

CHAPITRE VIII

EXAMEN MICROSCOPIQUE DES MICROBES

MÉTHODES DE COLORATION

Jusqu'à présent, nous n'avons examiné que des microbes agglomérés, soit en colonies sur des milieux solides, soit peuplant un milieu liquide : nous n'avons approfondi que la technique de l'examen macroscopique. Ce chapitre sera consacré à l'examen microscopique ; il traitera de la technique usitée pour étudier l'individu microbien isolé. Nous avons vu, dans l'Introduction, que la morphologie du microbe est une des bases de la classification ; c'est dire que l'examen microscopique est indispensable à la détermination des microbes. Pour être fructueuse cette étude microscopique doit disposer des moyens appropriés aux faibles dimensions des infiniment petits : de microscopes à forts grossissements et suffisamment éclairés, et, en outre, de procédés de coloration permettant de faire saillir le microbe du fond de la préparation.

On n'oubliera pas qu'il est des microbes tellement petits qu'on les a appelés invisibles. Il faut 2 000 diamètres et un éclairage intensif, pour voir le microbe de la *péri-pneumonie bovine*. D'autres sont encore plus petits.

§ 1. — LE MICROSCOPE

Nous n'avons rien de particulier à dire des loupes ou des microscopes à faibles grossissements employés pour l'examen direct des colonies sur milieux solides (p. 228). Nous avons

également parlé des instruments destinés à faire des cultures aérobies ou anaérobies sous le microscope (p. 156 et 209).

Nous ne décrivons pas le microscope ; mais nous insisterons sur les accessoires indispensables au bactériologiste, pour pouvoir obtenir des grossissements allant jusqu'à 1500 diamètres sans que la préparation soit trop sombre.

Un bon microscope de bactériologiste doit jouir au maximum des qualités requises. Il doit avoir un excellent *pouvoir définissant* (les bords des microbes très nets), avec un *pouvoir pénétrant* (netteté des microbes hors du foyer) suffisant, et un *pouvoir résolvant* intense (bonne image des détails).

L'éclairage au bec Auer ou électrique est excellent. Il est bon d'interposer un écran entre le microscope et la source lumineuse.

1° Objectif à immersion homogène. — Le principe de l'immersion (AMICI) consiste à relier l'objectif à la préparation par une couche de liquide dont l'indice de réfraction se rapproche sensiblement de celui du verre. On évite l'inconvénient des réfractions multiples. On s'est d'abord servi de l'eau. Il vaut mieux employer de l'huile de cèdre livrée par le fabricant de l'objectif ; l'indice de réfraction de l'huile étant le même que celui de la lentille de l'objectif, l'immersion est homogène. Les objectifs à immersion sont des instruments très délicats ; ils seront conservés dans des étuis en cuivre à couvercle soigneusement vissé, pour échapper à l'action si nocive des vapeurs acides du laboratoire. Pour employer un objectif à immersion, on le retire de son étui et on le visse au revolver du microscope. On place alors la préparation sur la platine et on dépose sur le centre de la lamelle, ou sur un point quelconque à examiner, une goutte d'huile de cèdre au moyen du bouchon plongeur du flacon. La goutte doit être suffisante pour s'étaler uniformément sous la lentille de l'objectif ; elle ne doit pas la déborder sensiblement. On abaisse alors le tube du microscope, au moyen de la grosse crémaillère (ou par simple glissement dans les anciens microscopes) jusqu'à ce que l'objectif plonge dans la goutte d'huile. A ce moment on fixe la préparation, on

avance l'œil sur l'oculaire et on met *au point* avec la vis micro-métrique. L'examen terminé, on relève le microscope, on dévisse l'objectif, on essuie la lentille avec une fine batiste, on la lave avec du *benzol* ou *xylol* ou du *toluène* (qui enlève toutes les traces d'huile), on l'essuie avec une peau de chamois, et on revisse l'objectif dans son étui. Nous le répétons : un objectif à immersion est un instrument *délicat* qui ne doit jamais être abandonné au microscope. Ses accessoires obligés sont donc ; un étui en cuivre, un flacon d'huile de cèdre avec bouchon plongeur, un flacon de *benzol* ou de *xylol*, un carré de batiste, une peau de chamois.

Le lavage de l'objectif au *xylol* doit se faire avec précaution car un excès de *xylol* décollerait la lentille.

On consultera les tables des fabricants de microscope, pour savoir à quel grossissement correspond le numéro de l'objectif. Le numéro de l'oculaire fera également varier le grossissement. On obtiendra le maximum de grossissement en allongeant du nombre de centimètres convenable (en général 160 mm) le tube du microscope. On a besoin couramment de grossissements de 800 à 4 200 diamètres.

2° Oculaires. — Les oculaires sont désignés par des chiffres de 0 à 5, le plus faible étant 0.

