

Préparer d'avance.

31. — VÉSUVINE ET VIOLET DE MÉTHYLE B. en solutions aqueuses saturées (1 gr. de matière colorante pour 50 cent. cubes d'eau distillée).

32. — NIGROSINE.

Nigrosine	1 gramme
Eau distillée	100 cent. cubes

II. — DES PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES

Peu de parties de l'organisme animal sont susceptibles d'un examen microscopique sans avoir subi une préparation préalable. Tout d'abord, pour se prêter à un examen microscopique, les organes doivent posséder une certaine transparence ; cette transparence nous pouvons l'obtenir soit en décomposant les organes en leurs éléments, par dissociation, soit en les divisant en coupes très minces ; cette dernière méthode n'est applicable qu'aux organes présentant une certaine consistance. Or ces organes sont fort peu nombreux. Ils sont tantôt trop mous, tantôt trop durs (calcifiés). Dans le premier cas il faut les durcir, dans le second les ramollir par décalcification ; mais le durcissement et la décalcification ne sauraient être appliqués aux organes frais sans nuire à leur structure. Ces méthodes doivent donc forcément être précédées d'une fixation préalable des moindres particules organiques. Les coupes ne sont donc possibles le plus souvent qu'après fixation préalable et durcissement consécutif (ou décalcification). D'ailleurs les coupes elles-mêmes exigent des manipulations ultérieures ; elles peuvent être rendues transparentes rapidement à l'aide d'agents qui éclaircissent, méthode surtout applicable, et avec succès, aux pièces fraîches, ou bien cet éclaircissement peut être réalisé après coloration préalable de la coupe. Les matières colorantes sont de précieux auxiliaires pour le micrographe ; elles trouvent leur emploi dans les pièces fraîches, voire même dans les organes vivants. Un grand nombre de découvertes importantes sont dues à l'emploi des colorants. Injectées dans les vaisseaux, les masses colorantes nous renseignent sur la distribution et le trajet des plus fins ramuscules vasculaires.

I. Matériaux pour l'étude microscopique.

Ce sont les amphibiens qui conviennent le mieux pour l'étude des éléments ou tissus simples. Les grenouilles, la salamandre tachetée, dont les éléments anatomiques sont très volumineux, sont surtout à recommander. Les mammifères au contraire se prêtent mieux à l'étude des organes. Pour la grande majorité des cas nos mammifères domestiques suffisent. C'est ainsi que les lapins, les cochons d'Inde, les rats, les souris, de même que les jeunes chiens, chats, etc. sont souvent avantageusement employés. On ne

négligera cependant aucune occasion de se procurer des organes de l'homme. Dans les cliniques chirurgicales, les pièces absolument fraîches ne sont pas rares, et pendant l'hiver, un grand nombre de pièces sont encore utilisables 2 et 3 jours après la mort.

Il est bon en général de fixer les organes lorsqu'ils sont encore chauds ; à cette fin on préparera, avant de sacrifier un animal, tous les flacons avec le liquide conservateur destiné à fixer les pièces qu'on va enlever (1), en ayant soin de les munir d'une étiquette, indiquant l'organe, le liquide conservateur et la date.

II. Mort et autopsie des animaux.

Pour tuer les amphibiens voici comment il faut s'y prendre. On sectionne avec de forts ciseaux la colonne cervicale (2), puis au moyen d'un stylet insinué dans le canal rachidien et dans la cavité crânienne on détruit la moelle et le cerveau. Les mammifères peuvent être sacrifiés soit à l'aide d'une incision profonde au niveau du cou, allant jusqu'à la colonne vertébrale, soit en leur couvrant le museau d'un linge imbibé de chloroforme.

