pour l'acide osmique à 1% tamponné à pH 7,2 et de deux heures pour le permanganate de potassium à 5% non tamponné.

* Boursier du Centre d'Études d'Histologie et Embryologie «Celestino da Costa» de l'Institut de Haute Culture.

Les inclusions ont été faites au méthacrylate de butyle selon la technique habituelle ou à l'Araldite 6005 selon la technique indiquée par la New York Society of Electron Microscopists.

Les coupes faites à l'ultramicrotome de Porter-Blum ont été recueillies sur des treillis couverts de formvar. Elles ont été observées sans coloration ou après coloration au permanganate de potassium ou à l'acétate d'uranyl. Pour la coloration au permanganate de potassium les treillis portant les coupes sont mises à flotter sur une solution de permanganate de potassium à 1% pendant 30 min. Ensuite elles sont rincées avec de l'eau distillée et lavées dans une solution d'acide citrique à 0,5% (LAWN 1960, ANDRÉ 1961) pendant 10 à 20 sec.

Pour la coloration à l'acétate d'uranyl les treillis portant les coupes sont mis à flotter sur une solution saturée d'acétate d'uranyl en alcool à 50° pendant 90 min ou davantage. Elles sont ensuite soigneusement lavées à l'eau distillée.

Les observations ont été faites au microscope RCA EMU 3 à 100 KW.

Observations

L'observation au microscope électronique des coupes de plaquettes sanguines montre que ces éléments sont formés par une substance fondamentale, finement granuleuse, le hyalomère, dans laquelle se trouvent dispersées formations variées dont l'ensemble constitue le granulomère plaquettaire. Le granulomère est formé par quatre types de granules: α , β , γ et δ (SCHULZ, JÜRGENS et HIEPLER 1958).

Le granulomère α est représenté par des granules ovalaires de 120 à 300 m μ de diamètre. Ces granules sont bien limités par une membrane et ont une matrice dense et homogène. Ils correspondent aux granulations azurophiles observées au microscope optique (RINEHART 1955; SURYASU et TAGESHIGE 1956; GOODMAN, REILY et MOORE 1957). L'ensemble des mitochondries forme le granulomère β . Elles sont peu nombreuses et petites (0,15 à 0,20 μ). Comme affirment FEISSLY et coll. (1960) leur petite taille *« doit être mise en rapport avec le faible taux respiratoire des plaquettes »*. Le granulomère γ est constitué par des microvésicules, des tubules et des vacuoles qui constituent les *éléments clairs des plaquettes* selon la désignation de FEISSLY, GAUTHIER et MARCOVICI (1960).

Le granulomère δ , que nous n'avons jamais observé, est constitué selon SCHULZ et coll. (1958) par des granules identiques aux cytosomes. Ces granules possèdent à l'intérieur des corpuscles très denses de 55 Å de diamètre dont l'aspect est identique à celui de la ferritine.

Outre ces formations, déjà décrites par plusieurs auteurs, nous avons identifié dans la substance fondamentale des plaquettes du sang humain normal deux autres types de formations: a) des granules allongés dont la forme rappelle une baguette de tambour; b) des grains denses dont les dimensions sont généralement inférieures à 200 Å.

Les granules en baguette de tambour (Figs. 1 et 2) sont limités par une membrane et sont allongés (environ 1 μ de longueur sur 500—2000 Å de largeur). Une de leurs extrémités ou parfois les deux sont dilatées ou bien présentent une forme lancéolée. La densité de leur matrice est identique à celle des granules α . On n'observe pas ces granules dans toutes les plaquettes; quand ils existent on en compte 1 à 2 par plaquette.

Les grains denses observés dans la substance fondamentale ont des dimensions variables mais généralement inférieures à 200 Å. Avec les techniques habituelles, fixation à l'acide osmique et inclusion au méthacrylate, l'aspect et la quantité de ces grains est très variable d'une préparation à l'autre. Abondants dans quelques

