

## **Les coupes du système nerveux central / par A. Mercier.**

### **Contributors**

Mercier, A.  
University of Leeds. Library

### **Publication/Creation**

Paris : Rueff, 1894.

### **Persistent URL**

<https://wellcomecollection.org/works/z55b8u4s>

### **Provider**

Leeds University Archive

### **License and attribution**

This material has been provided by This material has been provided by The University of Leeds Library. The original may be consulted at The University of Leeds Library. where the originals may be consulted.

This work has been identified as being free of known restrictions under copyright law, including all related and neighbouring rights and is being made available under the Creative Commons, Public Domain Mark.

You can copy, modify, distribute and perform the work, even for commercial purposes, without asking permission.



Wellcome Collection  
183 Euston Road  
London NW1 2BE UK  
T +44 (0)20 7611 8722  
E [library@wellcomecollection.org](mailto:library@wellcomecollection.org)  
<https://wellcomecollection.org>

D<sup>R</sup>. A. MERCIER

LES COUPES  
DU  
SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

*The University Library  
Leeds*



*Medical and Dental  
Library*



30106

004235551

J

H

STORE  
WL 301  
MER

J 8

STORE

SCHOOL OF MEDICINE  
UNIVERSITY OF LEEDS.

D 514

LES COUPES

DU

SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

---

CORBEIL. — IMPRIMERIE CRÉTÉ-DE L'ARBRE

---

SCHOOL OF MEDICINE  
UNIVERSITY OF LEEDS

LES COUPES

DU

SYSTÈME NERVEUX

CENTRAL

Par le D<sup>r</sup> A. MERCIER

*Ancien second médecin de l'Asile cantonal des Aliénés  
du Burghælzli, Zurich.*

---

INSTRUMENTS DE TRAVAIL ET ACCESSOIRES  
DURCISSEMENT — ENROBEMENTS  
ÉLABORATION ET MANIPULATION DES COUPES  
SYSTÈMES DES SÉRIES  
MÉTODES DE COLORATION  
IMPRÉGNATION MÉTALLIQUE, ETC.

---

PARIS

RUEFF ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS

106, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 106

—  
1894

Tous droits réservés.





Digitized by the Internet Archive  
in 2015

UNIVERSITY OF LEEDS  
MEDICAL LIBRARY.

605918

<https://archive.org/details/b21519602>

## INTRODUCTION

---

Les progrès immenses réalisés durant le cours des dernières années dans la connaissance du système nerveux central sont dus, pour une très grande part, aux perfectionnements qui se sont produits de différentes façons dans la technique microscopique en général, et très particulièrement dans les méthodes modernes de coloration et d'imprégnation métallique des coupes de l'axe cérébro-spinal.

Il ne faut pas oublier que, pour arriver à connaître exactement la structure de l'organe nerveux central et les rapports qui existent entre ses différentes parties, il est de toute nécessité que l'étude s'applique non seulement à la topographie et aux caractères généraux

des éléments nerveux constitutifs, mais encore à leur mode de structure intime ainsi qu'à leurs connexions de continuité ou de contiguïté.

Cette étude ne peut être rigoureuse et produire des résultats positifs, qu'en tant qu'elle reposera tout à la fois sur l'anatomie et sur l'histologie, et ce ne seront que les investigations qui combineront les procédés de ces deux sciences, qui permettront aussi de saisir l'unité du complexus morphologique et physiologique du système nerveux central.

Un travail pareil, pour être sérieux et vraiment instructif, ne doit pas s'exécuter exclusivement au moyen de livres, de dessins, de dissections, ou par le seul examen de préparations microscopiques toutes faites. Il faut nécessairement, soi-même, apprendre à faire des coupes, à les colorer, à les monter; s'assimiler la technique microscopique spéciale, qui, par des manipulations successives, des procédés divers, transforme une pièce donnée du système nerveux central en préparations microscopiques définitives; ces travaux pratiques, ces coupes, il est bon de les exécuter sur de nombreuses pièces, sur des organismes différents; il faut employer des méthodes de

coloration variées, puis examiner les éléments nerveux dans les différentes directions dans lesquelles ils progressent et à des grossissements divers. Ce n'est qu'à ce prix qu'on arrive à connaître l'organe cérébro-spinal à l'état embryogénique ou à l'état de développement définitif, pathologique ou normal.

Mais une étude anatomo-histologique toujours plus exacte, plus sévère relativement à l'interprétation des faits observés, n'est pas possible sans le secours d'une technique microscopique toujours plus parfaite. C'est à développer cette technique : instruments, procédés de durcissement plus rapides, méthodes de coloration plus égales, etc., que s'appliquent de nombreux savants; aussi, comme nous le disions plus haut, la technique qui a en vue l'élaboration de préparations du système nerveux central a-t-elle fourni déjà des résultats surprenants.

Malheureusement, la technique microscopique générale, usuelle, telle que la décrivent avec un grand luxe de détails, les remarquables traités classiques de Robin, de Ranvier, de Stœhr, de Fol, de Bolles-Lee et Henneguy, de Friedländer et de tant d'autres, embrasse le domaine des sciences anatomiques

ou naturelles, etc., dans son entier ; aussi, la place qui est réservée, dans ces ouvrages, au système nerveux central y est-elle le plus souvent tellement écourtée, que ceux qui veulent chercher dans tel ou tel de ces livres les méthodes modernes de coloration, par exemple, les détails de telles parties de la technique des coupes, etc. en un mot le résumé des soins à donner aux pièces d'origine cérébro-spinale, en sont trop fréquemment pour leur peine.

Les nouvelles méthodes de coloration, celles des gaines à myéline surtout, les nombreux procédés d'imprégnation métallique, récents pour la plupart, les perfectionnements techniques, les nouveaux agents employés, etc., sont épars dans des recueils périodiques, dans des monographies, ou mentionnés beaucoup trop sommairement, soit dit en passant, dans les traités d'anatomie des centres nerveux.

Il s'ensuit que celui qui n'a pas à sa portée une bibliothèque très spécialisée, bibliothèque qui ne se trouve guère que dans les asiles ou dans les cliniques de maladies du système nerveux, ne peut pas arriver à avoir une vue d'ensemble sur ce qui a été fait et ce qui se produit au jour le jour dans le do-

maine de la technique qui nous occupe.

Les leçons mêmes qu'il suivra dans un cours de micrographie ou d'histologie ne lui donneront, à cet égard, que des indications générales, mais insuffisantes pour mener à bien l'étude dont nous avons parlé et dont cette technique spéciale est le corollaire. Il en sera réduit, pour s'instruire, à collectionner des renseignements littéraires, disséminés dans les revues spéciales de langues diverses, ou à recueillir ici et là des renseignements, des données verbales, qui perdent le plus souvent à être formulées autrement que didactiquement ou par d'autres que par un auteur lui-même.

C'est pour combler, en partie tout au moins, ce que nous croyons être une lacune et pour répondre à un désir qui nous a été exprimé de différents côtés depuis que nous nous occupons de travaux pareils, que nous avons groupé dans les pages suivantes, et tels que nous les avons employés ou vu appliquer, les procédés capables de faciliter la technique microscopique spéciale des centres nerveux.

Nous ne pouvons cependant pas faire entrer dans le cadre restreint de ce volume

tout ce qui a été produit et publié relativement aux méthodes innombrables de coloration, méthodes elles-mêmes modifiées dans un sens et dans l'autre, aux procédés techniques divers et leurs perfectionnements ; une pareille œuvre de compilation ne répondrait pas au but que nous nous proposons.

Aussi force nous a été de condenser, d'éliminer ce qui ne nous paraissait pas utile ou nécessaire, et de ne mentionner tantôt plus longuement, tantôt d'une manière plus concise, suivant l'importance du sujet, que ce qui a été éprouvé, ce qui peut réellement rendre service, en constituant, non pas un traité didactique, mais comme un vade-mecum, qu'on pourrait consulter pour y trouver ce qui est nécessaire pour la pratique de laboratoire.

Nous renvoyons toutefois aux ouvrages classiques et aux sources auxquelles nous avons puisé, et que nous consignons à la fin de ce travail, pour tout ce qui a trait aux détails généraux, usuels, de technique microscopique, détails avec lesquels chacun apprend à se familiariser durant le cours de ses études.

Nous passerons rapidement en revue les instruments nécessaires pour l'étude propre-

ment dite et pour la fabrication des coupes, les accessoires d'installation et de travail, pour aborder les importantes questions du durcissement des pièces, des enrobements ; nous nous occuperons ensuite de l'élaboration des coupes, des systèmes de plaques, de feuillets en séries, et nous reproduirons telles qu'elles ont été publiées ou condensées, pour ne pas faire trop de répétitions, les méthodes les plus sûres, les plus usuelles de coloration des cellules avec leurs prolongements nerveux, des gaines de myéline, les procédés d'imprégnation métallique, avec quelques-unes des modifications que nous estimons bonnes, en accompagnant telle de ces mentions d'observations critiques.

La part qui dans ce travail nous revient en propre est, en somme, minime, puisque ce sont les recherches et les travaux d'autrui que nous désirons mettre en lumière ici dans un but scientifique général ; toujours est-il que cette part, si petite qu'elle soit, est le résultat de nombreuses expériences personnelles, d'une étude approfondie du sujet durant le cours de notre activité au laboratoire de l'asile du Burghoelzli, toutes choses qui ne nous ont été possibles que grâce à la bienveillance de notre



ancien directeur, M. le professeur Forel, auquel nous nous plaignons d'offrir tous nos remerciements pour la libéralité avec laquelle il a mis, durant ces dernières années, à notre service son savoir étendu, ses livres et les ressources du laboratoire de l'asile.

Novembre 1893.

D<sup>r</sup> A. MERCIER,

Ancien second médecin de l'établissement  
cantonal des aliénés du Burghoelzli Zürich.

## TECHNIQUE MICROSCOPIQUE

DES

## COUPES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

## PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUE PRÉPARATOIRE ET ÉLABORATION  
DES COUPES

## CHAPITRE PREMIER

## A. — INSTRUMENTS D'ÉTUDE ET DE TRAVAIL.

Dans le cours des manipulations nombreuses que subit une coupe du système nerveux central<sup>1</sup>, avant d'atteindre son parachèvement et de devenir une préparation microscopique proprement dite, il est nécessaire de contrôler, tout au moins au début d'une série et lorsqu'on substitue une méthode de coloration à une autre, les différentes phases par lesquelles elle doit passer. Pour cela, il n'est pas besoin d'employer un grossissement puissant. Non

1. Pour abrégé, nous emploierons dans la suite, pour désigner le système nerveux central, les lettres S. N. C.

seulement un grossissement faible ou moyen suffira pour juger, par exemple, du degré de coloration, de l'action exercée sur une coupe par un lavage ou un bain de différenciation, de la façon dont s'opère l'éclaircissement, mais il sera le plus souvent prudent de n'avoir recours qu'au grossissement moyen ou faible d'une loupe ou bien d'un oculaire (doublet) monté sur un pied, pour éviter les accidents qui pourraient détériorer l'objectif d'un microscope.

Tant qu'une coupe, en effet, n'est pas montée, elle nage la plupart du temps soit dans un récipient (cupule, auge) dans lequel on la traite, soit sur le porte-objet sur lequel elle aura été placée, dans une quantité plus ou moins considérable de liquide (mélange aqueux, acide, essence, alcool, etc.).

Or, pour examiner l'état d'une coupe en traitement, au grossissement d'un microscope, il faut l'approcher en général assez près de l'objectif; on court ainsi le danger de souiller une lentille, sans compter qu'on expose l'armature de l'objectif à des détériorations résultant du contact des réactifs dans lesquels la coupe séjourne momentanément; de même pour la platine et les autres pièces de l'instrument.

Une coupe en traitement ne devrait être examinée (contrôlée) qu'à la loupe ou au microscope à dissection; le microscope proprement dit ne doit être employé que pour l'étude de préparations terminées; mais, comme le porte-objet ou le récipient dans lequel se

trouve une coupe doit pouvoir reposer sur un support assez fort pour servir de point d'appui stable, qu'il est bon de pouvoir, en outre, bénéficier pour cet examen de la lumière réfléchie, que le tout, enfin, soit à l'abri d'un faux mouvement et qu'il est toujours utile d'avoir les deux mains libres, nous engageons l'opérateur à ne se servir que très exceptionnellement de loupes ou d'oculaires non montés sur un pied fixe.

Mentionnons comme bonnes la loupe de *Coddington* (1), celle de *Strauss*, modifiée par *Nachet*, et celle avec pied articulé de *Cosson* (1). L'essentiel est que l'instrument possède un pied métallique assez lourd, que la tige soit à crémaillère et que le bras articulé qui se meut sur cette tige puisse recevoir un oculaire ou un doublet qui soit susceptible d'être rapidement et facilement rapproché d'un objet quelconque placé sur la table de travail.

Un instrument qui rendra certainement de grands services dans la phase du traitement d'une coupe, et qui, au reste, plus tard également sera très apprécié pour l'étude d'ensemble d'une coupe du S. N. C., instrument qu'à notre sens on n'emploie pas suffisamment en histologie et qui, avec un jeu suffisant d'oculaires, peut souvent remplacer un microscope proprement dit, est le *microscope à dissection de Nachet*, ou ceux qui, dans la suite, ont été construits sur ce type (*microscope à dissection de Zeiss*, à appuis coudés). — En parcourant les catalogues de microscopes, on peut se convaincre que ces instruments présentent, au

point de vue de la forme, des dimensions, des détails de construction, de la grandeur et du prix (et le prix résume, le plus souvent, à lui seul le summum des qualificatifs), des variétés infinies. Chaque pays prône ses produits comme étant, cela va de soi, les meilleurs; chaque micrographe, au reste, a ses préférences.

Nous ne pouvons pas entrer ici dans trop de détails descriptifs, ou recommander spécialement pour l'étude du S. N. C. un instrument plutôt que tel autre; on en construit d'excellents partout; Nachet, Verick, Reichert, Hartnack, et nous en passons, Leitz entre autres, en fournissent de parfaits. Nos préférences personnelles vont aux produits de la maison Zeiss.

Pour avoir un vraiment bon instrument, il faut savoir (ou pouvoir!) y mettre le prix voulu. Thèse générale, les microscopes les plus simples sont les meilleurs (2).

Voici, brièvement résumées, les qualités indispensables que doit présenter un instrument convenable. Tout d'abord, et c'est ici une recommandation dont on ne tient communément pas assez compte, l'instrument doit avoir une puissante charpente; l'armature, le montage entier, le *statif*, en un mot, doit être solide, fort et bien planté. La base proprement dite du *statif*, ou le pied, sera large, bien évasée, construite en forme de fer à cheval. La crémaillère doit être mise en mouvement au moyen de deux grandes rondelles métalliques; elle doit être irréprochable, car c'est elle qui élèvera ou abaissera le système optique tout

entier. Nous proscrivons absolument l'emploi de microscopes avec le système du tube à tirage. Tous les bons instruments sont construits, actuellement, de façon à pouvoir basculer. La vis micrométrique doit manœuvrer toujours très exactement. Le tube à tirage supérieur sera gradué. La platine, ou table du microscope, sera grande, spacieuse, épaisse, forte. Elle sera placée assez haut, de façon à permettre dans la suite, si lors de l'achat d'un instrument on n'en fait pas de suite l'acquisition, l'adaptation de l'appareil condenseur d'*Abbe*. Le miroir sera grand, double, concave et plan, mobile dans tous les sens (2).

L'axe du miroir, l'ouverture de l'orifice central de la platine, les jours des diaphragmes, les objectifs, le corps du microscope, les verres des oculaires, toutes ces différentes parties, disons-nous, doivent être exactement *centrées* les unes par rapport aux autres.

C'est dire qu'il vaudra toujours mieux acheter l'instrument au complet dans la même fabrique, à cause des garanties d'un centrage parfait, sans parler des autres avantages, plutôt que d'acheter un statif, par exemple, d'une maison donnée et de s'adresser pour les objectifs et les oculaires à une autre maison. Il est prudent de n'acheter que conditionnellement, l'instrument devant être soumis, avant l'acquisition définitive, à l'appréciation d'un spécialiste.

Pour l'étude du S. N. C., un microscope pareil à celui qui remplit les *desiderata* que nous

venons d'énumérer suffira. Pour l'étude anatomique ou topographique, les objectifs 2, 4, 7 ou 8 de la plupart des constructeurs, AA, DD ou AA, C. E de Zeiss, les oculaires I et III (II et IV de Zeiss) répondront à la plupart des besoins. Pour l'histologie il faut, en outre, l'appareil condenseur d'Abbe et une lentille à immersion homogène (1/12).

*Règles générales pour l'emploi du microscope* (2). — Quelque objectif qu'on destine à un examen, ne se servir que d'un oculaire faible; commencer toujours par un grossissement faible. Ne sortir le tube à tirage que jusqu'à la marque, c'est-à-dire le nombre de centimètres exigés, prévue par le système optique. La plupart des préparations du S. N. C. exigent l'interposition d'un diaphragme à ouverture minime. Pour les objectifs ordinaires, n'employer que le miroir concave. Pour mettre au point, élever ou abaisser la crémaillère sans toucher à la vis micrométrique, qui ne doit servir qu'à parfaire la mise au point. La main gauche tient le porte-objet, la main droite sur la vis micrométrique. Regarder les deux yeux ouverts; le microscope doit être placé à environ 1 mètre ou un demi-mètre d'une fenêtre. Eviter le soleil.

Pour travailler à la lumière artificielle, observer les règles suivantes : 1° la lumière doit avoir une intensité suffisante; elle doit être blanche et permettre de reconnaître les différentes couleurs d'une coupe et de différencier les couleurs l'une de l'autre; 2° elle ne doit pas

éblouir ou fatiguer les yeux de l'observateur ; 3° il faut pouvoir se garer d'un dégagement de calorique trop considérable (3). La plupart des appareils employés (lampes), que la lumière soit fournie par une lentille convexe ou par une boule remplie d'une solution ammoniacale de sulfate de cuivre (boule des cordonniers), donnent une lumière qui ressemble à la lumière solaire directe et non pas à la lumière diffuse. On corrige cet éclat en plaçant entre la lampe et le miroir un écran de verre coloré en vert clair ou en bleu, suivant la source de lumière, pétrole, gaz ou lumière électrique.

On a construit des lampes spéciales, à réflecteurs, à miroir, à tubes projecteurs pour faciliter le travail de nuit (Voir les catalogues d'instruments et appareils microscopiques : lampes d'*Edinger*, de *Koch*, de *Schiefferdecker*, etc.).

Tenir le microscope en parfait état de propreté : ne jamais toucher les verres avec les doigts. Pour le nettoyage, se servir d'une peau de laine fine ou d'un linge très fin (toile de lin). Pas de chiffons, ni de mouchoirs ordinaires. A-t-on souillé un objectif, une lentille à immersion, enlever le système et l'essuyer avec la peau humectée d'alcool étendu, avec la toile de lin humectée avec de la benzine, mais sans dévisser les lentilles, sans froter. Sécher soigneusement. Pour les lentilles à immersion homogène, ne se servir que d'essence de cèdre.

Lorsqu'on ne travaille pas, tenir l'instrument sous une cloche de verre, ou l'enfermer dans sa boîte.



Comme accessoires, recommandons l'emploi de l'*appareil revolver* à deux ou trois pas de vis et sur lequel on tient vissés les objectifs dont on se sert le plus habituellement. Il est important, dans l'étude des préparations du S. N. C., de pouvoir examiner successivement, à différents grossissements, tel faisceau de fibres, telles cellules, etc. ; il suffit, dans ces cas, d'un simple mouvement de rotation imprimé à un objectif vissé sur le revolver, pour substituer presque instantanément un grossissement à un autre, sans courir le risque, en dévissant un objectif pour en visser un autre, de voir se déplacer la partie qu'on examinait. Nous préférons le revolver au système des objectifs à tiroir, que certains constructeurs recommandent, et qu'on change également avec rapidité et aisément sans changer la préparation de place.

Mentionnons aussi le *micromètre oculaire*, qui se place dans le cylindre d'un oculaire. Ce petit appareil rendra des services lorsqu'il s'agira de compter le nombre de certaines cellules, des cylindraxes, des fibres, dans un espace donné et pour permettre, par comparaison d'un côté de la coupe avec l'autre, de fixer le nombre et la grosseur de certains éléments à l'état normal et à l'état pathologique (atrophie par dégénérescence, par arrachement, etc.).

Toute étude microscopique, pour être complète, devrait toujours être accompagnée du *dessin* de la préparation examinée, d'une partie tout au moins de la coupe qu'on a sous les

yeux. L'observation en devient plus exacte, les détails mieux définis, le souvenir en est fixé d'une manière durable. Le dessin, — et en progressant on arrive à dessiner assez convenablement — force l'observateur à faire attention à tout ce qui s'étale sous ses yeux (proportions exactes, situation, rapports, nombre, etc.

Pour les débuts, on fera bien de ne dessiner qu'au grossissement faible.

On pourra s'aider de la chambre à prisme de *Zeiss* ou de *Nachet*, de l'appareil d'*Abbe* ou d'*Oberhauser*. Tout le monde connaît ces ingénieux appareils qui renvoient l'image microscopique sur une feuille de papier qu'il faut placer de telle sorte qu'elle corresponde au niveau de la platine du microscope.

Pour l'emploi de ces appareils, on observera les règles suivantes :

1° L'intensité de la lumière qui frappe le papier et celle du champ visuel du microscope doivent être, autant que possible, égales. L'intensité de la lumière qui frappe le papier étant d'ordinaire la plus forte, il faudra interposer entre le papier et la fenêtre un écran (verre fumé) pour assombrir un peu le papier. Si l'intensité de lumière est plus forte sur le champ visuel du microscope, il faudra diminuer l'ouverture du diaphragme ou de l'appareil condenseur.

2° Veiller à ce que l'angle formé par le miroir de l'appareil à dessiner et l'horizontale du papier, c'est-à-dire de la table de travail, soit exactement de  $45^{\circ}$ .

3° Fixer le papier de façon à ce qu'il ne glisse pas.

On peut se passer cependant de ces appareils en plaçant simplement le papier à dessiner sur un livre, une boîte, la caisse du microscope, par exemple, et à la hauteur exacte de la platine, en regardant avec l'œil gauche dans le microscope et en suivant de l'œil droit sur le papier la pointe de crayon qui y suit les contours de l'image observée. Après quelques essais, on s'y fait assez bien.

Pour les dessins, il est bon de se servir de crayons de *différentes couleurs* en adoptant une fois pour toutes les mêmes couleurs pour des éléments donnés; ces couleurs deviendront fondamentales; ainsi, pour les racines antérieures, par exemple, nous employons le crayon, c'est-à-dire la couleur rouge; de même pour toutes les fibres d'ordre moteur; pour les racines postérieures et les éléments d'ordre sensible, la couleur ou le crayon bleu; le jaune pour le faisceau pyramidien; le vert pour le faisceau cérébelleux, etc., etc., en conservant dans la suite la couleur adoptée pour un groupe d'éléments, un ordre de fibres, de cellules, etc., pour toutes les parties correspondantes de l'axe cérébro-spinal.

La *photographie* rend de certains services pour la reproduction des coupes de S. N. C.; cependant, nous estimons que les avantages qu'on lui a attribués, comparativement aux dessins faits à la main, ont été surfaits. Elle ne remplace pas un dessin exactement fait, surtout

quand il s'agit d'une préparation colorée d'une certaine manière ou d'un élément histologique observé à un grossissement puissant. Son application méthodique exige, pour fournir des résultats vraiment satisfaisants, le concours de nombreux facteurs : sensibilité particulière des plaques, coloration spéciale des coupes, focus particulier, objectif très puissant, éclairage *ad hoc*, chambre obscure d'un grand développement, appareils d'agrandissement, etc., etc., toutes choses qui ne peuvent guère être mises en œuvre dans un petit laboratoire. Aussi, le plus souvent, sera-t-il plus sage de s'en passer, quitte à faire opérer la reproduction de telles préparations rares par un opérateur de profession ou dans un grand laboratoire où se trouvent les instruments nécessaires. Nous renvoyons ceux que la question intéresse aux traités de photographie, qui presque tous consacrent un chapitre spécial à la reproduction des préparations microscopiques, aux ouvrages classiques de technique histologique et en particulier à l'ouvrage de *Fol*, pages 75, 85 (4).

C'est à *B. Stilling* que revient le mérite d'avoir introduit en technique microscopique la méthode de coupes en séries, c'est-à-dire d'une suite non interrompue de coupes, pour l'étude des différentes parties du S. N. C.

Dans le temps et avec les moyens rudimentaires qu'on avait à sa disposition, l'élaboration de coupes analogues à celles que nous obtenons aujourd'hui, et dont le diamètre et

l'étendue peuvent être relativement considérables, coupes transversales ou longitudinales du cerveau entier, coupes sagittales du tronc, etc., n'eût pas été possible. Pour réaliser ces progrès, il a fallu construire des instruments spéciaux, ingénieux, susceptibles de se prêter à toutes les exigences scientifiques modernes et au moyen desquels on pût opérer d'une manière continue, toujours égale et mathématiquement réglée, des coupes isolées et en séries, dans tous les sens et sur n'importe quelle pièce ou portion de l'axe cérébro-spinal.

Les microtomes fabriqués actuellement remplissent tous les *desiderata* formulés dans ce sens ; ils sont déjà si nombreux, si variés de formes, de dimensions, etc., enrichis de tant de détails accessoires, qu'il ne nous est pas possible de les énumérer ici. On consultera donc avec avantage les catalogues illustrés des maisons qui les construisent.

Citons comme les plus utiles et les mieux construits les microtomes de *Reichert*, à Vienne, de *Schanze*, à Leipzig, de *Jung*, à Heidelberg, de *Malassez*, le rocking-microtome de la Cambridge Society (5) et le microtome de *Thoma* (*Jung*). *Demaige*, à Paris, a construit sur le modèle du microtome anglais un instrument d'une grande régularité (5), qui se prête très spécialement à l'élaboration des rubans de coupes (sur papier) et qui, au point de vue des pièces volumineuses, est apprécié des spécialistes.

Le plus simple de ces instruments est représenté par un cylindre creux : la pièce à couper y est incluse dans une masse fluide qui se durcit par le refroidissement. A la partie supérieure du cylindre se trouve un anneau en verre ou en métal sur lequel glissera le couteau qui doit opérer les coupes. Une vis micrométrique fait monter la pièce prise dans la masse d'enrobement. Tel est le microtome de *Ranvier* (1), et c'est sur ce principe qu'est construit celui de *Gudden*, dont nous parlerons plus loin.

La construction des microtomes plus compliqués dont on se sert partout aujourd'hui repose sur le principe du glissoir. Figurons-nous un plot métallique sur lequel on peut à volonté fixer ou visser une lame de couteau, lame courte ou longue, plane ou concave, etc. Ce plot glisse, par traction mécanique (manivelle) ou manuelle, le long d'attelles en métal plein ou en verre, plus ou moins longues, hautes, épaisses, fixées sur une armature ou pied de métal. Un peu plus avant ou vers le milieu de l'appareil ainsi constitué se trouve la vis micrométrique qui, dans les microtomes de construction récente, se meut automatiquement par déclanchement d'un nombre donné de millimètres et qu'on gradue en conséquence. Au-dessus de la vis en question se trouve l'étau porte-objet, la pince dans laquelle on enchâsse la pièce destinée à fournir des coupes. Le tout repose sur une table. Il est des microtomes qu'on peut plonger tels quels

pour couper dans un récipient (baquet) rempli d'eau. Pour faciliter les différents actes de l'élaboration des coupes, les constructeurs ont pourvu ces instruments d'une quantité de détails ou d'accessoires, qui ont pour but aussi de remédier à différents inconvénients dont les coupes peuvent avoir à souffrir. De certains microtomes sont plus spécialement construits en vue des coupes provenant des pièces celloïdées, d'autres prévoient plutôt une fabrication de coupes paraffinées; les uns ne visent qu'à opérer des coupes isolées, les autres sont destinés plus particulièrement à l'élaboration des séries, des rubans de coupes. Pour ces détails techniques et les perfectionnements récents, nous engageons le lecteur à lire, dans *Hermann* (3), ce qui a trait aux microtomes de *De Groot* et de *Minot*, de *Strasser* (6). Puis *Schaffer*, *Thoma*, *Stoss* (*in* 3), et d'étudier les catalogues (prix courants) des maisons que nous avons indiquées plus haut.

Ceci dit, plutôt que d'insister sur des descriptions que tout le monde peut lire, nous nous bornerons à mentionner les conditions essentielles que doit remplir un microtome pour répondre à toutes les exigences : 1° il faut que la machine entière soit lourde, parfaitement d'aplomb, à base large et solide; 2° que la voie du glissoir, c'est-à-dire la voie sur laquelle le plot avance par glissement, soit longue, à parois hautes; 3° le plot doit être lourd, bien en main lorsque la traction ne se fait pas mécaniquement et être pourvu de

plusieurs trous ou pas de vis, de façon à pouvoir y enchâsser ou visser la lame dans différentes positions ; 4<sup>o</sup> l'étau porte-objet, la pince, comme nous l'appelons, doit être articulé, pouvoir pivoter en tous sens, de façon à ce qu'une pièce donnée puisse être coupée suivant différentes obliquités. Les bras de la pince ou les mors doivent pouvoir se laisser écarter facilement, et le tout être susceptible d'enserrer une pièce d'un volume au-dessus de la moyenne. Le système de pince qui remplit le mieux ces *desiderata* est celui construit par les soins de la Station zoologique de Naples ; on peut l'adapter à la plupart des microtomes modernes ; 5<sup>o</sup> l'instrument sera d'une construction aussi simple que possible.

Un instrument qui nous paraît réunir la plupart des conditions énumérées ici est le microtome à plan incliné construit, d'après *Rivet*, par *Reichert*, à Vienne. Il est construit en deux grandeurs, muni de deux lames, de la pince de Naples et d'un cadre métallique pour l'enrobage à la paraffine.

C'est un excellent instrument au moyen duquel on peut couper les pièces les plus petites et celles qui présentent un diamètre d'environ 6-8 centimètres. Avec le microtome grand modèle, on peut parer à toutes les éventualités (Voir le catalogue de *Reichert*).

Le microtome doit être tenu en parfait état de propreté ; lorsqu'on ne s'en sert pas, on le recouvrira d'une cloche ou d'une caisse (en bois ou en verre).



Le glissoir sera toujours parfaitement huilé.

Les lames doivent être larges, peu inclinées, longues pour les blocs celloïdins, courtes et plus épaisses pour les blocs paraffinés. Leur base doit être plate. On les essuiera soigneusement après chaque séance et, pour les faire aiguïser, on fera bien de les envoyer au fabricant qui les aura fournies.

Pour empêcher l'enroulement des coupes provenant de pièces paraffinées par un moyen mécanique, on a construit (*Strasser*) (6) un appareil spécial : le *Schnittstrecker* (*étaleur* ou *extenseur de coupes*), qui consiste en barres ou rouleaux ajustés sur la barre du microtome.

Il en existe de différents modèles. Très ingénieux, mais un peu compliqués, ces appareils ne sont pas d'une absolue nécessité; on peut les remplacer par l'emploi de la pincette et d'une aiguille manœuvrées avec patience et dextérité.

Pour l'élaboration des coupes provenant de pièces non enrobées ou de blocs celloïdins, et pendant laquelle la lame du couteau doit être constamment mouillée, *Bernhard* (7) a imaginé une espèce d'*irrigateur* automatique qui se fixe sur l'armature de l'instrument et qui, réglé d'une certaine façon, laisse tomber goutte à goutte le liquide voulu sur la lame; la main gauche de l'opérateur peut être utilement employée autrement qu'à humecter sans cesse la lame avec un pinceau. Cet instrument est d'un prix modique et rend de grands services, surtout dans l'élaboration de longues séries.

Recommandons également la *table-platine* de la Station zoologique de Naples, qui s'enchâsse dans la pince (étau porte-objet) du microtome ; elle est construite spécialement pour les blocs paraffinés.

Ces accessoires, de même que le cadre métallique de la Station de Naples, dont nous parlerons plus loin, se trouvent actuellement chez la plupart des fabricants de microtomes.

La plupart des instruments sont construits en différentes grandeurs et portent des numéros correspondant à leurs dimensions. Pour parer à toutes les éventualités, il est bon d'acheter plutôt un grand modèle, au moyen duquel il sera loisible de couper toutes sortes de pièces, mais de dimensions restreintes le plus souvent ; pour les grosses pièces, comme le cerveau entier, par exemple, d'animaux comme le chat, et à plus forte raison pour le cerveau humain, les microtomes pareils à ceux dont nous venons de parler ne suffisent pas.

Toutes les fois qu'il s'agira de faire des coupes de grand diamètre, il faudra avoir recours au *microtome de Gudden* (8).

Cet instrument est constitué par un cylindre métallique creux, dont la partie supérieure est enchâssée dans une cuve métallique (zinc), rectangulaire, à rebords assez élevés. Le corps même du cylindre se trouve placé au-dessous de cette cuve. Sur le fond du cylindre est adaptée une vis autour de laquelle tourne une roue dentelée et qui opère à la façon d'une vis micrométrique. Un ressort *ad hoc*,

produisant un certain bruit (avertisseur) au contact de chaque dentelure, se déclanche à chaque mouvement de rotation imprimé à la roue. Un tour de roue complet fait jouer le ressort seize fois et fait monter le fond du cylindre de la hauteur d'un pas de vis. Une fraction donnée de tour de roue ( $1/12$ ,  $1/8$ ,  $1/6$ , etc.) fera donc monter le fond du cylindre et la pièce incluse dans le cylindre d'une fraction correspondante d'un pas de vis, ce qui équivaut à un nombre déterminé de millimètres ou de fractions de millimètre. A la partie supérieure du cylindre est encastré un anneau en verre ou en métal assez large, très plat, sur lequel glissera le couteau destiné à opérer la coupe. Ce couteau, plat en dessous et légèrement concave en haut, glisse de gauche à droite et de haut en bas, tout en prenant constamment un point d'appui sur une règle métallique fixée en diagonale sur le fond de la cuve. Le couteau est manœuvré, c'est-à-dire dirigé, par les deux mains de l'opérateur ; les avant-bras de celui-ci reposent sur deux supports en bois, triangulaires, fichés pendant l'opération sur les angles de la cuve. L'appareil entier repose sur quatre pieds analogues à ceux d'une machine à coudre. Une planche recouvre le tout et, faisant couvercle, permet à l'instrument de servir de table. La cuve est remplie d'eau ayant bouilli, qui recouvrira par conséquent l'anneau et le couteau. On opère ainsi toujours sous l'eau. Nous verrons plus loin comment on doit procéder. L'inclusion

d'une pièce dans le cylindre se fait au moyen de stéarine ou d'un mélange de différentes paraffines.

