

pince de Cornet; sans quoi, lors du mordantage suivant, l'encre de fuchsine s'écoulerait sous la lamelle et le long de la pince. — Colorer en versant la fuchsine de Ziehl à la surface de la préparation et en chauffant une ou deux fois pendant un quart de minute. — Laver une dernière fois à l'eau et examiner dans ce liquide. — Si la coloration est réussie, faire sécher la lamelle et monter dans le baume au xylol.

V. — Recherche des microbes dans les coupes de tissus.

La coloration des coupes constitue un des points les plus importants de la technique bactériologique : c'est grâce à ce procédé que nous pouvons reconnaître la présence et le siège des microorganismes dans les divers tissus, et nous rendre compte des lésions qu'ils y provoquent.

Les coupes se colorent par deux sortes de méthodes :

1° Les méthodes de coloration simple : toute la préparation est uniformément colorée, mais les microbes tranchent sur le tissu par une teinte plus vive ;

2° Les méthodes de double coloration : les microbes sont teints d'une couleur, le fond d'une autre couleur.

La technique de la manipulation des coupes diffère légèrement suivant que la coupe a été faite par un procédé ou par un autre : les deux sortes de microtomes auxquels nous donnons la préférence sont :

a) Le microtome à congélation ;

b) Le microtome à la paraffine.

Toute pièce destinée à être coupée pour l'examen bactériologique doit être, aussitôt après l'autopsie, débitée en petits fragments cubiques d'un demi-

centimètre de côté au plus, et les fragments doivent être placés dans l'alcool absolu : il faut se servir à cet effet de flacons étroits et élevés, de telle façon que les fragments soient recouverts d'une haute couche d'alcool.

A. PRÉPARATION, COLORATION ET MONTAGE DES COUPES FAITES AU MICROTOME A CONGÉLATION (1).

PRÉPARATION. — La pièce ayant séjourné au moins vingt-quatre heures dans l'alcool absolu, on la place pendant vingt-quatre heures dans une solution de gomme *stérilisée* ; la gomme s'infiltré dans toutes les mailles et les anfractuosités du tissu : elle formera, pour ainsi dire, une charpente intérieure, qui donnera de la fermeté au tissu. Lorsque la pénétration de la gomme est suffisante, la pièce tombe au fond du vase qui contient la solution.

La pièce gommée est portée sur le microtome où elle est coupée d'après la technique spéciale à l'instrument, technique que nous n'avons pas à rappeler ici.

Les coupes sont reçues dans un cristalliseur rempli d'eau distillée : on les laisse dégommer pendant une heure. On les transporte ensuite avec la palette de platine dans l'alcool absolu, où on les laisse se déshydrater pendant une heure.

Les coupes sont alors prêtes pour la coloration (2).

(1) Nous traitons ici de la technique avec le microtome à congélation. On rapportera aisément cette technique aux coupes faites avec tout autre microtome automatique, ou avec le microtome à main (le microtome à paraffine excepté).

(2) On peut avec le microtome à congélation faire des coupes de pièces fraîches ; on congèle la pièce sur le microtome, on la coupe,

COLORATION ET MONTAGE DES COUPES. — 1. *Coloration simple par la méthode de Löffler.* — Immergez la coupe dans une solution fraîche et filtrée de bleu Löffler pendant dix à quinze minutes. Décolorez rapidement dans de l'eau distillée, contenant une ou deux gouttes d'acide acétique pour le contenu d'un verre de montre.

Montez alors la coupe : cette opération se fait de la façon suivante : Portez la coupe à l'aide de la palette de platine dans un cristalliseur rempli d'eau distillée; prenez une lame bien essuyée, plongez-la *obliquement* de la main gauche dans le cristalliseur, et avec une aiguille amenez doucement la coupe sur la lame, et placez-la de façon qu'elle ne fasse aucun pli. Enlevez la lame chargée de la coupe; déshydratez par l'alcool absolu. Séchez et fixez la coupe sur la lame à l'aide de feuilles de papier à cigarettes.

Éclaircissez alors à l'essence de girofles; enlevez l'excès d'essence par le xylol; laissez tomber sur la coupe une goutte de baume du Canada dissous dans le xylol, et recouvrez d'une lamelle bien propre. La goutte de baume s'étale et la coupe est montée.

On peut éclaircir la coupe avec l'essence de bergamote, ou l'huile de cèdre, et on peut monter dans la résine dammar.

Les microbes, dans cette méthode, se colorent en bleu foncé, les autres éléments en bleu pâle.

2. *Coloration au bleu de méthylène* (Kühne). — Laissez la coupe une demi-heure environ dans le bain colorant de bleu de méthylène phéniqué dont la formule a été donnée au chapitre VII.

