

difié par refroidissement doit être parfaitement transparent, sans grumeaux ni flocons en suspension.

Les vases nécessaires pour conserver les hémiglobes dans la gélatine glycinée, sont de petits cristallisoirs à fond très épais, rodés sur leurs bords pour recevoir un couvercle muni d'une rainure; le fond est usé à la meule à sa partie extérieure pour présenter une surface tout à fait plane.

Un de ces vases est placé à l'étuve à air chaud, entre 40 et 45 degrés, rempli de gélatine glycinée, contenant l'hémiglobe, la surface de section tournée en haut, sans adapter le couvercle. Cette première opération, qui dure 24 heures, a pour effet de rendre le mélange bien homogène et de permettre à toutes les bulles d'air emprisonnées de s'échapper; s'il en restait quelque-une, on chercherait par de petites secousses à la faire sortir. Au bout de ce temps, l'hémiglobe est retourné dans la position qu'il conservera définitivement, c'est-à-dire la surface de section en contact avec le fond du vase. Cette opération est délicate; pour la réussir, il faut que le cristallisoir soit bien rempli de gélatine afin d'éviter d'emprisonner aucune bulle d'air. Si cet accident se produisait, il vaudrait mieux recommencer l'opération que de s'exposer à avoir une préparation manquée: les bulles d'air sont l'ennemi de ce procédé.

A ce moment, si on plaçait le couvercle et qu'on terminât la préparation, on serait sûr au bout de quelque temps de la voir se fissurer lamentablement. Il faut la laisser à l'étuve à 40° plusieurs jours pendant lesquels l'eau s'évapore petit à petit et chaque jour rajouter un peu de gélatine glycinée. A un moment donné, toute évaporation cesse et la gélatine ne change plus de volume; c'est le moment opportun pour terminer la préparation. Pour ce faire, on verse à la surface de la gélatine glycinée fondue jusqu'à ce que le vase déborde et on adapte le couvercle qu'on avait préalablement laissé à l'étuve pour le réchauffer un peu, puis on charge le couvercle avec un poids et, sous l'influence de la pression, l'excès de gélatine s'échappe. Quand le refroidissement est complet, on nettoie avec soin l'extérieur du cristallisoir, puis, une fois

qu'il est bien sec, on applique avec un pinceau, au niveau de la rainure qui unit le couvercle à la boîte, du baume de Canada *sec* dissous dans le xylol. Les jours suivants, on rajoute de nouvelles couches du même lut, jusqu'à ce qu'une épaisseur assez grande garantisse à tout jamais la gélatine de l'évaporation et, par conséquent, de la formation de bulles ou de fissures. En suivant bien cette technique, on peut obtenir d'admirables préparations, se prêtant merveilleusement à l'étude macroscopique des lésions du globe de l'œil.

## CHAPITRE II

### PRÉPARATIONS HISTOLOGIQUES

§174. Apart un petit nombre de cas très spéciaux, les mêmes méthodes histologiques peuvent être appliquées indifféremment à l'œil normal et pathologique. La technique usitée d'ordinaire en histologie, trouve son application dans l'étude de l'œil; mais, eu égard à la grande spécialisation du sens de la vue, plusieurs procédés sont exclusifs à certaines membranes oculaires. Nous aurons donc à exposer :

- A. Les méthodes générales;
- B. Les méthodes spéciales.

Nous ne nous occuperons pas ici de toutes les méthodes usitées en histologie, telles que injections vasculaires, dissociations, etc. : leur application à l'œil n'offre rien de spécial et nous n'en retiendrons, chemin faisant, que ce qui peut intéresser directement l'ophtalmologie.

#### A. — MÉTHODES GÉNÉRALES

C'est le plus souvent sur des coupes fines qu'on est appelé à étudier l'anatomie des parties constitutives de l'œil : ces

coupes doivent être effectuées au moyen des opérations suivantes :

- 1° Fixation des tissus;
- 2° Durcissement;
- 3° Inclusion;
- 4° Confection des coupes;
- 5° Coloration;
- 6° Montage des préparations.