Le microtome de Gudden est construit en deux grandeurs. Le grand modèle contient un seul cylindre, qui permet l'inclusion d'un cerveau humain avec son cervelet et dont le diamètre est de 16 centimètres. Le petit modèle contient deux cylindres, l'un de 6 centimètres et demi, l'autre de 3 centimètres de diamètre, pourvus chacun d'un anneau d'une grandeur correspondante et d'une vis micrométrique. Cet instrument ne se trouve pas dans le commerce; il faut, pour l'acheter, s'adresser au constructeur *M. Katsch*, à Munich. Ce dernier a construit en outre un petit *cylindre portatif* à anneau supérieur, en verre, dont le diamètre est de 1 centimètre et qui rend de réels services pour couper de très petites pièces. Au fond du cylindre, une vis micrométrique.

Le tout peut se visser sur n'importe quel meuble et supporte l'immersion sous l'eau. Le grand avantage du microtome de *Gudden*, abstraction faite de la parfaite régularité des coupes obtenues, consiste à couper sous l'eau et en ce que les plus grandes, les plus fines de ces coupes ainsi élaborées se mettent à nager sur l'eau au moment où elles sont détachées de la pièce. On évite ainsi les plissements, les déchirures, qui seraient inévitables avec de grosses pièces, si elles étaient coupées aux microtomes ordinaires.

Pour former les blocs (celloïdés et paraf-

finés), nous recommandons le *cadre métallique de la Station de Naples*, à bras mobiles dont l'écartement ou le rapprochement peuvent être obtenus à volonté et qui est susceptible de former ainsi des rectangles de différentes grandeurs correspondant au volume de la pièce à enrober. Il est construit en trois modèles. Pour son emploi, voir l'article : Enrobage à la celloïdine. Il se ferme, c'est-à-dire se monte, au moyen de deux tenons mobiles et forme boîte quand il est agglutiné sur une surface plane (plaque de verre). On le nettoie très facilement et son prix est minime.

Lorsqu'une coupe isolée baigne dans un liquide colorant foncé, il est parfois malaisé de la fixer sur le fond du récipient avant de la sortir du bain ou de changer de liquide. En la cherchant, on s'expose à des détériorations fâcheuses (pointe d'aiguille, etc.). Pour remédier à cet inconvénient, *Obersteiner* (9) a imaginé un petit appareil, le *chercheur de coupes* (*Schnittsucher*), qui consiste en une boîte dont un des côtés manquerait.

Hauteur de la boîte, 12 centimètres ; largeur, 12 centimètres ; longueur, 18 centimètres. La paroi antérieure manque. Sur la paroi supérieure est une ouverture conique, d'un diamètre inférieur à celui du récipient habituellement employé. On place dans l'intérieur de la boîte une glace à miroir d'une longueur correspondant à celle de la boîte, mais plus large, de façon à ce qu'elle forme avec le fond de la boîte un angle de 30 à 40°, face à l'ouverture,

c'est-à-dire au côté manquant. Pour empêcher la glace de glisser, on fixe au-devant de celle-ci une petite liste de bois. Pour « chercher », placer le récipient sur l'ouverture de la paroi supérieure, la glace regardant vers une fenêtre.

Lorsqu'on veut obtenir une imprégnation complète d'une pièce au moyen de la paraffine ou que, dans le cours des manipulations techniques, il faille donner des bains à une température constante, comme certaines méthodes colorantes le prévoient, il est nécessaire d'avoir à sa disposition une *étuve de laboratoire* (*incubateur*). Il y en a de différentes grandeurs. L'étuve en question est représentée par une caisse métallique (en cuivre), à doubles parois. La caisse, c'est-à-dire l'espace compris entre les parois métalliques, est remplie d'eau distillée. L'intérieur de la caisse est d'ordinaire divisé en deux compartiments au moyen d'une plaque à jour qui fait tiroir, sur laquelle on place les récipients (auges, cupules, bocaux), et à différentes hauteurs suivant le cran où cette plaque-tiroir sera placée et suivant les dimensions du récipient.

La paroi antérieure de la caisse est fermée par une plaque de verre, encastrée dans un cadre métallique à charnières et fermant hermétiquement.

Un thermomètre spécial émergeant de la partie supérieure de la caisse plonge dans l'intérieur de l'étuve : il donne le nombre de degrés de l'air chauffé dans l'étuve. Un thermo-

régulateur, adapté à l'angle de la caisse et dont la boule à mercure baigne dans l'eau contenue entre les parois, laisse passer le gaz qui, venant d'une conduite, va se rendre au bec de gaz, dont on règle à volonté l'intensité. La flamme se trouve au-dessous du fond de la caisse. On peut ainsi graduer la température de l'eau et, par conséquent, celle de l'air de l'étuve, de façon à les maintenir un long temps durant à un certain nombre de degrés invariables. L'eau doit toujours remplir exactement l'espace compris entre les parois; il faut en rajouter de temps à autre pour maintenir le niveau voulu; les étuves se fixent au moyen de forts boulons contre le mur. Il en est qui sont montés sur des pieds en métal.

#### B. — INSTRUMENTS ACCESSOIRES.

##### VAISSELLE. — RÉACTIFS.

Nous n'avons pas l'intention de détailler ici tout ce que peut réclamer, en fait d'accessoires, etc., l'installation complète d'un laboratoire; nous désirons indiquer simplement les objets, les agents les plus nécessaires, voire même indispensables, pour la technique microscopique spéciale du S. N. C.

On trouvera au chapitre que cela concerne (Coloration) ce qui doit être employé spécialement pour l'application d'une méthode donnée. La nomenclature suivante et forcément réduite

pourra, au fur et à mesure des besoins, être complétée suivant les désirs de chacun.

1° *Instruments et ustensiles. — Divers.*

1-2 ciseaux droits, effilés, longs.

2-3 pincettes à dissection, à mors plats, dont l'une très forte.

2-3 aiguilles à dissocier, à manche de bois ou de corne.

2 scalpels au moins, droits, pointus.

1 spatule en os ou en bois, si possible en platine.

1 rasoir plat d'un côté.

3-4 piquants de porc-épic (vieux porte-plumes).

3-4 pinceaux à poils de blaireau.

Une provision de papier à filtrer, blanc (Josèphe).

Une provision de papier-closet (*closet-paper*).

Un nombre suffisant d'étiquettes gommées (grandes et petites).

Il est indispensable, en outre, d'avoir à sa disposition des boîtes, des cartons.

Si possible, une armoire *ad hoc*, pour conserver les différentes séries de coupes.

1 baquet à ordures.

1 trépied muni d'un treillis métallique.

1 encrier, plumes et crayon; un jeu de crayons colorés.

Une provision de vieux linges (mouchoirs).



Quelques bouchons et petits morceaux de bois quadrangulaires pour l'enrobage des pièces.

2° *Vaisselle. — Verroterie.*

Quelques baguettes de verre.

Au moins 12 sous-tasses en faïence blanche.

3-4 grandes assiettes, ovales et rondes, peu profondes, à fond plat.

Une collection de verres de montre (24-48).

15-20 cristallisoirs (les auges à oiseaux conviennent très bien).

Un cylindre gradué jusqu'à un litre, en verre.

Un cylindre gradué jusqu'à 100 grammes, en verre.

4 entonnoirs en verre au moins et de grandeurs différentes.

Quelques terrines en grès gris, à couvercle.

Une provision de plaques de verres de différentes dimensions.

Le nombre voulu de flacons pour réactifs et solutions.

Quelques bocaux en verre à large ouverture et à couvercle en verre.

2 auges spéciales pour les essences d'éclaircissement.

1 flacon avec bâtonnet de verre pour le baume de Canada.

2-3 cloches (verres à pied dont le pied serait cassé).

Une grande auge carrée ou oblongue, à couvercle fermant hermétiquement, pour le bain de déshydratation.

Une lampe à alcool, au moins.

Quelques tubes à expérience.

2-3 ballons en verre, à fond plat.

Une cruche à eau.

Le nécessaire pour se laver les mains.

Les assiettes doivent être larges, plutôt plates, de différentes grandeurs et correspondre aux dimensions des coupes : moyennes, grandes, très grandes (plats).

Les bocaux seront, en général, peu élevés, mais très larges. Pour la période de durcissement, nous recommandons l'emploi de terrines en grès ; on peut les couvrir au besoin avec une plaque de verre. Les récipients sont calculés *au prorata* des quantités de liquide nécessaire pour le durcissement.

Il en faut donc de très grands pour les cerveaux entiers, d'autres très longs, mais étroits, pour les moelles, etc., qu'on conserve *in toto*.

En fait de flacons, les premiers venus peuvent suffire. Pour quelques réactifs spéciaux, on en choisira avec bouchon de verre. Les verres de montre seront aussi concaves que possible et à bord rodé.

Les cristallisoirs (auges à oiseaux) seront peu élevés, et on en aura une certaine quantité, de dimensions différentes, à sa disposition ; ces auges conviennent très bien pour les bains de coupes isolées.

Il est important d'avoir toujours préparées

d'avance des provisions de porte-objets de différentes dimensions. Ils seront lavés d'avance et tenus à l'abri de la poussière dans un linge dont on les enveloppera.

Au début de chaque série, on numérote ceux qui devront être employés.

Leur épaisseur variera entre 1-1,5 millimètre (2).

Les couvre-objets seront taillés de façon à avoir les uns 15, les autres 25 millimètres de côté. Pour les coupes de plus grandes dimensions, ils seront proportionnés au diamètre de la surface à recouvrir. Pour les préparations qu'on n'examine qu'au grossissement faible ou moyen, une épaisseur de 1-1,5-2 millimètres n'a rien d'excessif. Pour les grossissements puissants, il faut employer des lamelles couvre-objets, dont on aura différents jeux sous la main.

Pour nos longues séries de coupes, nous faisons tailler des plaques de verre de façon à ce que celles-ci puissent servir suivant les dimensions des coupes que nous obtenons dans une série, soit de porte-objets, soit de couvre-objets. Leurs dimensions varient alors suivant les exigences de la pièce à couper.

### 3° Réactifs. — Ingrédients, etc.

En fait de substances colorantes, de réactifs, etc., se rappeler les deux règles suivantes, formulées par Stœhr (2) : 1° ne faire que de petites provisions ; les réactifs et la plupart des

substances employées en technique microscopique s'altèrent plus ou moins rapidement et sont, en général, d'un prix assez élevé; 2° ne faire les solutions et les mélanges à employer qu'au fur et à mesure des besoins. On se trouvera toujours bien, en outre, de revêtir chaque flacon, chaque bocal, chaque boîte, d'une étiquette très lisiblement annotée, mentionnant le nom du réactif et très exactement sa composition et le poids des substances employées. Les flacons et autres récipients seront convenablement fermés. On ne les remplira jamais complètement. Autant que faire se pourra, les ingrédients nécessaires aux manipulations seront tenus sous clef et à l'abri d'une lumière intense. Toutes les substances colorantes, les réactifs, etc., doivent provenir de fournisseurs très sûrs; au point de vue de la qualité, pas d'économie mal placée. Quant à l'emploi, savoir être ménager.

Il est indispensable d'avoir constamment à sa disposition et en quantité suffisante les ingrédients et solutions qui suivent :

Eau distillée, à conserver dans une dame-jeanne.

Alcool....	{	absolu au moins	500 cent. cubes.
		à 80 0/0	— 500 —
		à 95 0/0	— 1.000 —

Solution de Müller..... 2-3 litres.

Solution de bichromate de potasse à 2 0/0, en grande quantité.

Essence de girofle (ol. caryophyll-Nelkenoel)..... 200 cent. cubes.

Baume de Canada..... 100 —

Xylol..... 100 —

Carmin.	Aniline blue-black	Hématoxyline.
Picrocarmin.	Nigrosine.	Sublimé corrosif.
Nitrate d'argent.	Acide osmi- que 1 0/0.	Créosote.
Térébenthine.	Glycérine,	Collodion.
Solutions A et B	de celloïdine.	
Stéarine.	Deux espèces de gomme arabique, paraffine.	

Pour parer aux éventualités les plus fréquentes, nous recommandons en outre :

Acide acétique.....	50 cent cubes.	
Solution 10 0/0 de potasse caustique.....	50	—
Liqueur d'ammoniaque caus- tique.....	100	—
Acide chlorhydrique .....	50	—
Acide nitrique.....	50	—
Huile d'origan.....	50	—
Résine de Damar.....	50	—
Chloroforme.....	50	—
Ether sulfurique.....	100	—
Solution de permanganate de potasse à 1 0/0 .....	400	—
Solution de carbonate de li- thine à 1 0/0.....	200	—
Solution d'hématoxyline al- coolique à 4 0/0.....	100	—

Les différentes solutions colorantes et les mélanges spéciaux exigés par les méthodes qu'on désirera appliquer peuvent être préparés au fur et à mesure de leur emploi.

Pour faire des mélanges exacts d'alcool, *Stæhr* a établi la formule suivante :

$$100 : 96 = x : p. p.$$

S'agit-il, par exemple, de préparer de l'alcool à 90 0/0, on établira la formule :

$$100 : 96 = x : 90$$

$$96 x = 90 \times 100$$

$$x = \frac{9000}{96} = 93,7, \text{ chiffre rond } 94.$$

Pour obtenir 100 centimètres cubes d'alcool à 90 0/0, il faudra donc ajouter, à 94 centimètres cubes d'alcool absolu, 6 centimètres cubes d'eau distillée.

Lorsque nous parlons d'alcool à 90 0/0, à 85 0/0, à 60 0/0, etc., c'est à de l'alcool titré de cette manière que nous faisons allusion.

Nous recommandons vivement cette formule très simple au moyen de laquelle on obtient des alcools très exactement titrés, mais qui n'est pas encore assez généralement connue et appliquée.

	0/0	ccm.		ccm.		
Pour obtenir 100 c <sup>3</sup> d'alcool :	95	ajouter à 97,5	d'alcool absolu	2,5	d'eau distillée.	
	90	—	94	—	6	
	85	—	88	—	12	
	80	—	84	—	16	
	75	—	78	—	22	
	70	—	74	—	26	
	65	—	68	—	32	
	60	—	64	—	36	
	55	—	57	—	43	
	45	—	54	d'eau distillé	46	d'alcool absolu.
	40	—	58	—	42	
	35	—	64	—	36	
	30	—	68	—	32	

en chiffres ronds.

## CHAPITRE II

### Durcissement des pièces.

Les portions du S. N. C. destinées à être traitées en vue de fournir dans la suite des préparations microscopiques (des coupes colorées) doivent être enlevées du cadavre le plus tôt possible après la mort du sujet. Pour ce qui concerne l'homme très particulièrement, l'organe cérébro-spinal devrait être mis en contact avec le liquide durcissant aussitôt que faire se pourra, et non pas, comme cela arrive si souvent, dans cet état caractéristique de ramollissement qui compromet le durcissement et la procédure technique subséquente. Dans les cas d'autopsies, il doit être extrait du canal rachidien ou de la boîte crânienne avant que l'on procède à l'ouverture des cavités abdominale ou thoracique. Quoi qu'il en soit, il faut éviter soigneusement de souiller les pièces en question, de les saisir avec des instruments qui pourraient les endommager et les manipuler avec ménagement.

Après avoir fendu les enveloppes et disséqué

la ou les parties qu'on a l'intention de conserver, c'est-à-dire de traiter, au moyen d'un scalpel et de pincettes, on immerge ces parties telles quelles, sans les laver à l'eau, dans le liquide de durcissement. S'agit-il de parties délicates, d'un S. N. C. de taille minime qu'il faut conserver dans son entier, de pièces rares ou particulièrement fines, on enlèvera le tout avec les enveloppes, et, après avoir étalé l'organe bien à plat et délicatement sur une table ou sur une grande assiette de métal, on fend les enveloppes et on les rabat de chaque côté de l'organe, en ayant soin de n'entamer nulle part le tissu nerveux proprement dit. Puis, on soulève l'organe, on dissèque, c'est-à-dire on coupe les fibres nerveuses des racines ou des nerfs encéphaliques, etc., de façon à séparer complètement l'organe des enveloppes. D'autres fois, on ne fendra les enveloppes que sur l'un des côtés de l'organe et on le laisse tel quel en place ; ou bien aussi on coupe l'organe par tranches ou sections transversales en différents morceaux de grosseur variable, suivant la méthode qu'on a l'intention d'appliquer, suivant la taille, le degré de développement de l'organe. Les morceaux ou pièces de moyenne grosseur, celles dont la longueur n'excède pas 3,5 centimètres, durcissent beaucoup mieux et plus rapidement que celles qui sont plus volumineuses, et surtout que les organes immergés *in toto* dans le liquide durcissant.



Pour les organismes inférieurs, on sépare en général la moelle du cerveau et l'on durcit chacune de ces parties de l'axe dans le même récipient; pour les animaux supérieurs et l'homme, il est bon de sectionner la moelle, la moelle allongée, le cervelet et le cerveau en différentes portions, et de réunir les parties similaires, ainsi la moelle épinière et la moelle allongée dans un bocal par exemple, et les différents morceaux d'un cerveau dans un autre. Il est évident qu'un organe qui devra fournir des coupes entières intéressant toute l'étendue de l'organe, coupes longitudinales ou transversales du cerveau, sera durci *in toto* tel qu'il aura été sorti de la cavité qui le contenait. Pour durcir convenablement un cerveau *in toto*, il faut avant tout le débarrasser de la dure-mère et enlever, c'est-à-dire détacher les méninges, puis faire une incision longitudinale dans le *septum pellucidum* pour donner issue aux liquides intra-ventriculaires. Si les méninges ne se détachent pas facilement, il vaut mieux, pour ne pas entamer l'écorce, plonger l'organe tel qu'il est dans le liquide durcissant et ne les enlever que plus tard, lorsque le durcissement aura fait quelque progrès.

Le durcissement des pièces de l'axe cérébro-spinal constitue, dans la série des manipulations auxquelles nous les soumettons en technique microscopique, un des actes les plus importants de toute la procédure. C'est, en somme, de l'état du durcissement, des condi-

tions dans lesquelles cet acte s'accomplit que dépend le sort futur d'une pièce. On n'en tient généralement pas suffisamment compte. Aussi nous permettra-t-on de combler en quelque sorte cette lacune en entrant ici dans quelques détails qui paraîtront, à première vue, prolixes ou inutiles, mais qui, selon nous, ont leur raison d'être, précisément parce que l'observation et l'expérience nous ont prouvé que c'est de l'exécution de ces règles minutieuses que dépend le résultat final.

Nous nous occuperons d'abord du durcissement des pièces qui doivent fournir des coupes destinées à être colorées ou imprégnées. Ce qui a trait au durcissement des pièces destinées à être simplement conservées sera mentionné à la fin de ce chapitre.

Pour durcir des pièces avec l'intention d'en utiliser les coupes subséquentement faites, en vue de préparations microscopiques de quelque valeur, il vaut mieux ne pas employer tout d'abord d'alcool ; nous faisons une exception toutefois pour les pièces qui fourniront des coupes à colorer par les couleurs d'aniline. Ces couleurs, la nigrosine et l'aniline blue-black exceptées, prennent en général mal sur des coupes de pièces durcies aux sels chromiques. La coloration aux couleurs d'aniline s'applique, au reste, plutôt à des coupes isolées qu'aux séries proprement dites (la nigrosine et l'aniline blue-black toujours exceptées).

L'alcool d'emblée ne doit servir qu'à durcir les pièces qui dans la suite serviront d'objet

de démonstration, pour l'étude de l'anatomie topographique. On l'emploie comme agent de durcissement complémentaire ou secondaire dans une quantité de méthodes, mais seulement après que la pièce a acquis dans une solution de sels chromiques un certain degré de durcissement; hormis ces cas, qui sont spécifiés aux rubriques concernant les méthodes où l'alcool est utilisé de cette façon, il faut redouter son action au début du durcissement comme provoquant des altérations dans l'intimité des éléments nerveux, altérations qui rendent souvent une bonne coloration impossible (28-71).

De petits objets, moelles ou encéphales de vertébrés inférieurs, de petites portions du S. N. C. des organismes supérieurs, de l'homme également, peuvent durcir assez rapidement et convenablement dans une solution concentrée de *sublimé corrosif*, avec traitement subséquent par de l'alcool iodé, progressivement renforcé. La solution doit avoir une température de 40° C. au moment de l'immersion, et, pendant le temps nécessaire pour le durcissement, le bocal qui contient les pièces en traitement doit être tenu dans l'étuve à une température de 36° C., pour empêcher les précipités ou dépôts de sublimé. La solution chaude contiendra 10-15 0/0 de sublimé. Pour durcir à froid, on emploiera une solution de sublimé à 5 0/0. La durée du bain durcissant varie suivant la grosseur de la pièce ou des pièces. Un morceau de la grandeur d'une noisette est suffisamment

durci après quelques heures d'étuve pour supporter le durcissement complémentaire dans l'alcool.

Pour obtenir le durcissement complémentaire voulu, on plonge la pièce durcie au sublimé dans de l'alcool additionné de teinture d'iode dans la proportion de 1 0/0. On commence par de l'alcool à 30 0/0 et on augmente successivement pour arriver à l'alcool à 70 0/0, puis à 90 0/0; enfin, la pièce passe dans de l'alcool absolu auquel on ajoute également 1 0/0 de teinture d'iode. Au moyen de cette teinture, le sublimé qui se trouve en excès dans la pièce, est éliminé au fur et à mesure que se produit le durcissement complet. Elle n'exerce aucune influence fâcheuse sur les tissus nerveux. En sortant de l'alcool absolu, la pièce peut être coupée et les coupes être traitées par une méthode de coloration. Si l'on veut colorer les coupes ainsi obtenues au moyen de la méthode de Weigert, de Pal, etc., il faudra plonger ces coupes, avant toute autre manipulation, dans une solution d'acide chromique à 1 0/0 pendant cinq à quinze minutes et davantage, suivant la nature de la pièce et l'épaisseur de la coupe. Cela fait, on colore d'après les règles établies par ces méthodes.

Les enveloppes du S. N. C., qui, lorsqu'elles sont durcies avec les pièces qu'elles recouvrent dans un liquide chromo-potassique, sont molles, plus ou moins élastiques et qui ne se laissent alors pas couper facilement, acquièrent dans le sublimé un tel degré de consistance,

de dureté, qu'on peut les couper avec les pièces, sans courir le risque d'endommager celles-ci au moment de la fabrication des coupes.

Ce qui vient d'être dit concerne des pièces de petites dimensions, répétons-le; des expériences concluantes nous font encore défaut relativement aux cerveaux entiers. Le durcissement exigeant pour ces derniers un laps de temps plus considérable, il sera prudent d'employer tout d'abord, et aussi longtemps que possible, une solution chaude de sublimé, jusqu'à ce que les enveloppes soient suffisamment durcies pour pouvoir être enlevées facilement; sur quoi, on pourra plonger la pièce dans une solution concentrée froide de sublimé à 5 0/0, qu'on renouvelera au fur et à mesure de la formation de précipités ou de dépôts de sublimé, jusqu'au moment de la plonger dans le bain complémentaire d'alcool.

Pour de petits morceaux, en outre, du S. N. C., on emploie l'*acide osmique* à 1/2-1 0/0, l'*acide chromique* à divers titres, l'*acide nitrique* à 10 0/0, le *bichromate d'ammoniaque* à 1/2-1-5 0/0 et davantage. Mais le plus souvent ces réactifs sont employés avec d'autres agents fixatifs, soit en vue de la conservation d'une pièce, soit en vue d'en obtenir des coupes à colorer. Les méthodes qui prévoient ces différents modes de durcissement (de fixation) contiennent les indications nécessaires à l'opération.

Parmi les liquides durcissants les plus

recommandés, citons tout d'abord le mélange de *Flemming* (10), qui est d'un usage courant et dont les avantages sont assez unanimement appréciés :

D'une solution aqueuse d'acide chromique à 1 0/0.....	15 vol.
D'une solution aqueuse d'acide osmique à 2 0/0.....	4 —
Acide acétique.....	1 —

Les pièces qui auront durci dans ce mélange devront passer par le traitement complémentaire suivant. Lavage à l'eau durant 3-6 heures.

Durcissement complémentaire à l'alcool successivement porté de 30, 60, 70 à 90 0/0. Dans chaque alcool, bain d'un jour ; puis, enrobement à la celloïdine.

Lorsqu'a paru la méthode de durcissement de *Flemming*, on a voulu l'employer pour le durcissement des éléments histologiques les plus variés. Il y a eu un moment d'engouement, persuadé que l'on était qu'on tenait enfin la fixation par excellence. Il a fallu les avertissements de l'auteur lui-même pour ramener le mérite de la méthode à des limites plus définies. Le liquide de *Flemming* est indiqué pour certaines méthodes, dans lesquelles il rend d'excellents services ; mais on n'est pas, en l'employant, à l'abri de certaines déceptions.

*Hermann* (3) a proposé la modification suivante de ce liquide : il remplace l'acide chromique par une solution de chlorure de platine à 1 0/0, à même volume, et il prétend que

pour certains détails histologiques, ce mélange donne de meilleurs résultats que le liquide de Flemming proprement dit.

Une méthode peu connue encore, et qui se rapproche de la précédente au point de vue des résultats obtenus, est celle de *Benda* (11). Cet auteur plonge la pièce à traiter (elle peut être assez volumineuse) pour 24-48 heures dans le mélange suivant :

Acide nitrique.....	10 vol.
Eau.....	90 —

Après ce bain, la pièce passe, sans avoir été lavée à l'eau, dans une solution de bichromate de potasse concentrée. Pendant les premiers jours, ce mélange sera composé de 1 volume d'une solution concentrée de bichromate pour 3 volumes d'eau, ensuite de 1 volume d'eau et de 1 volume de bichromate.

Les morceaux d'un cerveau ou d'une moelle épinière doivent séjourner environ 15 jours dans le premier mélange. Après leur durcissement, les pièces sont abondamment lavées à l'eau et durcies complémentirement dans de l'alcool. Cette méthode ne convient pas pour les embryons.

Certains auteurs prévoient un durcissement au liquide d'*Erlicki*, dont voici, d'après *von Kahlen* (12), la formule :

Bichromate de potasse.....	2 gr. 50
Sulfate de cuivre.....	0 gr. 50
Eau.....	100 gr.

L'avantage de son emploi consiste en ce qu'on peut obtenir des durcissements rapides; huit à dix jours d'immersion suffisent quelquefois pour durcir une pièce de façon à pouvoir la couper. En plaçant le bocal qui la contient dans une étuve, le durcissement est obtenu déjà au bout de quatre à cinq jours; le liquide a sur celui de *Müller* le grand désavantage de ratatiner plus ou moins les tissus; en outre, les coupes qui proviennent de pièces ainsi durcies présentent souvent de nombreux petits précipités. On ne l'emploie guère que pour les méthodes qui prévoient expressément ce mode de durcissement.

La méthode de durcissement proposée par *Marchi* et *Algeri* (13) donne, pour l'étude des dégénérescences secondaires, de bons résultats. L'autopsie de l'animal opéré aura été faite trois semaines après l'opération. La pièce à examiner est plongée, aussi fraîche que possible, et pour huit jours au moins, dans la liqueur de *Müller*. Elle peut y rester longtemps, jusqu'à trois mois. Pour le durcissement en question, on coupe une pièce (après le bain de huit jours dans la liqueur de *Müller*) en morceaux rectangulaires ou cubiques, de très petit volume; on plonge ces morceaux dans la solution suivante, dite de *Marchi* :

Liquide de Müller.....	2 vol.
Solution d'acide osmique à 1 0/0.	1 —

Ils y séjourneront pendant cinq, sept, douze jours.



Les fibres normales prennent après ce traitement une teinte brune, tandis que celles qui sont en voie de dégénérescence se reconnaîtront facilement à la présence de granulations noires, très nombreuses.

Mentionnons le liquide durcissant de *Kultschitzky* (14).

L'auteur dissout une quantité donnée de bichromate de potasse et de sulfate de cuivre dans de l'alcool à 50 0/0, et ce, à l'abri de toute lumière (chambre noire). Il ajoute ensuite, toujours dans l'obscurité, à 100 centimètres cubes de cette solution, 5 à 6 gouttes d'acide acétique. Les pièces à durcir séjourneront dans ce liquide pendant 12 à 24 heures (toujours à l'obscurité!). Durcissement complémentaire à l'alcool à 96 0/0 et en chambre noire.

Pour ne pas faire de répétitions, nous indiquerons plus loin, à l'article : Imprégnation métallique, les procédés de durcissement préconisés par Golgi et les modifications proposées pour cette méthode par différents auteurs. Quoique nous ne nous occupions ici que du durcissement en vue des coupes du S. N. C., nous croyons être utile en indiquant encore la méthode de fixation par le *liquide de J'ol* (4), et qui est applicable aux petits morceaux des nerfs, des ganglions et de la substance nerveuse centrale.

Le mélange en question est composé de la façon suivante :

Solution d'acide hyperosmique	
à 1 0/0.....	2 vol.

Solution d'acide chromique à 1 0/0.	25	vol.
Solution d'acide acétique à 2 0/0.	8	—
Eau . . . . .	68	—

M.

Il faut employer de grandes quantités de liquide, qu'on renouvellera dès qu'il commencera à se troubler. Les morceaux plongent dans ce bain pendant au moins 24 heures; en général, plus longtemps encore. On les lave ensuite à fond, à l'eau distillée, et on les conserve dans de l'alcool à 80 0/0. Dès ce moment, ils sont aptes à être coupés.

Le réactif préféré à juste titre, le plus communément employé aussi, pour durcir convenablement des pièces du S. N. C., est le *bichromate de potasse* à l'état de *solution aqueuse simple* et à un degré de concentration plus ou moins fort, ou à l'état d'un mélange connu sous le nom de *liqueur de Müller*.

La composition du liquide de Müller est la suivante :

Bichromate de potasse . . . . .	20	gr.
Sulfate de soude . . . . .	10	—
Eau distillée . . . . .	1.000	—

M.

Quoique ce liquide jouisse d'une réputation universelle, il nous a paru que son emploi présentait parfois quelques désavantages, surtout pour ce qui concerne les pièces de grandes dimensions. Nous avons remarqué que souvent le durcissement se faisait, dans ces cas, d'une manière moins égale; les parties extérieures

ou périphériques d'une pièce se durcissaient convenablement, les parties intérieures ou centrales, moins complètement ou mal. Le liquide est cependant tout à fait indiqué lorsqu'il s'agit de durcir des pièces de grandeur petite ou moyenne. Pour l'emploi subséquent de certaines méthodes de coloration, il *faut* durcir dans la liqueur de Müller. Nous indiquons, au reste, le fait aux méthodes qui prévoient le cas.

Pour ce qui nous concerne, nous donnons absolument la préférence à une *solution de bichromate potassique, aqueuse simple, à titre faible*, qui, pour tous les cas où d'autres liquides durcissants ne sont pas obligatoires, nous paraît suffire.

Une grande faute qu'on commet généralement consiste à employer trop peu de liquide pour obtenir le durcissement d'une pièce du S. N. C. Pour que cette opération réussisse convenablement, il est nécessaire que les pièces à durcir puissent plonger dans de grandes quantités de liquide. N'oublions pas que, durant le cours du durcissement, et principalement au début, il se fait une continuelle décomposition altérant le liquide, qui ne remplira dès lors plus les conditions indiquées pour opérer un durcissement égal des divers éléments du tissu nerveux. Pour que les combinaisons qui doivent se faire entre les sels chromiques et telles parties des éléments nerveux (gaines à myéline, par exemple) se produisent normalement, il faut que la solution

de durcissement reste ce qu'elle doit être et que sa composition ne soit pas modifiée par des produits organiques (albuminoïdes), avec lesquels elle se trouve en contact constant. Dans une solution surchargée de ces produits d'élimination, les éléments nerveux s'altèrent à leur tour et durcissent mal ou pas du tout. Preuve en est sur le relativement grand nombre de pièces qu'on durcit, la souvent grande proportion de celles qui, dans la suite, ne se laissent pas colorer convenablement, précisément, et en dehors de certaines causes qui tiennent à la nature de la pièce, parce que l'acte du durcissement s'était accompli dans des conditions mauvaises. Il faut compter au moins 100 centimètres cubes de solution chromo-potassique pour 3-4 petites pièces de 3 centimètres de côté. Pour de plus grandes pièces, la quantité à employer, dès le début du durcissement et à chaque renouvellement du liquide, sera proportionnellement plus grande. Pour un hémisphère, il faut compter au moins 3-4 litres; pour le cerveau humain, 6-8-10 litres; pour la moelle allongée seule, environ 1 1/2-2 1/2 litres; pour le cervelet seul, 2-3 litres, etc. Ces données dépendent, cela va de soi, de la grandeur du bocal qui contient une pièce. Le bocal sera donc proportionné au volume d'une pièce. Pour de grands objets, il faut une colonne de liquide qui représente au moins 3-4-5 fois le volume ou l'espace occupé par une pièce dans un bocal donné.

Une seconde grande faute consiste à laisser

les pièces trop longtemps dans la même quantité de liquide. Les pièces réagissent très différemment sous l'action du liquide durcissant; il en est qui, au bout d'un temps relativement court d'un séjour dans la même quantité de solution durcissante se gâtent et pourrissent plus ou moins complètement; d'autres paraissent mieux supporter le contact avec le même liquide; mais, comme au début du durcissement on ne sait jamais comment se comportera une pièce donnée, il est de toute nécessité, pour éviter à des mécomptes, et à cause des raisons que nous avons énumérées plus haut relativement à la quantité du liquide, de changer fréquemment le bain durcissant.

Pendant les premiers huit jours, le liquide doit être, dans la règle, renouvelé tous les deux jours. Pour les grandes pièces qui offrent plus de surface et dont l'épaisseur contribue à favoriser un tassement des tissus, qui, notamment aux parties déclives de la pièce, prédispose à la désagrégation, tout au moins au ramollissement, il est nécessaire de changer le liquide chaque jour pendant la première semaine; puis, à mesure que la pièce se débarrasse de ses produits organiques (sang des vaisseaux, liquide cérébro-spinal, etc.) et que la solution durcissante apparaît moins souillée, l'opération pourra se faire moins fréquemment. La première quinzaine passée, il peut suffire de changer le liquide une fois tous les huit jours, jusqu'à ce que le durcissement voulu ait été obtenu, ce qui, suivant la nature et la grosseur

de la pièce, exige un laps de temps qui varie de 1 à 2 ou 3-5 mois, et même davantage. La dépense qui résultera de cette règle de prudence n'est pas si considérable qu'on pourrait le croire tout d'abord, les sels de bichromate potassique étant d'un prix modique; en outre, au lieu d'employer chaque fois de l'eau distillée, dont le prix est malheureusement encore partout trop élevé, on peut se servir d'eau ayant bouilli. On la laisse refroidir et on la tamise sur un linge très fin. Pour les premiers jours, il faut de l'eau distillée, tout au moins pour les petites pièces. Disons, en passant, que les cristaux de bichromate se dissolvent beaucoup plus rapidement dans de l'eau chaude. En ayant soin de filtrer convenablement les quantités de liquide ayant servi pour des bains de 2<sup>e</sup> ou de 3<sup>e</sup> semaine, on peut les employer de nouveau pour les premiers bains des nouvelles pièces. Ce sera économique, surtout quand il s'agit de durcir de grandes pièces, pour lesquelles il faut compter par litres. Le liquide des premiers bains ne peut servir une seconde fois, même si on le filtrait.

