

**Nerf optique et autres nerfs de l'œil.** — Le nerf optique peut être étudié avec la portion adhérente du globe oculaire, mais on est parfois amené à en faire l'examen spéciale. Il faut alors l'étudier par coupes transversales ou longitudinales et par dissociation avec les aiguilles. Le meilleur des réactifs fixateurs est l'acide osmique à un demi p. 100; on colore à l'hématoxyline ou au picro-carmin. Pour l'étude de la myéline et des dégénérescences il vaut mieux employer l'excellente méthode de Weigert que nous donnons ici avec détails.

Les pièces entières, incluses dans la celloïdine, sont plongées, avec le bouchon sur lequel elles sont collées, dans une solution saturée d'acétate neutre de cuivre, étendue d'un égal volume d'eau, puis placées à l'étuve à 35° pendant deux jours. Les coupes sont effectuées au microtome, puis portées dans le bain colorant suivant :

Hématoxyline . . . . .	1 gramme.
Alcool à 90°. . . . .	40 centimètres cubes.
Eau distillée . . . . .	90 —
Solution saturée de carbonate de lithine. . . . .	1 centimètre cube.

Les coupes sont laissées deux heures dans cette solution à chaud (35°). En opérant à froid, il faut les y laisser un temps plus long, qui peut aller jusqu'à vingt-quatre heures. La coloration effectuée on lave à l'eau et on procède à la décoloration dans :

Borax . . . . .	2 grammes.
Ferricyanure de potassium. . . . .	2 <sup>gr</sup> ,5
Eau distillée . . . . .	200 centimètres cubes.

On y laisse les coupes d'une demi-heure à plusieurs heures, suivant les cas. Pour les nerfs pathologiques, la solution décolorante doit être étendue d'eau, et la décoloration durer d'autant plus longtemps que la dilution est plus grande. On lave et on monte dans le baume par les procédés usuels. On peut aussi, après le lavage, colorer les noyaux en rouge par une teinture au carmin.

Les autres membranes de l'œil ne comportent pas, pour l'examen, de technique spéciale; la choroïde, la conjonctive, la sclérotique, etc., peuvent être étudiées par les méthodes générales de l'anatomie microscopique, auxquelles nous renvoyons.

### CHAPITRE III

#### TECHNIQUE BACTÉRIOLOGIQUE

Les études de bactériologie, comme celles d'histologie, comportent des méthodes générales, applicables au plus grand nombre de cas, et des méthodes spéciales, nécessitées par la nature différente des divers micro-organismes qu'on peut rencontrer dans les infections de l'œil ou de ses annexes. La technique bactériologique sera donc divisée en deux grands chapitres, comprenant respectivement ces deux ordres de recherches. Les méthodes générales devront être exposées en bloc, tandis que les méthodes spéciales trouveront leur place dans l'étude détaillée de chaque microbe individuel.

##### A. — MÉTHODES GÉNÉRALES

Dans les pages qui vont suivre, nous ne pourrions nous étendre avec beaucoup de détails sur toutes les méthodes usitées en bactériologie; nous supposerons le lecteur muni d'un traité spécial sur la matière, et nous n'en retiendrons que les notions strictement nécessaires à l'étude des microbes rencontrés dans l'œil.

L'étude des méthodes générales comporte les trois grandes divisions suivantes :

1° Coloration ;

2° Cultures;

3° Inoculations.

Nous les étudierons successivement.

§ 181. **Méthodes de coloration.** — On peut se proposer deux choses: ou bien étudier les microbes contenus dans les liquides normaux et pathologiques de l'œil (conjonctive, larmes, pus, etc.), ou bien étudier les microbes inclus dans les tissus; dans ce dernier cas il faut procéder par coupes.

*Liquides et sécrétions.* — L'étude des liquides et sécrétions se fait par la coloration sur les lamelles; on y procède de la façon suivante.

