

ploi. Pour l'étude du globe oculaire entier, les deux méthodes sont également applicables.

A. *Inclusion dans la celloïdine.* — Il faut d'abord déshydrater complètement la pièce à inclure. Si elle a été durcie dans le liquide de Müller, les solutions chromiques ou le formol, on commence par la laver dans un courant d'eau, ainsi qu'il a été dit plus haut, jusqu'à ce que tout le liquide fixateur ait été extrait. On porte alors la pièce dans l'alcool à 50 p. 100 pendant vingt-quatre heures, puis dans l'alcool à 70° pendant le même temps, et enfin dans l'alcool absolu. La pièce tout à fait déshydratée est portée dans l'éther pur pendant quelques heures et placée enfin dans la celloïdine. Il faut avoir deux solutions de celloïdine, l'une faible et l'autre forte. Pour les effectuer, on fait un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther, puis on y fait dissoudre de petits fragments de celloïdine. La solution faible doit être très liquide; la solution forte doit être sirupeuse, de consistance analogue à celle d'une solution épaisse de gomme arabique. On met d'abord la pièce dans un flacon *bien bouché* avec la solution faible; il n'y a pas de règle pour le temps où on doit l'y laisser; car il varie naturellement avec la nature et le volume de l'objet à étudier de quelques heures à plusieurs jours. On la met ensuite dans la solution forte, où un séjour de vingt-quatre heures est généralement suffisant.

Une fois les pièces bien pénétrées par la celloïdine, on procède à l'inclusion proprement dite. Le procédé le plus pratique consiste à placer l'objet au fond d'un petit cristalliseur en verre et à verser par-dessus une forte couche de solution forte, puis à recouvrir le cristalliseur d'une lame de verre et abandonner le tout à l'évaporation spontanée. Au bout d'un jour ou deux, la masse s'est peu à peu solidifiée, et en la coupant avec un scalpel, le long des parois du cristalliseur, on détache le bloc de celloïdine, qu'on équarrit de façon à enlever l'excès. Pour achever le durcissement, on place la pièce ainsi incluse dans l'alcool à 82° au maximum, l'alcool absolu dissolvant la celloïdine. Pour le durcissement, on peut aussi se

servir du chloroforme (Viallanes); ce dernier liquide est préférable pour les petits objets, tandis qu'on devra plutôt se servir d'alcool pour les pièces volumineuses. Si l'on veut inclure un globe tout entier, il faut avoir soin de pratiquer un trou dans la sclérotique, pour permettre à la celloïdine de pénétrer à l'intérieur de l'œil; de même une petite incision à la cornée sera utile pour permettre la pénétration dans la chambre antérieure.

B. *Inclusion dans la paraffine.* — La pièce étant bien déshydratée comme il vient d'être dit, est placée pendant six heures dans l'éther pur, qu'on change une fois. Au sortir de l'éther, elle est portée dans un bain de paraffine, dont le point de fusion est de 42°, dissoute dans l'éther et placée à l'étuve à 38°. Ce bain doit être très chargé en paraffine et ne contenir que la quantité d'éther juste nécessaire pour amener la fusion de la paraffine à la température de 38° (volumes égaux d'éther et de paraffine sont des proportions convenables). Après douze heures dans ce mélange, la pièce est placée dans un bain de paraffine pure fondue à 42° dans un flacon à paroi résistante, maintenu au bain-marie à cette température; puis, avec une trompe ou une petite pompe à main, on fait le vide dans le flacon: en quelques instants, la presque totalité de l'éther a été chassée et remplacée par de la paraffine pure. Cette petite manœuvre est un peu délicate, mais, quand elle est bien réussie, elle donne d'excellents résultats; elle évite surtout le long séjour dans la paraffine fondue, qui durcit trop les pièces.

La pièce étant ainsi pénétrée, pour l'inclure, on la place au fond d'une petite boîte en papier ou dans un cadre à inclusion qu'on remplit de paraffine fondue: puis le tout est placé sur une plaque de pierre ou de métal bien froide, pour provoquer le *refroidissement brusque* de la masse. En été, on pourra placer la petite boîte sur un fragment de glace. Le bloc refroidi est ensuite régularisé avec un scalpel. Si on veut inclure un globe entier, il faudra prendre les mêmes précautions, pour faire pénétrer la masse à l'intérieur de l'œil, que



celles dont nous avons parlé à propos de la celloïdine.