Lorsqu'on change le liquide d'un bocal qui contient une ou plusieurs pièces à durcir, il faut donner une nouvelle position à chaque pièce, la coucher dans un sens différent que celui qu'on lui avait donné tout d'abord; le plus souvent, il suffira de la retourner. C'est absolument nécessaire pour toutes les pièces, quel que soit leur volume, mais, en outre,

indispensable pour les grosses pièces, qui, sous l'action du poids exercé toujours dans une même direction, se durciraient mal, se déformeraient aux parties déclives ou s'aplatiraient sur le fond du bocal. Ces pièces reposeront, en outre, sur une couche d'ouate, qu'on changera également de temps à autre. Lorsqu'on durcit un cerveau tout entier, on glissera pendant toute la période de durcissement un plumbeau d'ouate entre les hémisphères, entre le cerveau et le cervelet, et entre le cervelet et la moelle allongée, de façon à ce que ces différentes parties ne se touchent pas et qu'elles soient sur le plus de surface possible en contact avec le liquide durcissant.

On recommande d'enlever la pie-mère là où elle se trouve encore, et les plexus choroïdiens après quelques heures ou quelques jours de durcissement; nous conseillons, lorsqu'on n'a pas pu enlever tout d'abord les membranes sans endommager l'écorce, d'attendre le moment où l'organe aura acquis un durcissement suffisant pour permettre plus facilement des manipulations qui peuvent souvent être fatales. La moelle épinière, avec tout ou partie de la moelle allongée, est, en général, extraite avec la dure-mère (ouverte) et placée telle qu'elle dans des bocalx spéciaux, très allongés, où l'on suspend l'organe au moyen d'un ruban ou d'une ficelle. Si la pièce tend à flotter, à se tordre, on peut suspendre à la dure-mère, mais jamais à l'organe lui-même, et à sa partie inférieure, un poids léger (non métallique, une pierre cou-

sue dans un petit sac en toile, par exemple), qui maintiendra la pièce sous le liquide et qui favorisera la direction droite que doit occuper l'axe spinal durant l'acte du durcissement.

Chaque bocal contenant une pièce sera soigneusement étiqueté; on mentionnera la date de la mort, celle de l'immersion de la pièce, le nom du sujet, la désignation de la pièce, la nature du liquide, les dates où l'on changera la solution du durcissement.

Nous croyons que les vases, bocaux, récipients, etc., qui contiennent des pièces à durcir doivent être opaques et être placés à l'abri de la lumière solaire, celle-ci décomposant, d'après ce que nous avons aussi pu observer, les solutions de sels chromiques. Tous ces récipients seront constamment tenus couverts, c'est-à-dire fermés.

Durant les premiers jours du durcissement très particulièrement, mais en général aussi pendant toute la durée de cet acte, nous recommandons l'emploi de solutions faibles. Une grande cause d'insuccès git, croyons-nous, dans l'immersion des pièces dans des solutions trop fortes. Il est des cas où l'on doit employer des solutions très chargées de sels chromiques; lorsqu'on s'aperçoit, par exemple, qu'une pièce, un cerveau entier, se durcit mal ou trop lentement, ou que par places il se décompose, il faut alors avoir recours à des solutions concentrées. Mais dans la règle, pour les 2-3 premières semaines, une solution à 1 1/2-2 0/0



pour les pièces de volume restreint, et 2 0/0-2 1/2 0/0 pour les pièces moyennes ou grosses suffira. A mesure que le durcissement avance, en général après 15-20 jours, nous remplaçons pour les grandes pièces, pour le cerveau durci *in toto*, la solution initiale par une autre à 3 1/2 0/0, tandis que nous laissons les petites pièces dans la solution faible. Il est une observation qu'ont faite tous ceux qui se sont occupés de technique microscopique du S. N. C., à savoir : que les différentes parties de l'organe cérébro-spinal durcissent chacune plus ou moins vite ; que, suivant les différents organismes, le durcissement se fait d'une façon différente, tant au point de vue de la durée nécessaire à l'atteindre que de la manière dont il s'effectue. Ainsi, les différentes parties de la moelle spinale et de la moelle allongée durcissent, en général, chez le même sujet, plus lentement que les différentes portions du cerveau proprement dit (28). Les premières ont souvent atteint un degré de durcissement suffisant, alors que les secondes sont déjà trop dures, ou bien celles-ci sont à point, alors que celles-là sont encore trop molles (27). La substance cérébrale est la substance nerveuse qui durcit le plus rapidement, la substance spinale le plus lentement ; le cervelet, la protubérance et la partie supérieure de la moelle allongée forment des étapes de transition, eu égard à la rapidité du durcissement, entre la moelle spinale et le cerveau. L'organe cérébro-spinal des organismes inférieurs durcit, dans la règle,

plus rapidement et mieux (et se laisse aussi mieux colorer) que celui des vertébrés supérieurs et que celui de l'homme surtout (71). Plus l'axe cérébro-spinal d'un organisme est susceptible d'un durcissement prompt, plus faible doit être la solution durcissante à employer. Ce sont là des règles que l'expérience a consacrées, mais qui n'ont cependant rien d'absolu.

Le temps nécessaire pour obtenir un durcissement convenable est très variable ; cela dépend, comme nous venons de le voir, de la nature de l'organisme, auquel la pièce a été enlevée, de son état de fraîcheur plus ou moins complet au moment de l'immersion dans le premier bain, des soins apportés à changer le liquide, de la température du liquide et du milieu ambiant, de la grosseur de la pièce et de sa consistance particulière physiologique ou pathologique, etc., etc.

Un cerveau de poisson, d'oiseau, des pièces de dimensions restreintes seront durcis en quelques semaines ; d'autres pièces de même volume ne le seront qu'au bout de quelques mois, d'autres le seront déjà après un temps plus court. Une moelle spinale humaine exige parfois près d'un an pour durcir convenablement ; les hémisphères, un cerveau, peuvent l'être suffisamment après 6-8 mois, souvent même moins, de séjour dans le liquide durcissant (28). Le degré de consistance, de durcissement voulu est jugé obtenu lorsque, avec un rasoir bien mouillé, on peut faire sur

l'organe des coupes transversales et longitudinales d'une venue, bien égales, fines, et que les substances blanche et grise ont acquis un aspect caractéristique. La substance blanche ne doit pas se différencier de beaucoup d'avec la substance grise. Les pièces sur lesquelles on constate une différence très marquée entre ces substances se colorent d'ordinaire mal ou pas du tout. Les pièces qui sont devenues trop foncées, surtout pour ce qui concerne des morceaux du cerveau proprement dit, sont difficiles à colorer et s'effritent facilement. C'est, en définitive, l'expérience, l'habitude du toucher, l'œil, qui fixent en dernier ressort le moment où le durcissement paraît être achevé. La pièce doit être dure et cependant présenter un certain degré d'élasticité; elle doit être dure, mais partout également, et ne pas présenter de places plus molles que d'autres.

Il importe de suivre avec attention le travail de durcissement, en palpant délicatement de temps en temps chaque pièce, pour éviter que, par un séjour trop prolongé dans la solution chromique, les tissus ne deviennent trop durs. Les pièces trop dures ne se coupent plus jamais bien; les coupes se recroquevillent sur le couteau, se fissurent, se plissent et se cassent; elles prennent mal la couleur. Si l'on constatait ce surdurcissement caractéristique, il faudrait plonger de suite la pièce dans de l'eau distillée tiède; mais le plus souvent déjà il est trop tard; on aura beau la baigner pendant des semaines et des mois, elle ne se

ramollira que rarement et elle doit être le plus souvent considérée comme perdue, tout au moins pour des coupes à colorer ; comme objet d'anatomie topographique, elle pourra rendre encore service. De certaines pièces subissent très rapidement, malgré une surveillance suivie, ce surdurcissement contre lequel on est impuissant. Ce sont, en général, celles de grandes dimensions, les hémisphères de l'homme surtout ; cela tient évidemment à une trop longue durée du bain durcissant.

Les bocaux qui contiennent des pièces à durcir doivent être tenus dans un local frais, sec, à température égale.

*Weigert* a prouvé que le durcissement des centres nerveux par le liquide de *Müller* ou par celui d'*Erlicki* — d'autres ont vérifié le fait pour ce qui concerne la solution aqueuse de bichromate de potasse simple — se faisait d'une manière beaucoup plus rapide en plaçant les bocaux dans un endroit chaud ou dans une étuve à 30-40° C. qu'en les laissant à la température d'une chambre ou d'un laboratoire ordinaire. Cela est, mais le durcissement ainsi obtenu donne des résultats moins égaux, moins sûrs, et nous croyons que, de même que la coloration, pour être nette et constante, doit se faire lentement au moyen de solutions colorantes plutôt faibles, mais dont le contact avec les tissus sera prolongé, de même le durcissement, pour qu'il puisse se faire régulièrement, intimement, progressivement, doit être lent et se faire à une température plutôt basse.

Il se produit fréquemment dans les bocaux où plongent des pièces à durcir, des colonies d'algues qui, ou bien forment comme un gâteau épais, nageant à la surface du liquide, ou bien s'attachent en filaments visqueux, plus ou moins consistants, sur la périphérie des pièces ou dans les anfractuosités qui s'y trouvent. *Pierret* (1) veut avoir observé que ces moisissures amènent, au bout d'un certain temps, la décoloration de la solution durcissante et veut avoir profité de ce fait pour décolorer la pièce elle-même lorsque le durcissement complet a été obtenu, en semant de ces moisissures dans le liquide chromique. L'action de ces moisissures est très variable ; nous croyons que, sur certaines pièces, elles entravent le durcissement régulier ; d'autres fois, elles provoqueraient, si l'on n'y veillait, le surdurcissement ; d'autres fois encore leur action paraît ne pas être nuisible ; la couleur de la pièce varie alors du vert jaune clair au noir brun. Nous pensons qu'il vaut mieux éviter l'apparition de ces moisissures en changeant fréquemment le liquide, et, lorsqu'elles se sont produites, en débarrasser les pièces le plus rapidement possible au moyen d'un lavage soigneux à l'eau fraîche ; mais elles sont parfois si adhérentes, qu'il faut faire attention de ne pas gâter la pièce en voulant la nettoyer. Des brisures de camphre n'empêchent pas leur formation.

*Conservation ultérieure des pièces.*

Les pièces qui après leur durcissement devront attendre, pour une cause ou pour une autre, un traitement subséquent, ou celles qui sont destinées à être conservées telles quelles peuvent être traitées de la façon suivante :

1° Les pièces ou morceaux destinés à être enrobés plus tard, en vue de la coloration des gaines à myéline (selon Weigert, Pal, etc.), seront plongés de suite dans l'alcool au titre prescrit par la méthode qu'on emploiera, en général de l'alcool à 70 0/0.

Le liquide sera fréquemment renouvelé, car il se souille abondamment ensuite des précipités qui s'y forment, surtout au début. Au bout d'un certain laps de temps, ce qui dépend de la dimension des pièces, de leur nature et de l'état du durcissement, l'élimination des sels chromiques est déjà si avancée qu'on court le danger de ne plus trouver dans les gaines assez de ces sels pour obtenir avec l'hématoxyline la combinaison classique voulue, la laque caractéristique des images de coloration hématoxylinique. Les pièces sont alors tout à fait vertes et peuvent se prêter à d'autres méthodes de coloration, celles d'Upson par exemple, pour lesquelles cette couleur verte est de rigueur ; mais elles réclameront, pour la coloration ultérieure des gaines, un nouveau bain chromo-potassique.

Il sera toujours préférable d'enrober ces pièces, leur durcissement obtenu, et de les conserver à l'état de blocs dans l'alcool prescrit.

2° Les pièces ou morceaux destinés exclusivement à la coloration des cellules et des cylindraxes, très spécialement à la coloration au carmin, seront conservés dans une solution très faible de bichromate de potasse ( $1/4$ ,  $1/2$ ,  $1/0/0$ ), ou simplement dans de l'eau distillée, qu'on changera de temps à autre et à laquelle, à mesure que la pièce rendra ses sels, on ajoutera quelques gouttes de liqueur de Müller ou de solution de bichromate, suivant la méthode à employer. En général, il faut ne pas attendre trop longtemps et couper le plus tôt possible. Les pièces destinées au microtome de *Gudden* sont immergées dans de l'eau.

Les bocalux seront couverts et placés à l'abri de la lumière solaire.

3° Les pièces durcies autrement que par des liquides au bichromate, ainsi les pièces durcies à l'alcool en vue de la coloration au bleu d'aniline, celles durcies aux mélanges osmiques, au sublimé corrosif, etc., restent, jusqu'à traitement subséquent, dans le liquide de durcissement complémentaire (alcool, alcool iodé, etc.). Voir ces méthodes.

4° Les pièces qui ne sont pas destinées à être coupées, mais qui doivent figurer dans une collection ou servir d'objets de démonstration, continuent à séjourner dans le liquide de durcissement. Les pièces durcies dans de

l'alcool spécial passent alors dans de l'esprit-de-vin ordinaire. Les pièces durcies dans un liquide au bichromate peuvent aussi passer dans de l'alcool d'abord à 60 0/0, puis successivement porté à 95 0/0.

Pour l'enseignement, il est préférable de durcir les grandes pièces (cerveaux) d'emblée dans de l'alcool pur ou dans un mélange d'alcool et de chlorure de zinc, mélange dans lequel on les conservera aussi dans la suite.

La méthode de conservation du professeur *Laskowski* (15) peut s'appliquer également à l'encéphale ou à toute pièce du S. N. C. On durcit la pièce en question dans une solution alcoolique saturée de chlorure de zinc. Le durcissement obtenu, la pièce passe pour 15-20 jours dans un bain de glycérine phéniquée à 5 0/0, après quoi on peut la conserver à l'air, ou bien elle reste dans la glycérine. La substance grise y ressort très nettement au moment où l'on fait des incisions sur l'organe ou sur une coupe; mais celle-ci s'altère souvent et prend une teinte uniforme et caractéristique.

Pour de petits encéphales et pour l'étude des relations topographiques, on peut durcir l'objet dans un mélange à parties égales de glycérine et d'acide acétique, et, après 24 heures de séjour dans le liquide, finir le durcissement et conserver la pièce dans le liquide de Müller (procédé de *Duval*) (5). Cette méthode donne aux pièces une consistance suffisante; elles ne sont pas friables, mais elles ne peuvent pas servir à faire des coupes.



La méthode de conservation mentionnée par *Schwalbe* (16) et qui, croyons-nous, provient de *Bischoff* (?) peut, à l'occasion, rendre service :

1° Placer le cerveau frais dans une solution concentrée de chlorure de zinc.

2° Enlever la pie-mère pendant que l'organe flotte dans ce liquide.

3° Environ 8 jours après cette immersion, bain d'alcool à 95 0/0.

4° Bain de quelques jours dans cet alcool, puis bain d'alcool absolu.

La déshydratisation doit être complète ; le séjour dans l'alcool absolu sera, par conséquent, plutôt trop long que trop court.

5° La pièce déshydratée passe dans un bain de xylol ou d'essence de térébenthine. Durée du bain : au moins une semaine.

6° L'organe passe dans un bain de paraffine (fondue à 50-55° C.), dans l'étuve à une température suffisamment chaude pour empêcher la paraffine de se prendre. Durée de cet acte : environ une semaine.

7° En sortant de ce bain, on plonge la pièce dans un baquet d'eau froide, afin que la masse se refroidisse en flottant sur l'eau. On évite ainsi les déformations qui se produiraient en plaçant l'organe dans un récipient. Il reste à enlever la paraffine prise sur la surface du cerveau. Pour cela, on promène une petite éponge imbibée d'alcool, fixée au bout d'une pincette et qu'on aura enflammée, à une certaine distance de la surface de l'organe. La paraffine

fondue, on peut peindre telles parties du cerveau qu'on voudra (circonvolutions, centres, etc.) avec des couleurs à l'huile. L'essentiel est de déshydrater la pièce à fond; sans cela, elle se ratatine et s'effrite tellement qu'un durcissement ordinaire au bichromate de potasse eût mieux valu.

Ce procédé est un peu compliqué et passablement coûteux.

*Hermann* (3) en décrit un autre suivant *Stieda*, qui est plus simple et qu'on peut appliquer avec une dépense minime :

1° Le cerveau passe, tel qu'il a été enlevé, dans une solution concentrée de chlorure de zinc, et ce pour 2-3 jours.

2° Cela fait, on enlève la pie-mère et on immerge le cerveau pour 15 jours environ dans de l'alcool à 96 0/0.

3° Il passe ensuite dans de la térébenthine, où il séjournera pendant 2-4 semaines;

4° Sur ce, l'organe passe dans un bain de vernis à l'huile pour un laps de temps qui varie de 15 jours à plusieurs semaines.

On a voulu conserver des encéphales dans des mélanges de vinaigre et de créosote, d'alcool méthylique, etc.; mais ces méthodes de conservation ne valent pas celles à l'alcool ni les procédés dont nous venons de parler.

Pour de plus amples renseignements, voir les traités de technique microscopique.

Les coupes qu'on ne tient pas à colorer peuvent, après leur élaboration, être simplement déshydratées et conservées telles quelles dans

de la glycérine. On les place alors, sur un porte-objet correspondant à leur diamètre, dans le bain d'alcool, et, au sortir de ce bain, on les recouvre d'une abondante couche de glycérine; comme couvre-objet, se servir de plaques de verre un peu épaisses; les bords du couvre-objet seront essuyés et on lutera la préparation obtenue soit avec de la paraffine, soit avec de la laque.

Ces préparations à la glycérine donnent parfois, pour les grandes coupes transversales ou longitudinales du cerveau, du bulbe, du cervelet, de bonnes images d'ensemble.

Sur les espaces atteints de dégénérescence, on voit alors les fibres nerveuses restées saines ressortir nettement du milieu atteint.

## CHAPITRE III

### A. — TRAITEMENT SUBSÉQUENT DES PIÈCES DURCIES.

Voici des pièces convenablement durcies. Avant de leur faire subir un traitement complémentaire en vue de la coloration, une question s'impose : que voulons-nous colorer ?

Le durcissement, l'enrobement, l'élaboration des coupes, actes très importants en eux-mêmes et relativement au sort final d'une pièce donnée, ne constituent, dans le cours de la technique microscopique cependant, qu'autant d'actes préparatoires ; car c'est, en fin de compte, dans la coloration des éléments nerveux que se résument et aboutissent toutes les manipulations nécessaires pour obtenir une préparation microscopique proprement dite. Or, les plus simples d'entre les innombrables méthodes de coloration exigent, outre leurs procédés de teinture spéciaux, le traitement préliminaire particulier d'une pièce destinée à fournir des images colorées : d'où la nécessité, au point où nous en sommes arrivés, de faire

un choix parmi ces méthodes, car de ce choix dépendra la marche à suivre pour chaque cas, c'est-à-dire pour chaque pièce.

Nous croyons qu'on peut grouper les différentes méthodes de coloration de la manière suivante :

1° Le groupe des méthodes qui ont pour but la coloration exclusive des cellules avec leurs prolongements (cylindraxes). Type : coloration au carmin, à l'aniline blue-black, méthodes de Rehm, etc., etc.

2° Le groupe de celles dont la technique consiste à colorer ou à laquer les gaines de myéline. Type : méthodes de Weigert, de Pal, etc.

3° Le groupe des procédés de teinture qui se sont donné pour tâche d'atteindre une coloration simultanée des cellules avec leurs prolongements et des gaines de myéline, et qui représentent souvent des combinaisons des méthodes des autres groupes. Leurs résultats se traduisent par des colorations ou teintures proprement dites. Type : méthode à la saffranine, à la galléine, à la fuchsine acide, etc., ou par des pseudo-imprégnations métalliques avec coloration, les éléments imprégnés étant susceptibles d'être éclaircis. Type : méthodes à l'or, au palladium, etc. C'est pour nous le groupe des méthodes mixtes.

4° Enfin, le groupe des méthodes qui ont pour objectif non plus la coloration des éléments nerveux, mais leur imprégnation métallique au sens strict du mot, avec formation de

précipités nombreux dans l'intimité même des éléments nerveux, ceux-ci n'étant plus susceptibles d'éclaircissement, et ressortant alors en noir sur le fond plus ou moins incolore des tissus circumvoisins. Type : les méthodes de Golgi, et les modifications récentes apportées par différents auteurs à ces méthodes.

Accessoirement, et cela est impliqué dans le choix d'une de ces méthodes, nous avons à décider comment la pièce sera coupée, et, par conséquent, à quel mode d'enrobage<sup>1</sup> ou d'inclusion nous avons à donner la préférence, pour mener à bien l'élaboration des coupes destinées à fournir des images colorées.

A cet égard aussi, nous classons ces actes préparatoires sous quatre chefs :

1° L'inclusion simple, provisoire, amovible, destinée plutôt aux pièces qui ne doivent donner que quelques coupes isolées.

2° L'enrobage à la paraffine.

3° L'enrobage à la celloïdine.

Ces enrobements sont destinés à transformer une pièce en un *bloc* de consistance homogène, résistante. Ils sont définitifs, inamovibles et se prêtent, avant tout, aux longues séries de coupes.

4° L'inclusion ou l'enchâssement dans le microtome de *Gudden* au moyen d'une masse stéarinique (ou de paraffines différentes), liquide

1. Nous préférons le mot d'*enrobage* à celui d'*enrobage*, employé par d'autres auteurs français.

d'abord et qui se solidifie par refroidissement. En tenant compte des données qui précèdent, nous pouvons formuler, à l'endroit des pièces durcies et relativement au traitement subséquent, les suppositions suivantes :

a. Nous supposons que la pièce que nous avons en main, doit fournir des coupes destinées à être colorées exclusivement en vue des cellules avec leurs prolongements (cylindraxes).

Il faudra tout d'abord débarrasser les tissus des sels chromiques qui s'y trouvent en excès. Pendant la période de durcissement, il s'est fait une imbibition complète du liquide chromique; les sels se sont infiltrés partout, autour des cellules, des prolongements, ils se sont entassés dans les gaines, les espaces périvasculaires et obstruent les vaisseaux sanguins, les espaces lymphatiques. Si l'on n'en débarrassait pas l'ensemble d'une pièce, les agents colorants, tels que le carmin, les couleurs d'aniline, etc., formeraient avec ces sels des combinaisons qui, au lieu de colorer, encrasseraient les éléments nerveux, ou bien ces agents colorants ne prendraient pas du tout; le résultat final serait gravement compromis.

Abstraction faite des méthodes de coloration spéciale qui prévoient un bain détergeant dans de l'alcool, à un titre donné, nous croyons, à cause de l'action nocive que l'alcool exerce sur les éléments nerveux, que cette élimination des sels chromiques doit se faire dans l'eau distillée ou, pour raisons d'économie, lorsqu'il s'agit de grandes pièces, dans de l'eau bouillie. La pièce

sera plongée dans une grande quantité de liquide, qu'on changera plusieurs fois par jour au début, puis journallement, enfin aussi longtemps que l'eau continuera à se colorer en jaune, ne serait-ce que faiblement. Cette série de bains détergeants peut exiger un temps plus ou moins long; il n'y a pas de règles fixes à établir à cet égard. Il faut surveiller la pièce en traitement, empêcher la formation de moisissures et de temps en temps, par le palper, se rendre compte de la consistance de la pièce; de certaines altérations (ramollissement) survenant quelquefois dans de certains états pathologiques.

L'eau tiède accélère le travail d'élimination des sels chromiques; aussi, lorsqu'on est pressé, peut-on placer le bocal dans un bain-marie de durée, ou dans une étuve très légèrement chauffée, ou sur un poêle, etc., en maintenant la température de l'eau à celle de l'eau tiède classique. Les alternatives brusques de chaud et de froid altèrent la consistance de la pièce; les transitions de température seront donc lentes; les bocaux seront tenus couverts et à l'abri de la lumière. Lorsque l'eau du bain détergeant ne se colore absolument plus en jaune, la pièce est prête à être enrobée et coupée.

Les pièces qui ont subi un bain détergeant dans de l'alcool en vue d'une méthode spéciale sont enrobées généralement à la celloïdine; celles qui ont passé par l'eau seront incluses de préférence dans le microtome de Gudden, pour être coupées sous l'eau.



b. Nous supposons que la pièce doit être traitée suivant l'une des méthodes de coloration des gaines de myéline.

La pièce durcie est débarrassée des derniers vestiges d'enveloppes, vaisseaux, etc., qui pourraient s'y trouver encore et passe, sans avoir été lavée à l'eau, dans l'alcool au titre prescrit par la méthode qui sera employée, en général dans de l'alcool à 60-70 0/0. Elle reste dans ce bain, dont on augmente parfois progressivement le titre, un laps de temps dont la durée est indiquée par chaque méthode. Pour être subséquemment enrobées, soit dans la paraffine, soit dans la celloïdine, les pièces doivent être complètement déshydratées.

c. Nous supposons qu'une pièce doit fournir des images de cellules avec leurs prolongements et de gaines à myéline.

Nous ne parlons *pas* ici des images à coloration *double*, où la coupe a été traitée d'abord en vue des gaines et ensuite en vue des cellules.

C'est un acte spécial, complémentaire de la coloration myélinique.

Notre supposition implique deux éventualités :

1° Nous désirons que toutes nos coupes soient colorées en vue des cellules et des gaines, que les images soient uniformes. Pour cela, nous ferons choix d'une méthode du troisième groupe, et nous ferons subir à la pièce le traitement prévu par la méthode à laquelle nous nous arrêterons (méthodes mixtes : Upson, Strœbe, Adamkiewicz, etc.).

2° Nous désirons obtenir alternativement des images de cellules et des images de gaines de la même pièce. Pour cela, nous traiterons la pièce ainsi qu'il a été dit à l'article *a* et *b*. Comme en *a*, lorsque nous voulons plutôt des images à cellules et exceptionnellement des images à gaines, les coupes destinées à la coloration myélinique seront alors plongées dans un bain chromo-potassique, pour s'imprégner de nouveau d'une certaine quantité de sels chromiques nécessaires pour la formation de la laque caractéristique dans les gaines. Comme en *b*, lorsque nous voulons plutôt des images à gaines et exceptionnellement des images à cellules, les coupes destinées à la coloration cellulaire seront largement lavées à l'alcool, puis à l'eau distillée et traitées selon la méthode de coloration choisie.

*d.* Nous supposons que la pièce doit être imprégnée de sels métalliques en vue de précipités, tels que nous les montrent les méthodes de Golgi.

Nous sortons la pièce du bain durcissant et, sans la laver à l'eau, nous l'immergeons dans le liquide prescrit par la méthode (argent, sublimé).

La plupart des pièces sont alors coupées telles quelles, plus rarement après avoir subi un enrobement celloïdine (jamais de paraffine). On peut les couper à la main (rasoir), puisqu'elles ne fournissent, dans la règle, pas de vraies séries. Leurs manipulations spéciales sont indiquées aux méthodes en question.

e. Nous supposons que la pièce ne peut pas être coupée de suite, ou que nous désirons la conserver telle quelle.

On la conserve alors dans une solution faible de bichromate 1/2-3/4-1-1 1/2 0/0, ou bien, lorsqu'on est presque certain d'employer dans la suite une coloration du deuxième groupe, on l'immerge provisoirement dans de l'alcool à 70 0/0.

Les petites pièces destinées à ne fournir que quelques coupes isolées peuvent être simplement collées sur un bouchon au moyen de celloïdine épaisse (B). Le bouchon qui les supporte sera taillé de façon à entrer commodément dans la pince du microtome.

On peut encore les emmailloter dans du papier buvard ou Josèphe préalablement ramolli dans de l'eau, ou les enchâsser dans une cavité taillée, en rapport de leurs dimensions, dans un morceau de moelle de sureau.

L'enrobement simple ou inclusion peut se faire dans une petite boîte de papier ou de carton, dans laquelle on place l'objet et où on l'arrose de la masse liquide qui devra durcir ensuite en se moulant sur lui. La boîte en question se laissera facilement défaire lorsque l'inclusion sera complète, c'est-à-dire que la masse sera solidifiée; elle peut servir à plusieurs inclusions. On peut, par exemple, entourer un bouchon d'une collerette de papier, tenue en place par une épingle ou gommée dans le sens de sa longueur. La collerette se fait d'une bande de papier dont on fait passer plusieurs

tours autour du bouchon qu'elle débordera d'une hauteur voulue et correspondant à la hauteur, c'est-à-dire aux dimensions, de la pièce. On y place alors l'objet, en l'y maintenant au moyen d'épingles, après quoi on verse le liquide qu'on laisse solidifier avant de retirer les épingles (Voir les traités de microscopie).

Pour opérer des séries de coupes sur n'importe quelle pièce du S. N. C., il ne saurait être question d'un mode d'inclusion aussi primitif. La pièce doit, au contraire, dans ces cas, arriver à être imprégnée de la masse liquide destinée à l'enrober et faire corps avec la masse durcie. Il doit se produire une pénétration graduelle de la masse dans l'intimité des tissus, de façon à ce que, sous l'action du refroidissement ou de la solidification, il se forme un bloc compact, sans bulles d'air, opaque ou demi-transparent, suivant le liquide employé; les coupes faites sur ce bloc représenteront des disques au centre, c'est-à-dire au milieu desquels se trouve encastrée, prise comme dans un collet, la coupe proprement dite de la pièce.

Nous avons vu que les enrobements dont on se sert en technique microscopique pour les séries de coupes du S. N. C. sont ceux à la paraffine et ceux à la celloïdine.

Voyons en quoi consistent les différents actes de l'enrobage.

## B. — ENROBEMENT A LA PARAFFINE (2) (5).

Les pièces destinées à être enrobées dans la paraffine doivent, avant tout, être complètement déshydratées. La durée de ce bain de déshydratisation varie suivant le volume d'une pièce, le degré de consistance de l'objet et le mode de coloration qu'on prévoit; elle varie de 1 à 3 jours et plus.

La pièce déshydratée passe dans un bain de pénétration; on emploie dans ce but un agent dissolvant, la paraffine; ce bain est donné d'emblée, ou l'agent dissolvant est dilué avec de l'alcool et n'est administré que progressivement. On peut se servir dans ce but de xylol, de toluine, d'essence de girofle, etc., ou de chloroforme. Les uns donnent la préférence au chloroforme, les autres au xylol. Le chloroforme pénètre bien, mais rend la pièce un peu cassante; l'essence de cèdre pénètre bien également, sans présenter cet inconvénient.

Le bain de chloroforme durera 24 heures. La pièce sera toujours largement recouverte de liquide. Pour une petite pièce (20 centimètres au moins), le bain pris, la pièce passe dans la solution suivante :

Paraffine.....	5 grammes.
Chloroforme.....	25 —

où elle restera pendant 2-8 heures. Couvrir le bain.

Cela fait, on place la pièce à enrober dans une cupule ou une auge à oiseaux, et on l'arrose de paraffine fondue, tiède, mais non pas chaude. La paraffine ne doit pas avoir une température de plus de 2-3 degrés au-dessus de son point de fusion.

On laisse la pièce en place dans le récipient dans lequel on vient de l'arroser pour un moment, puis on l'enlève pour la placer dans une autre auge, et on l'arrose d'une nouvelle quantité de paraffine fondue. Elle reste dans ce second bain, qui a essentiellement pour but d'enlever à la pièce les dernières traces du chloroforme, pendant 4-5 heures. Il est quelquefois nécessaire de donner un troisième bain pour enlever jusqu'aux dernières traces du liquide de pénétration. Cela fait, on place la pièce dans le cadre métallique de la Station de Naples ou dans une boîte de papier, ou dans un cylindre fait au moyen d'un morceau de carton blanc, gommé ou épingle; bref, dans un moule ou cadre quelconque.

Le tout est mis sur une assiette, sur une grande plaque de verre ou, suivant le volume de la pièce, simplement sur un porte-objet, et on l'arrose de paraffine. Pendant que celle-ci est encore fluide et transparente, on donne à la pièce la position exacte qu'elle doit occuper, en notant, au moyen d'un point de repère quelconque, quelle partie de la pièce correspond à telle partie du cadre, de façon à savoir plus tard par quel bout commencer les coupes, car, lorsque la paraffine sera prise, le bloc

entier sera opaque. On immerge le tout dans de l'eau froide, de façon à ce que l'eau n'atteigne que le bord supérieur du cadre, sans qu'elle puisse pénétrer dans le cadre ou le récipient lui-même. La paraffine se prend assez rapidement et acquiert insensiblement une consistance toujours plus homogène, qui facilitera la fabrication des coupes. Une fois que la paraffine a acquis le degré de durcissement voulu, on enlève l'armature du cadre métallique, ou le moule de papier, etc., et on laisse le bloc dans l'eau froide jusqu'à durcissement complet.

Pour fondre la paraffine, on en coupe quelques morceaux dans une cupule qu'on fait chauffer lentement sur un trépied muni d'un treillis métallique, ou bien on place la cupule dans une étuve ou sur un poêle. Tenir la cupule toujours couverte.

Pour obtenir une bonne paraffine, il est nécessaire de faire un mélange de différentes paraffines ayant chacune un point de fusion différent. Ce mélange, pour être convenable, ne peut se faire que dans une étuve. Il faut pouvoir disposer au moins de deux espèces de paraffines, l'une fondant à 45° C., l'autre à 52° C. La première a une consistance moins dure, elle est un peu molle; la seconde a le grain plus serré, elle est plus cassante, plus dure.

Pour faire le mélange, on prend généralement 30 grammes de paraffine à 45° C. (molle) et 25 grammes de celle à 52° C. (dure); cepen-

dant, il n'est pas toujours facile de fixer d'avance les proportions de chacune d'elles ; c'est affaire d'expérience et cela dépend aussi de la consistance de la pièce, en outre de la température ambiante.

L'enrobement dont nous parlons prévoit l'emploi du microtome à glissoir ; cependant, au besoin, un bloc paraffiné pourrait être enchâssé dans la masse du cylindre du microtome de Gudden, comme cela se fait également pour les blocs celloïdés de grandes dimensions, et être coupé sous l'eau.