Les petits embryons de 4 cent. de longueur peuvent être mis tout entiers dans le liquide fixateur, on les enlève au bout de 6 heures et on leur ouvre la cavité abdominale et la cavité thoracique. Lorsqu'on fait l'autopsie d'un animal, il faut autant que possible confier les extrémités à un aide. Les animaux de petite taille peuvent être fixés sur une plaque de liège à l'aide d'épingles. Les organes seront enlevés proprement (de préférence à l'aide de pinces et de ciseaux) ; il faut éviter à tout prix de comprimer les pièces ou de les saisir avec les doigts. Les pinces ne porteront que sur les bords des pièces. Les impuretés qui adhèrent à la pièce comme le sang, le mucus, les matières intestinales, ne seront pas enlevées par grattage avec un scalpel, mais bien en les lavant dans le liquide fixateur.

Avec la méthode que nous allons indiquer, il est presque impossible de ne pas tremper les instruments (ciseaux, pinces, aiguilles) dans des milieux acides, il faudra donc les nettoyer immédiatement, les passer à l'eau et les sécher soigneusement. Il faut surtout éviter de tremper une baguette souillée d'acide ou de matières colorantes dans un autre liquide, les réactifs sont altérés de cette manière et les préparations sont fortement compromises. Il en est de même des verres de montre, des cristallisoirs et

(1) C'est une cruauté inutile que d'enlever des organes d'un animal vivant.

(2) Les grenouilles seront tenues de la main gauche par les extrémités postérieures enveloppées d'un chiffon.

autres petits récipients qu'il faut toujours nettoyer immédiatement après s'en être servi.

Les récipients qui servent à isoler, à fixer, à durcir, à colorer, doivent toujours être couverts. (Les verres de montre doivent toujours être recouverts d'un autre verre de montre, toutes les fois qu'une manipulation exige plus de dix minutes.) On évitera également la lumière directe du soleil.

III. Méthodes pour isoler les éléments.

On isole les éléments soit par dissociation, soit en faisant agir quelque liquide dissolvant qui rend la dissociation souvent superflue. Il est difficile de faire une bonne dissociation. Il faut s'armer de beaucoup de patience et suivre rigoureusement les préceptes suivants : Les aiguilles doivent être bien aiguisées et bien propres, on les passera avant de s'en servir sur la pierre à repasser. Le fragment aura 5 mm. de côté au plus, il doit être dissocié sur la lame dans une seule goutte de liquide. La lame reposera sur un fond noir si la pièce est incolore, sur un fond clair si elle est foncée. Si l'élément est fibrillaire (s'il s'agit d'un faisceau musculaire par exemple) on place les deux aiguilles à une même extrémité et on le partage en deux faisceaux suivant sa longueur. On recommence la même manœuvre pour un de ces faisceaux secondaires et ainsi de suite jusqu'à ce qu'on ait obtenu des fibres fines complètement isolées (1). L'examen préalable à un faible grossissement sans lamelle montre si la dissociation est assez fine, et s'il faut l'arrêter ou la continuer (2).

LIQUIDES A EMPLOYER POUR ISOLER LES ÉLÉMENTS.

a) Pour les épithéliums.

L'alcool au tiers de Ranvier (page 4) est un excellent milieu de dissociation, on prend des fragments de 5 à 10 mm. de côté (des fragments de muqueuse intestinale par exemple), et on les plonge dans 10 cent. cubes d'alcool au tiers ; 5 heures après (10 à 24 heures et plus lorsqu'il s'agit d'un épithélium pavimenteux et ratifié) on enlève prudemment avec des

(1) Il est quelquefois difficile de diviser les fragments fibrillaires en deux faisceaux. On se contente de les diviser sur les trois quarts de la longueur, on recommence la même manœuvre, et l'on obtient ainsi des fibres isolées adhérant les unes aux autres par une de leurs extrémités.

(2) Les préparations dissociées dans peu de liquide sont souvent obscures au microscope, surtout lorsqu'elles ne sont pas recouvertes d'une lamelle. Il suffit pour obvier à cet inconvénient, d'ajouter une goutte de liquide, et de recouvrir d'une lamelle.

pinces les fragments qu'on place sur une lame dans une goutte du même liquide. On frappe légèrement sur la pièce, et un grand nombre de cellules épithéliales s'en détachent. Quelquefois il y a de véritables lambeaux d'épithélium qu'il suffit d'agiter avec une aiguille pour obtenir une dissociation complète; on recouvre d'une lamelle et l'on examine. Si l'on veut colorer les pièces, on porte les fragments à leur sortie de l'alcool dans 6 cent. cubes de picro-carmin (pag. 7). 2 à 4 heures après on les porte avec beaucoup de soin dans 5 cent. cubes d'eau distillée; on les laisse 5 minutes, puis on les place sur la lame dans une goutte de glycérine étendue d'eau, et l'on recouvre d'une lamelle. La préparation peut être conservée.

b) Pour les fibres musculaires et les glandes.