On augmente beaucoup le grossissement en employant de forts oculaires, mais aux dépens de la netteté de l'image. C'est aussi ce qui se passe si on allonge trop le tube. C'est donc aux objectifs qu'il faut s'adresser pour obtenir le grossissement voulu. On adapte en général un oculaire I ou II, et on tire le tube à 160 millimètres.

Les oculaires compensateurs sont à recommander pour les forts grossissements.

3° Condensateur Abbe. — Le condensateur Abbe se compose essentiellement de trois lentilles superposées qui sont de bas en haut : une lentille biconvexe, une concavo-convexe, une plan-convexe. L'ouverture de ces lentilles diminue de l'inférieure à la supérieure. Elles sont montées dans une garni-

ture conique, leur face convexe en bas (fig. 169). Ce système est placé sous la platine du microscope ; la lentille supérieure pénètre par l'orifice de la platine, de telle façon que la lame de la préparation repose sur sa face plane.

On supprimera tout diaphragme et on ne se servira que du *miroir plan*.

Le condensateur Abbe envoie sur la préparation un cône de lumière tellement intense, que toutes les parties peu ou pas colorées, les tissus spécialement, disparaissent presque complètement. Seules les parties très colorées, les microbes, absorbent suffisamment les rayons pour être visibles ; elles se détachent alors du fond avec la plus grande netteté. En plus, outre les rayons centraux, il existe des rayons obliques par rapport à l'axe du microscope, lesquels augmentent encore la netteté des contours. Une coupe, un frottis qui ne présentait aucun microbe à l'éclairage ordinaire (diaphragme et miroir concave), peut, avec le condensateur Abbe, montrer une grande quantité de microbes colorés. Cet instrument est donc indispensable au bactériologiste. C'est Koch qui l'a employé le premier, pour examiner les microbes colorés, en même temps qu'il supprimait le diaphragme.

Les préparations non colorées ne sont visibles à l'éclairage Abbe qu'à la condition de rétrécir considérablement le champ du microscope au moyen du diaphragme iris ; c'est ainsi qu'on arrive à apercevoir le tissu d'une coupe primitivement invisible.

HUEPPE conseille, pour augmenter encore la netteté, de glisser entre le condensateur et la lame de la préparation, une goutte de l'huile à immersion : le milieu est alors de même réfringence depuis le condensateur jusqu'à l'objectif.

4° Diaphragme iris. — Le diaphragme iris (fig. 170) est formé de lames mobiles les unes sur les autres fixées dans un tambour qui permet de réduire ou d'agrandir l'ouverture centrale en faisant mouvoir un bouton. On n'a pas besoin de rien



Fig. 169.
Schéma du condensateur Abbe.

déranger dans l'appareil pour modifier l'ouverture. Le diaphragme iris permet donc de rétrécir progressivement le champ microscopique.

C'est un instrument commode pour examiner les préparations peu ou pas colorées, par exemple les microbes vivants.

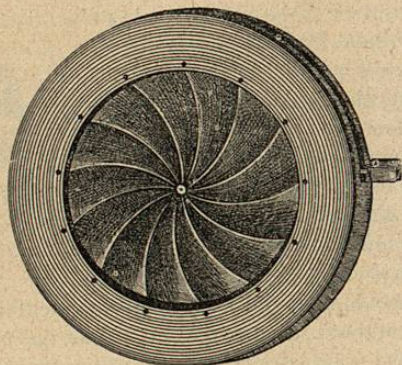


Fig. 170.
Diaphragme iris.

On rétrécit d'autant plus l'ouverture que la préparation est moins colorée. Nous venons de voir qu'il est employé quelquefois avec le condensateur Abbe.

Le diaphragme est également indispensable pour l'examen avec un objectif très puissant des préparations colorées.

5° Micromètre. — Les microbes ont des dimensions qu'on exprime par le nombre de μ ou millièmes de millimètre. On se sert d'un oculaire quadrillé pour faire ces mensurations. On pourrait s'en passer, en connaissant très exactement le grossissement obtenu et en mesurant avec une règle les dessins obtenus à la chambre claire.

6° Lames et lamelles. — On emploiera des lames et des lamelles de bonne qualité et assez minces.

Les lames sont en général des dimensions 76/26 millimètres; les lamelles 18/18 sont les plus employées. On aura cependant quelques lamelles 22/32.

La propreté des lames et lamelles est indispensable. Lorsqu'elles sont souillées de baume ou d'huile, on les recueille dans un cristalliseur rempli d'alcool à brûler. Le nettoyage s'opère en les faisant bouillir une dizaine de minutes dans une capsule de porcelaine remplie d'une solution de carbonate de soude à 5 0/0. On lave et on passe dans l'acide sulfurique ou dans la solution :

Acide sulfurique	100
Bichromate de potasse	20
Eau	1000

On les conserve dans l'alcool à 95° ou dans de l'alcool à 70° additionné de quelques gouttes d'ammoniaque.