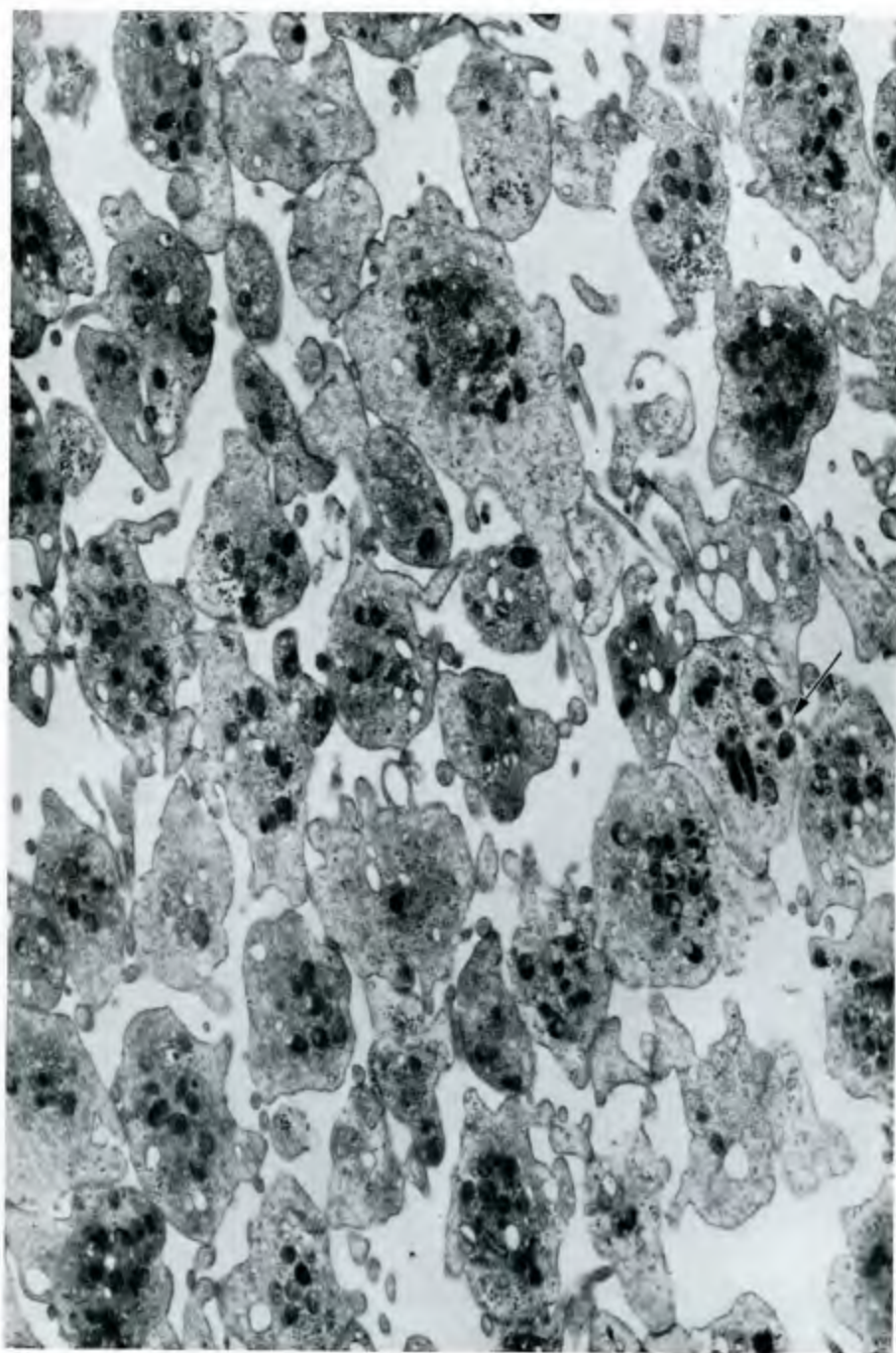


Fig. 1. Plaquettes sanguines humaines. Fixation au tetroxyde d'osmium, inclusion au méthacrylate, coloration à l'acétate d'uranyl. On peut reconnaître les différents éléments qui forment le granulomère.

Signalée par une flèche plaquette sanguine contenant deux granules en baguette de tambour.

Gross. 11 000 \times

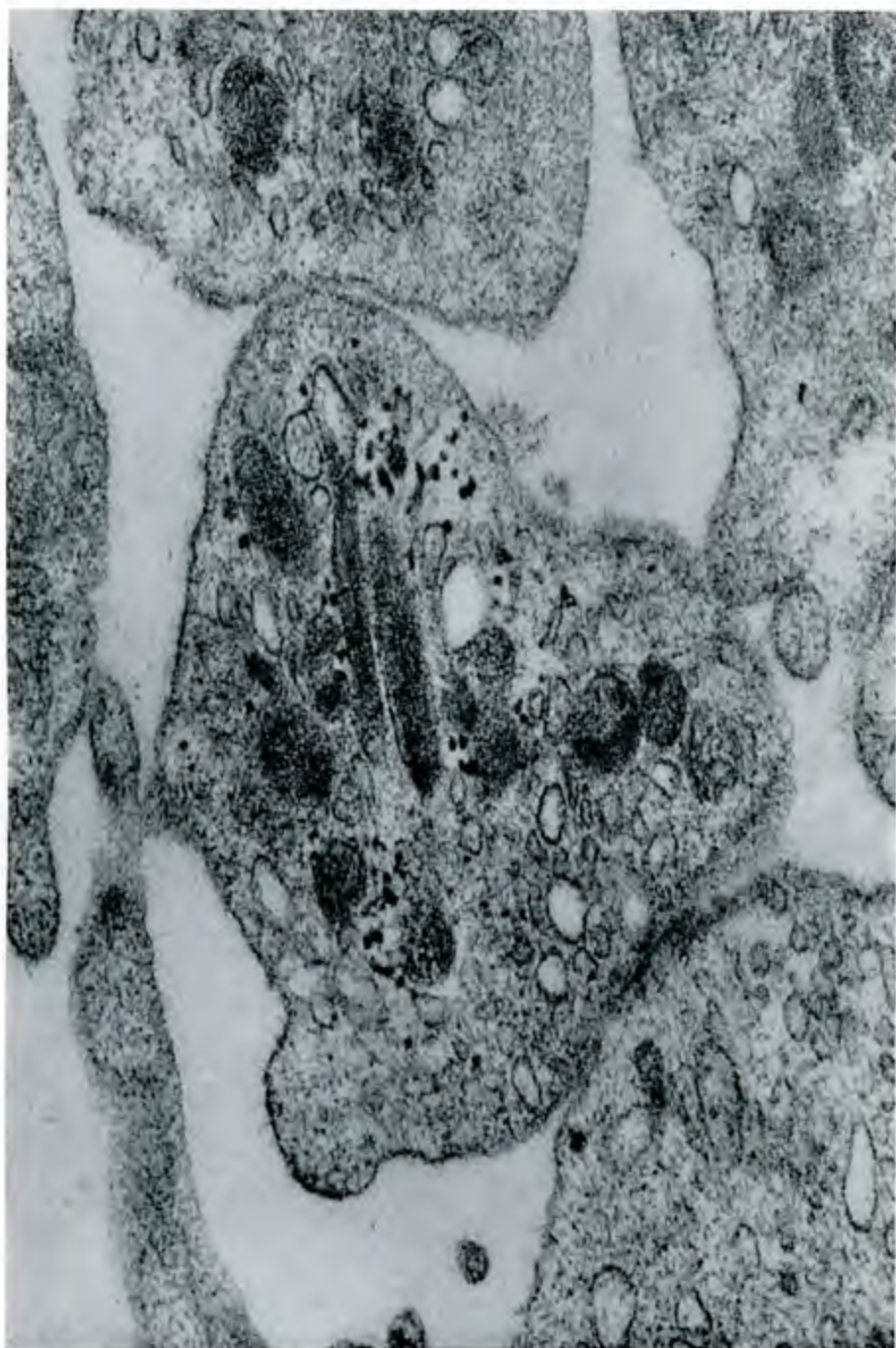


Fig. 2. Plaquette sanguine humaine. Même technique que dans la figure antérieure. Parmi les constituants habituels on observe deux granules en bagnette de tambour et des grains denses de 190 Å.
Gross. 76 000 ×