§ 175. **Méthodes de fixation.** — A. *Acide chromique.* — Ce réactif est un excellent fixateur; mais il demande à être manié avec habileté, car il a le défaut de rendre parfois friables et incolores les tissus qui ont subi son action. Pour la fixation, il faut éviter d'employer des solutions concentrées : les solutions de 0,02 à 0,15 p. 100 sont celles qui donneront les meilleurs résultats. Un séjour de cinq à huit heures dans cette solution donne en général une bonne fixation. Les solutions d'acide chromique étant peu pénétrantes, il faudra que le volume des pièces soit aussi restreint que possible, et que la quantité de liquide fixateur soit très grande par rapport au volume de la pièce à étudier. Il ne faut pas, une fois la fixation opérée, laisser un excès d'acide chromique dans les tissus, et avant tout traitement ultérieur il faut l'éloigner par un soigneux lavage à l'eau; on y parviendra aisément en laissant le fragment pendant une nuit dans un vase en verre où coule sans cesse un mince filet d'eau. L'acide chromique a l'inconvénient de contrarier beaucoup les colorations ultérieures.

B. *Bichromates alcalins et liquide de Müller.* — Nous les retrouverons plus loin avec les réactifs durcissants.

C. *Acide osmique.* — Ce précieux fixateur peut être employé soit en vapeurs, soit en solution. Pour faire agir les vapeurs d'acide osmique, on fait une solution aqueuse à 1 p. 100 de ce réactif; on en place une certaine quantité au fond d'un petit bocal, la pièce étant suspendue à quelques centimètres au-dessus de la surface du liquide. Il faut avoir soin de tenir bien fermé l'orifice du flacon; les vapeurs d'acide osmique, étant

très pénétrantes, déterminent facilement de l'irritation conjonctivale et bronchique. S'il s'agit d'une membrane, on peut aussi étaler celle-ci sur une lame de verre qu'on place à l'orifice du flacon d'acide osmique. On enlève les pièces sitôt qu'elles commencent à brunir, mais, pour une fixation un peu profonde, il faut quelquefois plusieurs heures. Après l'action des vapeurs d'osmium, un léger lavage à l'eau distillée sera suffisant pour permettre la coloration. Pour l'acide osmique en solution, il y a avantage à employer des solutions très diluées de 0,03 à 0,5 p. 100 et à utiliser une quantité plus grande de solution; les pièces devront toujours avoir un très petit volume. Pour éviter le noircissement ultérieur dû à un reliquat d'osmium, il faudra laver avec grand soin les membranes fixées par l'acide osmique en solution.

D. *Alcool absolu.* — Ce réactif est très précieux, car il ne gêne nullement les colorations, mais il a l'inconvénient de ratatiner un peu les éléments anatomiques; aussi, pour les structures délicates, on devra toujours lui préférer les fixateurs aqueux. Il est à peu près impossible de se procurer dans le commerce de l'alcool vraiment absolu; il semble donc préférable de le préparer soi-même, directement. On commence par distiller au bain-marie l'alcool à 90° du commerce et l'on obtient ainsi de l'alcool à 94 ou 95 degrés centésimaux qui est introduit dans un flacon bouché à l'émeri, à large ouverture, avec une certaine quantité de *sulfate de cuivre anhydre*. (On prépare ce réactif en calcinant des cristaux bleus de sulfate de cuivre jusqu'à ce qu'ils soient transformés en une poudre blanc grisâtre qui est le sulfate anhydre). On agite à plusieurs reprises le mélange, et au bout de 48 heures environ, on décante l'alcool, qu'on place dans un autre flacon dont le fond contient également 2 ou 4 centimètres d'épaisseur du même sulfate de cuivre anhydre. On peut ainsi conserver assez longtemps de l'alcool suffisamment absolu, sans craindre de le voir s'hydrater par l'ouverture du flacon.

Lorsqu'une pièce a été fixée par l'alcool absolu, il est bon de ne pas l'y laisser séjourner, car elle deviendrait friable et

cassante. Une fois la fixation opérée, on place les fragments pour les conserver dans l'alcool à 90° environ. La fixation par l'alcool absolu permet l'emploi de fragments de pièces assez volumineux, car la puissance de pénétration du réactif est considérable. Si on veut opérer très rapidement, on peut l'employer chaud et même bouillant.