Cette méthode d'enrobement présente, en regard de celle à la celloïdine, deux désavantages : le premier consiste dans l'emploi obligatoire d'une étuve dont le prix est toujours plus ou moins élevé ; le second dans l'enlèvement du collet de paraffine qui entoure la coupe proprement dite avant de traiter celle-ci par la couleur : le collet absorbe une certaine quantité de couleur et ne la rend pas de la même façon dans le bain décolorant ou de différenciation, d'où la nécessité de l'enlever à temps. Mais cet acte ne s'accomplit pas facilement ; aussi prudemment qu'on opère, il arrive très fréquemment qu'en cherchant à enlever le liséré de paraffine, on déchire ou détériore la coupe. Pour remédier à cette complication, on a proposé de plonger la pièce, à sa sortie du bain d'alcool avant le premier bain de paraffine, pour 24 heures dans le xylol (Voir plus loin).

*Giesbrecht* et *Bütschli* (in 5) ont préconisé



pour l'enrobage qui nous occupe le procédé suivant : La pièce, ayant été soigneusement déshydratée par l'alcool absolu, est pénétrée par le chloroforme, auquel on peut ajouter, en cas de nécessité, un peu d'éther sulfurique, pour l'empêcher de flotter si elle était très petite. On chauffe le tout au bain-marie et l'on ajoute au chloroforme, par intervalles, de petits morceaux de paraffine. A mesure que celle-ci fond, on en ajoute d'autres, et l'on continue ainsi aussi longtemps que des bulles d'air se dégagent. Lorsque les bulles ne se forment plus, on peut être sûr que la pièce est bien pénétrée. On chasse le chloroforme en continuant à chauffer à la température de la fusion de la paraffine, jusqu'à ce que tout le chloroforme soit entièrement volatilisé.

Pour savoir si le chloroforme est entièrement volatilisé, il suffit de plonger une aiguille chauffée dans la masse ; elle ne doit provoquer aucun dégagement de bulles.

Lorsqu'on emploie l'essence de cèdre, on place la pièce dans un mélange de paraffine et d'essence, en fondant vers  $35^{\circ}\text{C}$ . et en maintenant cette température au moyen d'un bain-marie ou dans une étuve, jusqu'à pénétration complète.

Le mélange de ce premier bain se fait avec parties égales d'essence et de paraffine fondant à  $50^{\circ}\text{C}$ . Après saturation, on sort la pièce du mélange, on l'arrose de la masse dont on veut se servir pour faire le bloc et on la laisse dans ce second bain à la température de fusion

de la paraffine employée. Puis on place la pièce dans un cadre, on l'y oriente, on l'arrose de paraffine, ou bien on laisse refroidir le tout dans le récipient qui a servi au dernier bain. La durée de ces bains varie suivant la nature de l'objet et son volume. Un embryon, par exemple, de la grosseur d'un pois est pénétré en 30 minutes souvent dans le mélange d'essence, et en une heure dans la paraffine pure fondant à 45° C.

Les petites pièces durcies au sublimé, solution concentrée chaude à 15 0/0, solution froide à 5 0/0, passent, lorsqu'on veut les enrober à la paraffine, après que le durcissement a été obtenu (quelques heures, 2 heures pour de très petites pièces, suffisent pour les durcir à point), pour 3-4 heures dans de l'eau distillée, puis pour 12 heures dans de l'alcool à 60 0/0.

En les sortant de ce bain, on les plonge pendant 24 heures dans de l'alcool absolu; cela fait, elles passent dans un mélange à parties égales de xylol et d'alcool, où elles séjournent 12 heures; enfin, pour 24 heures dans du xylol pur. On leur donne ensuite le premier bain de paraffine, préparé à parties égales de xylol et de paraffine, et qui durera 24 heures, à une température constante de 40° C. Le second bain de paraffine durera 2-3 heures; on se servira pour ce bain de paraffine pure fondant vers 55-58° C.

Cela fait, on provoque le plus rapidement possible la prise du bloc. Pour les enrobements de nos pièces durcies au bichromate de

potasse, nous avons employé le procédé suivant. Pour éviter des répétitions, nous résumons les différents actes de la méthode :

1° Bain dans un mélange à parties égales de xylol et d'alcool. Durée du bain : environ 12 heures ;

2° Immersion dans une solution concentrée de paraffine fondant à 52° C. dans du xylol. Durée de l'immersion : 24 heures, à une température constante de 37° C. (dans l'étuve) ;

3° Bain dans de la paraffine pure fondant à 52° C. Durée de ce bain : 24 heures, à une température constante de 55° C. (étuve) ;

4° Sortie du bain, prise du bloc dans le cadre métallique de la Station de Naples. Eau froide pour accélérer la prise du bloc, etc.

Nous avons dit que la condition première pour l'enrobage dans la paraffine consistait dans la déshydratation complète de la pièce.

Pour obtenir une déshydratation parfaite, *Suchannek* (18) a proposé l'emploi d'huile d'aniline. Il sort les pièces de l'alcool à 96 0/0 et les plonge pour 1-12-24 heures, suivant leur volume, dans de l'huile d'aniline parfaitement anhydre ; de là, il les transporte pour un même laps de temps dans du toluol. L'avantage ne nous paraît pas être très grand.

Il en serait autrement, d'après *Hermann*, pour le procédé de *Ciaglini* (19), pourvu que les expériences ultérieures viennent corroborer les résultats obtenus jusqu'ici. Il est applicable aux pièces de la moelle épinière. L'auteur évite complètement tout contact des pièces durcies

dans la liqueur de Müller, avec l'alcool.

Il sort les pièces durcies, les lave rapidement et les sèche superficiellement au moyen de papier Josèphe, puis il les plonge dans l'huile d'aniline. Après 3-5 jours, les pièces durcies sont devenues transparentes et peuvent, après un traitement au xylol, être enrobées à la paraffine. Durant le traitement subséquent, l'huile d'aniline remplace toujours l'alcool comme véhicule ou lubrifiant des coupes; celles-ci ne seront jamais mises en contact avec de l'alcool.

Les différentes manipulations auxquelles doivent être soumises ultérieurement les coupes en général ne sont pas toujours compatibles avec l'emploi de la paraffine comme masse d'enrobement; les coupes paraffinées s'effritent très facilement et le collet, avons-nous dit, qui doit disparaître, ne s'enlève pas aisément; pour remédier à ces inconvénients, on a proposé différents traitements spéciaux que nous indiquons plus loin au chapitre IV (Manipulations des coupes).

Un enrobement à la paraffine, soigneusement exécuté, n'est pas plus dangereux pour l'intégrité des éléments nerveux que l'enrobement à la celloïdine; les organismes les plus fins le supportent très bien. Le difficile avec les blocs paraffinés est de faire des coupes très égales et de les enlever de dessus la lame du microtome sans les détériorer; aussi, malgré les instruments spéciaux qui ont été construits pour obvier à ces inconvénients, préfère-t-on

souvent, surtout pour les pièces de volume plus considérable, l'enrobage à la celloïdine et, pour les grandes pièces, l'inclusion dans le microtome de Gudden.

C. — ENROBEMENT A LA CELLOÏDINE (2) (5) (12).

C'est à *Duval* que nous devons l'importante technique de l'enrobage à la celloïdine. Plus que toute autre substance imprégnante, la celloïdine pénètre les tissus d'une pièce, de façon à lui donner tout à la fois le degré de solidité voulue et l'élasticité nécessaire pour que la lame du couteau, en passant et repassant sur le bloc, enlève sur tout le champ de section des coupes d'une venue et parfaitement égales. Lorsque le bloc celloïdiné a été fait régulièrement et méthodiquement, il présente une consistance homogène parfaite. La celloïdine possède le grand avantage de ne pas s'effriter, comme le fait la paraffine, durant les manipulations auxquelles les coupes sont soumises; elle reste bien compacte; transparente, ce qui permet une facile orientation, et, dans les bains souvent prolongés de coloration, de décoloration ou de différenciation, etc., par lesquels elle passe en compagnie d'une coupe, elle n'absorbe que de faibles quantités des divers réactifs employés; en outre, les quantités qu'elle détient momentanément, elle les rend presque complètement, à la condition toutefois que les lavages soient un peu plus soigneux,

c'est-à-dire plus longs que si les coupes n'avaient pas été enrobées. Elle conserve la structure des éléments nerveux et forme une masse protectrice suffisamment résistante pour pouvoir supporter une certaine pression, comme celle de la pince du microtome, si, pour une cause ou pour une autre (la longueur de la pièce, par exemple), on n'a pas pu coller le bloc sur un bouchon ou un morceau de bois, comme cela doit se faire dans la règle. Elle est assez dure pour se laisser couper facilement, pas assez cependant pour empêcher la lame du couteau de couper franc, ou pour l'émousser à la longue. L'imbibition d'une pièce dans les solutions de celloïdine, même prolongée, est inoffensive pour les structures les plus délicates, et peut se prolonger impunément pendant plusieurs jours, voire même pendant des semaines. Contrairement à l'opinion émise par certains auteurs que l'enrobement à la celloïdine ne se prête pas à l'élaboration de séries de coupes, parce que, d'après ces auteurs, il ne serait pas possible de faire des coupes minces etc., l'expérience quotidienne a surabondamment prouvé (... la méthode des plaques de Wiegert est une illustration de ce que nous avançons ...) que l'enrobement à la celloïdine est par excellence l'enrobement des séries, et qu'on fabrique sur des blocs celloïdins des coupes minces et très minces. Dans l'enrobement en question, il faut distinguer deux actes distincts : le premier est celui de l'imprégnation, de la pénétration de la pièce par une celloïdine très

fluide, et qui nécessite un laps de temps plus ou moins long; l'autre qui consiste en une pénétration-inclusion, au moyen d'une celloïdine plus forte, plus épaisse, dans laquelle on laisse la pièce jusqu'à consistance voulue et pénétration complète, ce qui s'obtient, selon la nature et le volume des pièces, en quelques heures, quelques jours ou quelques semaines. Ces deux actes sont prévus par la méthode; cependant, on peut pénétrer et inclure une pièce d'emblée avec une solution forte lorsqu'il ne s'agit que de faire quelques coupes, au lieu d'une série entière. Mais, pour que la pièce soit bien enrobée, que les coupes puissent se faire très également, il faudra, même lorsqu'on sera pressé, veiller à ce que l'imprégnation-inclusion ait été complète.

Pour préparer les solutions de celloïdine, on coupe cette substance en petits morceaux cubiques et on prépare les mélanges suivants :

*Solution A* (solution faible). Coupez 30 grammes de celloïdine en petits cubes, qu'on plongera dans 30 centimètres cubes d'alcool absolu, additionnés de 30 centimètres cubes d'éther sulfurique. Se servir de flacons à large embouchure et à bouchon de verre; il faut qu'on puisse y introduire facilement le pouce et l'index à la fois. Le flacon sera toujours tenu bien bouché.

*Solution B* (solution forte). Prenez la même quantité de celloïdine coupée de la même façon. Ajoutez à 30 centimètres cubes d'alcool absolu 20 centimètres cubes d'éther.

Ces solutions s'épaississent toujours par le fait de l'évaporation des liquides, et au bout d'un certain temps elles se troublent; il faut alors laisser sécher la solution ou ce qui en reste, couper le résidu en petits cubes et dissoudre à nouveau et de la même façon (préalablement peser la celloïdine!) pour chaque solution. Lorsque les solutions s'épaississent sans se troubler, on peut ajouter la quantité proportionnée d'alcool et d'éther nécessaire pour les fluidifier à point.

Avant de passer une pièce dans un bain de celloïdine, il faut l'avoir préalablement déshydratée à fond dans de l'alcool à 90 0/0 pendant 1 ou 3 jours. Après ce bain d'alcool, les uns font subir à la pièce un bain complémentaire et à parties égales d'alcool absolu et d'éther sulfurique; les autres s'en passent et plongent la pièce dans la solution A. Cet acte peut avoir l'avantage de compléter la déshydratation lorsqu'on est pressé ou bien lorsque la structure spéciale d'une pièce paraît devoir le réclamer (embryons entiers); mais nous voyons dans ce second bain un danger: celui d'exposer la pièce, durant les différentes phases de la procédure subséquente, qui, quoique promptement exécutée, réclame cependant un certain temps, à un dessèchement plus rapide au contact de l'air, ce qu'on doit toujours éviter.

En sortant du bain de déshydratation, la pièce passe immédiatement dans la solution A. Voici comment on peut s'y prendre pour opérer cette première pénétration: *a)* placer la



pièce dans une auge à oiseaux d'une grandeur correspondant au volume de la pièce et l'arroser de solution, de façon à la recouvrir complètement; au bout d'un instant, ajouter un peu de liquide, en remplissant l'auge à peu près; couvrir; — ou bien *b*) placer la pièce dans le cadre métallique de la Station de Naples, dont les bras mobiles auront été rapprochés ou éloignés de façon à correspondre au volume de la pièce, et qu'on aura agglutinés au moyen de quelques gouttes de solution B sur une grande plaque de verre; remplir le cadre de solution A; couvrir; — ou bien *c*) fixer la pièce dans une petite boîte, faite de papier, de carton, suivant un schéma qu'on peut dessiner pour chaque cas, ou formée au moyen d'une collerette de papier gommé autour d'un bouchon.

Quelque moule qu'on ait employé, on laissera la pièce pendant 24 heures dans la solution A. Le lendemain, on sort la pièce de ce bain, ou bien on verse la solution A, et on donne dans un nouveau récipient ou dans celui qui a déjà servi le bain de solution B (avoir soin de verser la solution A dans le flacon A; les méprises sont faciles!). Après 24 heures de séjour dans la solution B, les petites pièces sont déjà suffisamment pénétrées pour être traitées. Les pièces de moyen ou de grand volume doivent séjourner de 2-4-8 jours dans le bain B : cela dépend de la nature de la pièce. C'est affaire d'expérience, comme aussi de juger de la consistance convenable des solutions. Surtout évi-

ter de se servir de solutions trop épaisses.

Une pièce ne reste jamais trop longtemps dans une solution de celloïdine; on pêche plutôt par excès contraire. Un séjour prolongé favorise la pénétration complète, puis le durcissement du bloc.

Lorsque la masse a pris une consistance voulue, la celloïdine doit être molle et un peu résistante, élastique, gélatineuse; on enlève le cône de papier ou le cadre métallique, ou bien, si l'on a traité la pièce dans une auge, on taille dans la masse un cube ou un rectangle suivant la forme de la pièce dans laquelle celle-ci sera prise, et on le sort de l'auge. On fixe le bloc, de consistance molle encore, au moyen de quelques gouttes de solution B, sur un bouchon ou, ce qui vaut infiniment mieux, sur un morceau de bois, rond ou carré, suivant la forme de la pince du microtome et taillé de façon à ce qu'il s'enchâsse facilement dans la pince ou les tenettes du microtome. En collant la pièce, c'est-à-dire le bloc mou, sur son bouchon, il faut faire en sorte qu'il y ait entre le bloc et le bouchon une couche de celloïdine d'au moins 2 millimètres d'épaisseur; on évitera également de serrer, de presser, de tasser le bloc mou sur le bouchon; cet acte doit être exécuté très délicatement. Cela fait, on verse encore un peu de celloïdine B sur le tout.

Le bloc ainsi ruisselant de celloïdine est placé sur une plaque de verre; on l'arrose encore une fois d'une nouvelle quantité de

liquide B, et on recouvre le tout d'une cloche en verre ou d'un bocal renversé, de façon à ne laisser entrer que très peu d'air sous le récipient. Pour cela faire, placer une aiguille à dissocier ou une allumette sous le récipient, c'est-à-dire sous le rebord de la cloche, etc.; cela suffira pour donner accès à la quantité voulue d'air.

Sous cette cloche se produit alors une évaporation qui est accélérée ou ralentie suivant le plus ou moins d'air qu'on laisse pénétrer du dehors dans la cloche, c'est-à-dire sur le bloc; or, comme le degré de consistance finale du bloc dépend du laps de temps passé sous la cloche, et que les blocs séchés lentement sont plus durs, plus résistants et homogènes que ceux qui sèchent vite, il s'ensuit que plus l'évaporation sera lente, meilleur sera le bloc; de là à conseiller, comme le font certains auteurs, de fermer la cloche hermétiquement il y a loin; on a beau soulever de temps en temps alors la cloche ou le bocal renversé, pour permettre aux vapeurs d'alcool et d'éther de s'échapper, l'évaporation ne s'en fait pas mieux, au contraire; ici, elle se fait par à-coups; suivant la méthode que nous recommandons, elle s'obtient graduellement et régulièrement, tout en étant continue. Là encore, c'est affaire d'observation et d'habitude.

Au bout d'une demi-heure à une heure, même 3 à 4 heures, quelquefois davantage encore, le bloc est suffisamment sec. Le bloc ainsi préparé est enlevé de dessus la plaque

de verre et passe de suite dans un flacon à large ouverture, contenant de l'alcool à 80 0/0. On y plonge le bloc, le bouchon en haut, et, pour l'empêcher de basculer, on fixe le bouchon du bloc au bouchon du flacon ou au couvercle du bocal au moyen de quelques gouttes de solution B, qui durcit vite lorsqu'on souffle sur la place d'agglutinement. Le flacon qui contient le bloc doit être complètement rempli d'alcool. Au bout de 24 heures, on remplace l'alcool à 80 0/0 par celui à 70 0/0, dans lequel le bloc pourra être conservé très longtemps. Avant de couper le bloc, on enlève au scalpel la portion de celloïdine qui se trouve recouvrir la pièce; on taille le bloc de façon à ce que les coupes qu'on élaborera n'aient pas un collet de celloïdine trop large.

Quand on a fini de couper, on recouvre la surface de section du bloc d'un peu de celloïdine, on fixe de nouveau le bouchon du bloc au bouchon du flacon et on l'immerge dans l'alcool.

## RÉSUMÉ DE L'ENROBEMENT.

<i>A la paraffine.</i>	<i>A la celloïdine.</i>
1° Durcissement.	Durcissement.
2° Bain d'alcool absolu.	Bain d'alcool absolu.
3° Bain xylol et alcool.	Bain alcool et éther.
4° Bain xylol et paraffine.	Bain solution A.
5° Bain de paraffine.	Bain solution B.
6° Prise du bloc, cadre.	Séjour sous la cloche.
7° Eau froide.	Alcool à 80 0/0.
8° Elaboration des coupes.	Alcool à 70 0/0.
9° —	Elaboration des coupes.

D. — INCLUSION DANS LE MICROTOME  
DE GUDDEN (8).

La pièce destinée à être coupée sous l'eau dans le microtome de Gudden est soigneusement débarrassée des parcelles d'enveloppes qui pourraient y adhérer encore, des vaisseaux qui serpentent dans les recoins des grandes pièces, etc. Les pièces durcies au bichromate de potasse sont, lorsqu'elles sont à point, d'ordinaire assez résistantes et élastiques tout à la fois, pour être manipulées sans danger dans un liquide quelconque. Lorsqu'on les sort d'un liquide et qu'il s'agit de les sécher avant de les introduire dans le microtome en question, il faut les manipuler avec beaucoup de précautions, car, une fois sèches, elles se cassent facilement, la moelle épinière surtout. La pièce à inclure est-elle bien propre, on commence par lui donner un bain d'eau chaude de 35-40° C. Ce bain est nécessaire pour que le mélange stéarinique ou paraffinique chaud qu'on coulera dans le cylindre se moule exactement sur toutes les parties de la pièce et qu'il puisse pénétrer jusque dans les plus petites anfractuosités de l'objet (cerveau). En se refroidissant dans le cylindre, le mélange stéarinique se prend, dans la règle, de la périphérie vers le centre et la pièce se trouve alors parfaitement saisie dans la masse, une fois que celle-ci est refroidie. Si l'on

plaçait la pièce dans le cylindre, sans avoir ramené sa température, périphérique tout au moins, au niveau de celle de la masse fondue, en un mot sans l'avoir baignée dans l'eau chaude, la stéarine se refroidirait du centre vers la périphérie, c'est-à-dire des bords de la pièce vers les parois du cylindre. Il se produirait alors des vides qui se traduiraient, au moment de couper, par des mouvements de va-et-vient de la masse entière et des mouvements de bascule de la pièce prise dans cette masse.

Pendant que la pièce baigne, on fait fondre dans une cupule ou, lorsqu'il s'agit d'un cerveau entier, dans une casserole en fer battu des morceaux de stéarine, mélangés à des morceaux de paraffine, ou bien des morceaux de la masse suivante, qu'on aura préparée auparavant :

Stéarine.....	15 parties.
Axonge.....	12 —
Cire.....	1 partie.

La quantité à employer pour chaque cas est proportionnée, cela va de soi, au volume de la pièce à inclure.

Pour remplir le cylindre du microtome, la masse fluide ne doit pas être en état d'ébullition; il faut, lorsque tous les morceaux sont fondus, enlever le tout de dessus la flamme et laisser la masse se refroidir un peu. Trop chaude, elle carboniserait les parties extérieures de la pièce. Nous attendons, en général,

qu'il commence à se former sur la surface de la masse fluide une fine pellicule de prise, et c'est à ce moment précis que nous remplissons le cylindre (le doigt peut supporter le contact de la masse fluide).

Arrivé à ce moment de la procédure, nous sortons la pièce de son bain d'eau chaude et nous la séchons avec un linge très fin et avec des morceaux de papier Josèphe, en pénétrant dans tous les recoins, de façon à ce que la pièce entière soit bien sèche. Cela fait, il s'agit de placer la pièce dans la position qu'elle doit occuper dans le cylindre pour être coupée.

Tout d'abord, on aura ramené le fond du cylindre à une hauteur correspondant à la hauteur de l'objet à couper, en tournant la roue dentelée de droite à gauche ou de gauche à droite, suivant le point où elle se trouvait arrêtée. On place alors la pièce sur un de ses côtés, sur sa base ou sa convexité, de pointe, etc., suivant la position dans laquelle elle doit être coupée, sur le fond du cylindre et dans l'espace compris entre les trois boutons métalliques qui en garnissent le milieu. Si la pièce ne se tient pas dans la position voulue, on la cale entre ces trois boutons au moyen de morceaux de liège, d'allumettes, de petits morceaux de carton, en ayant soin de ne placer ces supports que là où le couteau ne passera pas tout d'abord; autant que possible en dessous de la pièce. Lorsque la pièce est bien calée, on remplit doucement le cylindre avec la masse fluide, en ayant soin de ne pas arroser

la pièce, ce qui pourrait la faire basculer. Le cylindre une fois rempli, il se produit, au bout d'un instant, un dégagement assez prononcé de bulles d'air, puis un retrait du liquide stéarinique. On ajoute encore de quoi remplir complètement le cylindre jusqu'à ras de l'anneau, et on laisse la masse se prendre lentement dans l'immobilité la plus complète. Un peu plus tôt, un peu plus tard, suivant la quantité de liquide, en moyenne après quelques heures, la masse est durcie. On remplit alors la cuve du microtome avec de l'eau bouillie, refroidie et tamisée à travers deux linges. Cela fait, on couvre le microtome.

Le lendemain, pas avant, on enlève circulairement et par couches le dos du scalpel toujours tourné vers l'anneau, qu'on veillera à ne jamais endommager, parce que la moindre rayure sur l'anneau occasionnerait une éraillure du couteau et conséquemment des déchirures sur la coupe, on enlève, disons-nous, excentriquement la stéarine qui recouvre la pièce et celle qui l'enserme à sa partie la plus externe. Celle-ci mise à nu, on dégage, le scalpel toujours dirigé de la même façon, les abords immédiats de la pièce, de façon à ce qu'en coupant avec le grand couteau du microtome, la lame ne coupe que la pièce et non pas des morceaux de stéarine, ce qui l'émousserait et l'abîmerait à la longue.

Dès ce moment, on peut se mettre à couper.

La masse stéarinique ne sert, en réalité, que de support circulaire à la pièce, qu'elle englobe



si parfaitement qu'on pourrait parler ici d'un véritable enrobement. Cette masse d'inclusion ne sert que de support aux coupes à mesure qu'on élabore celles-ci, puisque la partie supérieure de la pièce, le champ de section, doit être dégagée de la stéarine qui lui faisait collet et émerger de la masse stéarinique. La stéarine ne doit pas adhérer trop fortement non plus à la périphérie de la pièce. C'est en préparant le mélange qu'il faut combiner les différents ingrédients dont se compose la masse, de telle sorte que celle-ci ne soit ni trop dure ni trop molle; puis, au moment de couler la masse fluide dans le cylindre, il faut veiller à ce qu'elle ne soit ni trop chaude ni trop froide, mais à point. Au bout de très peu de temps, on arrive à saisir ces degrés et à exécuter l'opération classiquement.

## CHAPITRE IV

### A. — ÉLABORATION DES COUPES.

#### 1° *Au microtome à glissoir.*

Le bouchon ou le morceau de bois sur lequel le bloc celloïdine a été collé doit être, avons-nous vu, taillé de façon à pouvoir s'enchâsser facilement dans la pince du microtome. La pince ou l'étau porte-objet ne doit, dans la règle, saisir ou serrer que le bouchon seul, et non pas, comme cela se pratique quelquefois, le bloc. Le diamètre du bouchon sera donc toujours plus grand que celui du bloc. La pince doit saisir, autant que possible, le bouchon dans toute son étendue, ses  $\frac{2}{3}$  au moins, de façon à ce que le bloc entier ne vacille pas pendant que l'on coupe. Lorsque la lame arrive au niveau de la pince, on s'arrête, puis l'on ramène la vis micrométrique à zéro ; on place le bloc, c'est-à-dire le bouchon, de façon à ce que ce bloc dépasse la pince d'environ un bon travers de doigt, et l'on recommence à couper.

Pour les blocs celloïdins, la lame est vissée sur le plot, de façon à former avec la voie du glissoir un angle aussi aigu que possible; elle doit couper parallèlement à l'axe du glissoir. Les lames destinées aux blocs en question doivent être longues, peu inclinées et plutôt étroites. Pendant que l'on coupe, la lame doit être constamment mouillée avec de l'alcool à 60-70 0/0.

Nous recommandons l'appareil irrigateur de Bernard, qui laisse tomber automatiquement et goutte à goutte le liquide sur la lame. Dès qu'une coupe est faite, c'est-à-dire enlevée du couteau, mouiller également la surface de coupe, qui ne doit jamais rester longtemps exposée à l'air.

Voici la marche à suivre pour l'élaboration d'un bloc celloïdiné :

Fixer le bloc c'est-à-dire le bouchon dans la pince; lui donner la situation exacte qu'il doit occuper. Visser la lame sur le plot. Mettre au point, c'est-à-dire élever la pince ou l'appareil qui la porte au moyen de la vis micrométrique, jusqu'à ce que la surface de coupe soit à niveau de la lame. Pour les microtomes à plan incliné, tourner la vis à main, qui peut monter ou descendre le support de la pince. Serrer toutes les vis. Repousser le plot à l'extrémité du glissoir (loin de soi). Mouiller la surface de coupe (du bloc) et la lame.

Tirer le plot à soi; la main doit reposer sur le plot, jamais sur la lame. On tourne la manivelle lorsque la traction est mécanique (avec

la main droite, la main gauche est occupée à mouiller la lame quand on ne travaille pas avec l'irrigateur). Si la coupe s'enroule, se plisse, etc., s'arrêter et doucement, en s'aidant d'un pinceau, d'une aiguille à dissocier ou d'une pincette, l'étaler sur la lame. La traction doit être franche, égale ; elle ne doit pas traîner. Il faut éviter de soulever le plot en l'attirant à soi, les à-coups, les arrêts non motivés. La coupe faite, attirer le plot jusqu'au bout du glissoir. Enlever la coupe soit avec un ruban de papier (voir méthode des plaques de Weigert), soit au moyen d'un pinceau ou de pincettes, puis l'immerger dans de l'alcool ou de l'eau distillée, suivant la méthode de coloration à appliquer. Repousser le plot loin de soi, jusqu'au bout opposé du glissoir. Tourner la vis micrométrique d'un nombre déterminé de fractions de millimètre, d'où dépendra l'épaisseur d'une coupe. Les chiffres voulus sont gravés sur la roue de la vis micrométrique, qui, sur les microtomes modernes, se déclanche et tourne, c'est-à-dire fait monter la pince automatiquement, lorsque le plot est repoussé au bout de la voie de glissement. Mouiller la lame, la surface de coupe, tirer le plot à soi, et ainsi de suite. Lorsqu'on a fait le nombre voulu de coupes, enlever le bloc, enduire sa surface de celloïdine, fixer le bouchon sur le bouchon du flacon où on doit le plonger. Dévisser la lame, l'essuyer à fond, l'enfermer dans son étui. Essuyer le microtome, le couvrir. Traiter les coupes.

Les blocs paraffinés peuvent être taillés de façon à entrer dans la pince, ou bien on les agglutine au moyen de quelques gouttes de paraffine fondue sur une petite table qui remplace la pince ou qui s'enchâsse dans l'étau porte-objet. Nous recommandons pour ces blocs la table de la Station de Naples ou l'appareil-cadre de Reichert, notamment pour les microtomes à plan incliné. La lame doit être courte, épaisse, forte, assez inclinée; on la visse transversalement sur le plot, elle formera avec l'axe de la voie de glissement un angle droit. On coupe à sec; sauf cela, l'opération reste, en somme, la même. Les coupes provenant de pièces paraffinées ayant une grande tendance à s'enrouler sur la lame, il est souvent difficile de les dérouler sans les gâter. Cet enroulement dépend, du reste, aussi du plus ou moins de consistance de la paraffine. Pour empêcher cet enroulement, on se servira avec avantage du *Schnittstrecker* ou extenseur de coupes, dont nous avons parlé. Nous ne l'avons pas employé et nous croyons que, dans la plupart des cas, on peut le remplacer en retenant, au moyen d'une aiguille ou d'un pinceau, le bord de la coupe qui commence à s'enrouler.

*Bolles-Lee* et *Henneguy* (5) conseillent, pour rendre cet enroulement moins nuisible, de tailler le bloc paraffiné en prisme à arête aiguë, de façon à donner aux coupes la forme d'un triangle juste assez large à sa base pour contenir la section de la pièce, et dont la hauteur

ait au moins de 5-6 fois la longueur de la base. L'arête du prisme étant orientée vers le tranchant de la lame, on obtient des coupes enroulées dont les spires vont en s'élargissant du sommet à la base, la section de la pièce se trouvant dans la dernière spire qui est la plus ouverte. La coupe placée sur un porte-objet avec la dernière spire en bas, il suffira de chauffer légèrement pour que la partie contenant l'objet se déroule complètement.

L'emploi du microtome ordinaire à glissoir, à traction manuelle ou mécanique (manivelle), n'est possible que pour des blocs ou des pièces de volume restreint. Il n'est pas possible de faire avec ces instruments des coupes d'un cerveau de chat ou de chien; par conséquent, il ne saurait être question d'élaborer des coupes longitudinales ou transversales d'une moelle allongée humaine, à plus forte raison d'un lobe cérébral. Pour ces pièces qui excèdent de certaines dimensions, il faut avoir recours au microtome de Gudden, instrument trop peu connu encore et qui, en technique microscopique, rend les plus grands services, puisque seul il permet d'élaborer des coupes d'une venue du cerveau entier, longitudinales, transversales, obliques, qui sont d'une si grande utilité dans l'étude des centres nerveux.

### 2° *Au microtome de Gudden.*

La cuve du microtome doit être toujours

suffisamment pleine d'eau propre. De temps en temps la vider, la nettoyer à fond et la remplir à nouveau d'eau bouillie, refroidie et tamisée. Le couteau doit être complètement couvert par l'eau; il coupe, avons-nous dit, de haut en bas, en s'appuyant à droite contre la règle métallique placée diagonalement sur le fond de la cuve. Il doit être dirigé plutôt par les pouces de l'opérateur que par les mains, les autres doigts n'appuyant que légèrement sur le dos du couteau; le pouce gauche pousse la lame dans la direction du pouce droit; celui-ci reprend pendant que le premier revient en arrière; le pouce droit reprend alors sa position première, le pouce gauche pousse la lame, et ainsi de suite. Les pouces, en faisant avancer le couteau, ne doivent pas dépasser les limites de l'anneau, ce qui ferait basculer la lame. Lorsqu'on coupe, la lame doit passer sur toute l'étendue du champ de section et de l'anneau, que la pièce à couper occupe peu ou beaucoup de place dans le cylindre, sans s'arrêter en chemin, sans à-coups, sans mouvements de bascule, ce qui se traduirait sur une coupe par des gradins, des rayures, des fentes transversales. Se rappeler ce principe : une place donnée du couteau doit toujours correspondre à une même place donnée de la pièce (8). La direction que doit toujours occuper le couteau lorsqu'on coupe sera parallèle au bord de la cuve. Quand, pour une cause ou pour une autre, on est obligé de s'arrêter, on reposera le couteau très à plat soit sur le

rebord de l'anneau, soit sur le fond de la cuve ; il ne doit jamais reposer à faux.

Voici les différents temps de l'opération : la lame est placée par son milieu en travers de l'anneau : 1° avec la main gauche, remonter la lame sur le rebord de l'anneau, en haut <sup>1</sup> (loin de soi), et l'y maintenir fixé, l'extrémité droite du couteau (de la lame) s'appuyant contre la règle métallique diagonale ; 2° avec la main droite, tourner la roue (la vis micrométrique) de gauche à droite d'un nombre donné de dentelures ou de fractions de dentelure ; 3° placer les deux pouces sur la lame, sur l'anneau ; 4° pousser la lame de gauche à droite en ramenant, au fur et à mesure de la marche (à droite et en bas), les pouces le long de la lame et toujours sur l'espace occupé par l'anneau ; 5° faire parcourir à la lame toute la surface de coupe et toute la surface de l'anneau ; 6° la coupe faite se met à flotter sur l'eau ; 7° ramener le couteau à sa position première (tout en haut de l'anneau), l'y faire reposer bien d'aplomb ; 8° des deux mains pêcher la coupe ; 9° saisir le couteau de la main gauche ; 10° de la main droite, tourner la roue, et ainsi de suite. Pendant qu'on coupe, prendre un bon point d'appui avec les avant-bras sur les supports triangulaires fichés du côté de l'opérateur sur les angles de la cuve, les pieds sur la barre

1. En haut et en bas de l'anneau, par rapport au rebord de la cuve qui se trouve du côté de l'opérateur (loin de soi et contre soi).



qui relie l'armature de la machine, à environ 5 centimètres du sol. Avant-bras nus ; endosser un tablier ; il ne faut pas employer de la force, mais de la légèreté de main et de la sûreté dans les mouvements.