§ 2. — EXAMEN DES MICROBES SANS COLORATION

Avant la découverte des méthodes de coloration on avait vu des microbes, même dans les coupes des tissus. On regardait directement les cultures délayées dans de l'eau, ou on traitait les coupes par les acides et les alcalins. Les coupes d'un tissu durci à l'alcool étaient plongées dans une solution forte d'acide acétique, puis dans une solution de potasse ou de soude à 2 p. 100; elles devenaient ainsi absolument transparentes sauf dans les points contenant des amas microbiens. C'est ainsi que BECKMANN avait vu des bactéries dans les vaisseaux du rein bien avant d'en connaître la nature. HEIBERG s'était servi de la potasse dans ses études sur la pyhémie. Enfin BAUMGARTEN, par le même procédé, avait vu, avant KOCH, le bacille tuberculeux. Mais on comprend le peu de progrès réalisables par des méthodes aussi primitives, aujourd'hui complètement abandonnées. Le microbe, même en culture abondante, est à peine visible grâce à son peu de réfringence; il est absolument impossible de savoir si la culture est pure, etc.

L'examen des microbes sans coloration n'est plus usité aujourd'hui *que pour étudier leur développement*, en cultures sous le microscope (p. 156 et 209), ou pour constater l'agglutination des microbes avec la *réaction agglutinante* (voy. p. 244). Lors même qu'on veut connaître la forme exacte et les mouvements des microbes, c'est-à-dire les propriétés des microbes vivants, on se sert des méthodes colorantes (voy. p. 260).

On examinera avec l'objectif sec 8 ou 9, l'oculaire 1 ou 2, sans éclairage Abbe.

§ 3. — EXAMEN DES MICROBES AVEC COLORATION

La coloration des microbes est la base de leur examen microscopique.

A) GÉNÉRALITÉS

1° Avantages de cette méthode. — Ils sont nombreux. La coloration permet de découvrir des microbes là où ils étaient invisibles. Elle est indispensable pour étudier la forme des microbes, leurs mouvements, les particularités de leur structure telles que cils, spores, forme des extrémités (*B. anthracis*), etc. Elle est précieuse pour la classification, en faisant connaître les propriétés chimiques de certains microbes : méthode de GRAM, coloration du *B. tuberculeux*, etc. Seule, la coloration permet de voir les microbes dans les coupes et d'étudier leur distribution, leurs rapports avec les cellules. Enfin, la coloration rend possible la conservation pendant plusieurs mois ou davantage des types de préparations de cultures, des coupes, qu'on peut montrer, dessiner, photographier.

2° Historique (Weigert, Koch, Ehrlich). Principes généraux. — On sait que la découverte des réactions chimiques des tissus, la possibilité de différencier certaines de leurs parties au moyen de réactifs, date de l'introduction du carmin en histologie par HARTIG, en 1854, et GERLACH, en 1858. Mais, en 1871 seulement, WEIGERT appliqua le carmin ammoniacal à la

coloration de certains cocci. En 1872, EBERTH et WAGNER réussissaient à colorer des cocci à l'aide de l'hématoxyline, mais échouaient pour les bacilles. La véritable découverte de la coloration pratique des microbes date de 1875, et elle appartient à WEIGERT¹. Le premier, WEIGERT emploie les couleurs d'aniline (le violet de méthyle) et montre que les cocci sont colorés par les réactifs du noyau; le premier, en outre, il réussit à décolorer les tissus autour des microbes. Il plongeait les coupes dans une solution d'hématoxyline qui colorait en bleu noyaux et cocci; il décolorait les noyaux à l'aide d'une solution étendue de potasse et d'acide acétique; ces coupes furent les premières où seuls les microbes restaient colorés. L'hématoxyline ne réussissant pas à colorer les bacilles, WEIGERT leur appliqua les couleurs d'aniline; c'est en 1877 que furent ainsi obtenus les premiers bacilles colorés. Cette même année 1877 voit naître les travaux de KOCH² qui fait entrer définitivement dans la pratique l'usage des couleurs d'aniline en montrant l'intensité, la sûreté, la rapidité de cette méthode de coloration. En 1878, KOCH obtient des coupes entièrement décolorées, sauf les microbes, en les lavant dans une solution de carbonate de potasse; il était sur la voie de la découverte du bacille tuberculeux. En 1881, WEIGERT montre les premières coupes avec double coloration; les microbes étant colorés par le bleu de méthylène, et les noyaux en rouge par le picro-carmin. En 1882, KOCH colore une espèce déterminée (le *B. tuberculeux*) par un procédé non applicable aux noyaux et aux autres microbes. Les couleurs d'aniline étaient définitivement entrées dans la pratique. Mais quelles couleurs employer?