E. *Liqueur chromo-acéto-osmique; liquide de Flemming.* — Ce mélange est un perfectionnement du liquide de Max Flesch, qui ne contenait pas d'acide acétique. En voici la formule :

Acide chromique . . . . .	0 <sup>gr</sup> ,25
Acide osmique . . . . .	0 <sup>gr</sup> ,10
Acide acétique glacial . . . . .	0 <sup>gr</sup> ,10
Eau distillée . . . . .	100 grammes.

H. Fol a donné une autre formule beaucoup plus faible en osmium :

Acide chromique . . . . .	0 <sup>gr</sup> ,25
Acide osmique . . . . .	0 <sup>gr</sup> ,02
Acide acétique glacial . . . . .	0 <sup>gr</sup> ,10
Eau . . . . .	100 grammes.

Ce mélange est encore préférable, selon notre expérience, à celui de Flemming; il permet d'employer le liquide en plus grande abondance, ce qui est toujours une bonne condition pour la fixation. On peut laisser aussi longtemps qu'on veut les pièces dans ces liquides; mais il ne faut pas oublier que plus l'action aura été prolongée, plus la coloration sera difficile. Il faudra toujours faire suivre cette fixation d'un lavage à l'eau très soigné. Les liquides de Flemming et de Fol peuvent être considérés comme les meilleurs fixateurs connus, surtout pour les structures délicates.

F. *Bichlorure de mercure (sublimé corrosif).* — C'est un très bon fixateur, mais son emploi est un peu délicat: il ne faut l'employer que pour les très petits objets. On emploie une solution saturée à froid: quelques minutes d'immersion dans ce liquide suffisent d'ordinaire. On fait suivre l'action

du sublimé d'un lavage à l'alcool fort, auquel on ajoute un peu de camphre pour faciliter le départ de l'excès de réactif.

176. *Méthodes de durcissement.* — Une fois la fixation opérée, il faut faire durcir les pièces pour pouvoir les débiter en coupes. Pour les tumeurs de l'orbite, du globe lui-même, l'alcool absolu peut suffire pour achever le durcissement; si les pièces ont passé au préalable par les liquides chromiques, il faut faire précéder l'action de l'alcool d'un lavage soigneux à eau courante. Pour les globes, le durcissement peut être fait entièrement dans les bichromates ou le liquide de Müller; il faut environ trois semaines pour arriver à un durcissement suffisant. Lorsqu'on place dans l'alcool des pièces ayant séjourné dans les liquides chromiques, il arrive parfois que, même après un lavage à l'eau, il se forme un précipité: on évite cet inconvénient en plaçant les pièces dans l'obscurité complète; l'alcool s'y colore un peu en jaune, mais il ne se forme pas de précipité. Pour le durcissement du globe de l'œil on peut aussi se servir du *liquide d'Erlicki*, dont voici la formule :

Bichromate de potasse . . . . .	2,5 parties
Sulfate de cuivre . . . . .	1,0 —
Eau . . . . .	100,00 —

C'est un très bon durcissant, qui a l'avantage de durcir beaucoup plus rapidement que les bichromates. Il faut faire suivre, comme toujours, son action d'un bon lavage à l'eau.

Plusieurs auteurs ont récemment proposé l'emploi du formol ou aldéhyde formique dans le durcissement des tissus de l'œil. Cette méthode permet d'effectuer, en même temps et d'un seul coup, la fixation des éléments et le durcissement des membranes.

Le formol est un fixateur puissant qui agit un peu à la façon de l'acide osmique, par une coagulation rapide des substances albuminoïdes; il jouit comme lui de la précieuse propriété de durcir les tissus sans les ratatiner, propriété qu'il doit à son faible pouvoir hygroscopique. D'autre part, c'est un

précieux antiseptique car il suffit d'une trace de formol pour empêcher toute pullulation microbienne; nous rappellerons ici que ce corps a été étudié pour la première fois par MM. Valude et Dubief en ce qui concerne ses applications à l'ophtalmologie.