La masse d'inclusion se met quelquefois à vaciller ; il faut alors sortir la masse, l'entailler sur les côtés, la placer de nouveau dans le cylindre et verser dans les espaces ainsi formés entre le cylindre et le bloc une quantité voulue de masse fluide. On peut remédier parfois à ce vacillement en déchaussant la pièce sur tout son pourtour et en garnissant l'espace libre, aussi profondément que possible, avec un mélange, fait à chaud, de térébenthine et de cire. La pièce seule se met à vaciller quelquefois, sans que la masse participe à ce mouvement de bascule ; cela provient le plus souvent d'un état de durcissement incomplet : la pièce est trop élastique. D'autres fois, ce vacillement est dû à des vides qui se sont produits pendant le refroidissement de la masse, autour de la pièce et surtout aux parties déclives de la pièce. On s'en aperçoit moins à des rayures sur les coupes qu'à des inégalités d'épaisseur, qui s'accroissent encore lorsqu'on croit remédier à la complication en faisant des coupes plus épaisses. Ici encore, ce qu'il y a de mieux à faire, c'est de sortir le bloc, de vérifier l'état de la masse et de remplir les vides avec de la masse fluide, ou bien encore d'enlever toute la masse d'inclusion, dégager soigneusement la pièce et l'inclure à nouveau. Les pièces desti-

nées au microtome de Gudden doivent être bien durcies; le liquide d'inclusion sera chaud à point pour éviter un retrait trop considérable de la masse dans le cylindre, car, plus le liquide sera refroidi, plus l'espace de retrait entre la masse et le cylindre sera grand.

Il arrive que, la lame ayant passé sur toute l'étendue de la pièce, la coupe ne se détache pas. Il faut alors placer le couteau dans la première position et, au moyen de pincettes, d'aiguilles à dissocier, du scalpel, séparer la coupe de la pièce ou du collet de stéarine qui l'empêche de flotter. Lorsqu'on s'aperçoit qu'un fragment d'épendyme ou de vaisseau sanguin, placé sous la lame, se laisse entraîner le plus souvent sous la coupe en élaboration, il faut remonter le couteau d'un peu, enlever l'obstacle ou, si cela n'est pas possible, faire des mouvements de va-et-vient avec la lame, scier, puis donner un coup brusque en avant; cela suffit d'ordinaire pour surmonter l'obstacle (27). Il faut tenir les lames très propres. Avec le microtome, *Katsch* fournit deux lames, l'une grande pour le microtome grand modèle, l'autre plus courte correspondant au diamètre des anneaux du petit modèle. Dès qu'on a fini de couper, essuyer la lame très à fond, sans froter ou en érailler le tranchant.

Lorsqu'une coupe est faite, elle se met, dans la règle, à flotter sur l'eau. Au moyen d'un morceau de papier, mais de préférence avec un morceau d'une toile métallique, d'un treillis

fin (cuivre), coupé au prorata de la grandeur des coupes et de telle sorte que ce morceau de treillis ait la largeur du récipient dans lequel la coupe devra être transportée, on pêche la coupe sur l'eau, la main gauche fixant la coupe sur le treillis, en ayant soin de laisser la coupe s'étaler lentement et complètement, à mesure qu'on sort le tout de l'eau, sur cette espèce de filet. Dès qu'elle est sortie, on immerge la coupe dans un bain d'eau distillée, en veillant à ce que, en retirant le treillis du récipient où la coupe vient de s'étaler, on n'endommage pas la coupe.

Ce qui vient d'être dit concerne les coupes petites ou moyennes. S'agit-il d'élaborer et de manipuler des coupes du cerveau entier, on ne peut pas songer à sortir la coupe de l'eau pour la transporter dans un récipient. Il faut ici plonger la plaque de verre qui fera porte-objet dans l'eau de la cuve, la glisser délicatement sous la coupe, qui, à cause de ses dimensions, ne surnage, en général, qu'à moitié, et chercher à l'y étaler convenablement sans plis, sans froissures, puis sortir le tout, en fixant la coupe sur le verre, au moment où l'on sortira l'objet de l'eau, au moyen d'un manche à aiguille, d'un piquant, etc., de façon à l'empêcher de glisser. Pour cela, on peut aussi employer une assiette plate, de grand diamètre, dans laquelle, une fois la coupe recueillie, on versera, avec les précautions voulues, au fur et à mesure des besoins, les liquides nécessaires, eau, couleur, alcool, etc. A-t-on sorti la coupe

sur une plaque de verre, celle-ci passe dans une assiette où l'on aura préalablement préparé le bain d'eau distillée. Pour ces grandes coupes du cerveau, il faut énormément de patience et une grande sûreté de main.

Les récipients, cupules, auges, etc., dans lesquels les coupes faites doivent être recueillies, se numérotent de gauche à droite. Sur un plateau, la première coupe occupera la première place à gauche en haut, la seconde sera placée à la droite de la première, et ainsi de suite.

La coupe faite doit être immergée dans l'eau et non pas flotter sur le liquide ; chaque récipient doit être couvert.

#### B. — MANIPULATIONS SUBSÉQUENTES DES COUPES.

Que la coupe provienne d'un bloc ou d'une pièce simplement collée sur un bouchon, qu'elle ait été faite dans le microtome de Gudden ou au moyen d'un microtome ordinaire, la première chose à faire après son élaboration est de la laver à l'eau distillée (ou à un alcool donné suivant la méthode de coloration employée).

La durée de ce bain est variable ; dans la plupart des cas elle comportera le laps de temps nécessaire pour achever l'élaboration des autres coupes d'une séance et pour préparer le traitement subséquent des coupes. L'essentiel est que la coupe faite sous l'eau s'y débarrasse entièrement des impuretés qui pour-

raient y être fixées et que, pour celle qui provient d'une pièce traitée à l'alcool, les éléments nerveux qui dans ce liquide ont souffert d'un ratatinement, d'un retrait plus ou moins accentué, s'y distendent et se gonflent de façon à reprendre leur volume normal. Ce mouvement d'expansion des éléments nerveux, des cellules surtout, est nécessaire pour obtenir une coloration fixe.

Comme exemple des manipulations à faire subir à une coupe, nous allons décrire le traitement nécessaire pour colorer une coupe faite sous l'eau, au carmin ammoniacque. La technique reste à très peu de chose près la même que pour les coupes provenant de blocs et élaborées au microtome à glissoir. La manière de procéder est la même pour les différents modes de coloration.

Tout d'abord, on peut distinguer deux modes principaux dans la manipulation des coupes : on peut laisser la coupe dans le récipient qui la contient, l'arroser, c'est-à-dire remplir le récipient d'un liquide donné, le vider, le remplir de nouveau, et ainsi de suite ; ou bien on peut sortir à chaque fois la coupe d'un bain pour la transporter dans un autre, soit au moyen d'un morceau de papier, soit avec une spatule, ou une pince si la coupe est celloïdine. Pour la coloration des cellules et des cylindraxes, en outre pour le traitement général des coupes élaborées sous l'eau dans le microtome de Gudden, le premier mode de faire nous paraît plus recommandable ; pour

des feuillets collodionnés, pour les coupes de blocs celloïdins, en outre pour les colorations des gaines de myéline, le second est préférable. Pour les grandes coupes du cerveau entier, tous les bains doivent se donner successivement dans la même assiette, en ayant soin de ne jamais verser le liquide *sur* la coupe ou dans son voisinage immédiat, ce qui provoquerait des plissements irréparables, mais sur les parois du récipient, de façon à ce que le liquide ne pénètre que graduellement, lentement, dans l'espace occupé par la coupe et ne l'immerge qu'insensiblement. C'est une règle applicable, au reste, pour toutes les coupes, grandes ou petites.

Nous avons rangé sur un plateau autant d'auges ou de cupules que nous aurons de coupes à traiter ; chaque auge est remplie convenablement d'eau distillée, chaque récipient est couvert d'une plaque de verre. La première coupe que nous traiterons passe dans l'auge qui se trouve à gauche en haut sur le plateau, la seconde à la droite de la première, et ainsi de suite. On numérotera, dans toutes les manipulations techniques, toujours de gauche à droite. La quantité de coupes voulue, c'est-à-dire prévue pour la séance est-elle obtenue, on essuie la lame et le microtome, on recouvre l'instrument et on commence à préparer le bain colorant. Cela fait, on découvre les récipients contenant les coupes ; on commence par la première à gauche ; de la main gauche on l'incline et, si la coupe n'adhère pas seule

au fond du récipient, on l'y fixe au moyen d'un instrument piquant, aiguille, etc., pour l'empêcher de s'échapper avec le liquide ; on verse l'eau. Pour ce premier bain, nous nous servons, par raison d'économie, d'eau distillée, filtrée à chaque fois après le premier lavage en question. On retourne l'auge et on laisse égoutter ; on opère de même pour les autres coupes. Toutes les auges vidées, on essuie chacun de ces récipients, de façon à ce que les parois et le fond de l'auge soient parfaitement secs ; attention à ne pas détériorer la coupe. On verse successivement dans chaque récipient la quantité voulue de couleur. La coupe ne doit pas flotter sur la solution, elle doit immerger complètement dans le liquide colorant.

La durée du bain colorant varie suivant la nature de la pièce, l'épaisseur de la coupe, le titre de la solution colorante et la température ambiante. De certaines pièces acceptent mieux la couleur ou telle couleur, que d'autres ; c'est affaire d'un essai pour chaque nouvelle pièce, pour chaque nouvelle méthode colorante au début de chaque nouvelle série. Les coupes minces séjourneront plus longtemps dans un bain colorant que celles qui sont plus épaisses. L'étendue, le diamètre d'une coupe, n'y sont pour rien. Les solutions faibles colorent, en général, plus également, plus exactement les éléments nerveux que les solutions fortes. Il vaut infiniment mieux, toutes choses égales d'ailleurs, laisser une coupe pendant un temps plus long dans une solution diluée, qu'un

temps moins long dans une solution concentrée. La durée de ce bain est prescrite par chaque méthode de coloration, et le titre des solutions est toujours exactement formulé. Le plus souvent, avec l'emploi d'une solution faible ou moyenne, la durée d'un bain colorant est de 12-18-24 heures. Les traités préconisent, en général, les méthodes et les colorations rapides, comme s'il s'agissait avant tout de teindre une coupe, et beaucoup moins de la coloration exacte des éléments nerveux. Cette coloration, pour être bonne, doit se faire lentement, progressivement ; le lavage décolorant, la différenciation, se font ensuite dans de meilleures conditions. Les coupes contenant la couleur, c'est-à-dire les coupes en traitement, ne seront jamais exposées à la pleine lumière solaire. Nous avons l'habitude de baisser les stores du laboratoire pendant la durée des manipulations. Les colorations en vue des cellules nerveuses avec leurs prolongements donnent, en général, des résultats plus satisfaisants, lorsque les coupes ou les pièces n'ont pas subi le contact de l'alcool. Faisons remarquer ici que les coupes qui ont séjourné dans l'alcool ou qui proviennent de pièces plus ou moins imbibées d'alcool, et qu'on immerge à un moment donné dans de l'eau distillée ou dans une solution aqueuse, présentent alors des mouvements rotatoires de diffusion, très prononcés, et quelquefois si énergiques que la coupe en tournant peut se détériorer, se fissurer, etc., lorsqu'elle est très mince, ou s'émietter, lors-



qu'elle est épaisse. Il faut alors immerger les coupes rapidement et, pendant les premiers instants du bain, la tenir délicatement sous le liquide, au moyen d'une baguette de verre, etc. ; de même lorsque les coupes flottent sur le liquide sans immerger tout à fait. Les coupes dont nous parlons séjourneront le moins de temps possible dans un liquide aqueux ; il en sera de même pour les coupes provenant de blocs paraffinés.

Le bain de couleur donné, on vide successivement les auges, on les essuie soigneusement chacune après les avoir retournées sur le plateau, pour qu'elles aient pu s'égoutter. Les auges propres et sèches, on donne le bain décolorant, ou fixatif, ou de différenciation, en versant dans chaque auge la quantité suffisante du liquide à employer. Il est bon de remuer l'eau de ce bain, de la battre délicatement avec une baguette de verre, de façon à activer le travail de décoloration et à répartir plus également dans le liquide les particules de couleur qui sont rendues par la coupe. Au bout d'un instant, on change l'eau ou le liquide décolorant en employant les mêmes précautions.

Lorsque la coupe ne rend plus de couleur, on verse le bain décolorant, on sèche l'auge et on donne le bain prévu par la méthode, en général celui de réduction ou de différenciation. Le bain décolorant a une durée qui varie également suivant la nature de la pièce, l'épaisseur de la coupe, le titre du liquide

colorant et le degré de décoloration à atteindre. Pour les coupes colorées au carmin, par exemple, il durera environ 1-1 1/4-2 heures, et, dans la règle, tant que la coupe rendra encore de la couleur.

Les récipients seront couverts. Pendant ce bain ou pendant un second lavage à l'eau, ou bien pendant un bain qui suivra l'immersion dans le liquide de différenciation, toutes choses que nous donnons de préférence dans un récipient plus grand, une soucoupe, par exemple, on placera la coupe sur le porte-objet. Quand on a à placer plusieurs coupes sur le même porte-objet, on place la première en rang à gauche sur le premier rang, la suivante à droite de la première, et ainsi de suite, en numérotant également sur les porte-objets toujours de gauche à droite. Les premières coupes placées, le premier rang par exemple au complet, on incline le porte-objet de façon à ce que les coupes déjà placées soient hors de l'eau, et on place les suivantes, en ne laissant tremper dans l'eau que la partie du porte-objet sur laquelle d'autres coupes doivent trouver place. Là ou les coupes convenablement placées, on essuiera soigneusement le porte-objet tout autour des coupes et on transportera le tout dans le bain de déshydratation (alcool absolu). Pour entrer le porte-objet dans le bain, on l'incline de façon à le faire pénétrer à moitié de pointe dans le liquide et, au besoin, en fixant la coupe pour l'empêcher de glisser. Les coupes doivent être

complètement recouvertes par l'alcool. La grande auge carrée dans laquelle ces bains se donnent sera tenue couverte. La durée moyenne de ce bain est d'environ 20-30 minutes pour des coupes de moyenne épaisseur et de moyenne étendue. Les coupes épaisses et celles de grandes dimensions y resteront plus longtemps que celles qui sont petites et minces. Pour de certaines coupes très délicates, il est prudent de commencer le bain de déshydratation par un liquide plus dense et de donner successivement des bains d'alcool à 80-90-95 0/0, pour finir par l'alcool absolu. Les coupes celloïdines et les pellicules de Weigert contenant des coupes provenant de blocs celloïdins seront déshydratées dans de l'alcool à 95 ou 96 0/0.

La déshydratation doit être complète; lorsqu'elle ne l'a pas été, on aperçoit, pendant l'acte de l'éclaircissement, des taches caractéristiques sur la coupe et qui ne disparaissent plus. Pour sortir le porte-objet de la cuve à alcool, il faut l'incliner de façon à ce que la partie du porte-objet qui contient ou porte les coupes sorte la première; on fixe la ou les coupes au fur et à mesure qu'elles sortent, de façon à les empêcher de glisser. Dès qu'un porte-objet est sorti, il faut tout d'abord recouvrir la cuve, puis laisser égoutter un moment, en tenant le porte-objet à plat ou très légèrement incliné; on essuie rapidement le pourtour du porte-objet, on le place très à plat sur la table de travail et on recouvre la

coupe (avec un pinceau) d'une quantité suffisante de liquide éclaircissant, le plus souvent d'essence de girofle (*Oleum caryophyllae-Nelkenoel*). Il faut que cet acte soit accompli rapidement, car, au sortir du bain de déshydratisation, les coupes sèchent très vite; or, pour si peu qu'elles le soient, des coupes sèches ne valent plus rien. La coupe doit reluire d'humidité; il faut donc veiller à ce que le luisant caractéristique se maintienne intact jusqu'au moment de la lubrification par l'essence. A ce moment, on peut placer le porte-objet pour un instant de côté et procéder au même traitement des autres coupes. Un instant après l'avoir recouverte d'essence, la coupe se met à flotter sur la couche de liquide. La transparence ne s'en obtient pas moins si on la laisse telle quelle; cependant, il vaut mieux l'immerger complètement sous l'essence, c'est-à-dire dans la quantité nécessaire de l'agent éclaircissant (essence de girofle, créosote, térébenthine, xylol, huile d'origan, etc., etc.). Pour cela, patiemment et délicatement on étale une goutte ou deux de liquide sur la coupe, et doucement on finit par l'immerger tout à fait. Au moment où l'essence de girofle est étendue sur la surface d'une coupe encore tout humide d'alcool, il se produit un trouble opalescent, qui disparaît insensiblement et que beaucoup de débutants envisagent à tort comme un phénomène anormal. Le trouble provient du mélange de l'essence et de l'alcool; ce dernier est insensiblement résorbé complè-

tement et la coupe, progressivement pénétrée par le liquide plus dense, passe ainsi graduellement à l'état de transparence. Les agents éclaircissants à action lente, comme ceux que nous venons de citer, sont ceux qui conviennent le mieux pour les coupes du S. N. C. Au reste, chaque méthode indique l'agent éclaircissant à employer. La transparence s'obtient plus ou moins promptement. C'est un acte à contrôler au microscope à dissection de Nachet. Lorsqu'elle est obtenue, on peut monter de suite, mais nous estimons qu'il est préférable de laisser la coupe s'imprégner encore pendant quelque temps et de parachever la transparence de tous les tissus. Placer les porte-objets très à plat; éviter le soleil. Lorsque la transparence est complète, on incline le porte-objet au-dessus de la cupule à essence et, tout en empêchant les coupes de glisser de la place qu'on leur a assignée, on laisse égoutter. On pose ensuite le porte-objet sur un plan incliné, de manière à ce que les dernières gouttes d'essence glissent le long du verre; on essuie soigneusement le porte-objet et l'on monte. On a conseillé de sécher la coupe en appliquant sur le porte-objet un morceau de papier Josèphe, qui absorberait toute trace d'essence. Nous proscrivons ce moyen. Le papier laisse sur la coupe des fils qui gênent l'examen et qui peuvent donner lieu à des erreurs d'interprétation. Pour les coupes éclaircies à l'essence de girofle, on peut traiter par le xylol (5-10 minutes), égoutter et monter. C'est un

surcroît de travail qui n'est pas absolument nécessaire et dont on se passera quand on aura des centaines de coupes à traiter dans une série. Pour monter, placer le porte-objet devant soi sur la table de travail, verser une goutte ou la quantité jugée suffisante de baume ou de résine sur le milieu de la coupe, et laisser ce liquide s'y étaler convenablement. Pour placer le couvre-objet, tenir ce dernier de la main gauche, prendre un point d'appui sur les avant-bras, soutenir de la main droite au moyen d'une aiguille à dissocier le couvre-objet, l'abaisser insensiblement et l'appliquer par son côté gauche sur le porte-objet, en calculant l'espace qu'il aura à recouvrir, de façon à ce que, en continuant à l'abaisser tout en le soutenant toujours avec la pointe de l'aiguille, il arrive à couvrir la coupe, le centre de celle-ci correspondant au milieu du couvre-objet. Pour de petites coupes, verser une goutte de baume sur le couvre-objet, retourner celui-ci et l'appliquer très à plat, en le tenant entre le pouce et l'index ou dans les mors d'une pince courbée, sur la coupe. Au moment où le couvre-objet s'étale sur une coupe, il se produit un mouvement de glissement dans un sens ou dans l'autre. Prévenir ce mouvement en appliquant un ongle de la main gauche et la pointe de l'aiguille tenue de la main droite sur le porte-objet et contre les bords du couvre-objet, pour maintenir celui-ci en place. Placer la préparation très à plat dans un lieu sec.

Pendant le cours des manipulations qui viennent d'être énumérées, il faut contrôler les résultats des différents actes, et surtout au début d'une série; c'est ici que le microscope à dissection de Nachet rendra de grands services, car on peut transporter sur la platine de cet instrument une auge, une cupule, etc., contenant une coupe en traitement, sans craindre de détériorer un objectif, si pour cela il avait fallu se servir d'un microscope proprement dit. En examinant ainsi une coupe après un lavage, ou dans le bain décolorant ou de différenciation, etc., on peut constater si l'opération se fait convenablement ou quelles sont les fautes à éviter dans la suite.

Relativement aux solutions colorantes, nous recommandons de placer sur chaque flacon un entonnoir muni d'un filtre, et de verser au fur et à mesure sur ce filtre la quantité de couleur qui aura servi pour un bain. La plupart de ces solutions se bonifient par un filtrage répété, et elles peuvent ainsi être employées très longtemps à l'état de pureté complète. Il en est qui se bonifient en vieillissant, comme la solution au carmin-ammoniaque, par exemple. Hors des phases de travail, les flacons seront bouchés. Chaque flacon sera étiqueté. Il est bon de tenir les solutions colorantes à l'abri d'une lumière trop vive. Il ne faut pas agiter un flacon sans le filtrer ensuite.

Relativement aux liquides décolorants, nous ferons observer qu'il ne faut pas laisser une coupe immergée, tout au moins longtemps

immergée, dans un bain décolorant ou d'eau distillée sans agiter le liquide avec une baguette de verre, le manche d'une aiguille à dissocier, etc.; il se forme souvent des dépôts de particules colorantes microscopiques durant cet acte sur la coupe, dépôts qui ne sont naturellement pas reconnaissables à l'œil nu et qui, à un moment donné, encrassent plus ou moins la préparation; en agitant le liquide, sans pour cela que les vagues provoquées dans le récipient soient trop fortes et que la coupe puisse en souffrir, on établit ainsi des courants qui entraînent les particules et qui contribueront à rendre l'image plus nette. Ce battage de l'eau doit se faire principalement un instant avant de sortir la coupe du liquide décolorant. Les coupes sont d'ordinaire toujours assez colorées; le plus souvent même, elles le sont trop. Ce qui manque, c'est le lavage soigneux, le bain décolorant minutieusement donné. Cet acte est, nous le répétons, très important; c'est là souvent que gît le secret des belles préparations du S. N. C. Il faut donc lui vouer tous ses soins et en contrôler les effets sur les coupes en traitement.

Relativement aux récipients dont on se sert, auges à oiseaux, cupules, soucoupes, assiettes, etc., aux linges qu'on emploie pour les essuyer, aux doigts de l'opérateur, nous ne saurions trop recommander la plus rigoureuse propreté. Après chaque manipulation, tout ce qui a servi doit être lavé et essuyé à fond, puis rincé à l'eau chaude ou avec un mélange d'eau



et d'alcool. Dans la règle, n'employer, comme instruments auxiliaires, que ceux qui sont de bois ou de verre (manches d'aiguilles à dissocier, manche d'un scalpel, piquant de porc-épic, spatule en platine, etc.), telle solution s'altérant au contact d'un métal, et les coupes en traitement pouvant se tacher irrémissiblement sous l'influence des combinaisons que les métaux (le platine excepté) font naître en présence de certains acides ou de certains réactifs.

Relativement au bain de déshydratisation, une remarque dont on ne tient pas suffisamment compte, en général : Avant le bain, il faut essuyer à fond le porte-objet qui vient de sortir d'un liquide aqueux (sans détériorer la coupe !). Si l'on n'y prenait garde, l'eau qui resterait fixée sur le verre diluerait à la longue l'alcool, et celui-ci ne remplirait alors plus sa tâche de déshydratisation ; au bout d'un certain temps, ce ne serait plus de l'alcool absolu, mais plus ou moins étendu, et, sans se douter de la cause d'une déshydratisation insuffisante, incomplète, on irait au-devant de mécomptes subséquents. Certaines coupes, ou plutôt certaines parties de coupes, comme la capsule interne, les franges du cervelet, etc., se plissent plus ou moins dans le bain d'alcool et peuvent alors faire croire à quelque complication ; il n'en est rien cependant, mais ces coupes nécessitent une plus grande quantité d'essence pour l'éclaircissement et un couvre-objet plus épais, plus lourd, pour que, sous l'action de la

pression que le verre exercera sur la coupe, les parties plissées s'étalent convenablement.

Relativement à l'essence de girofle, qui est l'agent éclaircissant par excellence et dont l'emploi est d'une grande simplicité, il faut avoir soin de la filtrer de temps en temps ; lorsqu'elle jaunit trop, il sera prudent de la remplacer par de l'essence fraîche.

Relativement au baume de Canada, nous recommandons de le tenir fluide à point ; s'il s'épaissit, il se répartira inégalement sur la coupe ; il modifie alors aussi l'optique et sèche mal. On le dilue en y ajoutant quelques gouttes de chloroforme ; après avoir remué le mélange avec une baguette de verre, on laisse reposer avant de s'en servir, jusqu'à ce que toutes les bulles d'air se soient dissipées. Le baume de Canada doit avoir une consistance sirupeuse et être toujours frais, c'est-à-dire peu coloré.

Les plaques collodionnées selon Weigert passent, après leur élaboration, dans le bain colorant, où le feuillet collodionné, c'est-à-dire la pellicule, se détache aussitôt. Dès ce moment, la pellicule est traitée, en somme, comme une coupe isolée ; ou bien aussi on peut découper les différentes coupes prises dans la pellicule et traiter chacune d'elles à part. Découper alors les coupes sous l'eau avec des ciseaux. Ces coupes ne sont pas éclaircies à l'essence de girofle, mais au carbol-xylol (Voyez méthode de *Weigert*).

On peut les monter au Canada. Le bain de déshydratation sera donné avec de l'alcool à

95-96 0/0. Pour les coupes provenant de plaques à la photoxyline, voir système d'*Obregia*; et pour celles traitées en séries suivant le système des feuillets de papier, voir système de *Strasser*.

Ce qui précède s'applique aussi bien aux coupes faites sous l'eau dans le microtome de Gudden qu'à celles provenant de blocs celloïdés et élaborées au moyen d'un microtome ordinaire à glissoir. Les coupes celloïdées seront de préférence transportées d'un bain dans un autre bain; elles resteront plus longtemps dans le liquide décolorant ou de différenciation, plus longtemps aussi dans un bain de lavage que les coupes non celloïdées, et elles seront déshydratées dans de l'alcool à 96 0/0.

Le bain d'alcool absolu, si la méthode colorante en prévoit un, sera de courte durée. Pour l'éclaircissement, préférer le carbol-xylol de Weigert ou l'huile d'origan. Lorsqu'on colore avec des couleurs d'aniline, il faut avoir soin d'enlever tout autour de la pièce enrobée autant de celloïdine que faire se pourra, cette substance s'imbibant outre mesure de couleur, ce qui, dans la suite, complique le traitement.

Les coupes provenant de pièces paraffinées sont d'ordinaire trop friables pour supporter impunément, sans préparation spéciale, les manipulations que nous venons de mentionner. En outre, pour que la couleur puisse prendre convenablement sur les éléments nerveux, il faut que la paraffine dont les coupes sont

imprégnées disparaisse de l'intimité des tissus nerveux. Pour cela, on a proposé différents moyens en vue de fixer la coupe paraffinée sur le porte-objet, avant de la soumettre au traitement colorant subséquent.

On peut étendre sur le porte-objet destiné à recevoir la coupe une mince couche du mélange suivant :

Collodion.....	1 partie.
Essence de girofle.....	2 parties.

Après avoir appliqué et étalé la coupe sur cette couche, on porte le tout à l'étuve et on l'y laisse pour 5-10 minutes à une température constante de 60° C. De là, le porte-objet passe dans un bain de xylol jusqu'à solution complète de la paraffine. Cela obtenu, on donne un bain d'alcool à 96 0/0. La coupe passe ensuite par la série réglementaire des bains d'eau distillée, bain de couleur, lavage, différenciation, alcool, xylol et Canada.

Ou bien on peut fixer la coupe paraffinée de la manière suivante :

Préparer une certaine quantité d'eau albuminée (du blanc d'œuf battu dans de l'eau jusqu'à formation d'une mousse caractéristique). Puis mélanger :

Eau albuminée .....	} à 1 volume.
Glycérine.....	

Filtrer. On étend une couche mince de ce liquide sur le porte-objet. Y placer la coupe,

transporter le tout à l'étuve à une température constante de 60° C. Le mélange s'y durcit et la coupe reste collée sur la couche étendue tout d'abord sur le porte-objet. Traitement subséquent ordinaire.

Ou bien encore on étend, au moyen d'une baguette de verre, une couche très mince d'une solution concentrée de colle-forte dans de l'alcool, sur le porte-objet préalablement tiédi (légèrement chauffé sur une lampe à alcool). On applique la coupe sur cette couche. On place le tout sur les rebords d'un récipient quelconque, auge à oiseaux, cupule, petit bocal, au fond duquel on aura versé quelques gouttes d'éther sulfurique. On expose l'objet aux vapeurs de ce liquide pendant quelques minutes, puis on place le porte-objet dans l'étuve à une température constante de 60° C. Bain de xylol, alcool et traitement subséquent comme plus haut.

*Neelsen* (71) propose le moyen suivant; préparer la solution que voici :

D'une solution à parties égales de sucre candi et d'eau.	}	āā 30 c. cubes.
D'une solution de dextrine dans de l'eau : à 1/2.....		
Glycérine.....	5	—
Alcool à 90 0/0.....	10	—

Étendre une mince couche de ce liquide sur le porte-objet. Y appliquer et y étaler alors la ou les coupes. Transporter le tout à l'étuve pour 20 minutes. Cela fait, donner un bain de

xylool jusqu'à solution de la paraffine. Bain d'alcool absolu. Dans ce bain, le mélange dextriné (l'alcool s'est déjà évaporé dans l'étuve) se durcit complètement; mais il se dissout dans l'eau; les coupes qui devront être colorées dans une solution aqueuse seront donc fixées sur le porte-objet suivant un autre procédé que celui-ci, et de préférence avec le mélange de collodion et d'essence de girofle.

Ou bien encore : recouvrir la coupe fixée sur le porte-objet au moyen de la solution dextrinée après le bain d'alcool (qui lui-même fait suite au bain de xylool), d'une couche très mince d'une solution de photoxylline :

Photoxylline .. . . . . .	45 parties.
Alcool absolu .. . . . . .	100 —
Éther sulfurique .. . . . . .	500 —

Après avoir étendu une mince couche de ce liquide sur la coupe, on laisse sécher à l'air jusqu'à prise complète de la pellicule. Lorsqu'on transporte alors le porte-objet dans de l'eau ou un liquide aqueux, le mélange dextriné se dissout et la coupe reste agglutinée sur la pellicule de photoxylline. On n'a qu'à détacher celle-ci de dessus le porte-objet pour la traiter ultérieurement comme une coupe ordinaire.

Il faut éviter l'alcool absolu, dans lequel la photoxylline se dissout. Ce procédé convient pour les colorations à l'hématoxyline et au carmin, mais pas ou mal pour les colorations aux couleurs d'aniline.

Pour les coupes de petites pièces durcies au

sublimé corrosif (Voir l'article *Durcissement*) et enrobées à la paraffine suivant un procédé spécial (Voir l'article *Enrobement à la paraffine*), nous produisons ici<sup>1</sup> une méthode aussi simple qu'ingénieuse, inédite encore, inventée par *Wlassak*, pour fixer les coupes paraffinées sur le porte-objet; nous avons pu en admirer les résultats au laboratoire de physiologie de Zurich.

Pendant que la coupe enlevée au petit bloc paraffiné repose encore sur la lame du microtome, on dépose une goutte d'eau distillée, préalablement chauffée, sur le porte-objet à la place que devra occuper la coupe. Au moyen du pinceau humecté d'eau distillée chaude on enlève la coupe de dessus la lame du couteau et on la place sur la goutte d'eau chaude qui se trouve sur le porte-objet, préalablement tiédi; on expose le tout, sur les parois ou le rebord d'un récipient quelconque contenant de l'eau distillée bouillante (le récipient est placé lui-même sur un trépied et au-dessus d'une flamme de gaz ou d'alcool), aux vapeurs de cette eau distillée en ébullition. La coupe s'étale alors très rapidement sur le porte-objet; cela fait, on transporte le porte-objet, inclus dans une boîte en fer-blanc, dans l'étuve; après quoi on traite la coupe, c'est-à-dire le porte-objet, suivant les règles prescrites pour les coupes paraffinées, xylol, alcool, etc., etc. Ce procédé peut s'appliquer aux coupes

1. Avec l'autorisation de M. *Wlassak*, premier assistant de l'Institut physiologique de Zurich.

d'un diamètre correspondant à celui de la moelle allongée d'un chat, d'un oiseau, etc.; les résultats immédiats qu'il produit sont parfaits.

### C. — SYSTÈME DES COUPES EN SÉRIES.

#### 1° *Système des plaques en séries de Weigert (20)*•

Pour simplifier la manipulation des coupes et pour permettre une coloration parfaitement uniforme d'une suite de coupes provenant de la même pièce ou d'une succession de coupes de pièces différentes, Weigert a imaginé le procédé de plaques ou de pellicules collodionnées, par séries non interrompues qui, en technique, est désigné couramment par le nom de l'auteur. Ce procédé peut s'appliquer à toute espèce de coupes, qu'elles proviennent de pièces enrobées à la celloïdine ou non.

Il se décompose en une série d'actes distincts que nous énumérons dans l'ordre de leur préparation; la synthèse du système s'en dégage sans qu'il soit nécessaire d'entrer dans trop de détails complémentaires.

a. *Préparation des plaques.* — On choisit des plaques de verre dont les dimensions varient suivant le but auquel elles sont destinées, c'est-à-dire le nombre des coupes qu'on a l'intention de traiter sur une plaque ou la grandeur des coupes en cause.

Pour les grandes coupes, on prendra des plaques de verre correspondant, par exemple,



à celles dont on se sert en bactériologie pour les cultures; pour les coupes moyennes, des plaques mesurant environ 4 sur 15 centimètres, etc. Pour les petites coupes, on peut se servir de porte-objets ordinaires. Après avoir soigneusement lavé et essuyé une plaque de verre, on la recouvre d'une mince couche de collodion; pour cela faire, étendez sur le milieu de la plaque une certaine quantité de collodion, comme le font les photographes lorsqu'ils préparent leurs plaques humides. Tenez la plaque très horizontalement par un de ses coins, imprimez-lui des mouvements de bascule, de façon à ce que le liquide s'étende dans tous les sens, sans déborder cependant; puis laissez égoutter la plaque par un de ses angles sur le flacon de collodion. On s'y fait vite.