Ici se placent les travaux d'EHRlich³ et de ses élèves SCHWARZE et WESTPHAL (1880). WEIGERT, EBERTH, et WAGNER avaient fait admettre qu'il y avait une relation entre les réac-

¹ WEIGERT, *Zur Technik der mikroskopischen Bacterien*, Untersuchungen Virchow's Archiv., t. LXXXIV.

² KOCH, *Untersuchungen über Bacterien*, Cohn's Beiträge zur Biol. der Pflanzen, III.

³ EHRlich, *Technik des Bacterien Untersuchung*, Zeits. f. kl. Medicin, I et II.

tions chimiques et la forme du microbe ; le carmin, l'hématoxiline, la safranine (un des meilleurs réactifs des noyaux) coloraient les cocci et non les bacilles. OBERMEYER (1873) croyait que les spirilles se coloraient moins bien que les autres formes microbiennes. C'était une erreur ; il n'y a aucune relation entre la forme et la réaction chimique, cette dernière est spéciale pour une espèce donnée et dépend de la couleur employée ; c'est ce qui va ressortir de l'exposé des expériences d'EHRlich et de son école.

EHRlich a divisé les couleurs d'aniline (lesquelles sont des sels) en *basiques*, *acides* ou *neutres*. Les *couleurs basiques* sont celles dont la base est colorante, tandis que l'acide ne l'est pas ; ainsi, dans l'acétate de rosaniline, la rosaniline est colorante et l'acide acétique ne l'est pas. Dans les *couleurs acides*, au contraire, l'acide est colorant, la base ne l'est pas ; ainsi, dans le picrate d'ammoniaque, c'est l'acide picrique qui a les propriétés colorantes. Les *couleurs neutres* sont celles qui sont composées d'un acide et d'une base doués tous les deux du pouvoir colorant ; exemple : le picrate de rosaniline. Voici un tableau des principales couleurs d'aniline.

	COULEURS BASIQUES :	COULEURS ACIDES :	COULEURS NEUTRES :
Violet	V. de gentiane. V. de méthyle (1B, 5B, 6B). Krystall-v. V. dahlia. Thionine.	Eosine. Safranine. Purpurine. Fluorescine. Tropéoline. Picrates, etc.	Picrate de rosaniline.
Rouge	Fuchsine. Rubine. Safranine.		
Bleu	B. de méthylène. B. Victoria.		
Vert	V. de méthyle.		
Brun	B. de Bismarck. Vésuvine.		

Cette division des couleurs d'aniline a une importance capitale en histologie et en bactériologie, car ces différentes classes de couleurs ont des propriétés bien spéciales.

Les *couleurs basiques* (*couleurs à élection*) ont une élection remarquable pour les noyaux des cellules et par conséquent pour tous les microbes, puisque le soi-disant protoplasma des microbes est en réalité de la substance nucléaire ; le microbe est une cellule réduite à son noyau. Ce sont des *couleurs nucléaires*. Cela se comprend assez facilement. Les matières albuminoïdes, et tout particulièrement les nucléines, dont se rapproche beaucoup le protoplasma microbien, sont acides et se combinent avec la base colorante des couleurs basiques. La combinaison est d'autant plus fixe que l'albuminoïde est plus acide, c'est dire que la coloration des noyaux et des microbes est plus fixe que celle du reste d'une coupe de tissu par exemple. Les couleurs basiques ont donc des propriétés électives qui les rendent très précieuses au bactériologiste.

Les *couleurs acides* (*couleurs sans élection*), au contraire, imprègnent indistinctement tous les éléments d'une préparation (*colorants diffus*), sans que la coloration résulte d'une combinaison. Toutes les parties de la cellule sont également teintées sans élection. Le principe colorant étant acide ne peut se combiner avec les albuminoïdes également acides ; c'est une teinture uniforme et non une réaction chimique. Le bactériologiste n'emploiera donc les couleurs acides que dans des cas très restreints. Il en sera de même des *couleurs neutres* et pour les mêmes raisons.

En résumé : on emploiera les *couleurs basiques*. On obtient avec elles des colorations aussi fixes que la combinaison chimique qu'elles représentent ; ces colorations n'atteignent que certains éléments ; enfin leur fixité varie avec les différentes cellules et les espèces microbiennes. La combinaison est plus stable avec le protoplasma de tel microbe qu'avec celui de tel autre : c'est un signe distinctif précieux pour la diagnose de l'espèce. La décoloration incomplète des coupes repose aussi sur le principe des différences dans la stabilité des colorations des éléments constituants. Une expérience d'EHRlich fait comprendre cette hiérarchie dans la stabilité de la coloration. On étale sur une lamelle un frottis de tissu quelconque contenant différents microbes, parmi lesquels le *B. tuberculeux*.