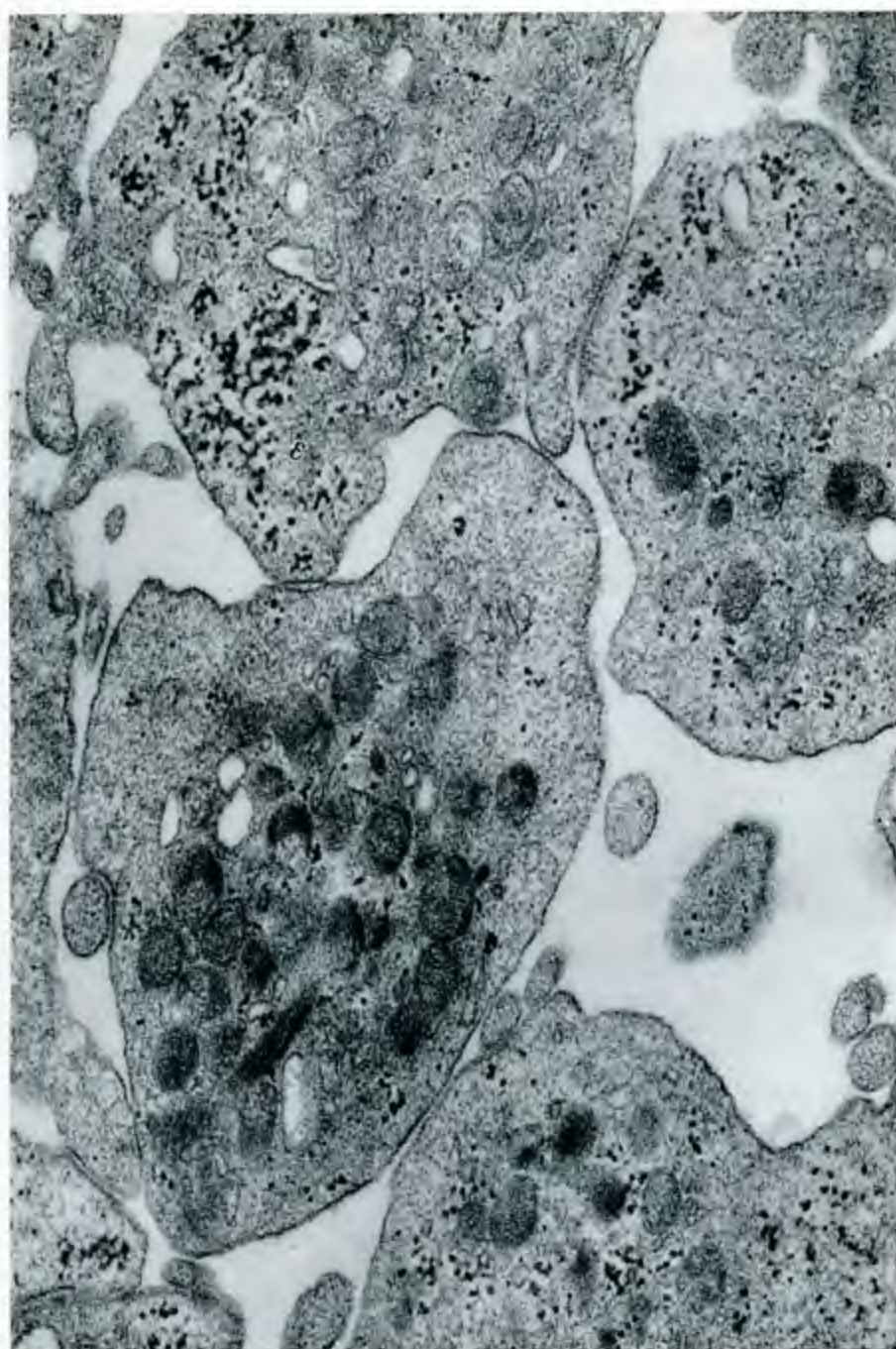


Fig. 3. Plaquettes sanguines humaines. Même technique que dans la figure antérieure. On peut voir de nombreux grains de 180 à 200 Å isolés ou formant des rosaires (*). Gross. 44 200 ×

unes, ils sont presque absents dans d'autres. Ils sont peu denses et fréquemment se concentrent dans des zones où la substance fondamentale de la plaquette est