La lessive de potasse à 35 0/0 (pag. 5) est ce qui convient le mieux. Des fragments de 10 à 20 mm. de côté sont plongés dans 10 à 20 cent. cubes de ce liquide; une heure environ après, le fragment se trouve dissocié avec une pipette ou des aiguilles; on place les éléments sur la lame dans une goutte de la même solution de potasse, on recouvre d'une lamelle, et l'on examine. La potasse diluée agit tout différemment. Elle détruit les éléments anatomiques, et si après les avoir traités par la potasse concentrée on examine les éléments dans une goutte d'eau, on ne voit rien ou à peu près rien, la solution tout à l'heure concentrée devient diluée et en très peu de temps les éléments sont détruits. Lorsqu'une solution concentrée de potasse ne donne pas de bonnes dissociations, c'est qu'elle est trop vieille; il faut donc toujours employer une solution fraîchement préparée. Il est bon aussi de savoir que même les bonnes préparations ne peuvent pas être conservées.

Le mélange de chlorate de potasse et d'acide azotique donne également d'assez bons résultats. Pour le préparer on ajoute à 20 cent. cubes d'acide azotique pur (voyez page 4) 5 grammes environ de chlorate de potasse jusqu'à ce qu'il se forme au fond du vase un dépôt insoluble. Un séjour de 14 heures environ dans ce liquide suffit pour désagréger suffisamment une pièce. Celle-ci est ensuite portée dans 20 cent. cubes d'eau distillée où elle peut rester sans inconvénient pendant un laps de temps variant d'une heure à 8 jours. Enfin, pour dissocier on porte la pièce sur une lame dans une goutte de glycérine diluée (page 5). Lorsque l'acide azotique est bien enlevé par les lavages la préparation peut être colorée et conservée. Il ne faut pas essayer de colorer au picro-carmin les fragments avant de les dissocier parce qu'ils deviennent trop friables.

c) Pour les canaux glandulaires.

Le meilleur liquide est l'acide chlorhydrique pur. On plonge de petits fragments (1 cent. de côté environ) dans 10 cent. cubes d'acide, et on les y laisse de 10 à 20 heures. Puis on traite par l'eau distillée pendant 24 heures environ, eau qu'on renouvelle plusieurs fois. En étalant le fragment sur une lame de verre, dans une goutte de glycérine diluée, on peut dissocier très facilement. Les préparations ainsi faites peuvent être conservées.

IV. Méthodes de fixation.

RÈGLES GÉNÉRALES. 1. — Pour fixer une pièce anatomique il faut toujours employer une quantité de liquide fixateur égale au moins à 50 ou 100 fois le volume de la pièce.

2. — Le liquide doit rester continuellement limpide. Dès qu'on constate un léger trouble il faut le renouveler. Ce trouble peut apparaître une heure et même plus tôt après que l'objet a été plongé dans le liquide fixateur.

3. — Les fragments à fixer doivent être petits et ne jamais dépasser 1 à 2 centimètres. Si l'on veut conserver toute la pièce pour choisir plus tard les fragments à examiner, il faut avoir soin d'y pratiquer, après un séjour de 5 à 10 heures dans le liquide, de larges incisions. Les pièces seront suspendues, ou bien elles seront isolées du fond du récipient par une couche de ouate.