On colore longuement au violet de gentiane et on lave à l'eau. On examine : la coloration est diffuse. On traite par l'acide acétique dilué : seuls les noyaux et les microbes restent colorés. On traite par le carbonate de potasse : les noyaux ont disparu, tous les microbes sont encore colorés. On traite par une solution d'acide nitrique : il ne reste plus de coloré que le *B. tuberculeux*. On prolonge le séjour dans le bain d'acide nitrique : tout est décoloré, c'est la « décoloration maxima » d'EHRlich.

Il n'y a donc pas de coloration absolument fixe, il y a des colorations *plus ou moins fixes* suivants les éléments combinés. La décoloration par un acide minéral s'obtient grâce à l'affinité de ces acides pour les couleurs avec lesquelles ils forment des combinaisons très solubles dans l'eau et à peu près incolores : la matière colorante, sel mono-acide, est devenue sel tri-acide, incolore ; par addition d'eau le sel redevient mono-acide coloré ; la décoloration a lieu au moment où l'acide employé est plus fort que l'acidité du protoplasma coloré. N'oublions pas cependant qu'il s'ajoute à cela les différences d'épaisseur des cuticules microbiennes. La décoloration par l'alcool, par la glycérine s'obtient grâce à une simple affinité de ces substances pour les colorants, l'alcool fait rapidement disparaître le vert de méthyle, tandis qu'il respecte la vésuvine ; le brun de Bismarck, la vésuvine résistent à la glycérine.

On conçoit les progrès réalisés à la suite de ces découvertes d'EHRlich.

La possibilité des *doubles colorations*, connues depuis WEIGERT et BAUMGARTEN, est facile à comprendre avec les données précédentes. Elles seront successives, substitutives ou électives (voy. p. 268).

On emploiera une couleur basique quelconque si on veut simplement mettre en relief l'ensemble général d'une préparation ; nous étudierons plus loin les colorations spéciales. Le *violet de gentiane* est la couleur la plus agréable pour l'examen microscopique. Avant l'introduction des plaques iso-chromatiques en photographie on se servait beaucoup de la vésuvine et du brun de Bismarck, qui seules permettaient une photo-

graphie nette des préparations colorées ; actuellement on peut photographier des préparations de toutes couleurs. NICOLLE préconise beaucoup la *thionine* (voy. plus loin). Un composé minéral, l'*oxychlorure de rhuténium ammoniacal*, a les mêmes propriétés colorantes que les couleurs d'aniline, mais en plus colore bien les pièces fixées par l'acide osmique (NICOLLE et CANTACUZÈNE).

3° Mode de conservation et d'emploi des couleurs d'aniline. — On achète et on conserve les couleurs d'aniline en poudre dans des flacons ordinaires. Il importe de s'approvisionner constamment à la même fabrique, car des dénominations identiques ne s'appliquent pas toujours à des produits identiques et bien définis. Il est arrivé à des bactériologistes d'obtenir avec une couleur des résultats, impossibles à reproduire avec d'autres échantillons, la première provision une fois épuisée.

Les couleurs d'aniline sont solubles dans l'alcool et dans l'eau.

On prépare d'avance des *solutions alcooliques* ; elles ne s'altèrent pas et peuvent se conserver longtemps. Elles doivent être saturées ; on verse dans une éprouvette de l'alcool absolu et 25 p. 100 environ de poudre : on filtre au bout de vingt-quatre heures pour enlever l'excès de dépôt. Les solutions alcooliques sont conservées dans des flacons compte-gouttes de 50 centimètres cubes environ. Le modèle le plus commode de ces flacons est représenté figure 171. Elles serviront à fabriquer les solutions définitives, en faisant tomber quelques gouttes de la solution alcoolique dans de l'eau, ainsi que nous le verrons.

Les *solutions aqueuses* doivent toujours être préparées au moment de s'en servir, car elles s'altèrent facilement, e

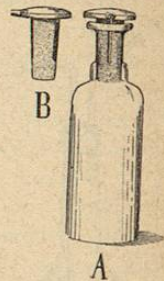


Fig. 171.

Flacon compte-gouttes.

A, flacon bouché avec son bouchon vu de face pour montrer la rainure du bec. — B, bouchon vu de profil pour montrer les rigoles latérales.

peuvent même devenir à la longue d'excellents milieux de culture. Il est facile de comprendre qu'une solution destinée à colorer les microbes d'une préparation ne doit pas en contenir. On doit toujours filtrer une solution aqueuse avant de l'employer pour se débarrasser des grumeaux. En général, on se sert de solutions mixtes : 10 parties d'eau pour 1 partie de solution alcoolique ; des solutions purement aqueuses peuvent cependant avoir leurs indications, par exemple : la coloration légère des microbes vivants.