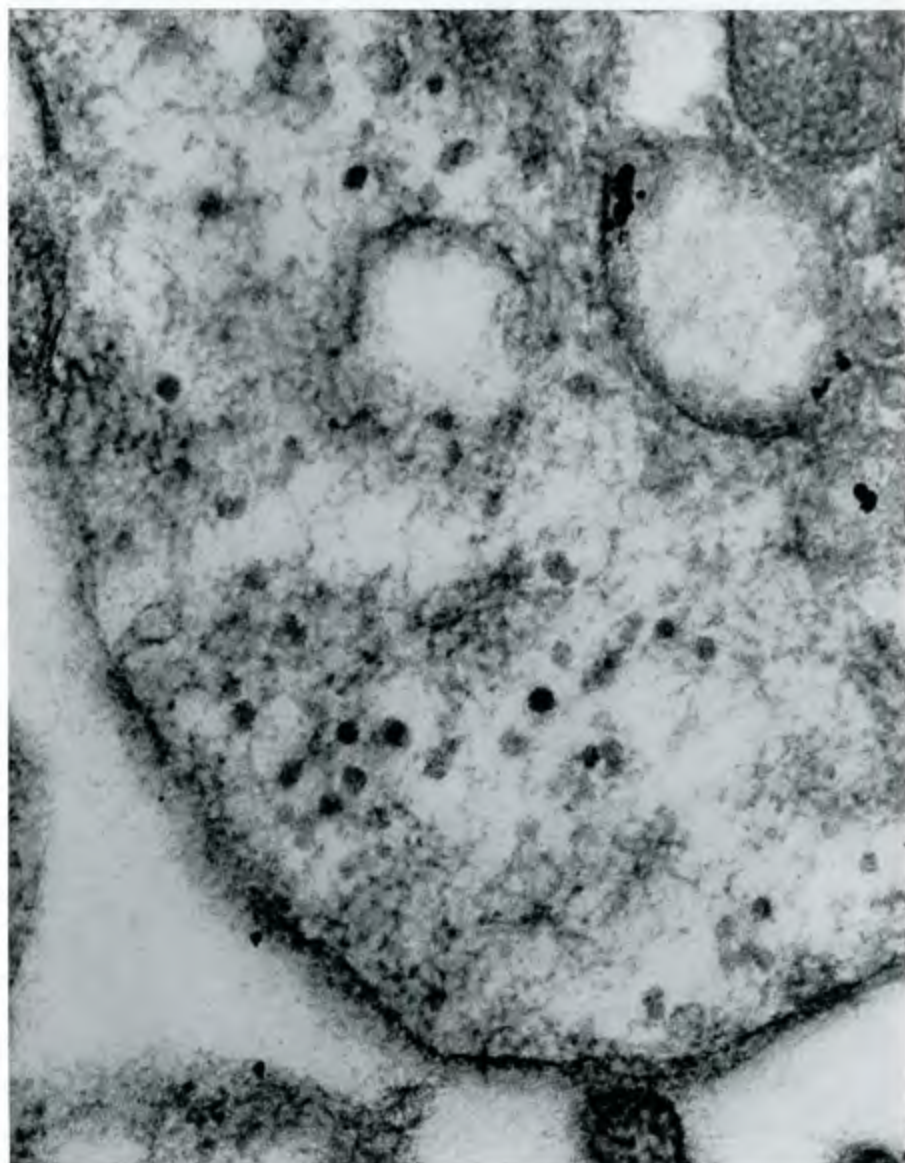


Fig. 4. Plaquette sanguine humaine. Même technique que dans la figure antérieure. Dans le hyalomère on voit des grains denses de 190 Å, à l'intérieur des particules denses de 30 Å. Gross. 139000 \times .

moins dense. Ils se réunissent souvent par leurs extrémités constituant des rosaires ramifiés.

Dans les plaquettes fixées et incluses selon la même technique mais dont les coupes ont été colorées à l'acétate d'uranyl ou au permanganate de potassium ces grains ont le même aspect et la même distribution mais leur densité est beaucoup

plus grande (Fig. 3). A des forts grossissements on observe à leur intérieur des particules denses de 30 Å (Fig. 4). Avec cette technique les résultats ne sont pas

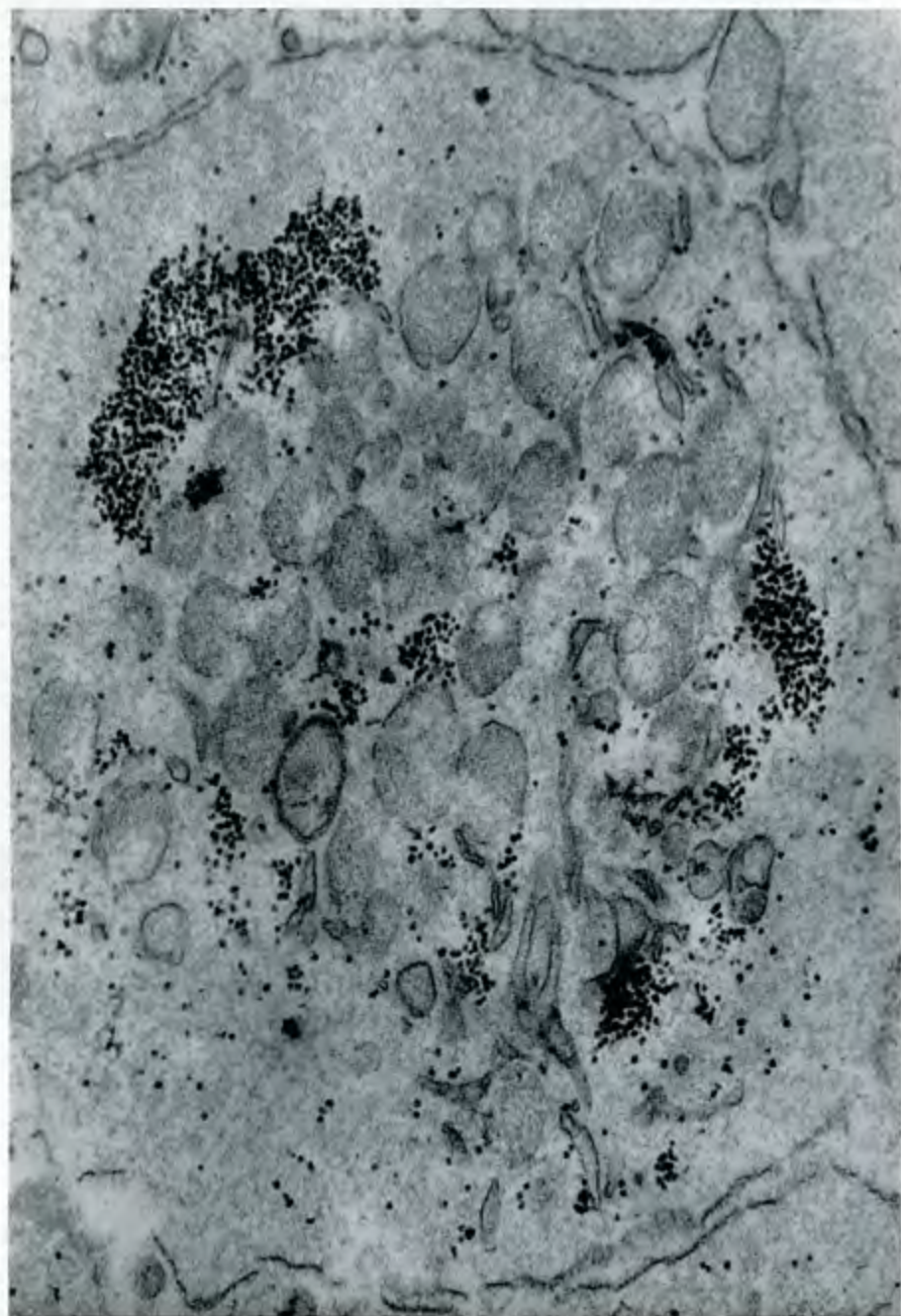


Fig. 5. Plaquette sanguine humaine. Fixation au permanganate de potassium, inclusion à l'Araldite, coloration à l'acétate d'uranyl. Des grains de 180 à 200 Å (glycogène) se trouvent dispersés ou forment des agrégats dans le hyalomère. Gross. 45 000 ×