Avec une aiguille flambée ou une pipette effilée, on porte sur la lamelle mince une gouttelette du liquide à examiner; on l'écrase avec une autre lamelle, qu'on sépare de la première par glissement: on obtient ainsi avec une seule goutte deux préparations. Il faut s'efforcer de faire la couche de substance aussi mince que possible, et se servir, par conséquent, d'une goutte très petite. Les lamelles sont ensuite abandonnées, à froid, à la dessiccation spontanée. Celle-ci étant complète, on laisse tomber sur chaque lamelle quelques gouttes d'un mélange à parties égales d'alcool et d'éther pour fixer la substance à la surface du verre; ce procédé est préférable à celui du chauffage, qui risque de calciner la préparation. Le liquide éthéro-alcoolique étant évaporé et la dessiccation étant de nouveau complète, les éléments doivent être soigneusement colorés.

A. *Coloration simple.* — Dans un grand verre de montre, on met de 5 à 10 centimètres cubes d'eau distillée, où l'on fait tomber une ou deux gouttes d'une solution concentrée aqueuse alcoolique d'une teinture d'aniline (violet de méthyle, fuchsine, bleu de méthylène); il faut éviter de mettre trop de couleur, la solution colorante doit être transparente. La lamelle est placée dans le bain colorant, et on l'y laisse de cinq à quinze minutes. Au bout de ce temps, la lamelle saisie avec une pince est lavée à l'eau distillée, puis abandonnée à la dessiccation spontanée à froid. Lorsqu'elle est bien sèche, on

place sur une lame porte-objet une goutte de baume de Canada sec dissous dans le xylol, et la lamelle est déposée sur cette goutte, la partie colorée en contact direct avec le baume. Il ne reste plus qu'à pratiquer l'examen microscopique, qui doit toujours se faire avec un objectif à immersion, l'éclairage Abbé et le miroir plan. Cette méthode simple est usitée pour faire des examens rapides, et fournir un aperçu approximatif des micro-organismes contenus dans le liquide à étudier; elle est moins parfaite, et donne de moins belles préparations pour l'étude définitive, que les méthodes suivantes.

B. *Méthode de Loëffler.* — On place la lamelle dans la solution suivante de cinq minutes à une demi-heure:

Potasse caustique à 1/10000° . . . . .	3 cent. cubes.
Solution alcoolique de bleu de méthylène . . . . .	1 —

On décolore *rapidement* par l'acide acétique dilué (une à deux gouttes d'acide pour un verre de montre d'eau), on lave avec soin, on sèche et on monte au baume.

C. *Bleu phéniqué de Kühne.* — La lamelle est plongée de cinq à quinze minutes dans la solution:

Bleu de méthylène . . . . .	4 gr, 5
Alcool absolu . . . . .	10 grammes.
Solution d'acide phénique à 5 p. 100. . . . .	100 —

Rincer à l'eau distillée, sécher et monter. Si la préparation est trop colorée, on peut l'éclaircir en plongeant et en maintenant la lamelle 3 ou 4 secondes dans la solution suivante:

Acide chlorhydrique . . . . .	X gouttes.
Eau distillée . . . . .	100 cent. cubes.

On passe ensuite dans:

Eau . . . . .	10 grammes.
Solution aqueuse saturée de carbonate de lithine . . . . .	X gouttes.

Laver à l'eau distillée, sécher et monter.

D. *Méthode de Gram.* — Cette méthode, excellente de tous points, est surtout un procédé de diagnostic; il faut donc la posséder complètement car elle trouve à chaque instant son application et permet de reconnaître de nombreuses espèces pathogènes. Faire dissoudre à froid en agitant violemment 10 grammes d'huile d'aniline dans 100 centimètres cubes d'eau distillée; la solution, louche, est passée sur un filtre préalablement mouillé, puis on y ajoute 1 gramme de violet de gentiane. On filtre cette teinture au moment de s'en servir. Comme elle se conserve mal, il vaut mieux la préparer en petite quantité, et au fur et à mesure des besoins. Les lamelles sont immergées pendant une minute, à froid, dans la teinture, puis portées, *sans les laver*, dans la solution iodo-iodurée suivante :

Iode métallique . . . . .	1 gramme.
Iodure de potassium . . . . .	2 —
Eau distillée . . . . .	300 cent. cubes.