Cela exécuté, dressez la plaque pour la faire sécher, ce qui s'obtient rapidement. On peut préparer ainsi une plaque immédiatement avant de s'en servir, c'est-à-dire de se mettre à couper, ou bien faire une provision de plaques sèches que l'on conservera alors à l'abri de la lumière, les plaques tenues droites et non pas posées horizontalement dans une boîte.

b. *Préparation des coupes en séries.* — Au lieu d'enlever de dessus la lame du microtome la coupe qui vient d'être faite, au moyen d'une épingle, d'une pincette ou d'un pinceau, on la cueille au moyen d'une bande de papier; ce papier doit être assez buvard pour s'imbiber facilement d'alcool; il doit être

transparent quand il est ainsi mouillé par l'alcool, et cependant il doit être assez résistant pour supporter, étant mouillé, une certaine traction exercée sur lui, sans se rompre; pas de papier buvard ordinaire, mais du papier-closet (*closet-paper* des Anglais) dont on se sert dans les laboratoires d'anatomie pathologique. On coupe ce papier en bandelettes. Chaque bandelette doit être deux fois plus large que la coupe qu'elle doit enlever.

La coupe repose donc sur la lame. On tient la bandelette légèrement tendue des deux mains et on l'applique sur la coupe, c'est-à-dire sur la lame du microtome, à la place où git la coupe, doucement, sans pression exagérée de haut en bas.

On tire à soi de haut en bas et d'arrière en avant, en suivant l'obliquité de la lame, en travers de celle-ci, de telle sorte que la coupe qui s'est collée contre le dessous ou le côté inférieur de la bandelette quitte la lame au fur et à mesure que la bandelette s'en éloigne, et avec la bandelette. Pour cueillir la première coupe, on applique, ainsi que nous venons de le dire, l'extrémité gauche de la bandelette, celle qui regarde l'opérateur; la seconde coupe viendra s'appliquer à la droite de la première, et ainsi de suite; la dernière de la lignée se trouvera placée à l'extrémité droite de la bandelette. Une bandelette ne doit jamais enlever plus qu'une lignée de coupes, c'est-à-dire que, sur chaque bandelette, il n'y aura qu'un seul rang de coupes. Le second rang, c'est-à-dire la

seconde bandelette, se placera sur l'assiette à la droite de la première, la troisième bandelette au troisième rang, à la droite de la seconde, et ainsi de suite. La longueur du rang ou de la série de coupes sur une bandelette ne doit pas dépasser la longueur de la plaque de verre destinée à recevoir le rang de coupes. Pour pouvoir plus tard recouvrir plusieurs coupes avec un même couvre-objet, on fera bien de répartir dès le début les coupes par petits groupes, correspondant à la dimension du futur couvre-objet. Ces groupes seront séparés les uns des autres par des intervalles libres suffisants. Pendant que l'opérateur fait les coupes, il faut que les bandelettes de papier avec les coupes qui s'y trouvent soient tenues en constant état d'humidité. A cet effet, on dispose à portée de la main droite une assiette plate, dans laquelle se trouveront superposées plusieurs couches de papier filtre blanc, recouvertes d'une couche de papier-closet, le tout convenablement imbibé d'alcool ordinaire.

Après avoir cueilli la coupe qui vient d'être faite, la bandelette est placée sur cette couche de papier mouillé; elle conserve ainsi elle-même le degré voulu d'humidité. Il ne doit pas y avoir d'alcool en excès dans l'assiette, car sans cela les coupes pourraient se mettre à flotter; il en résulterait une confusion complète au point de vue de l'ordre que chaque coupe doit occuper dans le rang. Il va de soi que les bandelettes reposent sur cette couche de

papier, par leur côté qui ne porte pas les coupes, c'est-à-dire les coupes en haut.

Au fur et à mesure de leur fabrication, les bandelettes viennent s'aligner toujours à la droite l'une de l'autre sur l'assiette. Il faut légèrement tendre les bandelettes pour les empêcher de goder, ce qui pourrait plisser les coupes. Elles peuvent ainsi rester plusieurs heures sur l'assiette, pourvu que le degré d'humidité voulu soit conservé. Ne pas oublier l'ordre réglementaire : première coupe, à gauche sur la bandelette ; première bandelette, à gauche sur l'assiette, etc., etc.

c. *Application des coupes sur les plaques.* — Ne jamais appliquer plus de deux séries de coupes, c'est-à-dire deux rangs, deux bandelettes, sur une même plaque.

Humecter encore la bandelette. La saisir des deux mains, en la tendant quelque peu. La retourner et l'appliquer, les coupes regardant la plaque de verre, sur la couche collodionnée de la plaque placée bien d'aplomb, en face de soi sur la table de travail.

Tendre encore un peu. Lâcher. Étendre délicatement une mince couche de papier ordinaire sur la bandelette. Presser doucement, également, avec le pouce ou la paume de la main droite, de gauche à droite, sans mouvements de va-et-vient, dans le sens de la longueur de la bandelette, en fixant le tout solidement avec les doigts de la main gauche.

Enlever le papier ; retirer de droite à gauche la bandelette. Les coupes doivent rester fixées

sur la plaque. La bandelette seule se détache. Si les coupes sont encore très humides, étaler sur la plaque une feuille de papier-filtre et presser mollement, doucement, de gauche à droite. Les coupes doivent être sèches; sans cela, au moment où l'on verserait la seconde couche de collodion, elles glisseraient. Toutefois, si elles sèchent trop, elles sont perdues; il y a là un juste milieu qu'il faut savoir saisir. La manipulation suivante devra donc se faire très rapidement et suivre immédiatement l'application du papier-filtre. On comprend pourquoi il ne faut transporter qu'un nombre restreint de coupes sur la même plaque: c'est que les soins que réclament un trop grand nombre de coupes prennent trop de temps; entre deux, elles sècheraient trop et seraient perdues. L'opération réussit parfaitement lorsque le champ d'action est restreint. Il suffit parfois d'un mouvement trop lent, d'un contre-temps pour tout compromettre.

d. *Deuxième couche de collodion sur les plaques.*

— Avant d'enlever la bandelette de dessus la plaque et déjà avant de sécher les coupes au papier-filtre, on aura ouvert le flacon de collodion et on l'aura placé très à portée de la main droite.

Au moment donc où le papier-filtre est enlevé et qu'on juge les coupes suffisamment séchées, on saisit rapidement le flacon de collodion et on verse une nouvelle couche du liquide sur les coupes ou, pour parler plus exactement, sur toute l'étendue de la plaque,

qu'on tient comme il a été dit plus haut. On laisse égoutter la plaque par un de ses angles sur le flacon, puis on dresse la plaque. On passe aux bandelettes suivantes, qu'on traite comme il vient d'être dit. Quand la couche de collodion versée sur la plaque est *presque* sèche, on la numérote avec un pinceau trempé dans du bleu de méthylène, qui dans les bains subséquents ne s'effacera pas.

e. *Bain de couleur. Bain décolorant.* — Dès que la plaque revêtue de sa seconde couche de collodion commence à être légèrement ou presque sèche, on peut, ou bien la plonger de suite dans le bain colorant, ou bien, si pour une raison ou pour une autre on préfère renvoyer la teinture à plus tard, la plonger, en attendant, dans l'alcool à 80-90 0/0 (ce dernier vaut mieux). Dans le bain colorant, la masse entière, c'est-à-dire les deux couches de collodion formant une pellicule à deux feuillets accolés, entre lesquels se trouvent prises les coupes, se détache aussitôt de la plaque. Les coupes restent prises dans l'ordre dans lequel elles ont été fixées sur la plaque et se colorent entre ces deux feuillets flexibles, mais résistants, parfaitement bien. On sort la plaque de verre du bain colorant, en n'y laissant que la pellicule de collodion. Le bain de couleur, le lavage à l'eau distillée, le bain de différenciation ou de décoloration, le bain d'alcool, etc., se succèdent ici comme s'il s'agissait, en somme, d'une seule coupe à traiter.

Ces opérations sont facilitées par le fait que

la pellicule au collodion est tenace, qu'elle n'adhère pas au fond des récipients dans lesquels elle passe, de façon qu'il est aisé ou de la sortir d'un récipient pour la transporter dans un autre, ou de verser le liquide d'un récipient pour y en introduire un autre. Après le bain de différenciation, qui, dans la méthode de Weigert, se fait au cyanure de potassium et, dans celle de Pal, à l'oxalate de potasse, il faut laisser tremper la pellicule pendant au moins une heure dans le bain d'eau distillée, qu'on aura soin de renouveler même plusieurs fois.

f) Arrivés à ce point du procédé, nous pouvons découper la pellicule sous l'eau, pendant le bain du dernier lavage, avec des ciseaux, en isolant chaque coupe ou en réunissant quelques coupes par groupes. Au besoin, pour ce faire, on peut se passer d'eau, pourvu qu'on ait soin d'étendre la pellicule sur une couche de papier-closet bien imbibé d'eau. Dans ce dernier cas, on coupe la pellicule avec le papier, et les nouvelles bandelettes ainsi obtenues se détacheront d'elles-mêmes lorsqu'on les aura plongées dans de l'alcool pour le bain de déshydratisation à 90-96 0/0.

Il ne faut jamais employer d'alcool absolu. Pour opérer la transparence des coupes, on emploiera soit de l'essence de girofle, soit un mélange de carbol et de xylol; on monte à volonté.

Les plaques ou pellicules collodionnées selon Weigert présentent quelques inconvénients : la couche de collodion adhère quelquefois trop

fortement au verre de la plaque, principalement lorsque la couche de collodion est très mince, de telle sorte qu'un groupe de coupes peut être déchiré ou compromis au moment où on détache la pellicule de la plaque.

On a reproché à ce système que la coloration des coupes prises ainsi entre deux feuillets ne se faisait pas d'une manière égale ; nous n'avons pas constaté le fait. En outre, que la coloration et la décoloration se trouvaient être ralenties. Il se produit souvent des bulles d'air entre les deux feuillets de la pellicule, qui, si elles se produisaient sur une coupe, formeraient plus tard autant de taches. Enfin, des particules de couleur adhèrent quelquefois sur les coupes et les encrassent. Ajoutons que la méthode n'est pas applicable aux coupes provenant de pièces enrobées dans la paraffine. Ce système, malgré les critiques que nous venons de formuler, n'en rend pas moins de grands services.

Pour l'éclaircissement des coupes ainsi traitées, Weigert (21) a prescrit dernièrement le mélange suivant :

Acide carbolique pur, cristallisé.....	1 partie.
Xylol.....	3 parties.

C'est à ce mélange qu'on aura donc recours pour obtenir la transparence des plaques. Pour conserver ce liquide, qui peut alors servir très longtemps, placer sur le fond du flacon



qui le contient un morceau de vitriol (cuprique) blanc, qu'on aura préalablement chauffé jusqu'à incandescence. Lorsque ce morceau bleuit, on le remplace par un nouveau morceau, ou bien on le fait chauffer de nouveau, et ainsi de suite.

2° *Système des feuillets en séries (coupes paraffinées), selon Strasser (22).*

a. *Préparation des feuillets de papier gommés et collodionnés.* — On coupe dans du papier un peu fort, lisse, consistant, des feuillets d'un format in-12 généralement; mais ces feuilles peuvent être, en somme, de toutes les dimensions désirées. On prend un de ces feuillets et on l'enduit sur toute l'étendue d'un de ses côtés d'une épaisse couche de gomme arabique. Dès que cette couche est assez sèche pour qu'elle ne colle plus et que le feuillet commence à se rouler, on l'étend sous une presse quelconque en ayant soin qu'il soit très à plat et que la couche de gomme ne puisse pas se craqueler. Il ne faut pas presser trop vite, sans quoi la couche de colle s'agglutinerait à la presse. Les feuillets doivent être très propres, chaque parcelle de poussière ou d'impureté s'incrétant plus tard sous la couche de collodion. Au bout d'un instant de pression méthodique, on étend sur la couche de gomme une couche de collodion qui ne

doit pas être très fluide, mais avoir une certaine consistance.

Cette couche de collodion doit être très également répartie sur toute l'étendue du feuillet de papier. Cette opération s'exécute facilement en fixant le feuillet, au moyen de quatre punaises, sur la table de travail ou sur une planche, la couche gommée en haut. On verse alors du collodion de consistance plutôt un peu épaisse, sur le milieu du feuillet et on l'étend rapidement au moyen d'un large pinceau que l'on promène à droite et à gauche. On laisse le feuillet dans la position horizontale et tendu, jusqu'à ce que la masse collodionnée soit bien fixée.

Il est bon de préparer ainsi 10-15 feuillets de papier du coup. Le premier feuillet est sec quand on achève la série. Lorsqu'un feuillet est bien sec, on le recouvre d'un second badigeon de collodion. Puis, pendant que la couche de collodion est encore molle, élastique, on place le feuillet sous la presse, le côté collodionné regardant la plaque métallique de la presse, ou une plaque métallique qu'on aura placée sur le feuillet sous presse. Pour conserver les feuillets ainsi préparés, on les tient sous presse sans serrer.

b. *Coupe du bloc paraffiné. Collage des coupes.* — Fixer un feuillet collodionné sur une plaque de liège, le côté gommé en haut. Sur le travers du feuillet, étendez une couche, d'une largeur correspondant au diamètre des coupes, du mélange suivant :

Collodion.....	2 parties.
Essence de girofle.....	1 partie.

On applique alors sur cette couche, au fur et à mesure de leur fabrication, les coupes que l'on enlève au bloc paraffiné. Cet acte est souvent difficile à exécuter correctement, surtout pour les coupes épaisses et pour celles qui sont très minces, parce que le collet de paraffine qui entoure une coupe pareille se casse et s'effrite très facilement. C'est le moment d'employer les instruments dont nous avons parlé, le *Schnittstrecker* ou *étale-coupes*. A-t-on placé une coupe sur le feuillet ou plutôt sur la bande badigeonnée du feuillet, on passe légèrement le doigt sur la coupe, pour l'aider à s'étaler convenablement sur la couche en question. On continue ainsi pour les coupes suivantes.

c. *Enlèvement de la paraffine. Enlèvement de la pellicule collodionnée avec les coupes. Coloration, etc.* — Le feuillet sur lequel on a ainsi, par raies ou par bandes successives, collé dans l'ordre de leur fabrication un certain nombre de coupes est placé dans une assiette dans laquelle on aura versé une suffisante quantité de benzine, qui a pour tâche de dissoudre la paraffine, ce qui s'obtient en général au bout de 15-30 minutes.

Cela fait, on étale le feuillet entre des couches de papier-filtre blanc ; on l'y sèche de suite, puis, sans que les coupes aient été exposées au contact de l'air, on les plonge

(c'est-à-dire le feuillet) dans de l'alcool à 95 0/0 (également dans une assiette), où elles ne séjourneront que quelques minutes. On sèche le feuillet comme on l'avait fait avant le bain. Puis on badigeonne de nouveau tout l'espace occupé par les coupes avec un mélange de collodion et d'essence de girofle, de façon à ce qu'il se produise comme un vernis très égal et sans bosselures qui recouvre la série entière des coupes.

On plonge alors délicatement le feuillet dans de l'alcool à 80-85 0/0, dans lequel on le laisse pendant au moins 15 minutes. Il vaut toujours mieux l'y laisser plus longtemps.

Lorsque la masse de revêtement collante est suffisamment durcie, on peut immerger le feuillet dans la solution aqueuse ou alcoolico-aqueuse d'un bain colorant.

Dans une solution aqueuse ou dans une solution qui ne contient que 1/10<sup>e</sup> d'alcool, la gomme du feuillet se dissout au bout de 10-15 minutes, suffisamment pour que la pellicule de collodion dans laquelle les coupes sont englobées se laisse enlever facilement. Pour n'avoir à traiter que la pellicule collodionnée dans la procédure subséquente de coloration, de différenciation, etc., il est avantageux de l'enlever le plus tôt possible, c'est-à-dire dès qu'elle commence à se laisser détacher du feuillet.

Pour la suite des manipulations, on traite la pellicule comme une pellicule de Weigert ou comme une coupe isolée.

d. *Transparence. Montage.* — Le traitement de la pellicule terminé (le dernier acte de presque toutes les méthodes colorantes est un lavage à l'eau distillée), on la sèche rapidement et la transporte dans de l'alcool à 90 0/0. Au bout d'un moment, on la plonge dans de l'alcool absolu, puis dans de la créosote. On monte au Canada. Les coupes qu'on n'a pas l'intention de monter de suite peuvent être conservées dans de l'alcool ou de la benzine.

L'auteur engage à traiter suivant le procédé du papier-gomme-collodion les coupes provenant de pièces enrobées dans la celloïdine. Les feuillets remplaceraient alors les plaques de verre. La méthode de l'enrobage à la paraffine peut rendre, suivie de ce procédé, de plus grands services qu'elle n'en a rendu jusqu'ici.

L'auteur recommande, eu égard à l'enrobage à la paraffine, de déshydrater les pièces à enrober dans de l'alcool complètement rectifié, de les imprégner de chloroforme ou d'essence de bergamote (Giesbrecht et Bütschli), mais de telle façon qu'un des côtés de la pièce ne trempe pas dans le liquide. L'imprégnation se fait mieux et l'enrobage à la paraffine est plus parfait.

Si l'on emploie pour les coupes traitées suivant ce procédé la coloration hématoxylinique de Weigert, et si à cette intention la pièce a été traitée par les sels chromiques et l'acétate neutre de cuivre, on verra, au moment du col-

lage, que, sous l'action de l'essence de girofle, les coupes vertes ou verdâtres se colorent en brun-jaune. Malgré cela, la coloration de Weigert réussit parfaitement.

3° *Système des plaques en séries d'Obregia (23).*

a) *Tout d'abord préparer deux solutions. Solution A.* — Faites avec du sucre candi finement pulvérisé et de l'eau distillée bouillante une solution de la consistance d'un sirop; puis ajouter, à 30 centimètres cubes de cette solution, 20 centimètres cubes d'alcool à 95 0/0, puis 10 centimètres cubes d'une solution sirupeuse de dextrine pure.

Pour faire cette solution de dextrine, ajouter à une certaine quantité d'eau distillée que vous verserez, pour cela faire, dans un tube à réaction autant de dextrine qu'il en faut pour obtenir, tout en agitant sans cesse le mélange et en le chauffant, un liquide transparent de la consistance d'un sirop. Cette solution se conserve longtemps.

b) Comme pour le procédé de Weigert, on verse une quantité suffisante de ce liquide sur la plaque de verre ou le porte-objet qu'on aura choisi, en tenant la plaque tout à fait horizontalement en main, de telle sorte que la plaque soit complètement recouverte par le liquide. Cela fait, on la laisse égoutter par un angle sur l'ouverture du flacon A. Pour sécher la plaque ainsi obtenue, on la place très à plat dans un endroit très sec et à l'abri de toute

trace de poussière. Au bout d'un instant, la plaque sera couverte d'une pellicule transparente, brillante, sèche, ne collant plus qu'au doigt mouillé. Les plaques préparées de cette façon peuvent être conservées telles quelles pendant quelques jours. La dextrine empêche la cristallisation du sucre.

c) *Solution B.* — Pour la préparer, prenez :

Photoxylline.....	6 grammes.
Alcool absolu.....	} $\bar{a}\bar{a}$ 100 c. cubes.
Éther sulfurique..	

La solution est parfaite au bout d'une minute. On laisse reposer et on décante la partie supérieure du liquide dans un flacon bouchant à l'émeri. Si l'on ne peut pas se procurer de la photoxylline, on peut employer du coton celloïdine très pur, et ce dans les proportions ci-dessus indiquées pour la photoxylline. Le coton celloïdine coûte moins et il est, en général, très soluble. On coupe.

d) Préalablement, on se sera procuré du papier de soie satiné; ce papier est très mince et ne laisse pas sur les coupes des fils qui gênent. Tailler, dans ce papier satiné, une bandelette de la longueur du porte-objet ou de la plaque préparée; couchez-la, le côté satiné en haut, dans une cuvette ou assiette plate, et arrosez d'alcool à 95 0/0, de façon à l'humecter convenablement. Au moyen d'une seconde bandelette taillée dans le même papier, on enlève les coupes de dessus la lame du micro-

tome, comme il a été dit pour le système de Weigert, et on applique cette seconde bandelette sur la première, de façon à ce que les coupes : 1° soient prises entre les deux bandelettes, 2° qu'elles soient disposées dans l'ordre dans lequel elles auront été faites, comme pour Weigert (première coupe à gauche sur le rang, deuxième coupe à droite de la première). On enlève alors la seconde bandelette et on arrange au mieux les coupes sur la première bandelette en les éloignant ou rapprochant les unes des autres, isolées ou par groupes ; on les étale convenablement pour éviter tout plissement, au moyen d'un pinceau trempé dans de l'alcool ; puis on soulève délicatement la première bandelette, les coupes en haut, et on l'applique sur une couche de papier-filtre reposant sur un plan incliné, jusqu'à ce que le luisant caractéristique des coupes produit par un excès de liquide sur la bandelette commence à s'effacer ; à ce moment précis, on soulève de nouveau la bandelette et on l'applique, les coupes en bas, sur le porte-objet ou la plaque préparée comme nous l'avons décrit. On étend un morceau de papier-filtre sur le tout, on passe légèrement le doigt par-dessus, de gauche à droite, et on enlève finalement la bandelette de papier satiné.

e) Les coupes adhèrent alors sur la plaque dans le même ordre dans lequel elles ont été élaborées, la couche de sucre candi dextriné formant un excellent agglutinatif. La plaque reste posée à plat devant soi sur la table de travail.



On prend ensuite la solution B et on en verse sur la plaque de quoi la recouvrir entièrement, en ayant soin de ne laisser égoutter l'excès de liquide que très lentement. Attention de ne pas verser l'excès de la solution B dans le flacon A ! La plaque est laissée posée à plat, à l'air, devant soi pour que la photoxylline acquière une épaisseur de couche parfaitement égale, et jusqu'à ce que le léger trouble laiteux qui se forme autour des coupes, en suite de l'excès de liquide, ait complètement disparu. La pellicule de photoxylline est alors formée.

Avec ce procédé, on a moins à redouter le dessèchement subit des coupes, qui leur est si funeste, que dans le procédé de Weigert, et ce au moment de l'application de la seconde couche protectrice de collodion, le sucre candi gardant très longtemps un certain degré d'humidité favorable à la conservation des coupes.

f) La pellicule formée, on peut numéroter les plaques avec un pinceau trempé dans une couleur à l'huile, le jaune de chrome, par exemple.

Immédiatement, la plaque est plongée dans un bain d'eau fraîche ; le feuillet de sucre s'y dissout. Au bout d'un instant, la pellicule de photoxylline se détache de la plaque de verre ; avec elle, les coupes qui se trouvent prises dans l'intimité même de la pellicule. Celle-ci est parfaitement intacte, très fine, très résistante et susceptible de résister à toutes les manipulations subséquentes.

On colore, etc., comme il a été dit pour les

pellicules de Weigert, avec les restrictions formulées plus loin.

Avec le système d'Obregia, les coupes ne sont plus claquemurées entre deux pellicules, comme dans la méthode de Weigert; elles se trouvent faire corps avec la seule pellicule à la photoxylline, de telle sorte que l'opération de la coloration et de la décoloration ou différenciation se fait plus rapidement, mieux et plus proprement. La pellicule elle-même est aussi moins épaisse. Cette méthode rend des services signalés pour les manipulations des grandes coupes, qui, en raison de leur étendue, du temps qu'il faut mettre à les étaler à chaque fois, avant, pendant et après chaque bain ou chaque manipulation, sont sujettes à se détériorer en un clin d'œil.

Le carmin et l'hématoxyline ne colorent pas la pellicule de photoxylline. Les couleurs d'aniline, qui au reste ne supportent pas toutes les manipulations de toutes les méthodes et qui sont attaquées facilement par l'essence de girofle, la colorent plus ou moins fortement. En employant le coton celloïdine à la place de la photoxylline, cet inconvénient disparaît. Ce système convient aussi bien aux coupes provenant de pièces enrobées dans la celloïdine qu'à celles qui ont été faites sur des pièces non enrobées. Son grand avantage consiste également en ceci : qu'on peut l'employer pour les coupes de pièces paraffinées. Pour ces dernières cependant, il faudra procéder de la façon suivante :

Les coupes sont arrangées en séries sur la plaque revêtue du feuillet de sucre candi, et au moyen d'un pinceau.

La plaque passe à l'étuve à une température de 57-60° C. pour 10 minutes. Les coupes s'y ramollissent et s'étalent d'elles-mêmes sur ce feuillet, sans se plisser. On aspire alors la paraffine fondue avec une double couche de papier Josèphe, et on passe la plaque soit au xylol, soit à la térébenthine. Cela fait, on sèche la plaque une seconde fois avec une couche de papier et on lui donne un bain d'alcool absolu de quelques minutes. On égoutte rapidement et on arrose, comme il a été dit plus haut, la plaque avec la solution de photoxylline.

Après 10 minutes d'exposition à l'air, on numérote la plaque, c'est-à-dire le feuillet supérieur, et on plonge le tout dans de l'eau froide, où la pellicule de photoxylline se détache rapidement. Cela fait, on donne le bain de couleur, celui de décoloration, etc., comme pour les autres méthodes. Pour le bain de déshydratation, il faut employer de larges quantités d'alcool à 95 0/0, puis, sans tarder, opérer la transparence suivant le procédé au carbol-xylol de Weigert. Monter au Canada.

#### 4° *Système de Darkschewitsch (24).*

L'auteur a imaginé une méthode relativement simple et facile à exécuter pour élaborer des séries de coupes et les conserver dans

l'ordre de leur fabrication. Choisissez un cylindre de verre ou un bocal d'un diamètre égal à peu près à celui des coupes qui vont être faites.

Taillez dans une feuille de papier buvard blanc des disques ou rondelles correspondant au diamètre du cylindre choisi, de façon à ce qu'ils puissent facilement être introduits dans le cylindre en question et à plat. Numérotez les rondelles de papier au crayon et introduisez-les l'une après l'autre, dans l'ordre de numération, dans le cylindre. Remplissez le cylindre du bocal d'alcool ordinaire.

Lorsqu'une coupe vient d'être faite, on l'enlève de dessus la lame du microtome avec une de ces rondelles en l'appliquant sur la coupe, comme il a été dit pour la méthode de Weigert. Ces rondelles, chargées chacune d'une coupe, sont entassées, la coupe en haut, les unes au-dessus des autres, dans le cylindre et forment ainsi comme une espèce de colonne. Le numéro d'ordre d'une coupe doit toujours correspondre avec celui d'une rondelle de papier.

Les coupes peuvent se conserver longtemps telles quelles. Veut-on colorer, on laisse écouler l'alcool, on rince le tout à l'eau distillée et l'on arrose le tout de solution colorante, de façon à remplir le bocal ou cylindre. On renouvelle ce mode de procédé pour les lavages ou les bains subséquents. Pour les derniers actes des manipulations techniques, on peut sortir les rondelles, les étaler sur des assiettes et les traiter isolément ou en commun, jusqu'à ter-

minaison de la méthode de coloration choisie.

Les coupes se détachent des rondelles au moment voulu.

### 5° *Méthode de Giacomini* (5).

A titre de renseignement, nous transcrivons telle que la décrivent Bolles-Lee et Henneguy la méthode de Giacomini, qui, pour un examen topographique à l'aide d'un faible grossissement, peut être de quelque utilité.

C'est une méthode macroscopique, en somme.

On fait une provision de plaques de verre à surface très unie et polie, de dimensions correspondantes à celles des coupes que l'on désire conserver. On les nettoie comme pour des opérations photographiques, de manière à les rendre chimiquement et physiquement parfaitement propres. On les couvre d'une couche unie de collodion, comme le font les photographes ; on les laisse sécher sur un plan très horizontal jusqu'à ce que le collodion ait pris une consistance qui lui permette de conserver l'impression de l'ongle. On passe alors à la gélatinisation des plaques.

On a préparé d'avance une solution à 8-10 0/0 de gélatine parfaitement pure dans de l'eau. On maintient cette solution à une température de 50-55° C. au bain-marie, dans une cuvette. On place les plaques dans la gélatine, la surface collodionnée en haut ; le moment venu (ce que l'on apprend en constatant que la couche de collodion ne laisse plus voir de stries

ni autres inégalités), on sort la coupe à monter de l'eau distillée dans laquelle elle attendait, on la porte dans la gélatine et, avec un pinceau fin, on la met en place sur la plaque.

On soulève avec précaution la plaque, en ayant soin de la tenir toujours horizontale, et on la sort de la gélatine. On la laisse un peu égoutter et on la met sécher, à l'abri de la poussière, sur un plan parfaitement horizontal. Si les coupes sont minces et que la couche de gélatine ne soit pas épaisse, les préparations seront parfaitement sèches en 12-18 heures. On peut estimer qu'elles sont assez sèches lorsqu'elles paraissent tout à fait transparentes et que la gélatine ne se laisse plus imprimer par l'ongle. Si, pendant qu'elles sèchent, les coupes viennent à n'être plus couvertes par la gélatine, il faut ajouter une nouvelle couche de celle-ci, en en versant sur la plaque.

Les préparations étant bien séchées, on incise les couches de gélatine et de collodion sur tout le parcours du verre; on introduit dans l'incision une lame mince de scalpel et l'on sépare du verre les deux feuillets comprenant entre eux la coupe ou les coupes.

Si le verre a été bien nettoyé et la couche de collodion bien étendue, cette opération n'offre pas de difficultés. La préparation est alors terminée, et l'on conserve définitivement les coupes ainsi montées entre les feuilles d'un album. Il est bon de prendre du papier un peu fort et un album un peu lourd, vu que les

feuillet de gélatine ont de la tendance à s'enrouler.

La grande utilité de cette méthode se trouve en ce qu'elle permet d'établir à peu de frais et de conserver dans un espace restreint une certaine collection de coupes de n'importe quelle étendue; par ce moyen, on peut s'organiser un petit musée sans grands frais. Nous ferons remarquer que cette méthode permet d'établir des séries parfaitement suivies de coupes; Giacomini a pu monter sur une même feuille de gélatine 200 coupes du pont de Varole.

## DEUXIÈME PARTIE

### MÉTHODES DE COLORATION ET D'IMPRÉGNATION

---

La coloration ou tinction des éléments nerveux est représentée, au point de vue physique, dit *Apathy* (26), par un dépôt extrêmement ténu de fines molécules d'une solution colorante sur les parties constituantes d'un tissu ou sur des éléments donnés, de forme et de nature spéciale, d'un tissu. Les molécules colorantes ne présentent pas un volume supérieur à celui des molécules du véhicule colorant lui-même; en d'autres termes, la couleur continue, en définitive, à demeurer à l'état de solution. C'est la raison pour laquelle les éléments nerveux colorés peuvent acquérir une transparence vitreuse presque parfaite par l'acte de l'éclaircissement.

L'imprégnation proprement dite (métallique)



est un procédé en suite duquel nous pouvons différencier de certains territoires d'un tissu, de certains éléments de ce tissu, d'avec les territoires ou les autres éléments circonvoisins, grâce à la formation de nombreux précipités granuleux, très serrés et reconnaissables au microscope. Plus les précipités seront fins, abondants et régulièrement fixés, c'est-à-dire localisés sur des éléments donnés, plus l'imprégnation sera réussie. Les espaces imprégnés, c'est-à-dire obstrués par les précipités, restent alors opaques (noirs ou noir-gris) et ne sont pas susceptibles d'être éclaircis ; il ne se produit pas de transparence des éléments imprégnés.

Entre ces termes extrêmes, coloration d'une part et, de l'autre, imprégnation métallique, se trouvent des degrés où l'on peut constater qu'une imprégnation s'accompagne de tinction des tissus, comme dans de certaines méthodes à l'or, ou bien que la coloration va de pair, tant son action est profonde, intense, avec une véritable saturation (sans précipités) de matière colorante des tissus, comme dans les méthodes à la safranine, à de certaines couleurs d'aniline, par exemple. Mais, dans ces cas, l'imprégnation colorante est indépendante de la tinction proprement dite, elle n'est pas cherchée, elle doit être considérée comme un acte concomitant gênant, inutile et doit être, autant que possible, évitée, puisque ce n'est pas une imprégnation, mais une coloration des éléments qu'on a en vue dans ces cas (26).

D'autres fois, la tinction est doublée d'une

combinaison particulière qui se produit entre les molécules colorantes, d'une part, et telle substance des tissus, d'autre part, comme nous pouvons le constater dans les procédés de coloration des gaines à myéline. Il se produit ici comme un nouveau corps, une espèce de laque par pénétration des substances albuminoïdes, ou des combinaisons obtenues par les sels chromiques et les substances albuminoïdes, sous le dépôt des molécules colorantes (hématoxyline). Cette néoformation par pénétration des molécules colorantes pourrait, à vrai dire, passer aussi pour une quasi-imprégnation, mais qui différencierait d'une imprégnation réelle par le fait qu'il ne se produit pas de précipités (métalliques), mais bien des amas de molécules colorantes en solution, qui se sont progressivement et jusque dans les plus fines ramifications des éléments en cause, entassés dans les espaces interstitiels.

Quoiqu'il ne soit pas facile, théoriquement, de séparer absolument ce qui est le fait exclusif d'une coloration ou d'une tinction, d'avec les quasi-imprégnations (non métalliques) ou les combinaisons de néoformation (laque), nous croyons cependant devoir réserver le nom d'*imprégnation* pour l'imbibition des éléments par des sels *métalliques* avec formation de *précipités opaques* intentionnellement obtenus. Nous appellerons les quasi-imprégnations accompagnées de coloration des éléments et susceptibles d'éclaircissement des *pseudo-imprégnations*.

Une tinction avec combinaisons interstitielles localisées, telle que nous la constatons dans les méthodes qui prévoient la formation de la laque dont nous parlions, est pour nous une *coloration massive*. Nous donnerons le nom de *coloration élémentaire* à la tinction moléculaire, simple, des éléments isolés.

Au point de vue pratique, et en nous reportant à ce que nous disions plus haut en parlant des colorations relativement à l'acte du durcissement, nous pouvons faire rentrer les données qui précèdent dans notre première classification des méthodes de coloration et formuler leur groupement synthétique de la façon suivante :

I<sup>er</sup> groupe. — Méthodes de coloration simple ou élémentaire ; tinction moléculaire. Méthodes de coloration des cellules avec leurs prolongements nerveux (cylindraxes). Agents colorants : carmin, couleurs d'aniline et leurs composés, ou les combinaisons de ces substances colorantes.

II<sup>e</sup> groupe. — Méthode de coloration massive ; tinction interstitielle ; néoformation par combinaisons dans les espaces interstitiels : laque. Méthodes dont la procédure consiste à colorer les gaines à myéline. Agent colorant : l'hématoxyline. Méthodes de Weigert, de Pal, etc. Accessoirement, d'autres agents colorants, mais sans formation de laque (Exner, Bellonci).