1. L'ALCOOL ABSOLU convient très bien à la fixation des glandes, de la peau, des vaisseaux sanguins, etc. en même temps qu'il fixe, l'alcool absolu durcit. Les objets fixés dans l'alcool absolu peuvent être coupés 24 heures après l'immersion (1). Il est donc surtout indiqué lorsqu'il s'agit de faire des examens rapides. L'emploi de l'alcool absolu exige les précautions suivantes: 1° l'alcool absolu, lors même qu'il ne présente aucun trouble, doit être renouvelé 3 à 4 heures après avoir reçu des pièces. 2° Les fragments mis dans l'alcool absolu ne doivent pas toucher ou adhérer au fond du vase (2). On arrive à éviter cet inconvénient soit en suspendant les pièces au moyen d'un fil, soit en les isolant du fond par une mince couche de ouate.

(1) Il ne faut pas trop tarder à couper les pièces fixées dans l'alcool absolu, car à la longue ces pièces peuvent s'altérer; le mieux est de les couper après 3 à 8 jours de fixation. Les coupes des pièces, ayant séjourné 24 heures seulement dans l'alcool absolu se colorent quelquefois mal.

(2) Les points qui ont touché le fond du vase paraissent sur les coupes fortement comprimés.

L'alcool à 90° agit autrement que l'alcool absolu ; il fait rétracter les pièces ; il ne peut donc être employé à la place de l'alcool absolu.

2. L'ACIDE CHROMIQUE s'emploie sous forme de solution aqueuse à deux titres différents.

a) La première solution (pag. 4) de 0,1 à 0,5 0/0 convient surtout pour les organes à tissu conjonctif lâche. Cette solution forte, tout en donnant au tissu conjonctif une excellente consistance, présente le désavantage de rendre les colorations difficiles ; mais, en revanche, elle fixe bien les figures karyokinétiques. Les pièces y séjournent de 4 à 8 jours ; au bout de ce temps elles sont lavées à l'eau courante, puis à l'eau distillée (quelques minutes) et enfin elles sont durcies dans l'alcool progressivement renforcé à l'abri de la lumière.

b) La seconde solution est à 0,05 0/0 ; on la prépare en ajoutant à la solution à 0,1 0/0 un volume égal d'eau. Les pièces sont traitées comme avec la solution a, avec cette différence qu'elles ne séjournent dans la solution b que 24 heures environ. Les solutions d'acide chromique pénètrent lentement, il est bon d'y plonger de petits fragments seulement de 5 à 10 mm. de côté.

3. L'ACIDE SULFO-PICRIQUE DE KLEINENBERG (pag. 4). Les pièces délicates (embryon) ne doivent guère y séjourner plus de 5 heures ; les pièces plus résistantes peuvent y rester 12 à 20 heures ; on durcit, dans l'alcool progressivement renforcé sans avoir préalablement lavé les pièces à l'eau.

4. LIQUIDE DE MULLER (pag. 4). Les pièces sont plongées dans de grandes quantités de ce liquide (400 cent. cubes environ). Elles y séjournent d'une à 6 semaines (1). Après ce temps on sort les pièces et on les lave à l'eau courante si possible pendant 4 à 8 heures ; on les passe quelques minutes à l'eau distillée et l'on durcit dans l'alcool progressivement renforcé, à l'abri de la lumière. Quand on ne suit pas à la lettre les indications précédentes, on risque de voir les pièces s'altérer ; c'est une des raisons pour lesquelles le liquide de Müller a été délaissé, même par des histologistes consommés.

5. ACIDE OSMIQUE (pag. 5). Cet acide irrite fortement les muqueuses ; il faut donc le manier avec prudence. On fixe soit en plongeant les pièces très petites de 5 mm. de côté au plus dans une solution d'acide osmique (à 1 0/0 généralement), 4 à 6 cent. cubes de la solution suffisent, soit en exposant les pièces humides aux vapeurs du même acide. Cette dernière ma-

(1) Les pièces peuvent séjourner dans le liquide de Müller bien plus longtemps, au delà même de 6 mois. Dans ce cas elles sont assez dures pour pouvoir être coupées sans durcissement préalable par l'alcool.