§ 178. **Confection des coupes.** — Les coupes s'exécutent au moyen du microtome. Il existe plusieurs modèles de ces instruments; la plupart sont bons. Il n'est pas tant nécessaire de posséder un outil très perfectionné, que d'apprendre à se servir habilement de celui qu'on a entre les mains; tel instrument qui semble primitif donnera, manié par un travailleur habile et patient, des résultats excellents.

A. *Inclusions à la celloïdine.* — Le bloc de celloïdine, convenablement durci, est mouillé avec un peu d'éther et collé sur un petit bloc de bois tendre avec du collodion. Il faut éviter de coller les pièces sur des fragments de liège, comme il est souvent recommandé, surtout si elles sont tant soit peu volumineuses: en effet, le liège ne jouit d'aucune rigidité et, pendant l'exécution de la coupe, il cède légèrement, de sorte qu'il est presque impossible d'avoir des sections fines. Les coupes sont faites avec le rasoir placé très obliquement et bien arrosé d'alcool; si l'on possède un microtome permettant de submerger la pièce et de couper sous l'alcool, cette disposition sera préférable. Les coupes sont recueillies sur le rasoir avec un pinceau et portées dans l'eau, dans les réactifs colorants ou dans l'alcool à 65°, si elles ne doivent être étudiées qu'ultérieurement.

B. *Inclusions à la paraffine.* — Le petit bloc de paraffine est serré modérément dans l'étau du microtome ou collé sur un morceau de bois; les coupes sont exécutées à sec et recueillies sur une feuille de papier blanc. Ici le rasoir ne doit plus être oblique, mais tout à fait transversal et perpendiculaire à la pièce, afin d'éviter, dans la mesure du possible, l'enroulement des coupes, et d'arriver à la confection de coupes en séries, utiles parfois pour étudier méthodiquement un point dans tous ses détails. Si la coupe contient un tissu homogène qui n'est pas susceptible de se désagréger, il suffit, pour séparer la paraffine, de bien la plonger dans le xylol, qui dissout instantanément la masse d'inclusion, puis dans l'alcool à 90°, qui enlève le xylol: on peut alors la colorer.

Mais ce n'est pas là le cas le plus général en ophtalmologie. En effet, les différentes parties de l'œil adhèrent peu les unes aux autres; on risquerait de les voir se séparer, et nager au hasard dans la préparation, si on enlevait brusquement la petite pellicule de paraffine qui maintient leurs rapports réciproques. Il faut alors coller la coupe encore incluse dans la paraffine, sur la lame porte-objet, par l'un des artifices suivants:

*Collage à l'albumine.* — On met un blanc d'œuf dans 200 grammes d'eau distillée et on agite fortement pour faire un mélange bien intime. On ajoute ensuite une solution phéniquée forte (§ p. 100), jusqu'à ce que le liquide devienne un peu louche; il faut s'arrêter à ce point, car au delà on aurait une coagulation de l'albumine. Cette addition d'eau phéniquée a pour but d'empêcher l'altération du liquide albumineux.

On met une forte goutte de cette eau albumineuse sur une lame porte-objet, puis, avec une aiguille ou une pince fine, on porte une coupe sur cette goutte. Ensuite, avec les plus grandes précautions, on chauffe très peu au-dessus d'une petite flamme, en évitant à tout prix la fusion de la paraffine. Sous l'influence de cette douce chaleur, on voit la coupe se dérouler petit à petit et s'étaler lentement; si le déroulement était laborieux, on pourrait l'aider avec une aiguille fine, le plus souvent c'est inutile. Une fois la coupe bien étalée, on enlève avec un papier buvard l'excès d'eau albumineuse et l'on chauffe un peu plus fortement, jusqu'à ce qu'on voie la paraffine commencer à fondre; on pose alors la lame sur un corps froid, et on abandonne le tout à la dessiccation spontanée. La coupe sèche est adhérente au verre dans toutes ses parties, et il suffit de la traiter alors successivement par le xylol et l'alcool absolu pour qu'elle soit propre aux colorations.