Au bout de quelques instants, on lave à l'eau et on plonge dans l'alcool fort (85° à 90°), en agitant constamment; cette dernière opération doit durer au plus une demi-minute pour les lamelles. S'il s'agit de pus ou de liquides contenant des éléments anatomiques, il y a intérêt à faire une double coloration; pour cela, au sortir de l'alcool, la lamelle est lavée à l'eau, et plongée pendant quelques minutes dans une teinture au carmin (picro-carmin, carmin d'Orth). On lave une seconde fois à l'eau distillée, on laisse sécher, et on monte au baume. Les microbes sont colorés en violet et les cellules en rouge, si l'on a fait une double coloration.

E. *Méthode de Weigert.* — Weigert a fait connaître un procédé de coloration qui est un perfectionnement de la méthode de Gram. La lamelle est colorée au carmin, lavée et séchée, puis placée dans la solution de Weigert ainsi composée :

Violet de méthyle 6 B solution aqueuse saturée à chaud . . .	68 cent. cubes.
-----------------------------------------------------------------	-----------------

Alcool absolu . . . . .	41 grammes.
Huile d'aniline . . . . .	1 —

Faire dissoudre d'abord l'aniline dans l'alcool et mélanger ensuite les deux liqueurs.

Au bout de 10 minutes environ, la lamelle est retirée et plongée dans la liqueur iodo-iodurée, lavée ensuite et séchée de nouveau. — Une fois bien sèche, la lamelle est décolorée dans :

Huile d'aniline . . . . .	20 cent. cubes.
Xylol . . . . .	10 —

Lorsqu'il n'y a plus trace de violet sur la lamelle, celle-ci est passée dans deux ou trois bains de xylol pur et montée dans le baume. La méthode de Weigert, par la suppression de l'emploi de l'alcool, donne des colorations bien plus belles que celle de Gram; la solution Weigert a aussi l'avantage de se conserver indéfiniment, elle peut donc être préparée d'avance.

*Coloration sur les coupes.* — En règle générale, toute pièce destinée aux recherches bactériologiques devra être durcie dans l'alcool seul, l'acide osmique et les liquides chromiques rendant plus difficile la coloration des micro-organismes. Les coupes seront toujours, autant que possible, exécutées après inclusion dans la paraffine, procédé qui donne les coupes les plus fines, point capital pour les recherches bactériologiques.

Les méthodes de coloration usitées pour les lamelles s'appliquent également aux coupes, avec des variantes dans la technique, nécessitées par la nature même de la substance à colorer.

A. *Méthode de Gram.* — La coupe est d'abord maintenue dans le violet de Gram pendant un quart d'heure, puis dans la solution iodo-iodurée, pendant une minute; elle est alors placée sans lavage dans l'alcool à 90° jusqu'à décoloration complète; on finit par un passage à l'alcool absolu et on monte au baume après l'éclaircissement par l'essence de girofle et le xylol. Si on veut une double coloration, on fait agir, après l'alcool, une

teinture de carmin (picro-carmin, carmin d'Orth); on déshydrate et on monte.

B. *Méthode de Weigert.* — Cette méthode est un peu compliquée pour les coupes; mais avec un peu d'exercice, on arrive à de si beaux résultats, qu'on est bien récompensé du temps et du travail qu'on y a consacrés.