III<sup>e</sup> groupe. — a) Quasi-imprégnations par *saturation* de matière colorante, sans précipités. Méthodes qui se sont donné pour tâche

d'atteindre à la fois la coloration des gaines et des cellules, présentant souvent des combinaisons entre les méthodes des autres groupes. Agents : safranine, galléine, fuchsine acide, etc. *Méthodes mixtes*, en un mot.

b) *Pseudo-imprégnations* avec coloration des éléments, sans précipités, susceptibles d'éclaircissement, présentant le caractère de l'imprégnation, mais avec coloration des tissus. Méthodes à l'or, au palladium, etc.

IV<sup>e</sup> groupe. — *Imprégnation métallique*. Précipités opaques, non susceptibles d'éclaircissement, métalliques *dans l'intimité* des éléments histologiques. Méthodes fondamentales de Golgi. Agents : sublimé, nitrate d'argent; modifications apportées à ces méthodes par d'autres auteurs.

## CHAPITRE V

### Coloration des cellules avec leurs prolongements.

(I<sup>er</sup> groupe.)

#### A. — MÉTHODES AU CARMIN ET SES COMPOSÉS.

Robin (1) a dit, d'autres ont répété après lui que « le carmin à l'état de dissolution est l'agent de coloration par excellence ». Jusque-là, nous sommes d'accord ; mais, quand ce savant ajoute dans son *Traité de microscopie*, page 245 : « On peut colorer par le carmin soit des objets frais, soit des objets durcis par l'alcool et par l'acide chromique ou par quelque autre moyen », et plus loin : « Il faut remarquer que, dans ces cas, mieux vaut l'alcool que l'acide chromique », nous sommes forcé de protester. Ainsi que nous l'avons dit au sujet du durcissement, les pièces destinées à fournir des coupes convenables au carmin ne doivent pas être durcies

à l'alcool. Il est certain que les pièces ayant séjourné, à plus forte raison durci dans l'alcool, fournissent des coupes qui, mises en contact avec le carmin, se colorent mal ou infiniment moins bien que celles qui proviennent de pièces durcies au bichromate de potasse.

Les solutions de carmin, additionnées fortement ou faiblement d'alcool, colorent également moins bien que les solutions aqueuses. C'est là une vérité qui résulte de nombreuses observations bien faites, de soigneuses expériences exécutées partout et dont, pour ce qui nous concerne, nous avons toujours pu confirmer le bien fondé. Aussi, reprenant l'axiome de Robin, en le modifiant, nous dirons : que le carmin à l'état de solution aqueuse est l'agent de coloration par excellence pour colorer les cellules nerveuses avec leurs prolongements (cylindraxes).

On lit, dans tels traités de technique microscopique, qu'il suffit de quelques minutes d'immersion dans une solution très chargée de carmin pour colorer des coupes. C'est là une erreur contre laquelle nous devons nous élever, car elle est la cause de découragements nombreux lorsqu'on débute dans la coloration des coupes du S. N. C. Sans doute, la coupe est colorée dans ces conditions, mais comment? Examinez-la avec un grossissement même faible ou moyen, que verrez-vous? Des amas de couleur, et voilà tout; en cherchant à examiner des cellules, des cylindraxes, vous constaterez que celles-là sont encrassées, irrè-

gulières, bosselées, que ceux-ci sont invisibles ou à peine visibles, et qu'il est impossible ni de les isoler les uns des autres, ni de les suivre dans leur parcours. De pareilles coupes ne supportent pas l'examen au grossissement fort et sont tout à fait impropres pour l'étude.

Pour que la coupe se colore régulièrement, exactement et dans tous ses détails, il est de toute nécessité qu'elle soit mise un long temps durant en contact avec la solution carminée; or, pour ne pas s'exposer à avoir des préparations surcolorées, qui, dans la suite, ne se décoloreront que mal et dont les éléments histologiques manqueront de finesse et de clarté, il s'ensuit que, pour obtenir de belles images, on ne doit employer que des solutions faibles. C'est ce que l'expérience journalière prouvera. Ceci s'applique, au reste, aussi aux autres agents de coloration que le carmin, la nigrosine, l'aniline blue-black, etc.

Certaines pièces se coloreront mieux que d'autres (28); il en est dont les coupes se comporteront différemment au contact du carmin, que la solution soit plus ou moins fortement diluée; l'essentiel est de toujours débiter par une solution faible. Dans la règle, les solutions au carmin ne doivent pas être additionnées de substances étrangères. Il n'est pas absolument nécessaire de boucher les flacons qui les contiennent; un entonnoir garni d'un filtre peut suffire pour empêcher les poussières de les altérer. En général, les solutions de carmin (carmin-ammoniaque) se

bonifient en vieillissant, pourvu qu'elles soient couvertes et filtrées de temps en temps. On aide à leur conservation en ajoutant quelques brisures de camphre dans le flacon, ou bien quelques gouttes de phénol à l'eau qui fixe le filtre sur l'entonnoir.

Les pièces destinées à fournir des coupes à colorer au carmin doivent durcir dans un liquide de bichromate de potasse. Le durcissement obtenu, la pièce passe dans de l'eau distillée ou ayant bouilli, pour un temps plus ou moins long. L'eau sera renouvelée chaque jour d'abord, puis aussi longtemps qu'elle se colorera en jaune. L'emploi de l'eau tiède comme bain détergeant accélère l'élimination des sels chromiques.

La pièce est alors enrobée dans le microtome de Gudden, pour être coupée sous l'eau. Pour la couper au microtome ordinaire, on la fixe sur un bouchon et on l'enrobe dans un mélange de deux parties de cire et trois parties d'huile de ricin (cadre métallique). De cette façon aussi on peut opérer des séries non interrompues. On peut la couper telle quelle en la fixant sur un bouchon au moyen de quelques gouttes de paraffine fondue.

*Forel* (27) dit que, « pour produire des préparations microscopiques parfaites, la solution de carmin doit teindre énergiquement les noyaux de la substance cérébrale, les cellules ganglionnaires avec leurs prolongements, le prolongement nerveux des cellules et les cylindres des fibres nerveuses. La substance



intermédiaire doit être teinte en rouge clair seulement, soit en rose. Les gaines à myéline des fibres nerveuses resteront blanches, incolores ou ne seront colorées en jaune que presque imperceptiblement. Les noyaux et les nucléoles des cellules doivent être plus fortement colorés que le protoplasma. Si la solution employée est vraiment bonne, ce dont on s'assure par des essais faits, dès le début, au moyen d'une solution progressivement renforcée ou diluée, les caractères de coloration tels que nous venons de les énumérer devront ressortir avec netteté sur toutes les coupes d'une même série, et plus particulièrement les cylindraxes devront se détacher nettement non seulement de leurs congénères d'un calibre différent, mais aussi de leur propre gaine à myéline. En employant l'alcool comme agent de durcissement, les coupes et plus spécialement la substance intermédiaire seront colorées trop intensivement, les cellules trop peu et irrégulièrement. »

Ajoutons encore que c'est l'essence de girofle qui donne les meilleurs résultats pour obtenir une transparence satisfaisante. La térébenthine gâte la préparation et rend la coloration diffuse. Les coupes au carmin, pour lesquelles on a employé de l'eau non distillée, se couvrent souvent, au bout d'un certain temps, de petits cristaux de chaux, qui les gâtent. Il vaut mieux pour les monter employer le baume de Canada dissous et, à l'occasion, dilué avec du chloroforme, que la résine

de Damar. Les coupes seront toujours couvertes d'un couvre-objet.

I. Méthodes au carmin-ammoniaque

a) Selon Gerlach (29).

Si ce n'est le premier, tout au moins un des premiers, Gerlach a employé le carmin-ammoniaque pour colorer les coupes du S. N. C.

La solution recommandée par cet auteur est la suivante :

Carmin très pur et très finement pulvérisé.....	} $\bar{a}\bar{a}$ 1 partie.
Liquueur d'ammoniaque caustique.....	
Eau distillée.....	50-100 parties.

Mêler rigoureusement et laisser le récipient qui contient le mélange, sans le couvrir, exposé à l'air pendant 24 heures, de façon à ce que la plus grande partie de l'ammoniaque employé puisse s'évaporer facilement.

Filtrer et couvrir la solution. Moins la solution contiendra d'ammoniaque libre, moins elle attaquera les tissus. Il faut la renouveler de temps en temps, parce qu'elle se couvre parfois de moisissures.

Pour colorer, faire différentes solutions de ce liquide, en prenant de l'eau distillée et en procédant volumétriquement. Etiqueter les solutions.

1° La coupe faite est lavée à l'eau distillée.

2° Elle passe dans le bain colorant. La coupe ne doit pas flotter sur le liquide, mais être immergée parfaitement. Avec une solution moyenne, durée du bain : 12-18-24 heures, suivant l'épaisseur de la coupe et la réceptivité de la pièce. Plus une coupe sera mince plus longtemps elle devra rester immergée dans la couleur.

3° Lavage à l'eau distillée; le bain doit être donné soigneusement, à défaut de quoi elle se souillerait dans le bain suivant, en s'y couvrant de petits dépôts granuleux de carmin. Les coupes colorées au carmin ne rendent leur excès de couleur que lentement; ce bain ne sera donc pas écourté. Changer l'eau tant que celle-ci se colore en rouge.

4° Bain à l'eau acidifiée par de l'acide acétique (environ 30 gouttes d'acide pour 300-500 centimètres cubes d'eau distillée). La durée de ce bain est variable et dépend aussi des particularités inhérentes aux pièces. En général, 20 minutes suffisent; quelquefois, 30, 50, 60 minutes ne sont pas de trop. Cet acte doit être contrôlé au microscope de Nachet, surtout au début d'une série. Ce bain a pour but de fixer la couleur sur les éléments.

5° On peut déshydrater de suite ou laver préalablement à l'eau distillée; quoi qu'il en soit, on aura placé la coupe sur le porte-objet, d'une façon ou de l'autre, avant le bain d'alcool.

6° Bain d'alcool. Durée : 20 minutes en

moyenne. Les coupes colorées au carmin peuvent séjourner longtemps dans l'alcool une fois teintes.

7° Essence de girofle.

8° La transparence obtenue, monter au baume de Canada.

Cette solution colore les noyaux et le protoplasma des cellules, les cylindraxes et faiblement la névroglie. Elle laisse les gaines à myéline intactes et ne colore pas les éléments graisseux, lamineux et muqueux.

*b) Selon Fritsch (31).*

Préparer une solution saturée du meilleur carmin rouge dans une quantité voulue de liqueur d'ammoniaque caustique. La solution doit se faire dans un récipient à large ouverture et n'être couverte que d'une mince couche de papier de soie.

On la laissera reposer telle quelle pendant 8 jours. Au bout de ce temps, on décante le liquide, en ayant soin de ne pas entraîner le dépôt qui se sera formé au fond du récipient. Le liquide décanté est recueilli dans un flacon qu'on bouchera légèrement et qu'on laissera reposer, sans l'agiter, pendant un mois. Cette solution sera la *solution mère*.

Pour teindre, on prend :

Eau distillée.....	400 c. cubes.
De la solution mère.....	10 gouttes.

M.

- 1° La coupe passe dans l'eau distillée.
- 2° Dans le bain colorant pour 24 heures.
- 3° Lavage à l'eau distillée pendant 24 heures.
- 4° Bain d'alcool ;
- 5° Traitement subséquent comme plus haut (essence de girofle, Canada). Cette solution se conserve longtemps. Il est bon cependant d'y ajouter de temps en temps quelques gouttes de la solution mère. Plus cette solution est fraîche, plus la coloration des coupes se fait bien, ce qui s'explique par le fait qu'il s'y forme du carbonate de carmin qui prend bien. Elle ne colore pas la celloïdine. Les préparations présentent une coloration fine, nette et la conservent bien.

c) *Selon Stöhr* (2).

Dissoudre dans :

Eau distillée.....	50 c. cubes.
Meilleur carmin.....	1 gr.

Cette solution doit se faire à froid. Ajouter :

Liqueur d'ammoniaque caustique.....	5 c. cubes.
-------------------------------------	-------------

M.

Laisser le liquide exposé à l'air jusqu'à ce qu'il ait perdu toute odeur ammoniacale, ce qui demande, en général, 3 jours. Filtrer.

Le liquide présente une belle coloration rouge-cerise, mais il prend une odeur nauséabonde, qui ne nuit en rien ni au pouvoir colo-

rant de la solution, ni à sa conservation.

Les coupes colorées au moyen de cette solution sont traitées comme celles au carmin-ammoniaque de Gerlach.

*d) Procédé selon Honegger (32).*

Une autre bonne méthode pour préparer une bonne solution de carmin consiste dans le procédé suivant : Broyer une certaine quantité de carmin très pur dans un mortier de terre ou de porcelaine, avec juste assez de liqueur d'ammoniaque caustique pour que le mélange bien trituré forme une pâte épaisse. Étaler cette pâte sur les parois du mortier, à l'air, et laisser sécher le tout, après avoir eu soin de répartir bien également la pâte de façon à ce que celle-ci ne forme partout qu'une croûte peu épaisse. Lorsque cette croûte sera bien sèche, la broyer de nouveau très à fond, jusqu'à ce que l'on obtienne une poudre tout à fait impalpable. Cette poudre reste exposée à l'air pendant environ 24 heures. Recouvrir le mortier d'une espèce de dais de papier pour empêcher les poussières de souiller le carmin, mais ne pas couvrir. Broyer de nouveau. Prendre ensuite une quantité voulue de cette poudre, la dissoudre à froid dans une certaine quantité d'eau distillée, en préparant ainsi des solutions exactement titrées.

Traitement comme pour la solution de Gerlach.

## II. *Méthode au carmin-borax* (GRENACHER) (30).

Mélanger dans une coupe en porcelaine :

Carmin.....	0 gr. 50
Borax.....	2 gr.
Eau distillée.....	100 —

Chauffer le mélange, en le remuant constamment, jusqu'à ébullition. Tout en remuant le liquide intensivement coloré en rouge-bleu, ajouter goutte à goutte de l'acide acétique dilué (environ 5 0/0), jusqu'à ce qu'il se produise un virage de la couleur et que le liquide présente franchement la coloration ordinaire d'une solution de carmin-ammoniaque.

Laisser reposer le liquide pendant 24 heures, décanté soigneusement sans troubler et filtrer. Pour favoriser la conservation du liquide, ajouter quelques gouttes de phénol.

1° La coupe faite passe dans de l'eau distillée.

2° Puis dans le bain colorant, où elle se teint assez rapidement d'une manière très intensive. La coloration est diffuse cependant, et la coupe serait inutilisable sans traitement complémentaire.

3° Plonger la coupe dans une cupule contenant la solution suivante :

Acide chlorhydrique.....	1 gr.
Acool.....	70 —
Eau distillée.....	30 —

M.

L'effet obtenu dans le bain précédent change à vue d'œil. La coupe rend immédiatement une partie de la couleur qu'elle contenait en excès, en s'enveloppant d'un nuage rouge. Durée de ce bain : 1/2-1 minute.

4° Lavage à l'alcool acidulé :

Acide chlorhydrique.....	1 partie.
Alcool à 70 0/0.....	100 parties.

M.

5° Lavage à fond dans de l'eau distillée.

6° Bain d'alcool absolu.

7° Traitement subséquent à l'essence de girofle et au baume de Canada.

Cette solution colore les noyaux d'une façon intense; mais, sous l'action de l'acide chlorhydrique, le protoplasma des cellules se gonfle et les préparations ne sont pas exactes. En outre, les préparations ne se conservent pas bien. En diluant la solution et en laissant les coupes plus longtemps dans le bain de couleur, on obtient parfois des colorations plus convenables; mais, somme toute, cette méthode ne vaut pas celle au carmin-ammoniaque.

III. *Méthode au carmin-cochenille-alun*  
(CZOKOR) (30).

Mélanger :

Alun.....	} aã 1 partie.
Cochenilles finement pulvérisées.....	
Eau distillée.....	100 parties.



Chauffer et continuer à bouillir jusqu'à réduction de la moitié du volume primitif. Ajouter un peu de phénol. Filtrer.

1° La coupe faite est lavée à l'eau distillée.

2° Elle passe pour 24 heures dans le bain colorant.

3° Lavage à l'eau distillée.

4° Bain de déshydratisation.

5° Traitement comme plus haut, essence de girofle, Canada.

L'action colorante de cette solution est à peu de chose près la même que celle du carmin-alun. Les cellules et les cylindraxes sont assez nettement colorés; les premières présentent une teinte plutôt violette, les seconds plutôt rougeâtre.

#### IV. *Méthode au carmin-alun* (GRENACIER) (30).

Préparer une solution faible et une solution forte.

Pour la première, prenez 1 gramme, pour la seconde 2 grammes de carmin; ajouter pour chaque solution :

D'une solution d'alun à 5 0/0.... 100 c. cubes.

Chauffer; laisser bouillonner pendant 20 minutes; continuer à tenir sur la flamme, sans ébullition nouvelle, pendant 1/2-1 heure. Laisser refroidir. Filtrer.

1° La coupe faite est lavée à l'eau distillée.

2° Immersion d'environ 2 heures dans le bain

colorant. Lorsque la solution est diluée, le bain durera plus longtemps.

3° Bain d'eau distillée.

4° Bain de déshydratisation.

5° Essence de girofle et Canada.

Les cellules, mais plus particulièrement les noyaux, sont colorées en rouge-violet.

V. *Méthode au carmin-uranium* (SCHMAUS) (31).

Cette méthode se prête avant tout aux pièces qui auront été enrobées à la celloïdine, que cette solution ne colore pas.

Les pièces destinées à cette coloration doivent avoir durci dans le liquide de Müller. Les résultats qu'elle fournit au point de vue de la coloration des cylindraxes sont bons.

Broyer dans un mortier :

Carbonate de carmin..... 1 gr.

Avec :

Nitrate d'uranium..... 1/2 gr.

Ajouter :

Eau distillée..... 100 gr.

Mélanger intimement et porter le tout sur le feu.

Chauffer pendant 1/2 heure. Laisser refroidir. Filtrer.

1° La coupe faite est lavée à l'eau distillée.

2° Bain colorant; durée : 15-20 minutes.

3° Lavage à l'eau distillée.

4° Bain d'alcool.

5° Essence de girofle et Canada.

### VI. *Méthode au carmin-lithine* (ORTH) (30).

Dissoudre :

Carmin.....	2 parties 1/2
Dans solution aqueuse saturée de carbonate de lithine .....	100 —

M.

1° La coupe passe dans de l'eau distillée.

2° Puis dans le bain colorant, où elle ne reste immergée que 2-3 minutes.

3° Laver la coupe pendant 1/2-1 minute dans l'alcool suivant :

Acide chlorhydrique....	1 partie.
Alcool à 70 0/0.....	100 parties.

4° Lavage soigneux dans de l'eau distillée.

5° Bain d'alcool. Essence de girofle, Canada.

La méthode est simple. Les coupes ne sont pas surcolorées, puisque, au moyen d'un bain un peu plus prolongé dans l'alcool acidifié, on peut faire disparaître l'excès de couleur. Sur des préparations obtenues ainsi, il faudra tenir compte de l'action exercée sur les éléments nerveux par l'acide chlorhydrique. En ajoutant à la solution lithino-carminée 2-3 parties d'une solution saturée d'acide picrique, on obtient une solution pico-lithino-carminée qui, employée comme la solution pico-carminée, permet une coloration double des éléments.

VII. *Méthodes au picro-carmin.*

a. *Selon Ranvier (30).*

Faire la solution suivante de carmin-ammoniaque :

Carmin .....	} aa 1 gr.
Ammoniaque .....	
Eau distillée.....	50 —

M.

Prendre de cette solution : 1 partie; y ajouter lentement et en remuant continuellement le mélange, tout d'abord par petites quantités, puis goutte à goutte, 2 à 4 parties d'une solution saturée d'acide picrique, et ce jusqu'à ce que le précipité qui se sera formé au début de l'opération et qui disparaît de nouveau lorsqu'on agite le liquide ne se dissolve plus en agitant la solution. Plus la quantité d'ammoniaque sera grande, plus il faudra ajouter de solution picrique. Filtrer et ajouter 2-3 gouttes de phénol par 100 centimètres cubes de solution. Si le liquide se trouble dans la suite, ajouter une ou deux gouttes d'ammoniaque; cela suffira pour clarifier de nouveau la solution, qui est d'un emploi très pratique. Le liquide produit, après un temps plus ou moins long (quelques minutes d'immersion suffisent quelquefois), une coloration double de la coupe qu'on veut colorer ainsi. Les noyaux se colorent en rouge vif, les substances protoplasmiques en jaune plus ou moins intense, les

substances du tissu conjonctif en rose pâle.

Cette différence dans la coloration s'accroît encore lorsque, après le bain de couleur, on passe la coupe dans de la glycérine acidifiée :

Acide chlorhydrique.....	1 gr.
Glycérine.....	100 —

M.

La solution picro-carminée colore particulièrement vite et énergiquement lorsqu'elle contient encore un peu d'ammoniaque libre, et, dans ce cas, c'est la coloration rouge qui domine.

Sous l'influence du bain de glycérine acidifiée, la matière colorante rouge est éliminée (plus ou moins) des substances protoplasmique et intermédiaire, de sorte que c'est alors la coloration jaune de l'acide picrique qui prévaut; mais, en même temps, la matière colorante rouge se fixe dans les noyaux. Il faut remarquer, en outre, que la coloration rouge est stable; que la coloration jaune, par contre, disparaît plus ou moins promptement. Pour conserver cette coloration jaune dans les préparations traitées par cette méthode, il est bon d'ajouter aux liquides employés une certaine quantité d'acide picrique, de façon à colorer ces liquides en jaune.

Pour ne pas faire de répétitions, nous indiquons ce procédé spécial, ainsi que le traitement subséquent des coupes colorées de cette façon, sous la rubrique suivante :

*b. Selon Stöhr (2).*

Préparer la solution qui suit :

Eau distillée .....	50 c. cubes.
Liqueur d'ammoniaque caustique.....	5 —

Mélanger et remuer avec une baguette de verre. Tout en remuant le liquide, ajouter :

Carmin.....	1 gr.
-------------	-------

Continuer à remuer jusqu'à dissolution du carmin. La solution obtenue, ajouter :

D'une solution aqueuse saturée d'acide picri- que.....	50 c. cubes.
--------------------------------------------------------------	--------------

M.

Laisser le tout à l'air dans un récipient à large ouverture, pendant 2 jours environ, en tous les cas jusqu'à évaporation complète de l'ammoniaque ; puis filtrer.

1° La coupe est lavée à l'eau distillée.

2° Immersion dans le bain de couleur. Durée du bain : 1 heure en moyenne.

3° Lavage dans de la glycérine acidifiée (acide chlorhydrique) à 1 0/0 et colorée en jaune par addition d'un peu d'acide picrique. Durée du lavage : 1/2 heure.

4° Lavage durant 5 minutes à l'eau distillée colorée en jaune avec de l'acide picrique.

5° Bain d'alcool absolu jauni au moyen d'une quantité d'acide picrique.

6° Essence de girofle.

7° Canada.

En jaunissant ces liquides, les éléments protoplasmiques restent colorés en jaune, le tissu conjonctif en rouge (rose), les noyaux sont franchement rouges, quelquefois brun rouge. Les tissus ayant subi la dégénérescence hyaline ou colloïde prennent également une teinte jaune. L'essentiel pour appliquer ce procédé est d'avoir à sa disposition de l'acide picrique très pur ou une solution picro-carminée parfaitement sûre.

Les méthodes que nous venons d'indiquer ne conviennent guère que pour la coloration des coupes isolées. Pour les séries, on n'emploiera guère que celles au carmin-ammoniac. Nous répétons qu'une coloration, pour être bonne, doit se produire lentement; cependant, lorsqu'on est pressé ou qu'il s'agit de n'examiner que quelques coupes, on peut activer l'acte de la coloration en transportant le récipient qui contient le bain colorant dans une étuve à une température ne dépassant pas 35-40° C. (couvrir le récipient). La couleur mord plus rapidement. La quantité de couleur employée ne sera pas versée de nouveau dans le flacon qui la contenait.

*Henle et Merckel* (33) ont conseillé le procédé suivant, pour activer la coloration au carmin :

1° La coupe est lavée à l'eau distillée.

2° Puis, pendant 10 minutes, elle est immergée dans une solution de chlorure de palladium à 1/500. En sortant de ce bain, la coupe

est colorée vivement en jaune et passe telle quelle dans :

3° La solution carminée. Peu de minutes après son immersion dans la couleur, elle est colorée en rouge vif.

4° Lavages répétés à l'eau distillée.

5° Bain de déshydratisation. Essence de girofle, Canada. Les gaines à myéline sont jaunes ; la névroglie, les cellules nerveuses sont colorées en rouge.

La coloration rouge, plus ou moins diffuse, de la névroglie est quelquefois gênante dans les préparations colorées au carmin. Pour remédier à cet inconvénient, Ranvier a proposé le procédé suivant :

Après le bain de carmin, les coupes passent dans le mélange qui suit :

Acide formique.....	1 partie.
Alcool.....	2 parties.

M.

Elles y séjournent de 5 à 10 heures.

Nous procédons pour nos coupes ainsi : nous lavons la coupe à l'eau distillée après le bain de carmin, mais rapidement, pour enlever l'excès de couleur, et la laissons pour 2-3 heures dans le mélange d'acide formique, sur quoi nous la traitons par l'alcool.

Les cellules, mais surtout les cylindraxes, sont nettement, proprement, différenciées les unes des autres ; belle coloration rouge ; les gaines sont limpides, parfaitement incolores ; les préparations plaisent à l'œil.



VIII. *Méthode de coloration double  
de M. Duval (1).*

Les pièces auront durci dans une solution de bichromate de potasse.

1° La coupe est lavée à l'eau distillée.

2° Elle est colorée au carmin suivant la méthode n° I.

3° Premier bain d'alcool à 36 degrés.

4° Second bain d'alcool absolu.

5° La coupe passe pour 5-20 minutes dans une solution alcoolique de bleu d'aniline (bleu d'aniline soluble dans l'alcool) peu chargée (10 gouttes d'une solution saturée dans 10 grammes d'alcool absolu).

6° Au sortir de ce bain, la coupe est immergée dans de la térébenthine, puis elle est montée au baume de Canada ou au Damar.

Les préparations présentent une belle couleur violette qui paraît à première vue trop sombre, mais qui présente à l'examen microscopique une extrême transparence.

Les contours des cylindraxes et des cellules sont nettement perçus. Les cellules nerveuses et leurs prolongements sont d'un violet virant sur le rouge; le carmin domine. Les vaisseaux sont d'un violet virant sur le bleu; l'aniline prévaut. Les capillaires sont bien visibles et distincts. Les enveloppes de la moelle, ainsi que les prolongements du tissu lamineux se colorent en bleu presque pur, de sorte qu'il

est très facile de les distinguer des parties nerveuses proprement dites (1).

Ces couleurs passent malheureusement assez vite, le bleu surtout.

### IX. *Méthode au carmin acide de Zuppinger.*

Nous devons à l'obligeance de M. le Dr Zuppinger (à Elgg-Zurich), qui s'est fait remarquer par ses travaux microscopiques très réussis, exécutés dans le laboratoire de notre asile, la communication des deux méthodes de coloration inédites qu'il nous autorise à publier. La première a trait à l'emploi du carmin acide, la seconde, qui sera décrite plus loin, de l'aniline-bleu.

Les coupes à traiter suivant Zuppinger doivent provenir de pièces durcies dans de l'alcool ordinaire ; elles peuvent y avoir séjourné très longtemps (jusqu'à trois ans). La grosseur des pièces n'influence en rien l'acte du durcissement.

1° La coupe faite passe dans de l'eau distillée pendant environ 12-24 heures (en général pour une nuit).

2° On l'immerge dans la couleur, qu'on aura préparée de la façon suivante : on ajoute à une quantité donnée de carmin-ammoniaque suffisamment d'acide acétique, et goutte à goutte, en agitant le mélange, pour que le reflet bleuâtre du carmin-ammoniaque disparaisse et fasse place à un reflet ou ton jaune ou jaunâtre. C'est affaire de coup d'œil. La couleur

rouge diminue en même temps d'intensité et pâlit. On laisse reposer et l'on filtre.

Cette solution ne colore que lentement. Il faut, par conséquent, laisser les coupes le temps voulu dans le bain.

3° Le degré de coloration désiré est-il obtenu (les coupes ne pâliront pas dans le bain de déshydratation), on lave la coupe à l'eau distillée, faiblement acidifiée par de l'acide acétique.

4° Bain d'alcool absolu.

5° Éclaircissement à la térébenthine.

6° Monter au Canada. Couvre-objet.

Les cellules nerveuses sont colorées en rouge, les noyaux un peu plus intensivement que le corps même de la cellule; les cylindraxes se détachent nettement des gaines, qui sont tout à fait incolores. Le tissu conjonctif n'est que faiblement teint. Les préparations se conservent très bien, mais elles n'ont pas, selon nous, la netteté des images obtenues par l'aniline-bleu.

#### B. — MÉTHODES AUX COULEURS D'ANILINE, ETC.

Outre les procédés au carmin que nous venons de mentionner pour la coloration des cellules et des cylindraxes, on a essayé des combinaisons de cet agent avec les réactifs les plus variés: acide borique, osmium, phénol, etc., et quantité d'autres matières tinctoriales.

Tout ce qui possède un pouvoir colorant quelconque a été mis à contribution, au reste,

pour colorer les coupes du S. N. C. : safran, thé, myrtilles, café, bains de sureau, nous en passons, mais sans grand succès. La plupart des couleurs d'aniline aussi ont fourni autant de méthodes nouvelles ; mais la fixité de ces couleurs sur les éléments nerveux étant, en général, assez incomplète, il a fallu, après de nombreux essais, élaborer pour chaque couleur à peu près une technique spéciale pour arriver à des résultats satisfaisants. Parmi ces couleurs, il en est quelques-unes qui sont actuellement employées avec succès pour la coloration des cellules et des cylindraxes ; cependant, les résultats que donnent ces nouveaux procédés sont, en somme, la nigrosine et l'aniline blue-black exceptés, moins constants que ceux que nous devons au carmin, tout au moins pour de longues séries de coupes. Telles la fuchsine, la safranine, le brun-vésuvine, le lilas de Dahlia, le rouge de Magenta, le bleu de méthylène, etc.

*Hermann* avait, il y a quelques années déjà (*in* 27), indiqué une méthode d'imprégnation par la fuchsine, qui avait donné de bonnes images de noyaux et particulièrement des nucléoles ; sur cette méthode se sont greffés dans la suite les procédés actuellement employés, dans lesquels figure cette couleur. *Benczur* (*in* 5) avait proposé une solution concentrée d'alizarine dans de l'alcool, dans laquelle la coloration des éléments nerveux devait se faire assez bien. *Duval* (*in* 5) a préconisé l'emploi de la purpurine, comme ayant

une électivité spéciale pour les éléments nerveux, en particulier de la moelle durcie au bichromate d'ammoniaque. Les cellules nerveuses et leurs prolongements demeureraient incolores, de même que les fibrilles du tissu conjonctif; mais les noyaux de la névroglie se coloraient en rouge. *Griesbach* (5) recommanda le vert d'iode en solution aqueuse d'environ 1/20/0. La coloration se fait, paraît-il, rapidement. On lave à l'eau, on passe par des alcools de plus en plus concentrés et on monte au baume de Canada. La coloration des cellules et des cylindraxes est bonne. Durcissement au bichromate de potasse. Les bains prolongés ne détruisent pas la couleur. *Ehrlich* (34) a proposé une méthode qui a fait époque et école, en employant le bleu de méthylène, mais principalement sur les tissus vivants. Malheureusement, les préparations obtenues ne se conservent pas bien. D'autres auteurs ont préconisé le vert de méthylène, l'éosine, etc.; consulter sur ce sujet : *Apathy* (26), *Hermann* (3), *Bolles-Lee* et *Henneguy* (5), *Edinger* (72) et le recueil des numéros de 1890-93 de la *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, de même que les numéros des mêmes années du *Neurologisches Centralblatt*.

Force nous a été de faire un choix parmi toutes ces couleurs, c'est-à-dire de ces méthodes et de nous en tenir à celles qui sont d'un emploi courant et dont les résultats sont fixes dans la coloration des séries de coupes.

Les couleurs d'aniline, qui, au point de vue

de la manière dont on les emploie et des images qu'elles donnent, se rapprochent le plus de la coloration au carmin, sont l'aniline blue-black et la nigrosine (avec un durcissement à l'alcool, l'aniline-bleu). L'aniline blue-black et la nigrosine ont été recommandées il y a longtemps déjà par les Anglais, et préconisées ensuite par *Luys* (noir de Colin), par *Gaule* (nigrosine) et d'autres. *Martinotti*, *Forel*, *Gierke*, etc., les trouvent inférieures au carmin.

Ces couleurs ont donné de beaux résultats à *Seguin*, de New-York, à *Vejas*, dans le laboratoire de notre asile ; aussi consignerons-nous, après avoir indiqué les méthodes de *Jelgersma* et de *Schmaus* à l'aniline blue-black, la méthode à la nigrosine telle que nous l'avons employée jusqu'ici pour nos séries, en la faisant suivre du procédé de *Bewan-Lewis*, qui, avec *Sankey*, a été le promoteur de la coloration nigrosinique. *Martinotti* a associé à la nigrosine l'acide picrique, principalement pour les altérations pathologiques.

Les méthodes aux couleurs d'aniline destinées à la coloration des gaines à myéline ou des cellules et des gaines sont indiquées au chapitre VII.

#### X. Méthodes à l'aniline blue-black.

##### a) Selon *Jelgersma* (35).

Les principaux avantages de la méthode

consistent en ce que les préparations ainsi obtenues se conservent très longtemps. L'aniline blue-black ne colore presque pas ou pas du tout le tissu conjonctif et la névroglie. Elle colore particulièrement bien les cellules et les cylindraxes. Les cellules apparaissent en bleu clair, le noyau et le nucléole colorés plus fortement en bleu foncé. L'écorce cérébrale et celle du cervelet se laissent très joliment teindre; les cellules pyramidales et celles dites de Purkinje se colorent d'une façon très nette. Sur des pièces pathologiques, on peut suivre ainsi les altérations qu'ont subies les éléments et les modifications que présentent les cellules ganglionnaires; les gaines restent incolores. La méthode de coloration est simple. On prépare des solutions aqueuses à titre différent : une solution à 1/100, une autre à 1/800-1000, une autre à 1/2000.

Nous n'employons que les solutions très diluées, mais nous donnons des bains plus longs.

1° La coupe est lavée à l'eau distillée.

2° Elle passe dans le bain colorant; elle y séjourne, suivant Jelgersma : pour la solution *forte*, 1/4 d'heure; *moyenne*, 5 heures; *faible*, 12 heures.