*Collage au collodion.* — On fait le mélange suivant (Schælibaum):

Collodion élastique . .	1 partie
Essence de girofle . . .	3 —

On étale avec un pinceau un peu de cette colle sur la lame



porte-objet et on y dépose la coupe; puis on chauffe à une très douce chaleur jusqu'à fusion commençante de la paraffine. Le collage est terminé en quelques minutes, et on peut alors enlever la paraffine avec le xylol. Si la coupe est enroulée, il faut procéder avec beaucoup de prudence dans le chauffage, comme pour l'eau albumineuse.

§ 179. **Coloration des préparations.** — La coloration des pièces peut se faire soit en masse, avant l'inclusion, soit après la confection des coupes; cette dernière méthode permet de colorer différemment plusieurs coupes semblables, et cet avantage compense largement la difficulté et la longueur plus grande des manipulations. Si la coupe a été collée sur la lame porte-objet, les manipulations se font naturellement sur cette lame; sinon on se sert de petits godets, ou de verres de montre, dans lesquels on verse les réactifs.

A. *Coloration à l'hématoxyline.* — L'hématoxyline est un excellent réactif, qui donne d'admirables préparations, à cause de sa puissance de sélection sur les noyaux. La meilleure solution est celle d'Ehrlich, qui se prépare ainsi :

Eau . . . . .	100 cent. cubes
Alcool absolu . . . . .	100 —
Glycérine . . . . .	100 cent. cubes.
Acide acétique cristallisable . . . . .	10 —
Hématoxyline . . . . .	2 grammes
Alun . . . . .	en excès.

B. *Picro-carmin de Ranvier.* — Les coupes y sont placées au sortir de l'eau; lorsqu'on juge la coloration suffisante on lave et on monte la préparation.

C. *Carmin au lithium (Orth).* — Par cette méthode, on obtient une très belle sélection du carmin sur les noyaux cellulaires. La solution d'Orth s'obtient en faisant dissoudre deux parties et demie de carmin dans 97 parties et demie de solution aqueuse saturée de carbonate de lithine. Pour l'usage, après avoir placé pendant quelques instants la coupe dans la solution carminée, on la porte sans la laver dans l'alcool chlorhy-

drique (alcool 100, acide chlorhydrique 1). Quand la coupe n'abandonne plus de matière colorante, on la lave à grande eau pour faire disparaître complètement l'alcool et l'acide et on la monte. C'est là une très bonne méthode.

On laisse ce mélange exposé pendant longtemps à la lumière, jusqu'à ce qu'il ait pris une teinte rouge foncé. Ainsi préparée, la solution se conserve intacte pendant des années; elle offre aussi l'avantage inappréciable, de colorer très bien les pièces qui ont séjourné dans l'acide osmique ou les solutions chromiques. La coloration s'opère en quelques minutes; il suffit ensuite de laver la coupe à l'eau distillée pour enlever l'excès de teinture. Dans certains cas, le simple lavage à l'eau de fontaine filtrée, au lieu d'eau distillée, ajoute à la beauté de la coloration par suite de la présence dans cette eau d'une petite quantité d'ammoniaque.

Si l'on veut obtenir des doubles colorations, on peut ajouter de l'éosine dans la formule ci-dessus, ou procéder en deux temps; c'est-à-dire plonger la coupe colorée d'abord en violet, soit dans une solution d'éosine, soit dans le picro-carmin. Ces doubles colorations sont très recommandables, elles donnent de superbes préparations.

§ 180. **Montage des préparations.** — La coloration terminée, il faut monter les préparations pour pouvoir les étudier sous le microscope; on y réussit par les procédés suivants :

A. *Montage à la glycérine.* — La coupe étant dans l'eau, on la place sur une lame porte-objet, si elle n'y est déjà collée; puis on dépose à sa surface une goutte de glycérine neutre, qu'on recouvre d'une lamelle mince. Au bout de quelques jours, la glycérine ayant pénétré la coupe, celle-ci s'est déshydratée en partie, puis éclaircie: on peut alors luter la préparation. On y arrive en enlevant l'excès de glycérine avec un peu de papier-filtre, et en étalant sur les bords de la lamelle, avec un pinceau, une couche de cire à cacheter dissoute dans l'alcool. La glycérine pure a quelques inconvénients, par exemple pour les grandes coupes de globe entier. On les



atténuée dans une certaine mesure en y incorporant de la gélatine; le mélange suivant donne de bons résultats :

Gélatine . . . . .	20 parties.
Eau . . . . .	130 —
Glycérine . . . . .	100 —
Solution alcoolique de camphre . .	15 —

On fait fondre la gélatine dans l'eau et l'on clarifie avec un blanc d'œuf; on ajoute ensuite la glycérine et le camphre. Cette gélatine-glycérine s'emploie à chaud (30°) et se prend en gelée par le refroidissement.