4° Outillage nécessaire pour les colorations. — Il faudra des provisions de couleurs diverses en poudre, des solutions alcooliques en flacons compte-gouttes, de l'eau distillée dans une pissette (fig. 172), des éprouvettes graduées de petites dimensions, des entonnoirs en verre avec filtres



Fig. 172.
Pissette.



Fig. 173.

Pince Cornet maintenant une lamelle.

en papier, des verres de montre ou des coupelles en porcelaine, des verres à pied, des pinces Cornet (fig. 173), des flacons divers simples ou à compte-gouttes contenant différents liquides : eau d'aniline, solutions d'acide nitrique ou sulfurique, liquide iodo-ioduré, etc., un bec Bunsen ou une lampe à alcool, une aiguille à dissection, sans parler bien entendu des lames et des lamelles (voy. p. 252)

B) COLORATION DES MICROBES VIVANTS

Cette méthode de coloration ne s'applique naturellement qu'à l'examen des cultures et quelquefois des exsudats, mais

nullement à celui des coupes. Elle sert à observer la forme réelle du microbe qui n'est pas rétracté par la dessiccation, ses mouvements¹, ses dimensions. Elle est rapide, et journellement employée dans les laboratoires.

On se sert pour colorer le microbe sans les tuer de solutions aqueuses très diluées ; la dilution doit être telle que la goutte écrasée entre la lame et la lamelle paraisse incolore. On met une goutte d'une pareille solution au centre d'une lame, et on dépose sur elle une goutte de la culture à examiner. Si la culture est liquide, on la puise directement ; si elle est solide, on en délaye une parcelle dans une solution de sel marin à $\frac{0,7}{100}$; on peut aussi ajouter un peu de solution saline à la culture liquide. La goutte de culture déposée sur la goutte de solution colorante, on les écrase avec une lamelle qu'on scelle à la paraffine, si l'examen doit être un peu prolongé. La préparation est prête à être examinée. Le fond paraît incolore, les microbes se détachent suffisamment colorés avec tous leurs mouvements, leur forme réelle. Si l'étude des mouvements est le véritable but de l'opération, on se servira avec avantage de la chambre humide de Ranvier (p. 159). Les mouvements cessant dès que l'oxygène de la goutte est absorbé, on prolongera leur durée en emprisonnant une bulle d'air entre la lame et la lamelle, ou en introduisant dans la goutte des fragments d'algues vertes d'après le procédé d'ENGELMANN.

On peut opérer un peu différemment. On place côte à côte sur la lame la goutte de culture et une goutte très fine de solution colorante concentrée. On fait rejoindre les deux gouttes par leur bord en appliquant la lamelle ; les microbes ont alors des degrés inégaux de coloration, suivant qu'on les examine

¹ Nombre d'espèces microbiennes sont mobiles. Cette mobilité est un caractère assez important pour la diagnose. Elle est très variable, très rapide ou très lente. La translation des microbes s'exécute suivant des modes très divers : progression régulière d'avant en arrière, autour d'un axe longitudinal, par oscillations. Les spirilles se meuvent comme des anguilles. Les microcoques exécutent des mouvements de gyration sur eux-mêmes.

Cette mobilité est due aux cils vibratiles (p. 275).

en un point plus ou moins rapproché de la tache colorante.

MACÉ recommande l'usage du vert de méthyle qui ne colore pas uniformément; je préfère la fuchsine ou le violet de gentiane.

C) COLORATION DES MICROBES FIXÉS MORTS (HORS DES COUPES)

En laissant de côté, pour le moment, la coloration des microbes dans les coupes histologiques, nous devons étudier les méthodes de coloration des microbes présents dans les cultures, les exsudats, les liquides pathologiques quelconques (crachats, etc.), et même dans les frottis. On appelle *frottis* le mode de préparation qui consiste à écraser un tissu entre deux lames; les débris sont colorés et examinés; les microbes, certaines formes cellulaires, apparaissent ainsi suffisamment. Le frottis ne peut remplacer les coupes, mais constitue un procédé rapide pour la coloration des microbes dans un tissu.

La base de la coloration des microbes, dans ces conditions, est la *fixation*; les microbes sont tués et fixés dans leur forme à la lamelle qui subira les différents bains de la coloration. Depuis longtemps (1838) EHREMBERG avait employé la dessiccation pour fixer les infusoires; EHRLICH avait également chauffé une goutte de sang pour étudier les globules. KOCH appliqua ce procédé à la bactériologie, en 1879.