Rincez à fond dans l'eau distillée; et plongez

et on la reçoit dans de l'eau distillée contenant 1 p. 100 de sel marin. Les coupes subiront ensuite les diverses méthodes de coloration.

dans le bain acidulé dont nous avons donné la formule, jusqu'à coloration bleu tendre. Enlevez l'acide par l'immersion dans la solution de carbonate de lithine dont la formule a été donnée également ci-dessus.

Placez dans l'eau distillée quelques minutes, passez à l'alcool absolu, et disposez dans un petit baquet contenant bleu de méthylène aniliné.

Ce bleu de méthylène aniliné s'obtient de la façon suivante : Broyez dans un mortier sans choc une *pointe de couteau* de bleu de méthylène, ajoutez 10 p. 100 d'huile d'aniline pure, et versez le tout dans un flacon sans filtrer. La solution dépose et se clarifie.

Pour l'usage versez quelques gouttes de cette solution dans un petit baquet contenant huile d'aniline pure.

Au sortir du bain dans le bleu de méthylène aniliné plongez dans l'huile d'aniline pure, laissez quelques minutes. Portez ensuite deux minutes dans une essence bien fluide, et enfin immergez dans le xylol à deux reprises consécutives en changeant le bain.

Amenez la coupe sur la lame porte-objet, mettez une goutte de baume ou de résine dammar et placez la lamelle.

« A première vue, dit Kühne, la méthode qui vient d'être décrite paraît toujours compliquée et peu pratique. Cependant on reviendra vite de cette opinion aussitôt qu'on se sera familiarisé avec la technique donnée. »

3. *Coloration simple par la thionine phéniquée de Nicolle.* — Faites agir la thionine une demi à une minute suivant les cas. Lavez à l'eau, déshydratez par l'alcool absolu et montez dans le baume après éclaircissement au xylol.

4. *Double coloration par la méthode de Orth.* —

Laissez la coupe quelques minutes dans le picromcarmin de Orth.

Traitez-la par la solution suivante :

Alcool à 70°.....	100 grammes.
Acide chlorhydrique.....	1 —

dont on dépose quelques gouttes dans un verre de montre. Le séjour de quelques secondes dans ce bain aide à la fixation du carmin.

Lavez à l'alcool à 90°.

Mettez alors dans le bain colorant, violet de gentiane, de méthyle, etc.

Après une demi-heure environ de séjour, décolorez par alcool absolu, ou huile d'aniline, jusqu'à ce que la teinte de carmin seule persiste. Lavez au xylol et montez.

Les bactéries apparaissent en violet sur un fond rouge.

5. *Double coloration par la fuchsine et le vert aniliné* (Kühne). — Déshydratez la coupe à l'alcool, colorez-la par la fuchsine phéniquée (liqueur de Ziehl et Kühne. Voy. ch. VII), pendant trois à cinq minutes. Rincez à l'eau, plongez un instant dans l'alcool et différenciez par le vert de méthyle aniliné. Ce vert de méthyle aniliné s'emploie et se prépare comme le *bleu de méthylène aniliné* dont nous avons parlé plus haut.

Le vert de méthyle aniliné sert ici à l'extraction de la fuchsine, « ce qui naturellement demande plus ou moins de temps suivant l'épaisseur de la coupe et l'intensité de la coloration. De très fines coupes sont différenciées en quinze minutes, des coupes plus épaisses demandent jusqu'à deux heures.

« Il n'est pas difficile de reconnaître le degré convenable de décoloration. Pour cela on passe la coupe dans l'essence et le xylol, et l'on voit si elle

a pris ou non la teinte du vert de méthyle. » Si cette dernière teinte est nette, montez aussitôt, sinon replongez jusqu'à bon effet dans le bain de vert aniliné.

Les bacilles ressortent très vivement en rouge sur fond bleu ou vert.

6. *Coloration double par la méthode de Gram et ses dérivés.*

a) *Méthode de Gram.* — Placez la coupe dans le violet de Gram pendant un quart d'heure, puis dans la solution iodo-iodurée une minute. Décolorez à fond dans l'alcool absolu.

Placez alors la coupe, pour obtenir la coloration du fond, dans une solution hydroalcoolique faible d'éosine, de brun de Bismarck, de vésuvine, ou dans le picromcarmin de Orth, pendant deux ou trois minutes.

Montez par le procédé indiqué plus haut.

Les microbes sont colorés en violet foncé, les éléments anatomiques en rose ou en brun pâle, suivant qu'on a employé l'éosine et le picromcarmin, ou le brun de Bismarck et la vésuvine.

b) *Méthode de Kühne ou Kühne-Gram.* — On emploie le *Krystall-violet* mêlé au carbonate d'ammoniaque ou le bleu Victoria (Voy. ci-dessus pour les détails).