B. *Montage dans le baume du Canada.* — Le montage dans ce milieu exige des manipulations assez compliquées, mais il a l'avantage de permettre la conservation presque indéfinie des préparations. Son mode d'emploi est un peu différent, suivant qu'il s'agit de coupes à la paraffine ou de coupes à la celloïdine.

1° *Coupes à la paraffine.* — La coupe débarrassée de sa paraffine et colorée, est déshydratée par l'alcool absolu. Ce dernier est ensuite éloigné, et la coupe éclaircie, par l'essence de girofle, la créosote, le xylol, etc. Lorsque la coupe est tout à fait transparente et que, examinée à un faible grossissement, elle ne présente plus ni parties sombres, ni gouttelettes en suspension, on fait tomber l'excès de liquide éclaircissant, et on dépose sur la coupe une goutte de baume du Canada sec dissous dans le xylol, qu'on recouvre d'une lamelle mince. La préparation est alors terminée.

2° *Coupes à la celloïdine.* — L'alcool absolu, la créosote, l'essence de girofle, dissolvent la celloïdine; on ne peut donc les employer. La déshydratation se fera avec de l'alcool dont le titre ne dépassera pas 95° qu'on renouvellera au besoin plusieurs fois. Pour éclaircir les coupes, on se sert d'essence de bergamote, d'essence d'origan, de chloroforme, d'essence de bois de cèdre, d'huile d'aniline, etc. On peut se servir avantageusement de benzine, à condition qu'elle soit très pure (benzine Collas). La coupe, une fois éclaircie, est traitée par le xylol et montée au baume comme précédemment.

#### B. — MÉTHODES SPÉCIALES

**Étude de la cornée.** — A. *Méthode de Ranvier (nerfs et cellules fixes).* — La cornée fraîche est placée, pendant cinq minutes, dans du jus de citron frais et filtré sur un morceau de flanelle. On la met ensuite dans une solution de chlorure double d'or et de potassium à 1 p. 100; puis on fait agir la lumière du jour sur la pièce placée dans : eau 50 centimètres cubes, acide acétique deux gouttes. On lave, on durcit dans l'alcool absolu, et on coupe.

B. *Méthode de Rollett (cellules fixes).* — On met la cornée fraîche dans une chambre humide où on l'expose aux vapeurs d'iode. Aussitôt qu'elle est devenue brune, on pourra enlever l'épithélium. Si la réaction n'est pas complète, on remet la cornée dans la chambre humide et on continue l'action de l'iode. Pour la dissociation des fibres, Rollett recommande la macération dans une solution de permanganate de potasse. Aussitôt que le tissu a bruni, on l'agite dans l'eau et on peut facilement dissocier.

*Pour les épithéliums,* fixer la cornée par le liquide de Flemming ou l'acide osmique, laver et couper après durcissement ou inclusion, enfin colorer à l'hématoxyline et carmin.

**Iris et procès ciliaires.** — On fixe la pièce dans le mélange chromo-acéto-osmique de Flemming ou mieux dans celui de Fol; elle peut, sans inconvénient, y séjourner plusieurs jours. Les coupes se font soit dans la celloïdine soit dans la paraffine : on doit les colorer par le picro-carmin, mais surtout par le carmin d'Orth ou l'hématoxyline. Les doubles colorations donnent de très belles préparations. Pour l'étude de l'épithélium du corps ciliaire et des cellules cylindriques de la portion ciliaire de la rétine, on pourra, outre les colorations ci-dessus indiquées, employer le procédé suivant. Les coupes, débarrassées de paraffine ou incluses dans la celloïdine, sont lavées dans l'eau pour éloigner l'alcool, puis on les place pendant vingt-quatre heures dans une solution concentrée de