On commence par colorer les coupes à l'éosine, ou dans la teinture au carmin. Cette double coloration n'est pas indispensable, mais elle donne des préparations plus démonstratives. La coupe colorée ou non par le carmin, est mise dans l'alcool fort pour la déshydrater complètement, puis placée sur une lame porte-objet, où on la laisse partiellement sécher. Au moment où la coupe devient terne, on laisse tomber sur elle quelques gouttes de teinture au violet de méthyle de Weigert, qu'on laisse agir pendant environ dix minutes. A partir du moment où la solution de Weigert est en contact avec la coupe, il ne faut plus toucher, *sous aucun prétexte*, à cette dernière, car, presque immédiatement elle devient collante, adhère à tous les objets, et le moindre contact détruit la coupe en y déterminant des plis indélébiles; si par malheur elle s'enroule ou se plie, n'y touchez pas, terminez les opérations, et attendez la fin pour tâcher de réparer le mal.

Après avoir laissé écouler l'excès de matière colorante, on verse sur la coupe, toujours en évitant d'y toucher, quelques gouttes de liqueur iodo-iodurée, qu'on laisse agir une minute. Au bout de ce temps, on fait couler le liquide par inclinaison de la lame, et on le remplace par quelques gouttes d'huile d'aniline pure. Cette dernière se colore en violet; on la renouvelle plusieurs fois de suite, jusqu'à ce que, mise sur un papier blanc, elle ne présente plus la moindre teinte bleue. A ce moment, la coupe est redevenue couleur rouge carmin ou bien ou incolore, suivant qu'on a procédé ou non à la double coloration. Avec quelques gouttes de xylol, on enlève l'huile d'aniline et on monte dans le baume. Les microbes sont colorés en violet foncé, les tissus en rose. Cette excellente méthode peut ser-

vir à colorer presque tous les micro-organismes qu'on rencontre dans les maladies oculaires.

C. *Méthode de Loëffler.* — Cette méthode pourra trouver son application pour certaines espèces microbiennes impossibles à colorer par le Gram ou le Weigert. On immerge la coupe dans une solution fraîche et filtrée de bleu Loëffler, pendant quinze minutes. On décolore rapidement dans un verre de montre contenant de l'eau distillée, avec une goutte d'acide acétique. On lave dans l'eau pure, on déshydrate par l'alcool absolu, on éclaircit par l'essence de girofle, et on monte dans le baume au xylol. De cette façon, les microbes sont colorés en bleu foncé, les tissus en bleu pâle. La différenciation est moins belle que par les autres procédés.

§ 182. *Méthodes de culture.* — Nous ne pouvons donner ici tous les détails, se rapportant à la culture des micro-organismes, qu'on trouve dans les traités de bactériologie. Nous indiquerons seulement ici quelques méthodes spéciales à l'ophtalmologie.

On peut se proposer divers modes de culture;

- a. Cultiver les microbes de la conjonctive normale et pathologique.
- b. Cultiver les microbes accidentellement localisés dans les cavités oculaires : chambre antérieure, corps vitré.
- c. Cultiver les microbes d'une lésion des diverses membranes de l'œil.

D'une manière générale, après avoir préparé les milieux de culture solides ou liquides appropriés, on procède d'abord à la prise de semence qu'on va transplanter de l'organisme vivant dans le milieu artificiel. Dans quelques cas, on peut se servir de l'aiguille de platine, qu'on stérilise dans une flamme de Bunsen ou une lampe à alcool en la portant au rouge. Après refroidissement, on trempe l'aiguille dans la substance à étudier, et, purement, on va ensemercer les tubes de culture par les méthodes usuelles. Le fil de platine trouve surtout son usage dans les cas où le liquide à ensemercer étant en très petite quantité ne peut être collecté et enlevé en

masse. Lorsque au contraire il s'agit d'un liquide un peu abondant (abcès, pus conjonctival, etc.), l'usage des pipettes effilées est préférable, en permettant la cueillette d'une quantité appréciable de liquide expérimental. La pipette effilée a également l'avantage d'un transport facile, avantage grandement appréciable si le laboratoire n'est pas à proximité. Tels sont, dans leurs grandes lignes, les procédés généraux pour recueillir les semences; voyons les cas particuliers.

