

APPENDICE

Technique du microtome.

1. — Microtomes.

Les microtomes les plus employés sont construits d'après deux principes différents.

Dans les uns l'objet à couper s'élève par glissement du porte-objet sur un plan incliné.

Dans les autres l'objet s'élève verticalement au moyen d'une vis micrométrique.

Les deux espèces de microtomes sont excellentes. Toutes les parties du microtome doivent être tenues le plus proprement possible. Quand on s'en sert souvent, il faut les enfermer dans une boîte en bois pour les protéger de la poussière. La rainure, sur laquelle glisse le porte-couteau, doit aussi être parfaitement propre; on la nettoie de temps en temps avec un linge imbibé de benzine et on la graisse avec de l'huile de moelle de bœuf ou de la vaseline, de façon que le chariot glisse sans secousses (1). Il faut avoir un soin particulier du couteau, et ce n'est qu'avec un couteau très bien aiguisé qu'on peut faire des séries de coupes très fines.

Un couteau coupant vraiment bien doit couper un cheveu fin, que l'on tient entre les doigts par une de ses extrémités.

2. — Inclusions.

A. — DANS LA PARAFFINE.

On emploie pour cela :

1° La *paraffine*. Il y en a deux sortes, une plus molle (fondant à 45° cent.) et une plus dure (fondant à 52° cent.); on en fait un mélange, qui fond environ à 50°. Tout dépend de la proportion exacte de ces deux paraffines, et bien des insuccès proviennent d'un mauvais mélange.

On ne peut indiquer exactement les proportions, car la consistance de la paraffine dépend essentiellement de la température extérieure. De même, pour obtenir des coupes très fines avec des objets plus durs, il faut employer des mélanges plus durs. Pendant l'hiver, à une température de

(1) Il faut au contraire huiler très peu la rainure du porte-objet du microtome Thomas, pour que le porte-objet ne soit pas repoussé par le couteau,

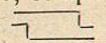
chambre de 20° cent., on peut employer un mélange de 30 grammes de paraffine molle avec 25 grammes de paraffine dure.

2° Le *chloroforme*, 20 cent. cubes.

3° Une *solution de paraffine dans le chloroforme* (3 grammes du mélange dans 25 cent. cubes de chloroforme). Cette solution est liquide à la température de la chambre.

4° Une *étuve en fer blanc* à doubles parois séparées par un intervalle rempli d'eau. Sous la boîte brûle une petite flamme de gaz. Au-dessus sont deux ouvertures : l'une conduit dans l'intervalle mentionné, où se trouve un régulateur de Reichert. La deuxième ouverture conduit dans l'intérieur de la boîte, où se trouve un thermomètre. La paroi antérieure est formée d'une plaque de verre qui glisse dans une rainure verticale. L'intérieur est divisé en trois compartiments par deux cloisons mobiles. La boîte a 25 cent. de longueur, 23 de haut, 16 de profondeur.

Cette étuve est presque indispensable à ceux qui se servent beaucoup de la paraffine; cependant on peut faire fondre la paraffine au bain-marie et la maintenir liquide sur une lampe à alcool.

5° Un *moule à inclusions*, composé de deux pièces métalliques coudées, qui sont ainsi juxtaposées 

Au lieu de ce moule on peut se servir de petites boîtes de carton ou de papier dur (de vieilles cartes-postales).

Les objets à inclure doivent être complètement déshydratés par un séjour de 2 à 3 jours dans l'alcool absolu plusieurs fois renouvelé; puis on les porte dans un flacon avec 20 cent. cubes de chloroforme, jusqu'au lendemain (1). Ensuite ils sont portés dans la solution de paraffine dans le chloroforme, et, après 2 à 8 heures selon le volume des fragments, mis dans une capsule contenant de la paraffine fondue, mais pas trop chaude (2). Après 1/2 heure on transporte les fragments dans une deuxième capsule (3) de paraffine fondue, où selon leur volume ils restent 1 à 5 heures. On prend ensuite une assiette creuse, on y place un porte-objet et on dispose sur ce dernier le moule à inclusions, dans lequel on verse en même temps la paraffine et l'objet. Puis, pendant que la paraffine est encore liquide, on donne à l'objet, au moyen des aiguilles, l'orientation voulue. Cela fait, on verse avec précaution dans l'assiette de l'eau froide, jusqu'au bord supérieur du moule; la paraffine commence aussitôt à durcir; l'on verse alors un peu plus d'eau, jusqu'à ce que le moule soit complètement immergé. Après cette manipulation la paraffine acquiert une consistance homogène, tandis qu'autrement elle devient facilement cristalline et est ensuite plus difficile à couper, en même temps que la structure de la pièce incluse peut être altérée.