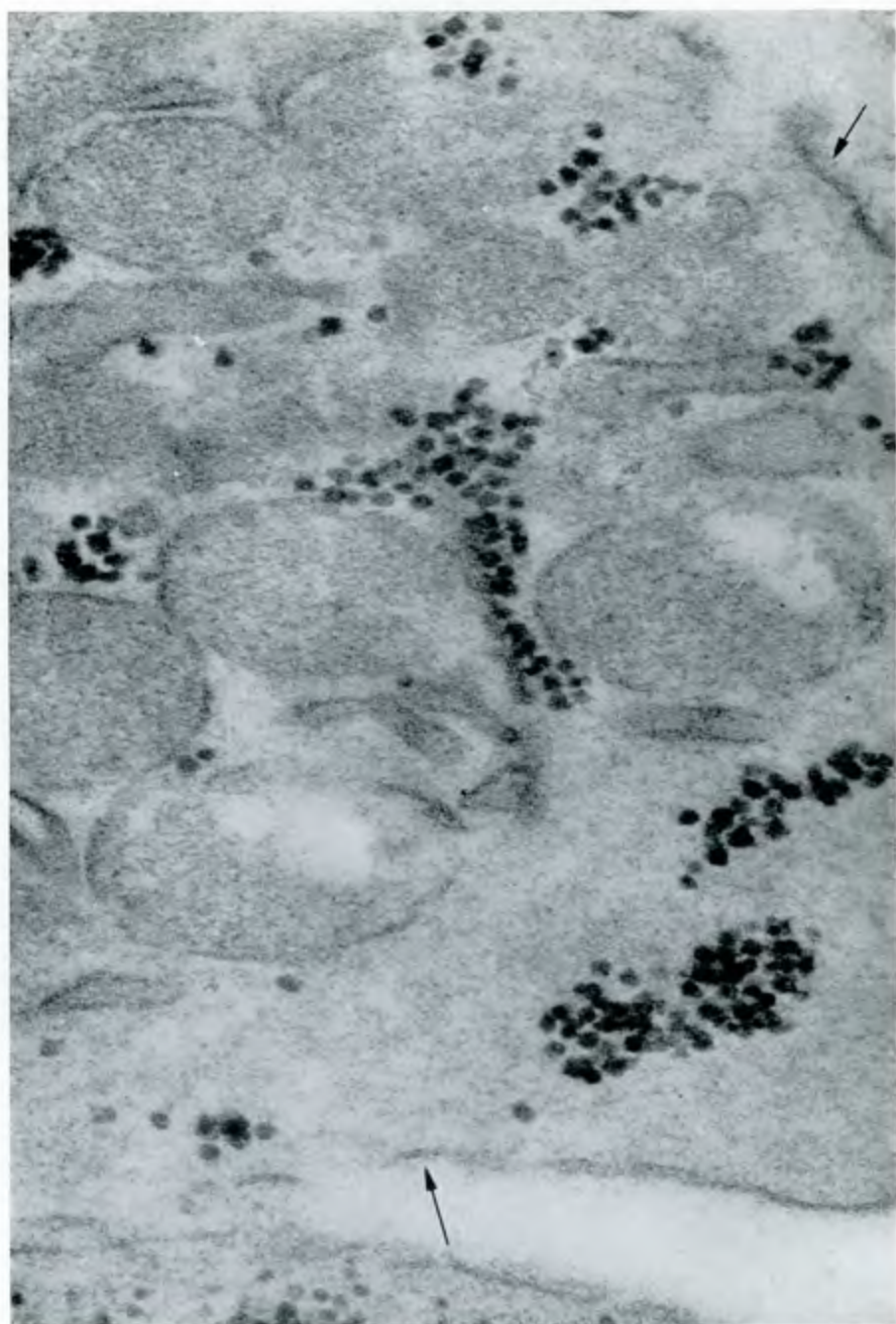


Fig. 6. Plaquette sanguine humaine. Même technique dans la figure antérieure. Entre les granules α dont la matrix est peu dense et homogène, on voit des grains de 180 à 200 Å. On peut reconnaître les trois lamelles de la membrane plaquettaire (↑). Gross. 126 000 \times .

non plus constants. Dans certaines préparations presque toutes les plaquettes présentent des zones contenant de grandes quantités de ces grains, tandis que d'autres traitées de la même façon en sont complètement dépourvues.