A. *Prises de semence sur la conjonctive.* — S'il y a beaucoup de sécrétion conjonctivale, on peut, à la rigueur, employer un fil de platine terminé en boucle, ou une pipette effilée, mais ce cas est le plus rare. Nous donnons ici deux procédés différents pour récolter les microbes de la conjonctive destinés aux cultures.

1° *Procédé de Morax.* — On aspire une petite quantité de gélatine nutritive liquéfiée dans une pipette stérilisée, on la laisse couler à la surface de la conjonctive en faisant bâiller légèrement le cul-de-sac de manière à ce que le liquide y pénètre. Avec l'anse de platine, on touche légèrement la surface de la conjonctive et des culs-de-sac, de manière à entraîner les micro-organismes dans la gélatine. Après quelques secondes, on aspire la gélatine rassemblée dans le cul-de-sac inférieur avec la même pipette, et on la répartit aussitôt dans un ou deux tubes de gélatine ou de gélose que l'on coule ensuite dans des boîtes de Petri.

Nous avons expérimenté ce procédé; il n'est pas pratique. Pour réussir, il suppose outre un malade très docile, ce qui est rare, étant donné la douleur occasionnée par les inflammations conjonctivales, une habileté peu commune de la part de l'opérateur.

Le procédé suivant, que nous employons depuis deux ans au laboratoire des Quinze-Vingts, est au contraire à la portée de tout le monde; il est facile à appliquer et n'impose au malade qu'un désagrément minime.

2° *Procédé de Dubief.* — On se sert de stylets en fer, comme les stylets de trousse, terminés par une extrémité ren-

flée. Autour de la petite boule qui termine la tige et sur celle-ci, à 1 centimètre et demi de hauteur environ, on roule une très légère couche d'ouate hydrophile: un tiers de millimètre d'épaisseur suffit; moins il y en a, plus l'opération est facile; il en faut juste assez, pour pouvoir absorber la sécrétion conjonctivale, ou essuyer la surface de la muqueuse. On prépare d'avance une vingtaine de ces petits balais rudimentaires, qu'on place dans un tube bouché à l'ouate, et qu'on aseptise à l'étuve sèche à 160°, jusqu'à ce que le coton ait légèrement jauni. On peut ainsi les garder stériles un certain temps, et en avoir toujours d'avance pour servir au fur et à mesure des besoins. Comme ce procédé est expéditif, on peut n'être pas avare de stylets et en consommer plusieurs sur le même individu, en prenant la substance à cultiver dans les deux yeux ou dans des points différents du même œil. Pour recueillir le liquide à ensemercer, on renverse légèrement le rebord palpébral de la main gauche, tandis qu'avec le stylet tenu dans la main droite on balaie rapidement le cul-de-sac et les différentes parties de la conjonctive, en priant le patient de regarder en haut ou en bas, suivant qu'on opère sur le cul-de-sac inférieur ou supérieur, et en ayant soin d'éviter de toucher le rebord ciliaire, si l'on veut étudier seulement la conjonctive.

Aussitôt après, avec une pince flambée, on arrache la petite bourre de coton et on la précipite dans un tube de bouillon où, après quelques minutes de brusque agitation, elle se dissocie en général facilement. Il arrive cependant que si la bourre de coton est très humide, cette petite manœuvre devient laborieuse; il vaut mieux alors opérer autrement. On stérilise en la portant au rouge une petite cupule de platine, et après qu'elle est refroidie, on coupe en tout petits fragments la bourre de coton au moyen de ciseaux courbes, fins, bien aseptiques, en faisant tomber tous les fragments d'ouate dans la cupule. En quelques secondes, la manœuvre est terminée et on n'a plus qu'à immerger le tout dans un tube de bouillon où la substance d'ensemencement va se diluer par l'agitation.

Avec ce tube original, il sera maintenant facile de préparer des tubes de gélatine, de gélose, des boîtes de Petri, etc., de se livrer, en somme, à toutes les opérations bactériologiques ordinaires.