1° Méthode générale. — Elle comprend un certain nombre de temps:

A. ÉTALEMENT. — Il faut d'abord étaler le liquide ou le frottis contenant les microbes sur *deux lamelles*. Cette opération doit se faire sur les lamelles et non sur les lames; le maniement de celles-ci serait plus difficile et la couche colorée serait trop éloigné de l'objectif du microscope. Les lamelles peuvent servir plusieurs fois si on a soin de les laver aux acides (voy. p. 253). Au moment de leur emploi, elles seront lavées à l'eau chaude et à l'alcool pour les dégraisser.

On prend deux lamelles bien sèches, et on dépose sur le centre de l'une d'elles la goutte de culture ou d'exsudat, ou la parcelle de tissu, de pus, de crachat, de dépôt, etc., destinée à être écrasée. Les cultures solides sont au préalable délayées, dans une goutte d'eau distillée et stérilisée, à l'aide d'un verre de montre; les liquides pathologiques peuvent être centrifugés. On recherchera de préférence les parties solides des crachats, des exsudats. On recouvre la première lamelle avec une seconde, et on fait glisser alternativement l'une contre l'autre les deux lamelles en les serrant entre le pouce et l'index. Lorsque la goutte liquide paraît uniformément étalée, lorsque le frottis est suffisamment écrasé, on sépare brusquement les deux lamelles par glissement, et on saisit chacune d'elles avec une pince Cornet (fig. 173).

Il est quelquefois intéressant de constater le groupement naturel des microbes d'une culture solide. KOCH a employé la *préparation par impression* (Klatschpreparate) pour étudier les colonies du *B. tuberculeux*. On applique légèrement une lamelle sur la face supérieure d'une colonie qui s'accrole au verre (voy. p. 434).

B. DESSICCATION. — Pour opérer la dessiccation il suffit de laisser la pince et sa lamelle à l'air libre, sous une cloche pour éviter les poussières; mais la dessiccation est longue. On peut l'activer avec un soufflet (poire en caoutchouc) ou en mettant la lamelle à l'étuve (+ 37°).

On utilisera aussi la *platine chauffante* (fig. 174).

C. FIXATION. — On doit fixer solidement la préparation à la lamelle, pour que les manipulations ultérieures ne l'entraînent pas. On obtient cette fixation en *coagulant les matières albuminoïdes* par la chaleur; il se produit une véritable rétraction qui fait adhérer au verre. C'est le temps le plus délicat des préparatifs de la coloration; si on chauffe trop, le protoplasma ne fixe plus les couleurs. On obtient une fixation excellente en mettant la lamelle dans une étuve à + 415°; on préfère, pour aller plus vite, la passer simplement au-dessus de la flamme

d'une lampe à alcool ou d'un bec Bunsen, en la tenant entre deux doigts ou mieux au bout de la pince Cornet. On promène lentement la lamelle en la faisant passer trois fois sur la

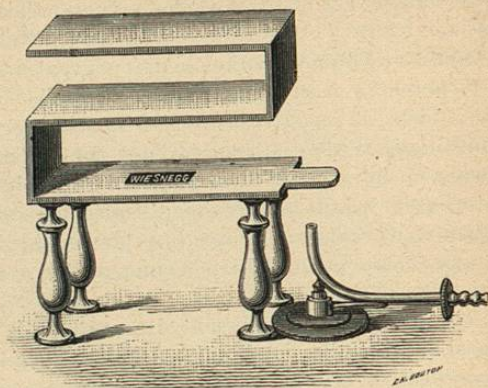


Fig. 174.
Platine chauffante.

flamme, le côté de la préparation en l'air, « comme si on coupait du pain » (Koch). Ces trois passages suffisent à porter la lamelle à $+120^{\circ}$. La fixation est très difficile si le bouillon de culture contenait de la glycérine (cultures de *Bacilles de Koch*).

On peut aussi fixer à l'alcool-éther (parties égales) ou au chloroforme.

D. COLORATION. — Deux procédés sont employés. Le premier consiste à faire tomber avec un compte-gouttes quelques gouttes de la solution colorante sur la lamelle maintenue, au moyen de la pince Cornet, la face utile en haut. Dans le second procédé, la lamelle est plongée, la face utile en bas, dans un verre de montre contenant la solution colorante.

a. Les bains colorants simples se composent d'une solution d'une couleur d'aniline quelconque :

Solution alcoolique	1
Eau	10

dans laquelle on laisse la lamelle pendant deux à dix minutes.