(1) Pour les petits objets, 1 à 2 heures suffisent.

(2) La paraffine ne doit pas être chauffée à plus de 2 à 3 degrés au-dessus de son point de fusion; pour le mélange indiqué plus haut, la température intérieure de l'étuve doit être de 50° cent.

Si l'on a fondu la paraffine au bain-marie, on règle la flamme de façon à maintenir à la surface de la paraffine une petite pellicule de paraffine solidifiée.

(3) Cela peut enlever de l'objet le dernier reste de chloroforme. Au bout d'un certain temps la première capsule contient beaucoup de chloroforme, dont on peut débarrasser la paraffine en la portant à une température plus élevée.

Après environ 10 minutes, les pièces de métal sont enlevées et le bloc de paraffine est laissé dans l'eau, sur le porte-objet, jusqu'à complet durcissement.

L'objet ainsi inclus est déjà bon à couper après 1/2 heure ; si l'on doit le débiter plus tard, on le marque avec une aiguille et il peut être conservé pendant un temps indéfini.

B. — DANS LA CELLOÏDINE.

Pour cela on se sert de :

a) Une solution faible de celloïdine. La celloïdine qui se vend chez le Dr Grüber à la consistance du fromage gras ; un morceau de 30 grammes est coupé en petits cubes et mis dans 30 cent. cubes d'alcool absolu additionné d'égale quantité d'éther.

b) Une solution un peu plus épaisse d'environ 30 grammes de celloïdine dans 20 cent. cubes d'alcool absolu et 20 cent. cubes d'éther. Cette solution a la consistance d'un sirop épais.

Les deux solutions sont conservées dans des flacons à col large, bien bouchés, et peuvent, lorsqu'elles se sont trop épaissies, être rendues plus liquides par de l'alcool-éther (1).

Les pièces à inclure doivent être complètement déshydratées, et avoir séjourné 1 à 3 jours dans de l'alcool absolu plusieurs fois renouvelé. De là, les pièces sont portées dans la celloïdine faible et le lendemain dans la celloïdine épaisse, dans laquelle elles peuvent rester aussi longtemps que l'on veut. La plupart sont suffisamment imbibées après 24 heures ; seulement les objets volumineux, renfermant de nombreuses cavités, doivent séjourner plus longtemps (jusqu'à 8 jours) dans la solution épaisse. Puis la pièce est placée rapidement sur un bouchon de liège sur lequel on verse un peu de celloïdine. Il faut prendre garde d'appuyer la pièce trop fortement sur le bouchon, autrement elle se détache facilement. Il doit y avoir entre le bouchon et la pièce une couche épaisse de 1-2 mm., mais pas davantage, car, la celloïdine convenablement durcie étant élastique, une couche trop épaisse donnerait à la pièce une certaine mobilité sous le choc du couteau.

Le tout sera alors placé 1/2 à 4 heures sous une cloche de verre non hermétiquement close pour obtenir une dessiccation lente, et ensuite dans un cristalliseur avec 30 cent. cubes d'alcool à 80 0/0. Pour submerger la pièce on colle le bouchon de liège par sa face inférieure, au moyen de celloïdine, à la face inférieure du couvercle du cristalliseur. Le lendemain l'alcool est remplacé par de l'alcool à 70°, dans lequel les pièces peuvent être conservées longtemps.

(1) Au bout d'un certain temps, les solutions deviennent troubles et laiteuses, il est alors préférable de laisser complètement sécher la solution et de dissoudre à nouveau les morceaux dans l'alcool-éther.

3. — Coupes.