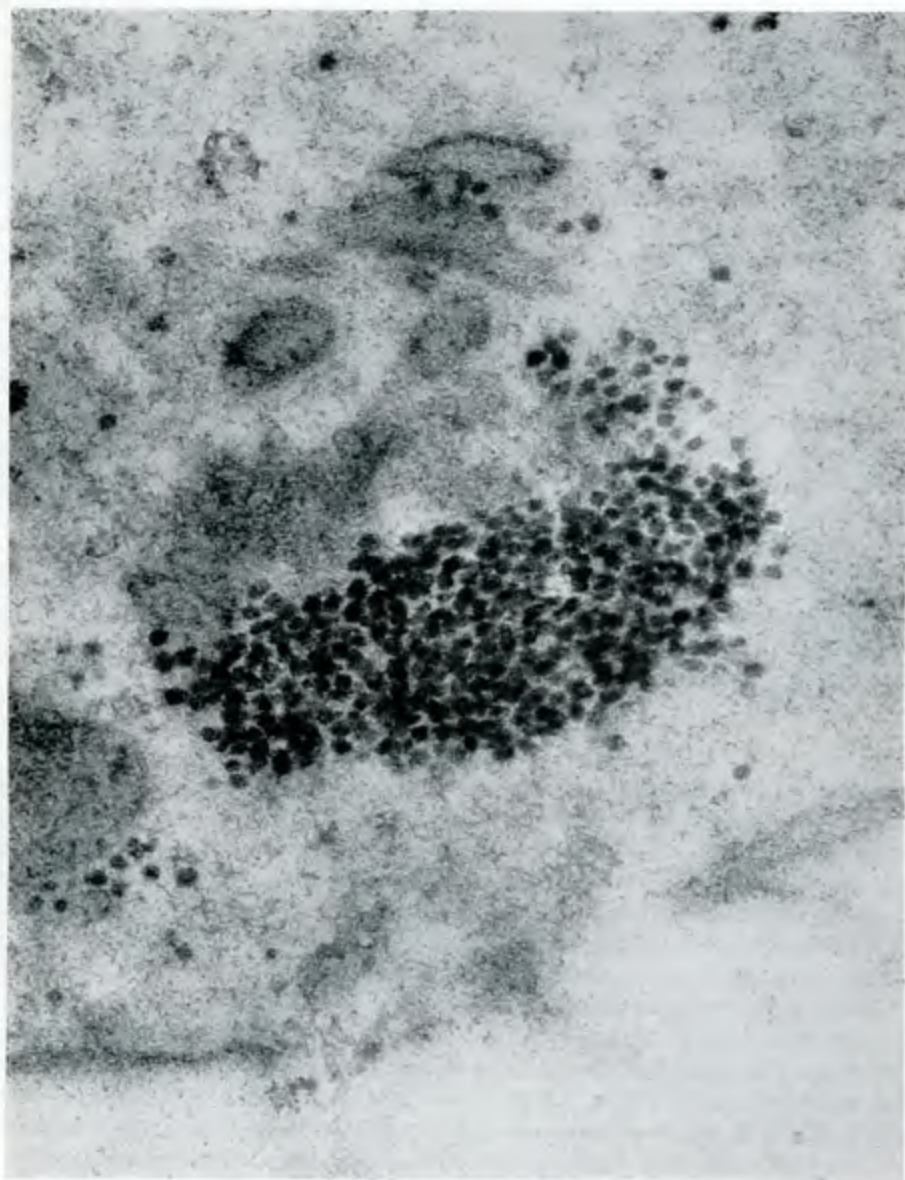


Fig. 7. Plaquette sanguine humaine. Même technique que dans la figure antérieure. Agrégat de plusieurs centaines de grains (glycogène). Gross. 126 000 \times

Par contre leur observation est constante dans les coupes de plaquettes fixées au permanganate de potassium, incluses à l'Araldite et colorées à l'acétate d'uranyl. Avec cette technique leur aspect est aussi plus régulier (Fig. 5). Les grains sont

ronds, très denses, indépendants les uns des autres, et ont un diamètre de 180 à 200 Å. Souvent à l'intérieur de ces grains on reconnaît des particules plus denses. Ces grains se distribuent dans le hyalomère de la plaquette de deux façons: a) en petits groupes, entre les éléments du granulomère (Fig. 6); b) sous forme d'agrégats de plusieurs centaines de grains qui souvent occupent les régions périphériques de la plaquette (Fig. 7).

Les caractéristiques morphologiques des grains cités ci-dessus sont identiques à celles des grains de glycogène mis en évidence dans différents organes par plusieurs auteurs et par d'autres méthodes (DROCHMANS 1960a, 1960b; MILLONIG et PORTER 1960; REVEL et coll. 1960).

Jusqu'à présent nous n'avons jamais observé de rapport entre ces grains et les constituants du granulomère.

Les résultats que nous avons obtenus avec l'association du permanganate de potassium, Araldite et acétate d'uranyl ont été toujours satisfaisants. Les structures plaquettaires sont régulières et nettement dessinées. La membrane plaquettaire est bien contrastée, et a environ 78 Å d'épaisseur. Très souvent, avec cette technique la membrane présente des interruptions irrégulières. Aux forts grossissements on voit qu'elle est constituée par trois lamelles: deux lamelles denses séparées par une lamelle (moyenne) moins dense (Fig. 6). A l'extérieur de la membrane plaquettaire nous n'avons jamais observé aucune couche identifiable à l'atmosphère plasmatique périplaquettaire de ROSKAM.

La substance fondamentale, le hyalomère, est homogène. Les membranes des constituants du granulomère γ sont denses et bien dessinées. La membrane des granules α est nette elle aussi mais la matrice de ces granules est moins dense que dans les coupes de plaquettes fixées à l'acide osmique.

Discussion

Dans un travail antérieur (DAVID-FERREIRA 1961) nous avons décrit dans les plaquettes du sang humain des grains denses de 230 Å, sur la nature desquels nous ne nous sommes pas prononcé. L'aspect et les dimensions de ces grains nous ont amené à la conclusion qu'ils étaient différents des grains décrits par BERNHARD et LEPLUS (1955) et par PEASE (1956) et identifiés par ces auteurs comme étant des grains de PALADE. Nous avons aussi conclu qu'ils étaient différents des grains de «liberalisierte α -substanz» signalés par SCHULZ (1960). Les observations présentées dans ce travail démontrent que les grains de 180 à 200 Å, dispersés ou agroupés dans le hyalomère des plaquettes, présentent les caractéristiques des grains de glycogène décrits dans le foie et d'autres organes par plusieurs auteurs (DROCHMANS 1960a, 1960b; MILLONIG et PORTER 1960; REVEL et coll. 1960). Ils sont peu denses dans les préparations non colorées de matériel fixé au tétr oxyde d'osmium. Dans les préparations de matériel inclus au méthacrylate souvent ils adhèrent les uns aux autres et forment des rosaires ramifiés (Fig. 3). Dans les préparations de matériel fixé au permanganate de potassium et inclus à l'Araldite ils sont toujours indépendants les uns des autres (Fig. 5). Leur distribution dans la substance fondamentale de la plaquette est de deux types: en petits groupes dispersés entre les organoïdes cellulaires (Fig. 6) ou en agrégats de plusieurs centaines de grains dans certaines zones du hyalomère (Fig. 7).

A l'aide de différentes réactions histochimiques plusieurs auteurs ont cherché à identifier au microscope optique le glycogène, dans les plaquettes sanguines. Les résultats sont contradictoires. Selon WISLOCKI et DEMPSEY (1946) et REINGOLD et WISLOCKI (1948) les plaquettes n'en possèdent pas. Au contraire, pour BIANCHINI et BERTELLI (1954), GUDE et coll. (1955) et pour VERCAUTEREN (1955), une partie des polysaccharides des plaquettes correspond au glycogène. Au cours de ce travail nous avons essayé sur des frottis de plaquettes la réaction de MAC-MANUS. Avec cette réaction nous avons observé au microscope optique dans les plaquettes soit une coloration diffuse du hyalomère soit, dans quelques plaquettes, des granules intensément colorés. Après digestion salivaire on n'observe pas la réaction colorée. Ces observations sont d'accord avec celles réalisées au microscope électronique. Il est probable que les plaquettes qui montrent une coloration diffuse correspondent à celles qui au microscope électronique présentent des grains isolés dispersés dans le hyalomère, tandis que les granules colorés observés dans quelques plaquettes correspondent probablement aux agrégats granulaires que nous avons observés au microscope électronique.

En ce qui concerne l'observation au microscope électronique des petits grains denses dans le hyalomère plaquettaire les résultats sont contradictoires. Après fixation au tetroxyde d'osmium et inclusion au méthacrylate certains auteurs signalent des grains de 150 Å, d'autres nient leur existence. D'après nos observations ces différences d'opinion résultent de la variabilité des résultats après la fixation au tetroxyde d'osmium. En effet avec l'emploi des techniques habituelles l'observations de ces grains n'est pas constante. Il est probable que les grains signalés dans les plaquettes par BERNHARD et LEPLUS (1955) et par PEASE (1956) correspondent aux grains de glycogène que nous avons mis en évidence. A l'époque où ces auteurs ont étudié les plaquettes l'identification au microscope électronique du glycogène n'était pas encore possible.