Leber, Marshall, emploient pour le durcissement par le formol différentes solutions de 10 à 30 p. 100, mais celle qui donne les meilleurs résultats est la dilution à 10 p. 100. Le formol pénètre rapidement dans l'intimité des tissus, et au bout de vingt-quatre heures, un œil est déjà suffisamment dur pour subir des coupes, sans crainte de voir les diverses membranes se dissocier. Lorsqu'un œil a été durci et fixé par le formol, on peut lui appliquer les divers procédés d'inclusion et de coloration dans la celloïdine ou la paraffine, usités pour les pièces durcies dans les solutions chromiques ou le liquide de Müller; il est même inutile de soumettre la pièce à un lavage, la présence d'un excès de liquide fixateur ne gênant en rien les manipulations ultérieures. Les principaux avantages du formol sont les suivants : 1° le temps nécessaire pour le durcissement est court; en général, trois à quatre jours suffisent pour durcir convenablement un œil; 2° les membranes et les milieux de l'œil, après l'action du formol, conservent leur teinte normale, et même les tissus prennent un certain degré de transparence; 3° les pièces anatomiques, une fois durcies dans le formol, peuvent être conservées indéfiniment dans ce même liquide, ou bien montées dans la glycérine solidifiée pour les démonstrations; 4° le corps vitré reste parfaitement transparent et conserve sa consistance normale dans le formol. En ce qui concerne l'inclusion à la gélatine, il faut faire quelques restrictions : en effet, il arrive souvent que les milieux gélatineux exposés à l'action du formol louchissent, se troublent même au bout de quelque temps, ce qui ôte beaucoup d'intérêt aux préparations victimes de cet accident. Une autre remarque à faire à propos de l'action du formol sur la gélatine est la suivante : ce composé insolubilise la gélatine, si bien que celle-ci perd le pouvoir de fondre à la

chaleur. En ce qui nous concerne, pour les inclusions à la gélatine, ces inconvénients nous ont fait persévérer dans l'usage de la gélatine arsenicale dont le mode d'emploi a été exposé plus haut.

Krűckmann emploie le formol en vapeurs, comme l'acide osmique. Il expose l'œil pendant douze heures dans un dessiccateur dont le fond contient une certaine quantité d'aldéhyde formique pure. Au bout de quelques heures d'exposition, il pratique une petite fenêtre scléroticale pour faire agir les vapeurs de formol sur les milieux et membranes. La pièce ainsi fixée peut subir les diverses inclusions histologiques ou la préparation à la gélatine; on peut aussi la conserver dans la glycérine ou mieux dans une solution de chloral à 30 ou 50 p. 100 qui ne produit pas de ratatinement, pour une étude ultérieure. Il est bon de faire agir les vapeurs de formol dans l'obscurité. La conservation par ce procédé serait parfaite, d'après Krűckmann, les milieux restent transparents, et les membranes intactes dans leur structure la plus délicate.

A part un tout petit nombre de cas (les tumeurs par exemple), il est difficile de couper les différentes parties intégrantes de l'œil après l'action de ces seuls réactifs : on ne pourrait ainsi obtenir des coupes fines et profitables à l'étude; il faut presque toujours recourir aux méthodes d'inclusion. Ces méthodes s'imposent absolument pour pratiquer des coupes sur la totalité du globe : seules elles permettent de maintenir en place les diverses membranes et les milieux qui le constituent.

§ 177. **Méthodes d'inclusion.** — Deux méthodes d'inclusion, que nous exposerons successivement, peuvent être employées dans l'étude de l'œil. Toutes deux sont excellentes, et ce serait une erreur d'employer exclusivement l'une d'elles au détriment de l'autre; le travailleur aura bientôt fait de discerner celle qu'il doit choisir dans chaque cas particulier. Il est cependant vrai de dire que l'inclusion dans la paraffine permet seule les coupes d'une très grande finesse; dans les recherches bactériologiques, elle trouvera seule aussi son em-