Après immersion de cinq à quinze minutes dans le bain, lavage à fond dans l'eau.

Immersion, dans la solution iodo-iodurée de Kühne, deux à trois minutes.

Nouveau lavage à l'eau.

Extraction de la matière colorante au moyen de la *fluorescène* alcoolique. Enlèvement de cette dernière par l'alcool pur. Passage de la coupe dans l'huile d'aniline, l'essence et le xylol. Inclusion dans le baume.

La double coloration est donnée par le carmin.

Kühne recommande le procédé suivant :

Placez d'abord la coupe dans une solution alcaline de carmin (carmin lithique de Orth, c'est-à-dire 2,5 p. 100 de carmin dans solution saturée à froid de carbonate de lithine). Rincez à fond dans l'eau. Placez alors quelques heures sous l'action du carmin acide, ou carmin chlorhydrique : 50 parties d'alcool à 70° mélangés à quatre gouttes acide chlorhydrique et 0^{gr}, 50 de carmin. On cuit pendant dix minutes et on filtre après refroidissement.

La coupe ainsi carminée est lavée à l'eau, déshydratée à l'alcool et soumise à la méthode de Kühne.

c) *Méthode de Nicolle-Gram.* — Laisser la coupe 1/4 d'heure dans le carmin de Orth. Laver à l'eau. Faire agir le violet phéniqué (V. ci-dessus *méthode Gram-Nicolle*) 4 à 6 secondes et ensuite le liquide de Gram fort 4 à 6 secondes en le renouvelant une à deux fois. Décolorer par l'alcool absolu additionné d'un tiers d'acétone. Passer rapidement dans l'alcool picriqué (alcool à 95° additionné d'une trace d'acide picrique de façon à obtenir une coloration jaunée verdâtre très pâle).

Déshydrater par l'alcool absolu. Eclaircir par le xylol et monter dans le baume. La coloration obtenue est ici *triple*.

Méthode d'Ehrlich et ses dérivés. — Nous en traiterons en parlant de la tuberculose.

Telles sont les méthodes générales de coloration des coupes qui nous paraissent les plus recommandables, et les trois méthodes de Kühne sont particulièrement excellentes.

Nous reviendrons sur les détails en traitant de chaque microtome et nous indiquerons alors la méthode d'élection, et aussi telle autre méthode spéciale qui n'aurait pas trouvé place dans ce chapitre général.

B. PRÉPARATION, COLORATION ET MONTAGE DES COUPES FAITES AU MICROTOME A LA PARAFFINE.

Les manipulations préparatoires que l'on fait subir à la pièce qui va être coupée par le microtome à la paraffine sont longues et délicates ; la coloration et le montage exigent du soin et de l'adresse, mais les avantages du procédé sont très marqués : coupes d'une régularité parfaite, d'une finesse qui peut aller jusqu'au millième de millimètre. Ces avantages compensent très largement les inconvénients. C'est donc là un procédé des plus recommandables et qu'il est nécessaire d'indiquer.

On peut, avec le microtome à la paraffine, couper des fragments d'organes non colorés ou couper des fragments *colorés préalablement* au carmin picro-carmin ou carmin boracique) : de là deux procédés distincts que nous allons décrire. Disons de suite qu'il est très avantageux d'employer le second procédé lorsque la double coloration est possible, car la pièce étant colorée au carmin il y a moins de manipulations à faire subir aux coupes si fines et par conséquent si fragiles.

Premier procédé : La pièce n'est pas colorée avant de passer au microtome.

On coupe en forme cubique un petit fragment de l'organe que l'on se propose d'examiner, et on le laisse durcir dans l'alcool absolu pendant au moins vingt-quatre heures. Au bout de ce temps, et pour passer au microtome, la pièce doit subir les manipulations suivantes :

1° Séjour dans un mélange à parties égales d'alcool et d'éther pendant vingt-quatre heures ;

2° Séjour dans l'éther sulfurique pur pendant vingt-quatre heures ;

3° Séjour dans une solution concentrée de paraf-

fine dans l'éther sulfurique pendant vingt-quatre heures;

4° Enfin séjour dans la paraffine fondue à $+ 45^{\circ}$ pendant vingt-quatre heures.