nœuvre s'exécute de la façon suivante. On verse 1 cent. cube d'eau osmique à 2 0/0 dans un petit flacon de 5 cent. de haut environ. On ajoute ensuite une partie d'eau distillée. On adapte au flacon un bouchon en liège. Sur la face inférieure de ce bouchon on fixe la pièce avec des épingles, et l'on bouche hermétiquement le flacon. Dix minutes ou une heure après (suivant le volume de la pièce) on enlève la pièce et on la plonge directement dans le flacon. Le séjour des pièces dans l'acide est dans les deux cas de 24 heures environ. Les flacons doivent être bien bouchés et tenus à l'abri de la lumière. Passé ce temps, les pièces sont sorties, lavées à l'eau courante pendant une demi-heure à une heure, rincées dans l'eau distillée, et durcies dans l'alcool progressivement renforcé.

6. ACIDE CHROMO-ACÉTO-OSMIQUE (pag. 5). Excellent pour fixer les figures karyokinétiques. De petits fragments très frais, chauds encore si c'est possible, sont plongés dans 4 cent. cubes de ce liquide ; ils y séjournent d'un à 2 jours, voire même plus ; ensuite les fragments sont lavés pendant 4 heures environ dans de l'eau courante, rincés à l'eau distillée, et durcis dans l'alcool progressivement renforcé.

Les liquides fixateurs qui ont déjà servi ne peuvent plus être employés ; il faut les jeter.

V. Durcissement.

L'alcool absolu excepté, tous les autres moyens de fixation exigent un durcissement consécutif. Le meilleur durcissant est l'alcool progressivement renforcé. Les liquides de durcissement, de même que les liquides fixateurs, doivent être employés en assez grande quantité, et lorsque l'alcool se trouble ou se colore il faut le changer (1). Voici d'ailleurs comment il faut procéder : Les pièces fixées dans un liquide quelconque une fois lavées à l'eau (2) sont placées pendant 12 à 20 heures dans l'alcool à 70°. Ce temps écoulé, les pièces sont sorties de l'alcool à 70° et portées dans l'alcool à 90°, dans lequel le durcissement est complété en 24 à

(1) Les pièces fixées dans l'acide chromique ou dans le liquide de Müller, lorsqu'elles n'ont pas été trop lavées à l'eau (ce qu'il faut d'ailleurs éviter), perdent dans l'alcool des substances qui précipitent à la lumière du jour, mais si l'on a soin de tenir le flacon d'alcool contenant les pièces dans l'obscurité, les précipités ne se produisent pas, l'alcool jaunit tout en restant limpide. C'est pour cette raison que nous avons recommandé de durcir ces sortes de pièces à l'abri de la lumière. Il suffit de placer le flacon dans un coin obscur du laboratoire. Tant que l'alcool jaunit d'une manière intense, il faut le changer tous les jours, fût-il même à 90°.

(2) Excepté les pièces fixées à l'acide picrique qui sont directement plongées dans l'alcool à 70°. Dans ce cas l'alcool sera renouvelé plusieurs fois pendant le premier jour.

48 heures. Dans ce dernier alcool les pièces peuvent séjourner pendant des mois.

L'alcool à 90° qui a déjà servi est recueilli dans un flacon et peut servir soit à brûler, soit à durcir des fragments de foie pour l'inclusion des objets à couper.

VI. Décalcification.

Les pièces ne doivent pas être plongées à l'état frais dans le liquide à décalcifier, il faut les fixer et les durcir au préalable. Les petits os (ceux du métacarpe compris), les dents, les parcelles de grands os enlevées à la scie et ayant 3 à 4 cent. de longueur, sont plongées dans 300 cent. cubes de liquide de Müller. 2 à 4 semaines après on les lave à l'eau courante et on les plonge dans 150 cent. cubes d'alcool progressivement renforcé. Après un séjour de trois ou plusieurs jours dans l'alcool à 90°, l'os est porté dans le liquide à décalcifier, qui dans l'espèce est l'acide chlorhydrique dilué. (Acide chlorhydrique pur 9 à 27 cent. cubes, eau distillée 300 cent. cubes). Ici encore il faut de grandes quantités de liquide (300 cent. cubes au minimum), qu'on renouvelle au commencement tous les jours, et ensuite tous les 4 jours jusqu'à complète décalcification. On contrôle le degré de décalcification en piquant les pièces avec une vieille aiguille et en les coupant avec un scalpel (1). L'os décalcifié est flexible, mou, et se laisse facilement couper. Les os du fœtus, la tête des embryons, seront décalcifiés dans l'acide chlorhydrique plus faible (acide chlorhydrique 1 cent. cube, eau distillée 99 cent. cubes) ou dans 500 cent. cubes d'une solution saturée d'acide picrique. Pour les os adultes la décalcification n'est guère terminée avant plusieurs semaines; pour les petits os et les os du fœtus, il suffit en général de 3 à 12 jours.