Pour obtenir une coloration plus intense on laisse la lamelle pendant vingt-quatre heures dans le bain à froid¹, ou pendant dix minutes dans le bain chauffé jusqu'à production de vapeurs. Ce chauffage (KOCH, LÖFFLER) se fait dans une étuve à $+50^{\circ}$, ou en mettant le verre de montre au-dessus d'une flamme. On se sert alors de verres de montre rodés qu'on recouvre hermétiquement, ou mieux encore de capsules en porcelaine ou en platine.

b. Un autre procédé consiste à employer un mordant (procédé imité de la teinture) qui, se combinant à la fois avec la matière colorante et l'élément cellulaire, les unit plus intimement. Citons parmi les principaux mordants :

Acides	}	acétique.
		oxalique.
A. phénique	}	à 5 p. 100 (ZIEHL). Créosote.
Tanin		à 25 p. 100.
		Iode en solution iodo-iodurée.
		Bichlorure de mercure.
Alcalins	}	Potasse à 0,01 p. 100 (Koch, LÖFFLER).
		Ammoniaque.
		Aniline (EHRlich, 1882).
		Etc.

L'huile d'aniline est blanche lorsqu'elle est bien pure, mais brunit très facilement. On fait un mélange de une partie d'huile pour vingt d'eau, on agite fortement, on laisse reposer cinq minutes, et on filtre sur papier mouillé jusqu'à clarification. On appelle eau d'aniline le produit de la filtration; il peut se conserver assez longtemps. L'eau d'aniline est de moins en moins utilisée.

On emploie couramment (et presque uniquement) les liquides à mordants pour toutes les colorations. On devra préparer les suivants :

¹ On se sert alors de godets en porcelaine s'emboîtant les uns dans les autres pour éviter l'évaporation.

1° *Liquide phéniqué de Ziehl* (1882) :

Fuchsine ou rubine	1 gramme.
Acide phénique neigeux	5 —
Alcool à 90°	10 —

Triturer d'abord la fuchsine et l'alcool; ajouter l'acide phénique; agiter jusqu'à dissolution. Ajouter :

Eau	90 cent. cubes.
---------------	-----------------

Attendre vingt-quatre heures. Filtrer. Mettre en flacon compte-gouttes.

Ce liquide colore tous les microbes à froid en quelques secondes, sauf le *Bacille tuberculeux* qui exige une plus longue exposition (voy. p. 293). Il ne doit être employé que pour la coloration des cultures, car le phénol détermine des grumeaux dans les préparations de sang, de pus, d'exsudats. Il colore cependant bien le *Pneumocoque* avec sa capsule dans le sang du lapin ou de la souris.

2° *Bleu phéniqué de Kühne* :

Bleu de méthylène	1 gramme.
Acide phénique neigeux	1 —
Alcool absolu	40 cent. cubes.
Eau	100 —

Liquide à placer à côté de celui de ZIEHL.

3° *Bleu alcalin de Löffler* (1884) :

Sol. alcoolique de bleu de méthylène	30 cent. cubes.
Potasse	0 cc. 01
Eau	100 cent. cubes.

4° *Violet aniliné d'Ehrlich, Weigert* :

Solution alcoolique saturée de violet de gentiane ou de violet de méthyle	5 cent. cubes.
Eau d'aniline	400 —

à mélanger au moment de l'employer.

5° *Thionine phéniquée* (NICOLLE) (voir p. 291) :

Solution saturée de thionine dans alcool à 50°	10 cent. cubes.
Eau phéniquée à 1 p. 100	100 —

C'est, peut-être, le plus usité des colorants ordinaires.

6° *Bleu de Roux*. — Préparer séparément chacune des deux solutions :

A	B
Violet dahlia 1 gr.	Vert de méthyle 2 gr.
Alcool absolu 40 —	Alcool absolu 20 —
Eau distillée . Q. S. p. 100 —	Eau distillée . Q. S. p. 200 —

Au bout de vingt-quatre heures, les mélanger. Filtrer. Conserver en flacon bien bouché.

Toutes ces solutions doivent être filtrées au moment de s'en servir. On verse sur un petit entonnoir garni d'un filtre, et on fait tomber directement sur la lamelle.

c. Dans les vieilles cultures, surtout en bouillon, existent des matières précipitées qui se colorent comme les microbes et nuisent à la netteté de la préparation. On peut remédier à cet inconvénient.

THOINOT et MASSELIN, colorent à la *fuchsine phéniquée de Ziehl* pendant cinq à quinze minutes, rincent et séchent. Ils plongent ensuite la préparation dans de l'*huile d'aniline* jusqu'à décoloration en apparence totale, puis font passer dans l'*essence de bergamote* ou de *girofle* et enfin dans le *xylol*.

GUIRAUD et GAUTIER (1901) recouvrent la lamelle d'une solution aqueuse saturée de *bleu d'aniline* et chauffent jusqu'à dégagement de vapeurs, à deux ou trois reprises. On lave à grande eau. La lamelle paraît complètement incolore. L'opération ne dure pas cinq minutes. Seuls les microbes sont colorés.

E. DÉCOLORATION, DOUBLES COLORATIONS. — a. Le plus souvent la coloration est terminée, et on passe de suite au lavage. Mais lorsqu'on veut auparavant décolorer la préparation en totalité