A. — OBJETS DANS LA PARAFFINE.

Le bloc de paraffine contenant l'objet est fixé dans le microtome de Yung sur un cylindre rempli de paraffine durcie, et dans le microtome de Schwanz sur une petite tablette (1) que l'on met en place de la pince. Sur la petite tablette l'adhérence s'établit simplement en appuyant le bloc de paraffine sur la tablette préalablement chauffée. Pour le cylindre creux rempli de paraffine on chauffe celle-ci ainsi que la face inférieure du bloc de paraffine, et on les appuie légèrement l'une contre l'autre ; on achève de fixer solidement en promenant une aiguille chaude tout autour de la base du bloc de paraffine. Pour obtenir un refroidissement rapide, on immerge le cylindre ou la petite tablette pendant cinq minutes dans l'eau froide. On régularise ensuite le bloc de paraffine en lui donnant la forme d'un prisme à base carrée et en enlevant la paraffine qui recouvre la partie supérieure de l'objet.

Le prisme ne doit pas avoir plus d'un cent. de hauteur, et l'objet ne doit pas être entouré d'une couche de paraffine épaisse de plus de 1 à 2 millimètres.

Le cylindre ou la tablette est ensuite placé dans le microtome. On coupe avec une lame sèche.

La position du couteau dépend de la nature de l'objet.

1. — Coupes avec le couteau placé obliquement.

S'agit-il d'objets volumineux de consistance inégale, le couteau doit être fixé à angle le plus aigu possible par rapport à l'axe du microtome. Le prisme de paraffine doit être placé par rapport à la lame du couteau, de manière à ce que celle-ci entame le prisme par une de ses arêtes. Le couteau doit glisser lentement, pour éviter toute secousse.

2. — Coupes avec le couteau placé transversalement.

Le couteau est placé perpendiculairement à l'axe du microtome, et le bloc de paraffine est placé de façon que le tranchant de la lame entame le prisme par une de ses faces. Le couteau est promené rapidement comme si l'on rabotait, de telle façon que les coupes se collent les unes aux autres par leurs bords en formant un long ruban. Avec une bonne consistance de paraffine la première coupe reste plate sur la lame du couteau et se trouve poussée par la deuxième coupe dans la direction du dos du couteau. Mais si les premières coupes ont une tendance à s'enrouler, il faut avec précaution les ramener dans la bonne direction à l'aide d'un pinceau fin. On réussit le mieux les coupes en ruban avec une épaisseur de 1/100 de mm., les coupes de plus de 1/100 de mm. se roulent facilement et se collent plus difficilement l'une à l'autre par leurs bords.

(1) Au lieu de tablette je me sers d'un petit cylindre de bois tendre de 3 cent. environ de hauteur et de 1 cent. 1/2 de diamètre, qui est placé dans la pince du microtome.

Difficultés qu'on rencontre en coupant et moyens d'y remédier.

Toute personne qui a travaillé à la paraffine a eu à enregistrer quelques insuccès.

1°. — *Le couteau glisse sur l'objet* et fait une coupe soit incomplète, soit nulle. La raison réside le plus souvent dans le microtome, soit que la rainure où glisse le couteau soit sale, soit que le couteau ne soit pas assez tranchant.

Dans d'autres cas il faut chercher la raison dans l'objet, qui est peut-être trop dur, ou de consistance trop inégale ou mal inclus. Dans ce dernier cas cela tient à ce que l'objet n'a pas été suffisamment déshydraté, c'est alors qu'on voit des taches opaques; ou bien à ce qu'il contient encore du chloroforme. Dans les deux cas il faut tout recommencer dans un ordre inverse jusqu'à l'alcool absolu, ou jusqu'au bain de paraffine. — Enfin la consistance de la paraffine peut être la cause des échecs.

2°. — *Les coupes se roulent.* On peut remédier à cela, au moyen d'un pinceau ou d'une aiguille recourbée que l'on tient contre la coupe qui s'enroule.

La raison de cet enroulement des coupes est dans la dureté trop grande de la paraffine, de même que la raison du troisième inconvénient.

3°. — *Les coupes s'émiettent.* La bonne consistance de la paraffine dépend essentiellement de la température extérieure. La paraffine est-elle trop dure, il ne faut pas chercher immédiatement à lui donner une consistance convenable par l'adjonction de paraffine molle, — ce qui ne doit être que le dernier remède, — mais l'on essaye d'abord un moyen plus simple. On coupe pour cela au voisinage d'un poêle ou auprès d'une lampe à gaz. Souvent on arrive au résultat en chauffant le couteau légèrement (1).