Dès que la décalcification est terminée, les os sont lavés pendant 6 à 11 heures dans de l'eau courante et durcis à nouveau dans l'alcool progressivement renforcé.

Il arrive souvent aux débutants de durcir une pièce avant que la décalcification soit complète, ils ne s'en aperçoivent qu'au moment de pratiquer les coupes. Il faut alors recommencer la décalcification, tout en se rappelant qu'un trop long séjour dans les liquides à décalcifier finit par altérer complètement les tissus.

(1) L'aiguille et le scalpel doivent être nettoyés immédiatement après avoir servi.

VII. Coupes.

Le rasoir doit être bien aiguisé (pag. 2). On ne peut faire de bonnes coupes qu'à cette condition. La lame du rasoir sera mouillée avec l'alcool toutes les fois qu'on s'en servira. Pour cela on prépare une assiette plate, remplie de 30 cent. cubes d'alcool à 90°, toutes les 3 ou 4 coupes on y mouille la lame en même temps qu'on y dépose les coupes. Le rasoir doit être tenu horizontalement, d'une main légère, le pouce du côté du tranchant, les autres doigts du côté du dos, le dos de la main tourné en haut. Avant de commencer les coupes on aplanit d'abord la surface de la pièce, en détachant d'un seul trait une tranche plus ou moins épaisse; puis commencent les coupes proprement dites. Il faut les faire légèrement, sans brusquerie (1); de cette manière on peut obtenir des coupes d'une minceur et d'une régularité suffisantes. Il faut toujours en faire un assez grand nombre (10 à 20); on les place au fur et à mesure dans le récipient d'alcool (2), soit avec une aiguille, soit avec la lame elle-même du rasoir en même temps qu'on la plonge dans l'alcool. En plaçant ce récipient sur un fond noir on peut choisir parmi les coupes celles qui paraissent le plus mince, mais il ne faut pas croire que les coupes très minces sont toujours les plus utiles: dans quelques cas, quand, par exemple, on veut avoir une vue d'ensemble des tuniques de l'estomac, il faut des coupes assez épaisses. Pour les vues d'ensemble il est nécessaire d'avoir des coupes épaisses et larges; pour l'étude des détails de structure il faut des coupes très minces, des coupes déchiquetées.

Si le fragment qu'on doit couper est trop petit pour être tenu avec les doigts, on l'inclut généralement dans le foie.

On prend un fragment de foie de bœuf (3) ou mieux de foie amyloïde ou graisseux de l'homme; dans les laboratoires d'anatomie pathologique il est facile de s'en procurer; dans les laboratoires de physiologie on peut prendre du foie de chien. On découpe des fragments d'environ 3 cent. de haut sur 2 cent. de largeur et 2 d'épaisseur; ces fragments sont immédiatement jetés dans l'alcool à 90° qu'on renouvelle le lendemain; deux ou trois jours après, les fragments de foie ont acquis le degré de dureté voulue. Pour inclure l'objet à couper, on pratique une fente plus ou moins profonde dans le fragment hépatique et l'on y insinue

(1) On ne doit pas appuyer sur le rasoir, on le tire seulement à travers la pièce.

(2) Les coupes très fines peuvent être portées directement sur la lame de verre porte-objet, lorsqu'elles ne doivent pas être colorées.

(3) Le foie de chien convient également très bien.