On laisse alors refroidir la paraffine qui, en se coagulant, enrobe la pièce: lorsqu'elle a atteint le degré de dureté nécessaire, c'est-à-dire lorsqu'elle est susceptible d'être nettement coupée au couteau, on taille autour de la pièce enrobée, à l'aide d'un bistouri bien tranchant, un cylindre que l'on fait ensuite pénétrer par frottement dans un des godets ronds du microtome, et l'on procède à la coupe qui peut se faire à des épaisseurs très variables, qu'indique une table spéciale placée sur le microtome, table à l'aide de laquelle on règle mathématiquement l'appareil. On obtient ainsi un ruban de coupes rappelant la forme du *tœnia solium*, dans chacun des anneaux duquel se trouve au centre une coupe entourée de paraffine.

Deuxième procédé : la pièce est colorée au carmin avant d'être coupée.

On coupe un très petit fragment de l'organe que l'on veut examiner, de telle façon que l'on obtienne un volume de $1/2$ centimètre de long sur environ $1/4$ de centimètre de large. On le durcit par un séjour dans l'alcool absolu d'au moins vingt-quatre heures. Ensuite on le soumet à l'action des différents réactifs suivants :

1° Séjour dans une solution de carmin nouvellement filtrée pendant douze heures (coloration en masse);

2° Séjour dans l'alcool absolu pendant une heure;

3° Séjour dans un mélange d'alcool et d'essence de bergamote à parties égales pendant une heure;

4° Séjour dans l'essence de bergamote pure pendant deux heures;

5° Séjour dans une solution épaisse de paraffine (paraffine Dumaige) dans l'essence de bergamote, pendant au moins deux heures, à l'étuve ($+ 25^{\circ}$ à $+ 30^{\circ}$);

6° Séjour dans la paraffine pure fondue, à l'étuve entre $+ 45^{\circ}$ à $+ 50^{\circ}$, pendant au moins deux heures.

On laisse la paraffine se prendre en masse : et l'on agit de la façon indiquée au premier procédé pour obtenir les coupes. Les anneaux du ruban ainsi obtenus contiennent chacun une coupe colorée en rose par le carmin, et limitée par une zone de paraffine.

Fixation sur les lames des coupes données par le microtome à la paraffine. — Que la coupe débitée par le microtome soit ou non colorée, le procédé est le même. On prend dans le ruban de coupes deux fragments de cinq à six coupes chacun, et on les dispose sur une lame bien préparée de la façon suivante : la lame bien propre, bien essuyée, a été enduite d'un côté et sur une surface de trois centimètres de long sur un et demi de large d'une solution très légère de gomme. On dispose sur cette surface enduite de gomme les deux fragments du ruban de coupes l'un au-dessous de l'autre, et tous deux parallèlement au grand axe de la lame.

On fait égoutter la lame, et on laisse sécher à l'abri de la poussière pendant quinze heures environ. Au bout de ce temps on porte la lame sur la platine chauffante jusqu'à ce que la paraffine emprisonnant les coupes devienne transparente. On enlève la paraffine par le xylol, et le xylol par l'alcool; on sèche alors avec des feuilles très propres de papier à cigarettes. Les coupes sont ainsi solidement fixées sur la lame et prêtes à subir les manipulations destinées à la coloration

des bacilles. Nous n'avons pas à revenir sur ce sujet qui a été déjà traité longuement : le lecteur se reportera aux pages précédentes ; répétons seulement que, lorsque la double coloration est possible, il est toujours indiqué de donner la coloration du carmin à la masse du tissu avant de la soumettre au microtome.

On peut parfois opérer plus rapidement la fixation sur la lame, surtout lorsqu'il ne s'agit que d'un examen histologique de la coupe carminée. Sur la lame, on étend avec un pinceau une légère couche de la solution suivante (Schællibaum) :

Essence de girofle.....	3 vol.
Collodion.....	1 —

puis on dispose les coupes comme il a été dit. On les fixe avec le pinceau, on fond la paraffine, etc., comme il est dit ci-dessus.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

MALADIES MICROBIENNES COMMUNES A L'HOMME ET AUX ANIMAUX

I

CHARBON BACTÉRIDIEN

(FIÈVRE CHARBONNEUSE. — SANG DE RATE, ETC.)

I. — Historique.

La découverte de la bactérie charbonneuse est due à Davaine et Rayer. Les points principaux de l'histoire de cette affection ont été établis par Davaine, Koch, Pasteur, Chamberland et Roux.

Le lecteur trouvera dans le livre de Straus : *Le charbon des animaux et de l'homme*, un exposé magistral de toute la question.

II. — Charbon bactérien spontané (1).

Le charbon bactérien est une maladie commune aux animaux et à l'homme.

(1) Il est bien entendu que ce terme *spontané* appliqué à une maladie microbienne quelconque indique l'affection contractée par contagion naturelle et non artificielle. Le terme « *spontané* » s'oppose ainsi au terme « *expérimental* ou *inoculé* ».