B. *Prise de semence dans les milieux.* — Les occasions qu'on a de recueillir, pour les cultiver, les micro-organismes des milieux oculaires sont relativement rares; on n'y peut guère songer en dehors d'une opération ayant un but thérapeutique, ou bien après énucléation du globe. Si l'œil a été enlevé, la substance est recueillie au moyen d'une pipette effilée à laquelle on fait traverser la cornée ou la sclérotique; après qu'on a légèrement flambé la surface de la membrane avec une baguette de verre chauffée. Si c'est au moment d'une opération, on en est réduit à recueillir aussi purement que le permettent les circonstances, la substance d'inoculation soit avec une pipette, soit avec l'anse de platine; dans ce dernier cas, étant données les conditions où l'on opère d'ordinaire, il ne faut guère espérer obtenir d'emblée une culture pure. La substance recueillie sera diluée et mise en culture par les procédés usuels.

C. *Prise de semence sur les membranes.* — S'il s'agit d'une collection liquide purulente ou non, elle est recueillie par le moyen de la pipette flambée. Si c'est un produit solide (tuberculose), on en coupe de petits fragments avec des instruments flambés qu'on fait tomber dans les tubes de culture. Dans le cas de tuberculose, la culture échoue toujours et il ne faut pas négliger de faire concurremment des inoculations aux animaux.

§ 183. **Inoculations aux animaux.** — La technique des inoculations appliquée aux recherches ophtalmologiques ne diffère pas sensiblement de celle employée en bactériologie générale. Ce sont toujours des infections expérimentales pratiquées soit sous la peau, soit dans les veines, soit dans une cavité séreuse, généralement le péritoine; d'ailleurs, la voie d'inoculation à choisir varie avec chaque cas particulier, et nous retrouverons plus loin leur description avec l'étude

spéciale des différents micro-organismes. Seule l'inoculation dans la chambre antérieure est un peu spéciale. Pour faire cette opération, d'ailleurs fort simple, il faut procéder comme il suit. Après avoir soigneusement écarté les paupières de l'animal choisi, on fait, avec une pique ou un couteau de Græe, une petite incision à la cornée, à sa partie supérieure; il sort de l'humeur aqueuse, et par la plaie on introduit, au moyen d'un fil de platine flambé, la substance à inoculer (pus, culture, petit fragment d'organe, etc.). La plaie cornéenne se referme d'elle-même dans la plupart des cas et l'on peut alors assister au développement de la lésion expérimentale. Pour empêcher les infections accidentelles que l'animal provoque souvent en se grattant l'œil avec ses pattes, une fois l'inoculation opérée, on rabat (si c'est un lapin) l'oreille sur l'œil et on la fixe à la joue correspondante par un point de suture; mais cette précaution est ordinairement inutile, car l'occlusion obtenue ainsi est bien loin d'être parfaite.

#### B. — PRINCIPAUX MICROBES PATHOGÈNES DE L'ŒIL

§ 184. Nous indiquerons ici les microbes oculaires pathogènes les plus habituels avec leurs caractères généraux et différentiels.

**Streptocoque.** — Conjonctive normale; certaines conjonctivites; abcès sous-conjonctivaux; abcès des paupières; panophtalmies; sécrétions purulentes en général.

*Morphologie.* — Coccus en chaînettes (30 à 40 grains dans les bouillons, 6 à 10 grains dans le pus et sur milieux solides); grains égaux dans les cultures jeunes, inégaux dans les cultures vieilles.

*Diagnostic bactériologique.* — Se colore par la méthode de Gram, ne liquéfie pas la gélatine sur laquelle il se développe en petites colonies opaques, sphériques, grosses comme une tête d'épingle. — Le bouillon à 37° se trouble d'abord puis s'éclaircit au bout de 48 heures, la culture flottant en flocons déliés: le bouillon devient acide. — Lait coagulé en 4 à 5 jours.