Quelques caractéristiques des grains de «liberalisierte α -substanz» signalées par SCHULZ (1960) sont identiques à celles que nous avons observées avec les mêmes techniques (acide osmique, méthacrylate) dans les grains de glycogène. Nous n'avons pas jusqu'à présent observé de rapport entre les grains de glycogène et les granules α comme il a été signalé à propos des grains de «liberalisierte α -substanz».

Dans les plaquettes de malades atteints de la thrombopathie de WILLEBRAND-JÜRGENS, SCHULZ et coll. (1958) ont décrit un type spécial de granules dont la forme rappelle une baguette de tambour («*Trommelschlegelgranula*»). Selon les observations de ces auteurs, ces granules, dont le nombre par plaquette est variable, ne se rencontrent jamais dans les plaquettes d'individus normaux et sont caractéristiques de la thrombopathie de WILLEBRANDT-JÜRGENS, SCHULZ et coll. (1958) admettent même que les granules en baguette de tambour sont l'expression morphologique de l'altération génétique qui est à la base de la maladie.

Plus récemment JEAN (1961) a signalé des granules en baguette de tambour dans les plaquettes d'un cas de thrombopathie de WILLEBRANDT-JÜRGENS, dans celles de quatre patients atteints de thromboasthénie et dans un cas de réticulo-endothéliose. Selon cet auteur on ne peut pas considérer les granulations en baguette de tambour pathognomoniques de la maladie de WILLEBRANDT-JÜRGENS.

Comme nous l'avons décrit, on observe fréquemment dans les plaquettes du sang des individus normaux des granules identiques à ceux signalés par ces auteurs. Ce fait permet de conclure que ces granules ne sont caractéristiques d'aucune de ces maladies mais nous ne pouvons pas nier que leur nombre soit plus grand dans les plaquettes de quelques uns de ces malades.

Comme nous l'avons signalé au chapitre des observations, l'ultrastructure de la membrane des plaquettes sanguines est identique à celle des membranes cellulaires. Nous n'avons jamais reconnu à l'extérieur de la membrane des plaquettes l'existence d'une couche que l'on pourrait identifier comme l'*atmosphère plasmatique périplaquettaire* de ROSKAM, mais en principe on pourra admettre que les techniques employées en microscopie électronique ne sont pas les plus indiquées pour mettre en évidence cette atmosphère.

Récemment encore l'existence de l'atmosphère périplaquettaire a été admise par SALMON (1958, 1960) pour expliquer un certain nombre de phénomènes. Selon cet auteur «*les plaquettes humaines sont capables d'adsorber de façon tenace une protéine en présence de laquelle elles sont incubées*» et il a conclu que ces expériences «*apportent une nouvelle preuve en faveur de la notion selon laquelle l'atmosphère plasmatique périplaquettaire serait constituée de protéines adsorbées à la surface des thrombocytes*». Après la démonstration du pouvoir phagocytaire des plaquettes (DAVID-FERREIRA 1960, 1961) confirmé postérieurement par SCHULZ (1961) des expériences comme celles réalisées par SALMON (1958, 1960) peuvent avoir une autre explication. On pourra admettre que par pinocytose ou phagocytose, les plaquettes incorporeront les protéines avec lesquelles elles sont incubées. Cette incorporation expliquerait également la façon tenace dont ces protéines sont liées aux plaquettes.

Quand on emploie le permanganate de potassium comme fixateur on observe souvent des interruptions de la membrane des plaquettes. Nous avons interprété ces interruptions comme des artefacts. En effet, le pH de la solution de permanganate de potassium employée étant d'environ 8-9, ces interruptions peuvent être expliquées selon BAYER (1960) comme une altération artificielle provoquée par l'action du fixateur. Cet auteur, qui a étudié l'action du permanganate sur la membrane des érythrocytes, a conclu que le pH de la solution est important pour la conservation de la membrane cellulaire. Il a vérifié que la structure typique de la membrane est observée uniquement à partir de pH 4-5. Quand le permanganate de potassium utilisé possède un pH d'environ 8-9, la cellule gonfle et la membrane présente des interruptions. Il semble qu'après fixation au permanganate de potassium la membrane cellulaire reste très fragile.

De nos observations nous pouvons conclure que l'association de la fixation au permanganate de potassium, à l'inclusion à l'Araldite et à la coloration à l'acétate d'uranyl constitue une technique très utile pour l'étude des plaquettes sanguines. La substance fondamentale de ces éléments est bien conservée et les systèmes de membranes bien dessinés et très contrastés. D'une façon générale les détails cellulaires sont très fins au contraire de ce qu'on observe dans les préparations fixées au tetroxyde d'osmium et colorées à l'acétate d'uranyl ou au permanganate de potassium.

Pour la mise en évidence du glycogène cellulaire cette association est très efficace. Les grains de glycogène sont denses et indépendants les uns des autres

(Fig. 5, 6 et 7). Les résultats obtenus sont identiques à ceux de REVEL et coll. (1960) après l'emploi de l'hydroxyde de plomb.

Nous ne possédons pas encore une grande expérience des méthodes utilisant des sels de plomb comme colorants; toutefois après leur emploi, nous avons toujours observé des précipités sur les coupes. Au contraire avec la coloration à l'acétate d'uranyl, plus facile à réaliser, les précipités sont plutôt rares. Les résultats obtenus avec ces deux méthodes étant pratiquement les mêmes, pour la mise en évidence du glycogène, il nous semble que, dans ce but la technique de coloration à l'acétate d'uranyl possède de gros avantages sur les techniques de coloration utilisant les sels de plomb.

Résumé

L'ultrastructure des plaquettes a été étudiée à l'aide de différentes techniques de fixation, d'inclusion et de coloration.

L'association de la fixation au permanganate de potassium, à l'inclusion à l'Araldite et à la coloration à l'acétate d'uranyl s'est montrée très utile pour l'étude de ces éléments du sang.

Avec cette méthode nous avons mis en évidence le *glycogène* des plaquettes. Cette substance se présente sous l'aspect de grains de 180 à 200 Å, très denses, très abondants, dispersés ou formant des agrégats de plusieurs centaines de grains dans la substance fondamentale.