4°. — *Les coupes se plissent* et sont pressées les unes contre les autres, et la forme des objets coupés se trouve altérée. Cela tient à ce que la paraffine est trop molle. L'immersion répétée du bloc de paraffine dans l'eau froide, l'installation du microtome dans une pièce froide, remédient à cet inconvénient.

B. — OBJETS DANS LA CELLOÏDINE.

L'épaisseur de la couche de celloïdine entourant l'objet doit être de 1 à 2 mm.

On place le couteau à angle très aigu par rapport à l'axe du microtome. Le couteau doit être mouillé avec de l'alcool à 70 0/0, que l'on applique avec un pinceau chaque fois que l'on a fait 2 ou 3 coupes. — Les coupes sont recueillies avec un pinceau et portées dans un cristalliseur, contenant de l'alcool à 70 0/0.

On n'obtient pas de très fines coupes (de moins de 1/100 de mm.) avec des objets dans la celloïdine.

(1) La meilleure paraffine peut s'émietter, lorsqu'on la coupe avec un couteau froid.

4. — Montage des coupes.

A. — OBJETS DANS LA PARAFFINE

Lorsqu'il ne s'agit pas de coupes en série ou de coupes très fines, on les porte dans une capsule avec 5 cent. cubes d'essence de térébenthine, et lorsque la paraffine est dissoute, on les porte dans une deuxième capsule d'essence de térébenthine. De là les coupes, lorsqu'elles proviennent d'objets colorés en masse, sont portées sur le porte-objet et montées suivant les règles énoncées page 24. Mais si les coupes doivent encore être colorées, on les fait passer de l'essence de térébenthine dans environ 5 cent. cubes d'alcool absolu, qui doit être renouvelé après 2 minutes. Après 2 autres minutes les coupes se colorent parfaitement.

S'agit-il au contraire de séries et de coupes très fines, les coupes doivent d'abord être fixées. Les porte-objets dont on se sert dans ce cas doivent être absolument propres; on les nettoie avec un peu d'alcool et un linge très propre. Sur le porte-objet bien sec on porte alors les coupes et l'on met sur leur bord, avec un pinceau fin, une goutte de solution de gomme très claire (1). Puis on place et on fixe de même à la gomme la coupe suivante ou le fragment suivant du ruban de coupes, et ainsi de suite. Il n'y a pas d'inconvénient à ce que les coupes flottent. On met alors le porte-objet sur la flamme d'une lampe à alcool ou bien pendant 1 à 3 minutes dans l'étuve (2). Ensuite on range encore une fois les coupes avec une aiguille, puis on enlève l'excès de gomme par une légère inclinaison du porte-objet ou avec un morceau de papier à filtre, et on laisse le tout sécher, à l'abri de la poussière.

Le lendemain, le porte-objet est arrosé avec de l'essence de térébenthine et, si les coupes sont déjà colorées, on monte dans le baume. Si au contraire les coupes ne sont pas encore colorées, l'essence de térébenthine est essuyée et le porte-objet porté dans l'alcool absolu (3). Après environ 5 minutes le porte-objet retiré de l'alcool est essuyé rapidement autour des coupes, puis placé dans le liquide colorant, ou bien on verse quelques gouttes du liquide colorant, d'hématoxyline par exemple, directement sur les coupes. De là le porte-objet est placé quelque temps dans un cristalliseur avec de l'eau distillée, puis monté soit dans la glycérine (page 25), soit dans le baume après lavage à l'alcool absolu et à l'huile de lavande.

(1) La solution doit être préparée fraîchement chaque fois. Une petite goutte de solution officinale de gomme arabique est mélangée dans un verre de montre avec 5 cent. cubes d'eau distillée.

(2) La paraffine ne doit pas fondre, le mélange de paraffine fondue et de gomme n'étant plus soluble dans l'essence de térébenthine.

(3) L'opération qui consiste à essuyer l'essence de térébenthine, aussi bien que l'alcool, sur le porte-objet, doit se faire lestement, car les coupes ne doivent pas sécher, sous peine d'être perdues.

B. — OBJETS DANS LA CELLOÏDINE.

Les coupes sont portées dans un cristalliseur avec 20 cent. cubes d'alcool à 90°. Si elles ne proviennent pas de fragments colorés en masse — qui sont à recommander — elles peuvent être encore colorées ; l'hématoxyline même donne à la celloïdine un ton légèrement bleuâtre. Les coupes ne doivent pas être portées dans l'alcool absolu, car celui-ci dissout la celloïdine. Elles sont portées de l'alcool à 90-95° dans environ 5 cent. cubes d'huile d'Origan et lorsqu'elles sont éclaircies, montées dans le baume.

Les séries de coupes d'objets dans la celloïdine sont utiles seulement pour des cas tout à fait spéciaux, par exemple pour le système nerveux central. On trouvera dans les articles de Weigert (*Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie*) des détails très intéressants à ce sujet (1).

(1) Vol. II, page 490 ; vol. III, page 480 ; vol. IV, page 209.

TABLE ANALYTIQUE

A

Achromatine, 34.
Acide acétique, 4. — azotique, 4. — chlorhydrique, 4. — chromique, 4 ; emploi, 14. — chromo-osmio-acétique, 5. — formique, 5. — osmique, 5 ; emploi, 14. — picrique, 4. — sulfo-picrique, 4 ; emploi, 14.
Acini, 150. — des glandes lacrymales, 288.
Alcool absolu, 3. — à 90 0/0, 3. — à 70 0/0, 4. — progressivement renforcé, 15. — de Ranvier, 4.
Alvéoles pulmonaires, 201.
Ampoule des canaux semi-circulaires, 296.
Amygdales, 165, 190.
Anatomie microscopique, 33.
Angle iridien, 267.
Anneaux d'étranglement des fibres nerveuses, 116. — fibreux des ventricules, 126.
Anse de Henle, 210. — sœurs, 38.
Aponévroses, 61.
Apophyse basilaire, 165.
Appareil filamenteux, 271. — lacrymal, 287. — de la vision, 261.
Arachnoïde, 103.
Arcades tarsiennes, 287.
Arcus spiralis, 300.
Area centralis, 290.
Artères, 127, 142. — bronchiques, 205. — centrale de la rétine, 279. — ciliaires, 281. — hélicines, 229. — hépatique, 184. — hyaloïdienne, 279. — interlobulaires, 213. — du labyrinthe, 304.
Aster, 38.

B

Baguettes de verre, 3.
Bande vasculaire, 299.
Basement membrane, 54.

Bassinnet, 214.
Bâtonnets de la rétine, 269. — des cellules gustatives, 315.
Baume damar, 6. — emploi, 24.
Bichromate de potasse, 4.
Bile, 186.
Bleu de Berlin, 22.
Bourgeons gustatifs, 161, 315.
Bourrelets glénoïdiens, 72. — unguéal, 246.
Bouton gustatif, 315.
Bronches, 201, 207.
Bronchioles respiratoires, 201.
Bulbe pileux, 247.

C

Calculs prostatiques, 228.
Calices rénaux, 214.
Canal de Bartholin, 177. — central de la moelle, 94. — déférent, 221, 226, 241. — épидидymaire, 226. — hyaloïdien (ou de Cloquet), 279. — hyoïdien, 282. — nasal, 288. — de Petit, 279, 282. — de Schlemm, 266, 282. — de Sténon, 178. — de Warthon, 178. — de Wirsung, 178.
Canalicules dentaires, 156. — lacrymaux, 287. — nourriciers (cornéens), 263, 282, 291. — osseux, 66. — séminifères, 222, 239.
Canaux biliaires, 185. — droits, 211. — éjaculateurs, 226. — excréteurs du sperme, 226. — de Havers, 66, 84. — semi-circulaires, 296. — testiculaires, 222. — urinaires, 209, 218. — de Volkmann, 68.
Capillaires, 131 ; formation, 131. — biliaires, 181, 185, 198. — lymphatiques, 134. — sanguins, 143. — du foie, 181.
Capsule de Bowman, 211, 219. — cristallinienne, 278, 293. — de Glisson, 185. — articulaires, 72. — surrenales, 216, 220.
Carbonate de lithine, 6.