Selon les observations réalisées, la membrane des plaquettes est identique aux membranes cellulaires. Nous n'avons reconnu à l'aide des différentes techniques employées, aucune couche que l'on puisse identifier à l'atmosphère plasmique périplaquettaire de ROSKAM. Nous avons admis que certains phénomènes dont l'explication reposait sur l'existence de cette «*atmosphère*» peuvent être expliqués par la capacité phagocytaire des plaquettes.

Dans le granulomère des plaquettes de sang humain normal nous avons observé des granules en baguette de tambour que nous admettons pouvoir être des constituants normaux des plaquettes.

Bibliographie

- ANDRÉ, J.: Sur quelques détails nouvellement connus de l'ultrastructure des organites vibratiles. *J. ultrastruct. Res.* **5**, 86—108 (1961).
- BAYER, M. E.: Elektronenoptische Untersuchungen an der Membran des Erythrocyten. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **270**, 323—331 (1961).
- BERNHARD, W., et R. LEPLUS: La méthode des coupes ultrafines et son application à l'étude de l'ultrastructure des cellules sanguines. *J. suisse Méd.* **85**, 897—907 (1955).
- BIANCHINI, E., et G. BERTELLI: Comportamento istochimico dei polisaccaridi nelle piastrine dell'uomo normale ed in varie Emopatie. *Quaderni coagulazione* (V. Baldacci) **2**, 29—38 (1954).
- BIRCH-ANDERSEN, A.: The use of epoxy resins as embedding media for electron microscopy. *Proc. 4th. Internat. Conf. Electr. Micr.*, vol. 2, p. 44—52. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- DAVID-FERREIRA, J. F.: Démonstration du pouvoir phagocytaire des plaquettes sanguines chez le lapin. *Proc. European Regional Conf. Electr. Micr.* Delft **2**, 917—920 (1960).
- Sur la structure et le pouvoir phagocytaire des plaquettes sanguines. *Z. Zellforsch.* **55**, 89—103 (1961).
- DROCHMANS, P.: Mise en évidence du glycogène. *Proc. European Regional Conf. Electr. Micr.* Delft **2**, 645—649 (1960a).

- DROCHMANS, P.: Mise en évidence du glycogène dans la cellule hépatique par microscopie électronique. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 553—558 (1960b).
- FEISSLY, R., A. GAUTHIER et I. MARCOVICI: L'ultrastructure des thrombocytes du sang humain normal. *Proc. 4th Internat. Conf. Electr. Micr.*, vol. 2, p. 261—263. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- GLAUERT, A. M., and R. H. GLAUERT: Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 191—194 (1958).
- GOODMAN, J. R., E. B. REILLY and R. F. MOORE: Electron microscopy of formed elements of normal human blood. *Blood* **12**, 428—443 (1957).
- GUDE, W. D., T. T. ODELL and A. C. UPTON: A cytochemical study of human and rat platelets. *Anat. Rec.* **121**, 303, Abstr. (1955).
- JEAN, G.: Thrombocytes et thrombopathies. *Experientia (Basel)* **17**, 428—429 (1961).
- LAWN, A. M.: The use of potassium permanganate as an electron dense stain for sections of tissue embedded in epoxy resin. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 197—198 (1960).
- LUFT, J. H.: Permanganate, a new fixative for electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 799—801 (1956).
- Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 409—414 (1961).
- MANCINI, R. E., et R. C. BARRY: Estudio critico del glucógeno en los leucocitos. *Rev. Soc. argent. Biol.* **17**, 499—511 (1941).
- MILLONIG, G., and K. R. PORTER: Structural elements of rat liver cells involved in glycogen metabolism. *Proc. European Regional Conf. Electr. Micr. Delft* **2**, 655—659 (1960).
- MOLLENHAUER, H. H.: Permanganate fixation of plant cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 431—436 (1959).
- PEASE, D.: An electron microscopic study of red bone marrow. *Blood* **11**, 501—526 (1956).
- REVEL, J. P., L. NAPOLITANO and D. W. FAWCETT: Identification of glycogen in electron micrographs of thin sections. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 575—589 (1960).
- RHEINGOLD, J. J., and G. B. WISLOCKI: Histochemical methods applied to hematology. *Blood* **3**, 641—655 (1948).
- RINEHART, J. F.: Electron microscope studies of sectioned white blood cells and platelets. *Amer. J. clin. Path.* **25**, 605—619 (1955).
- SALMON, J.: Recherches immunologiques sur l'existence d'une atmosphère plasmatique entourant les plaquettes humaines. *Proc. of VIIIth. International Congr. of the Int. Soc. Hemat. (Rome)* **2**, 1—9 (1958).
- Absorption of proteins by blood platelets. *Experientia (Basel)* **16**, 26—27 (1960).
- SCHULZ, H.: Submikroskopischer Beitrag zur Orthologie und Pathologie der Thrombocyten. *Verh. der Dtsch. Ges. für Inn. Medizin (66. Kongreß)*, S. 832—848. München: Bergmann 1960.
- Über die Phagozytose von kolloidalem Siliziumdioxid durch Thrombozyten mit Bemerkungen zur submikroskopischen Struktur der Thrombozytenmembran. *Folia haemat. (N. F.)* **5**, 195—205 (1961).
- R. JÜRGENS u. E. HIEPLER: Die Ultrastruktur der Thrombozyten bei der konstitutionellen Thrombopathie (V. WILLERRANDT-JÜRGENS) mit einem Beitrag zur Submikroskopischen Orthologie der Thrombozyten. *Thromb. Diath. haemat.* **2**, 300—323 (1958).
- SUEYASU, T., and Y. TAGESHIGE: Electron microscopic study on the blood platelets of the rabbit. *Kurume med. J.* **3**, 114—128 (1956).
- VERCAUTEREN, R.: On the cytochemistry of Leucocytes. *Verh. van De Koninklike Vlaamse Acad. voor Geneeskunde van België* **17**, 263—323 (1955).
- WATSON, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 475—478 (1958a).
- Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 727—730 (1958b).
- WISLOCKI, G. B., and E. W. DEMPSEY: Observations on the chemical cytology of normal blood and hemopoietic tissues. *Anat. Rec.* **96**, 249—278 (1946).

Dr. J. F. DAVID-FERREIRA, Laboratório de Microscopia Electrónica
C. Gulbenkian, Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de
Medicina, Lisboa, Portugal