3° Lavage à l'eau distillée.

4° Bain d'alcool.

5° Essence de girofle.

6° Canada.

C'est, en somme, le traitement des coupes colorées au carmin. Les préparations colorées

à l'aniline blue-black sont moins fatigantes à la longue à l'examen microscopique que les premières.

Cette méthode réussit aussi bien sur les coupes élaborées au microtome de Gudden que sur celles qui proviennent de blocs celloïdés.

Dans le traitement des coupes ainsi colorées nous avons souvent remplacé le lavage à l'eau distillée par un bain d'alcool à 40 0/0, additionné d'un peu d'acide acétique, jusqu'à ce que la coupe ne rende plus de couleur.

*b) Selon Schmaus.*

Après différents essais, l'auteur est arrivé à recommander le procédé suivant :

Au lieu d'une solution aqueuse, il emploie une solution alcoolique à 1/4 0/0. L'alcool lui-même est à 50 0/0, auquel il ajoute une certaine quantité d'acide picrique.

1° La coupe faite est lavée à l'eau distillée.

2° Bain colorant; durée : 1 heure.

3° Lavage à l'eau distillée.

4° Bain d'alcool.

5° Essence de girofle.

6° Canada.

Le grand avantage de cette méthode consiste en ceci : qu'on peut colorer ainsi des coupes provenant de pièces ayant trempé dans la solution cuprique de Weigert.

Les plaques collodionnées selon Weigert peuvent être traitées suivant l'une ou l'autre



de ces méthodes de coloration. Il vaut mieux cependant découper alors chaque coupe (dans le bain colorant) et la traiter ensuite à part.

L'essentiel pour ces deux méthodes est de n'employer que de l'aniline blue-black anglaise; les autres couleurs similaires ne sont pas sûres.

En vue d'obtenir une coloration double, nous avons traité des coupes colorées et décolorées selon Pal par l'aniline blue-black. Il faut alors décolorer fortement dans le liquide oxalique pour que tout ce qui n'est pas gaines soit parfaitement incolore. Les cellules se colorent alors en bleu et l'on obtient ainsi des images noires et bleues, qui sont, quoique originales, encore assez présentables.

## XI. *Méthode à la nigrosine ou noir d'aniline.*

### *a) Méthode de notre laboratoire.*

Faire deux solutions, l'une à 1/000, l'autre à 2/000 d'eau distillée.

La procédure de coloration est exactement la même que pour le carmin-ammoniaque.

1° Lavage de la coupe à l'eau distillée.

2° Bain de couleur; durée : de 18-24 heures, suivant l'épaisseur de la coupe, la nature de la pièce, la réceptivité des tissus, la dilution de la solution. Nous préférons la solution à 1/000 et laissons, en général, la coupe pendant 24 heures dans le bain. Une solution diluée donne

aux coupes une teinte plutôt bleue ; une solution chargée, une teinte plutôt noire.

3° Lavage à l'eau distillée et à l'eau acidifiée (Voir carmin-ammoniaque).

4° Bain d'alcool.

5° Essence de girofle et Canada.

Ce qui précède concerne les pièces détergées et coupées sous l'eau.

Les coupes celloïdées sont lavées après la couleur dans de l'alcool à 40 0/0, acidifié, comme dans la méthode de Schmaus, et déshydratées dans de l'alcool à 96 0/0.

Nous colorons la plupart de nos longues séries de coupes en colorant, de deux coupes, l'une au carmin-ammoniaque, l'autre à la nigrosine, la procédure étant la même pour les deux modes de coloration. Nous obtenons ainsi des images alternativement rouges et bleues, ce qui, pour l'étude de nombreuses coupes successivement examinées, repose les yeux. La nigrosine se comporte, à l'égard des éléments nerveux, comme l'aniline blue-black. L'essence de girofle décolore parfois les coupes traitées par l'alcool ; il faut alors la remplacer, pour l'éclaircissement, par l'huile d'origan. Les solutions se conservent longtemps ; elles se bonifient lorsqu'on les filtre souvent. Dans les cas de dégénérescence, les territoires atteints ne sont pas colorés et frappent de suite les regards. Pour l'étude histologique des éléments, nous donnons la préférence au carmin.

*b) Selon Bewan-Lewis (5).*

1° La coupe est colorée dans une solution aqueuse à 0,25 0/0, pendant 1 heure.

2° Lavage à l'alcool.

3° Essence de girofle ; lorsqu'il s'agit de coupes du cerveau ou de la moelle.

Pour les coupes de substance corticale du cervelet :

1° Colorer comme il est dit plus haut.

2° Décolorer pendant 20-30 minutes dans une solution de chloral à 2 0/0.

3° Traiter par un mélange à parties égales d'essence de girofle et d'une solution à 2 0/0 de chloral, auquel on ajoute assez d'alcool pour avoir une solution claire.

4° Laver à l'alcool.

5° Essence de girofle.

6° Canada (5).

*c) Selon Martinotti, à la picro-nigrosine (5).*

*Durcissement ad libitum.*

1° Bain de couleur dans le liquide suivant : solution de nigrosine et d'acide picrique à saturation dans de l'alcool (décantée).

Durée du bain : 2-3 heures à 2-3 jours.

2° Lavage à l'alcool.

3° Décolorer dans un mélange de : 1 partie d'acide formique et 2 parties d'alcool, jusqu'à

ce que les substances grise et blanche apparaissent clairement différenciées à l'œil nu.

4° Bain d'alcool.

5° Essence de bergamote.

6° Canada.

L'auteur prétend que cette méthode réussit même avec des matériaux réfractaires à d'autres procédés de coloration.

## XII. *Méthode de Zuppinger à l'aniline-bleu.*

Lors des nombreux essais de coloration par les couleurs d'aniline entrepris, dans le temps, par cet auteur dans le laboratoire de l'asile, Zuppinger était arrivé à se convaincre que, très spécialement pour les couleurs d'aniline-bleu, il était préférable de durcir les pièces à l'alcool, ces couleurs n'ayant que peu ou pas d'électivité pour les tissus durcis par les liquides chromiques. Les magnifiques coupes de Zuppinger colorées par sa méthode provenaient de pièces ayant séjourné près de trois ans dans de l'alcool ordinaire. Elles ont été faites il y a vingt ans et se sont conservées aussi belles qu'elles l'étaient alors; les images des cellules et des cylindraxes sont très nettes et soutiennent la comparaison avec les meilleures de notre collection, obtenues par d'autres méthodes, le carmin y compris.

Les coupes colorées dans une solution aqueuse d'aniline-bleu, sans autre procédé complémentaire, perdent leur couleur dans le

bain de déshydratisation et pendant l'acte de l'éclaircissement, si bien que, lorsqu'on les monte, on n'a que des images troubles, décolorées ou très inégalement colorées. Les anilines-bleus solubles dans l'eau semblent se prêter moins à la coloration complète des éléments que celles qui ne sont solubles que dans l'alcool.

Le traitement par les bases ne leur convient pas; celui par les acides, par contre, réalise la fixation désirée de la plus belle couleur bleue qu'on puisse se représenter.

La couleur employée par Zuppinger est le chlorure de triphénylrosaniline (bleu de Lyon), qui, au moment où l'auteur s'en servait, était largement utilisé pour la teinture des soies, mais qui, depuis, a été remplacé dans l'industrie par le bleu de toluidine ou de Parme (*Licht blau*), et au moyen duquel on n'obtient pas, pour les éléments nerveux, des résultats aussi satisfaisants. Le premier est soluble dans l'alcool, insoluble dans l'eau; le second est soluble dans l'eau. Celui-là a une teinte pure de bleu, celui-ci un reflet plutôt verdâtre.

L'essentiel pour la coloration des éléments nerveux est d'avoir un bleu d'aniline présentant les caractères du chlorure de triphénylrosaniline dont voici la formule :  $C_{20} H_{16} (C_6H_5)_3 N_3 HCl$ .

Pour préparer la solution colorante, on prend une pointe à couteau de couleur (2-3 grammes) pour 1/2 litre d'eau distillée. Agiter le tout dans un ballon. Chauffer jusqu'à ébullition, en

agitant de temps en temps. Au moment où le liquide commence à bouillonner, on ajoute goutte à goutte une quantité suffisante d'une solution d'acide sulfurique à 10 0/0 :

Acide sulfurique à 66° de	
Baumé.....	1 partie.
Eau.....	9 parties.

M.

jusqu'à ce que le mélange prenne exactement la couleur du liquide de Fehling (sulfate de cuivre). Le liquide ne doit bouillir que peu de temps, car plus on fait bouillir, plus la solution colorante sera chargée en couleur. Les coupes sont, au reste, toujours plutôt trop que trop peu colorées. On laisse refroidir, puis l'on filtre ou l'on décante soigneusement. La solution ainsi obtenue est conservée dans une bouteille fermée au bouchon et que l'on tiendra à l'abri de la lumière. Elle se conservera très longtemps.

1° La coupe faite est lavée à l'eau distillée.

2° Elle passe dans la couleur le temps voulu pour acquérir le degré de coloration plus ou moins intense qu'on se propose de lui donner, en se rappelant toutefois que la couleur pâlira toujours un peu plus, un peu moins, dans le bain subséquent d'alcool.

3° Lavage dans l'eau acidifiée par quelques gouttes d'acide acétique.

4° Bain de déshydratisation (alcool absolu).

5° La transparence s'obtient au moyen de l'essence de térébenthine ou de la créosote

6° On monte au baume de Canada. Couvrebjet.

Sur des préparations obtenues ainsi, les gaines sont incolores, les cellules et leurs prolongements les plus fins et les noyaux, colorés en un bleu vif d'un effet surprenant, sur le fond blanc nacré des gaines.

Ces préparations se conservent très bien, même à la lumière; elles pâlissent un peu, mais ne se présentent que mieux pour cela, étant, au début, plutôt trop intensivement colorées.

Cette méthode est inédite; la description qu'en donnent Bolles-Lee et Henneguy (page 368 de leur traité) repose sur une erreur.

### XIII. *Méthode au brun-vésuvine.*

On peut faire deux espèces de solutions. L'une, aqueuse, doit être saturée (environ 3-4 0/0) et être préparée au moyen d'eau distillée qu'on fera bouillir au moment du mélange avec le brun de Bismark; laisser refroidir. Filtrer.

La seconde sera alcoolique, également concentrée. Dissoudre environ 2-2 1/2 0/0 de couleur dans de l'alcool à 40 0/0.

1° La coupe faite passe à l'eau distillée.

2° Bain colorant d'environ 5 minutes de durée.

3° Lavage des coupes à l'alcool à 95 0/0 ou à l'alcool acidifié.

Alcool absolu..... 100 parties.  
 Acide chlorhydrique.... 1 partie.

M.

4° Bain dans de l'alcool absolu.

5° Essence de girofle.

6° Baume de Canada. Couvre-objet.

*Von Kahliden* recommande d'employer les deux solutions de la même manière. Une surcoloration des coupes n'est pas à redouter. Les noyaux sont colorés en brun foncé; le protoplasma plutôt en brun clair. La coloration est quelquefois diffuse. Les préparations obtenues se prêtent remarquablement bien à la photographie (c'est pourquoi nous reproduisons la méthode), mais elles ne se conservent pas longtemps.

#### XIV. *Méthode de Niss'l* (36).

Les pièces qui doivent être traitées suivant cette méthode seront tout à fait fraîches au moment de l'immersion dans le liquide durcissant. Elles seront coupées en morceaux dont chacun ne doit pas avoir plus de 1 centimètre cube. Les petits morceaux passent de suite, sans durcissement préalable, dans une solution chromique dans de l'alcool à 70 0/0.

Au bout de 2 jours, on remplace cet alcool par de l'alcool absolu. Après 5 jours d'immersion dans ce liquide, les petits morceaux peuvent être coupés.

1° La coupe faite passe de suite dans le liquide colorant, représenté par une solution



saturée de fuchsine. Chaque coupe sera traitée à part et dans un verre de montre aussi concave que possible. Dès que la coupe plonge dans le bain colorant, on expose le verre de montre à la flamme d'une lampe à alcool, en plaçant le verre sur un treillis et le tout sur un trépied, plutôt que de tenir le verre avec des pinces. Éviter de placer la lampe trop près du verre. Chauffer jusqu'à dégagement de vapeur sur le liquide.

2° Cela fait, sortir la coupe du bain colorant et la plonger, pour 1-2 minutes, dans un bain d'alcool absolu. Placer la coupe sur un porte-objet.

3° Au sortir de ce bain, recouvrir la coupe d'une abondante quantité d'essence de girofle, qu'on laisse en contact avec la coupe jusqu'à ce que celle-ci ne rende plus de couleur. Égoutter. Nouvelle couche d'essence ; égoutter de nouveau. Essuyer.

4° Monter au Canada.

Cette méthode donne une bonne coloration des cellules et des noyaux. Les gaines de myéline ne sont pas colorées. Les principaux prolongements nerveux apparaissent assez nettement. Les cellules névrogliales et les vaisseaux sont également colorés.

Pour couper, fixer les morceaux avec de la gomme sur un bouchon ; bain d'alcool pour durcir la gomme.

XV. *Méthodes de Rehm* (37).A. — MODIFICATION DE LA MÉTHODE DE NISS'L,  
AU BLEU DE MÉTHYLÈNE.

Durcissement selon Niss'l. Mêmes règles pour le traitement subséquent des pièces.

1° La coupe faite passe de l'alcool où elle avait été recueillie dans une solution de bleu de méthylène à 0,10 0/0, qu'on aura préalablement chauffée. Elle y séjournera 1-1 1/2 minute.

2° Lavage à l'alcool à 96 0/0 jusqu'à ce qu'elle ne rende plus de couleur.

3° Huile d'origan pour la transparence.

4° On transporte alors la coupe au moyen d'une spatule sur le porte-objet. On l'y sèche avec un morceau de papier Josèphe.

5° Puis on monte à la benzocolophane.

Le mélange de benzine et de colophane est à préférer au Canada pour ces colorations, sauf pour la fuchsine et le rouge de Magenta. Pour ces dernières, Rehm se sert d'un mélange de colophane et de chloroforme qui sèche vite et qui ne jaunit pas. Les coupes colorées au bleu de méthylène et décolorées ensuite avec de l'alcool présentant une différence de coloration des cellules nerveuses d'avec les cellules névrogliales; on colore complémentaires ces dernières au moyen d'une solution alcoolique de fuchsine (diamantine) (0,10 de fuchsine pour 100 d'alcool à 96 0/0) et l'on obtient ainsi des images sur lesquelles les deux ordres

de cellules sont colorés différemment et de façon à frapper de suite l'attention. En sortant de l'alcool, la coupe passe rapidement dans de l'essence de girofle. Monter au chloroforme colophané.

La coloration méthylénique doit être faible, celle à la fuchsine intensive.

Les cellules nerveuses sont bleues, ou bleu rougeâtre ; les cellules névrogliales et les noyaux des vaisseaux, rouges. Cette différence dans la coloration ne se produit pas chez les embryons et les animaux nouveau-nés. Sur des pièces normales de l'homme, on ne trouve pas de coloration rouge dans les cellules ganglionnaires. Les petites cellules de la couche profonde du cervelet sont colorées, chez l'homme, le putois, le chat, la souris, en rouge ; les cellules de Purkinje et les autres cellules de l'écorce cérébelleuse, en bleu.

#### B. — POUR LA COLORATION DES CELLULES NÉVROGLIALES ET DES CELLULES DES VAISSEAUX.

a) 1° La coupe faite passe pour quelques minutes dans une solution aqueuse d'éosine à 1 0/0.

2° Lavage à l'eau.

3° Lavage à l'alcool.

4° Bain colorant de quelques minutes dans une solution aqueuse de rouge de dahlia à 0,10 0/0.

5° Bain de différenciation dans de l'alcool.

6° Huile d'origan.

7° Canada chloroformé.

b) 1° Au lieu de donner le bain colorant à l'éosine, on plonge la coupe dans une solution aqueuse de nigrosine à 1 0/0.

2° et 3° Comme ci-dessus.

4° Bain colorant d'une demi-heure dans une solution alcoolique de fuchsine à 0,10 0/0.

5° Différenciation à l'alcool.

6° Essence de girofle.

7° Colophane chloroformée.

Les cellules en question sont colorées en bleu foncé avec l'emploi de la méthode *a* (tout le reste reste rouge) et par la méthode *b* en rouge (le reste apparaît alors coloré en gris-bleu).

C. -- POUR LA COLORATION DES NOYAUX  
DES CELLULES NERVEUSES.

1° La coupe passe pour 5 minutes dans un bain de la solution suivante :

Carmin.....	} à 1 gr.
Liqueur d'ammoniaque caustique	
Eau distillée.....	100 —

M.

2° Lavage dans de l'alcool à 70 0/0, auquel on aura ajouté de l'acide nitrique dans la proportion de 1 0/0.

3° Lavage à l'alcool pur, où la coupe se débarrasse de l'acide.

4° Bain colorant de 1/2 minute dans une solution aqueuse et froide de bleu de méthylène à 0,10 0/0.

5° Différenciation à l'alcool.

6° Huile d'origan.

7° Colophane chloroformée.

Les noyaux des cellules nerveuses se détachent nettement du fond rose pâle du reste de l'image, par une coloration en rouge vif; les fibrilles des noyaux sont très exactement teintées en rouge; le protoplasma du corps des grandes cellules motrices est bleu, celui des petites cellules ganglionnaires est plutôt incolore. Dans les noyaux mêmes, le nucléole est coloré en bleu clair ou en rose. Dans les cellules névrogliales et les cellules des vaisseaux, il ne se produit pas de différence de couleur entre le noyau et le nucléole; ici, tout est bleu ou violet.

#### D. — POUR LA COLORATION DES CYLINDRAXES.

1° La coupe, après avoir été recueillie dans de l'alcool, passe dans le bain d'une solution aqueuse d'hématoxyline à 0,50 0/0. Durée du bain : 1-2 jours.

2° Lavage à l'eau distillée additionnée de carbonate de lithine (pour 100 grammes d'eau, ajouter 1 gramme d'une solution concentrée de carbonate de lithine) et ce jusqu'à ce que la coupe ne rende plus de couleur.

3° Différenciation à l'alcool à 96 0/0.

## 4° Huile d'origan.

Les cylindraxes sont colorés en gris-noir, le tissu névroglie est peu apparent, les vaisseaux sont simplement indiqués.

Si on laisse la coupe un jour seulement dans la solution hématoxylinique et qu'on différencie ainsi qu'il est dit, qu'on la transporte ensuite pour quelques minutes dans une solution de brun-vésuvine (brun de Bismark) à 0,10 0/0, on obtient de très belles images; les cylindraxes sont gris, toutes les cellules sont colorées en brun, les noyaux des cellules nerveuses en gris.

## CHAPITRE VI

### Coloration des gaines à myéline.

(II<sup>e</sup> groupe).

#### A. — MÉTHODES A BASE D'HÉMATOXYLINE.

##### XVI. *Méthodes de Weigert.*

a) *Méthode primitive fondamentale.* — La pièce doit durcir dans le liquide de Müller ; puis, sans avoir été mise en contact et en quelque manière que ce soit avec de l'eau, elle passe dans de l'alcool ordinaire, pour y subir le durcissement complémentaire. En sortant de l'alcool, et toujours sans avoir été lavée à l'eau, elle est enrobée à la celloïdine. Le bloc plongera dans de l'alcool à 80 0/0. De là, il passe dans la solution suivante :

Solution saturée d'acé-	} Volumes égaux.
tate neutre de cuivre.	
Eau distillée.....	

M.

Le récipient qui contient le tout est placé dans une étuve à une température de 35-45° C. Il y reste pendant 1-2 jours ; ce temps écoulé, le bloc est plongé de nouveau dans de l'alcool à 70-80 0/0. Il est prêt à être coupé. La lame du microtome et la surface de coupe seront mouillés avec de l'alcool à 80 0/0.

1° La coupe faite passe dans la solution colorante suivante :

Hématoxyline.....	1 partie.
Alcool.....	10 parties.
Eau distillée.....	10 —

M.

La solution n'est bonne que 10-15 jours après sa préparation. En ajoutant à ce liquide 1 partie d'une solution saturée de carbonate de lithine préparée à froid, on hâte le pouvoir colorant de l'hématoxyline, on mûrit la solution. La coupe reste immergée dans le bain colorant pendant 2-24 heures, suivant le degré d'intensité qu'on désire donner à la coloration, suivant l'épaisseur de la coupe et la nature de la pièce. Les coupes de la moelle spinale y séjourneront moins longtemps que celles de l'écorce cérébrale ou cérébelleuse.

2° La coupe, qui dans ce bain est devenue parfaitement noire, est lavée dans de l'eau distillée qu'on renouvellera deux ou trois fois.

3° Elle passe ensuite dans le liquide de réduction :



Borax .....	2 ou 4 parties.
Ferricyanure de potassium .....	2-5 ou 5 —
Eau distillée .....	100 ou 200 —

M.

La coupe reste dans ce bain jusqu'à ce que la différenciation entre les substances grise et blanche soit nettement produite. Les fibres à myéline doivent se détacher franchement par leur couleur bleue, noire, du fond brun ou brunâtre ; parfois, la substance grise apparaît colorée en jaune. La durée de ce bain est difficile à fixer ; elle varie suivant la nature de la pièce et peut exiger, suivant les cas, de 1/4 d'heure à 24 heures d'immersion.

4° La différenciation obtenue, laver la coupe à l'eau distillée.

5° Bain d'alcool absolu.

6° Éclaircir avec l'huile d'origan ou laver au xylol.

7° Monter au xylol-Canada. Couvere-objet.

*Weigert* a modifié les derniers actes pour les plaques collodionnées.

Lorsque les bandelettes taillées dans la pellicule ont été fixées sur un porte-objet et qu'elles ont passé par le bain de déshydratation, on les baigne dans du carbol-xylol :

Xylol .....	3 parties.
Acide carbolique pur, mais liquéfié .....	1 partie.

M.

Les morceaux de pellicule s'y éclaircissent

rapidement. La transparence obtenue, on égoutte et on sèche les coupes en appliquant sur le porte-objet un morceau de papier Josèphe (1 feuille pliée en 4) et en passant légèrement la main par-dessus le tout. On monte ensuite au Canada qui sera plutôt un peu épais. Le carbol-xylol qui a servi est versé de nouveau dans son flacon et peut servir plusieurs fois encore.

La solution d'hématoxyline est formulée actuellement, d'après *Weigert*, ainsi :

Hématoxyline.....	1 gr.
Alcool absolu.....	10 —
Solution concentrée de carbonate de lithine.....	1 c. cube.
Eau distillée.....	90 gr.

M.

Les pièces durcies dans le liquide de Müller et destinées à être traitées par cette méthode doivent présenter une coloration brune ou brunâtre ; elles ne doivent pas avoir été verdies par l'alcool.

La durée du bain d'hématoxyline est, avon-nous dit, très variable. On lit, dans quelques auteurs, que des coupes de la moelle s'y colorent déjà après 15-30 minutes, mais il est prudent de les y laisser au moins quelques heures ; en les sortant trop tôt, on s'expose à n'avoir qu'une partie des gaines colorées, ce qui exposerait à des erreurs d'interprétation des images. Les gaines à myéline sont colorées en noir-bleu, les parties dégénérées ne sont pas colo-

rées et font tache en proportion du nombre des fibres détruites. Quelques parcelles de myéline, derniers vestiges des fibres nerveuses détruites, se colorent cependant encore par-ci par-là.

Il arrive que des coupes, surtout lorsqu'elles sont épaisses, ne se décolorent pas convenablement, malgré un bain prolongé dans le liquide de réduction; on peut, dans ces cas, activer la décoloration en plaçant la coupe de nouveau dans de l'alcool pour 24 heures, pour l'immerger de nouveau dans le liquide réductif ou différentiel, ce qui peut se répéter quelquefois de suite.

Comme les coupes de pièces ayant séjourné dans la solution cuprique ne peuvent pas être employées pour une coloration subséquente (double) au carmin, et qu'il est agréable d'avoir dans une série des coupes présentant des colorations de cellules, on a proposé de couper avant l'immersion du bloc dans le bain cuprique et de ne traiter par ce dernier liquide que les coupes destinées à être colorées d'après Weigert. Le séjour de ces coupes dans le bain cuprique sera, dans ces cas, de très courte durée, et après ce bain elles devront passer par un bain d'alcool à 70 0/0 avant d'être immergées dans le liquide colorant.

On a proposé également, pour avoir des coupes à images de cellules et à gaines colorées, de passer les coupes faites dans l'eau dans la solution cuprique de Weigert, puis dans de l'alcool à 80 0/0 et de les laisser long-

temps dans l'hématoxyline. La méthode de Weigert doit être suivie rigoureusement pour donner des résultats satisfaisants. Si la pièce à traiter avait par mégarde passé par l'eau après son durcissement, il faudrait la plonger de nouveau pour quelques jours dans le liquide de Müller avant de la transporter dans l'alcool. Lorsqu'on n'a pas de carbol-xylol sous la main et qu'on emploie l'huile d'origan pour l'éclaircissement, il faut éviter de laisser la coupe longtemps en contact avec l'huile : il en résulterait une décoloration partielle.

La transparence obtenue, rapidement monter au Canada. Une pellicule collodionnée passe exactement par les mêmes phases de manipulations qu'une coupe isolée.

*b) Méthode modifiée, rapide.* — Weigert a modifié sa méthode première pour éviter les précipités qui se produisent dans le traitement par le cuivre et qui abiment le couteau. Cette modification permet, en outre, d'éviter le bain de différenciation lorsque les coupes sont très fines (jusqu'à 1/40<sup>e</sup> de millimètre) et qu'on modifie, en outre, légèrement le liquide colorant.

La pièce convenablement durcie aux sels de chrome est enrobée dans la celloïdine et forme bloc sur un bouchon. Le bloc passe dans le liquide suivant, pour y prendre le mordant :

D'une solution saturée à froid	}	Parties égales
d'acétate d'oxyde de cuivre		
neutralisé.....	}	en
D'une solution de sel de Sai-		
guette à 10 0/0.....		volume.

M.

et ce, pour 24 heures dans l'étuve.

Ce bain pris, le bloc est plongé de nouveau pour 24 heures dans une solution simple d'acétate de cuivre.

Lorsqu'on veut éviter la différenciation, on colore les coupes ainsi :

Solution alcoolique d'hématoxyline à 10 0/0.....	1 partie.
Solution diluée de carbonate de lithine. ....	9 parties.

M.

Cette solution contient, pour 100 centimètres cubes, 7 centimètres cubes d'une solution saturée de carbonate de lithine.

Pour obtenir une clarté parfaite du fond de l'image, on peut, après avoir lavé à l'eau, traiter la coupe à l'acide acétique à 1/5-1/2 0/0. Mais cette pratique n'est pas indispensable. Le simple lavage à l'eau suffit. Si l'on a affaire à des coupes plutôt épaisses et à des séries celloïdées, le traitement produit une surcoloration; les coupes exigent alors un bain de différenciation.

Pour la transparence, donner d'abord le bain d'alcool à 90 0/0, puis traiter par un mélange de xylol et d'huile d'aniline (1 : 2), ensuite par le xylol et enfin monter au xylol-Canada.

XVII. *Méthode de Pal* (39).

Parmi toutes les modifications apportées depuis son apparition à la méthode de Weigert, il n'en est point qui donne d'aussi brillants résultats que la méthode de Pal. Contrairement à ce qui se produit sur des coupes traitées selon Weigert, les tissus qui environnent les fibres à myéline restent complètement incolores ou plutôt sont tout à fait décolorés lorsqu'ils ont subi le traitement institué par Pal, ce qui permet une coloration complémentaire ou double du plus bel effet et qui ne nuit en aucune façon à la tinction des gaines à myéline.

La pièce qui doit fournir des coupes doit être taillée en morceaux de 2 centimètres cubes environ, les morceaux plongeant dans de larges quantités de liquide de Müller. Changer le liquide chaque jour pendant la première semaine. Le durcissement obtenu, les morceaux passent, sans avoir été lavés à l'eau, dans une suffisante quantité d'alcool à 70 0/0 (à l'abri de la lumière). Changer l'alcool chaque jour pendant la première semaine. Au bout de 8-10 jours, on peut couper les pièces telles quelles ou préalablement enrobées.

1° La coupe faite (ou la pellicule collodionnée selon Weigert obtenue) passe dans de l'alcool à 70 0/0.

2° De là, et sans attendre, dans le bain colorant constitué par une solution d'hématoxyline

selon Weigert, additionnée d'environ 1 centimètre cube de solution lithinée par 30 centimètres cubes de solution de Weigert. Durée du bain : environ 6 heures. On peut les y laisser (c'est ce que nous faisons toujours) pendant 18-24 heures; la décoloration, c'est-à-dire la différenciation, sera plus lente alors, mais les gaines seront mieux teintées.

3° En sortant de ce bain, la coupe est presque noire; on la lave à l'eau distillée, additionnée de solution lithinée :

Eau distillée.....	50 c. cubes.
Solution lithinée.....	1 c. cube.

M.

Changer le mélange jusqu'à ce que la coupe ne rende plus de couleur (1/2 heure).

4° Elle passe dans le bain de différenciation suivant :

Permanganate de potasse...	0 gr. 25
Eau distillée.....	100 c. cubes.

Après 1-3 minutes, mais souvent beaucoup plus longtemps, la différenciation se produit.

5° Lavage soigneux dans de l'eau distillée.

6° Bain dans le liquide de décoloration suivant :

Acide oxalique.....	} aa 1 gr.
Sulfure de potasse.....	
Eau distillée.....	200 c. cubes.

M.

Cette solution doit toujours être fraîche, le récipient bien bouché; la cupule qui contien-

dra la coupe en traitement sera couverte pendant le bain.

En quelques secondes (10-40-60), la décoloration est complète, c'est-à-dire que la substance grise devient jaunâtre, souvent blanche ou jaune-blanc; la substance blanche, les gaines à myéline restent colorées en bleu-noir ou noir.

Si, à ce moment de la procédure, la décoloration ne paraît pas assez complète, si la substance grise de la coupe ne prend pas l'aspect d'un papier blanc-jaune, on recommence la manipulation précédente : bain d'eau distillée (1 minute), bain au permanganate (le temps voulu pour différencier) et bain d'eau distillée, puis à l'acide oxalique. On répète cette procédure jusqu'à résultat satisfaisant.

En fait de quantités de liquide à employer, il faut compter 30 c. cubes de solution hématoxylinique, 50 c. cubes d'eau lithinée, 30 c. cubes de solution de permanganate, 20 c. cubes de liquide oxalique pour traiter 10-15 petites coupes. Pour un plus grand nombre de coupes ou des coupes plus grandes, il faut renouveler les quantités dans les proportions indiquées.

7° La coupe est lavée à fond dans de l'eau distillée.

8° Bain de déshydratisation (plaques collodionnées : alcool 95 0/0).

9° Essence de girofle.

10° Canada. Couvre-objet.

Si la pièce avait été lavée par mégarde après le durcissement, ou si elle présente une colora-



tion verdâtre suspecte, on plongera les coupes tout d'abord dans le liquide suivant :

D'une solution d'acide chromique dans de l'eau distillée à 1/2 0/0, quantité suffisante pour un bain. Ou bien dans une solution de bichromate de potasse à 1-3 0/0, et ce pour quelques heures. Les coupes passeront pendant 24 heures dans la solution hématoxylinique additionnée de carbonate de lithine, à l'étuve à 35-40° C. pour une heure. Puis, traitement subséquent, comme il est indiqué plus haut.

Si la pièce est coupée dans l'eau au microtome de Gudden, les coupes passeront dans un bain d'alcool à 70 0/0 avant de passer dans la couleur. Les images sont alors moins nettes que lorsque la méthode est appliquée rigoureusement et qu'on opère sur un bloc.

Pour les pellicules collodionnées selon Weigert, il faut remarquer les points suivants : elles resteront plus longtemps dans l'eau lithinée, un peu moins longtemps dans la solution de différenciation ; elles seront lavées très à fond et seront éclaircies au carbol-xylo.

Si l'on veut obtenir une coloration double, complémentaire, des éléments (cellules) décolorés par la solution oxalique, on procédera ainsi :

Lorsque la coupe sort du bain oxalique, on la lave à fond pendant 5 minutes dans un premier bain d'eau distillée ; on change cette eau et on donne un second bain d'eau d'une durée de 10 minutes. La coupe passe dans une solution de carmin ou de picro-carmin. Durée du bain colorant : 3-10-18-24 heures, suivant la solution

et la réceptivité de la coupe. Lavage à l'eau distillée, bain d'alcool, essence de girofle, baume de Canada ou résine de Damar.

Les résultats que fournit la méthode de Pal sont beaux ; les fibres à myéline sont nettement colorées, les tissus circumvoisins incolores ; par-ci par-là on observe quelques taches brunes ou des filaments noirs ; les premières proviennent de manipulations faites peu soigneusement, les seconds sont des produits de coagulation colorés, le long du trajet d'un vaisseau ou un fin vaisseau lui-même. Ne pas confondre avec des fibres. Quelquefois, le pigment des cellules ganglionnaires se colore en brun ou brun-jaune ; on avait, mais à tort, voulu conclure, de cette différence de réceptivité de certaines cellules pour la couleur dans le cours de ce traitement, à une différence dans les fonctions de la cellule ! Conserver les préparations selon Pal à l'abri de la lumière.

### XVIII. Méthode de Kulschitzky (40).

Les pièces destinées à être traitées doivent durcir dans le liquide de Müller ou, ce qui est préférable, dans le liquide d'Erlicki :

Bichromate de potasse.....	2 gr. 50
Sulfate de cuivre.....	0 gr. 50
Eau.....	100 gr.

M.

1° La coupe faite passe dans le bain colorant suivant

Hématoxyline dissoute dans Q. s. d'alcool absolu.....	1 gr.
Solution saturée d'acide borique..	20 gr.
Eau distillée.....	80 gr.

M.

Le liquide sera légèrement acidifié avant de l'employer.

La coupe reste dans ce bain pendant 18-24 heures.

2° Lavage à l'alcool.

3° Essence de girofle.

4° Canada. Couvere-objet.

La solution colorante de Kulschitzky est jaune quand elle vient d'être préparée; au bout de 2-3 semaines, elle prend une belle couleur rouge. C'est à ce moment qu'on peut commencer à s'en servir. La quantité nécessaire pour un bain est versée dans une cupule et acidifiée (quelques gouttes d'acide acétique pour plein un verre de montre) avant que la coupe n'y plonge. L'auteur a modifié sa solution ainsi qu'il suit :

Hématoxyline.....	2 gr.
Alcool absolu.....	Q. s. pour dissoudre.
Solution d'acide acétique à 2 0/0..	100 gr.

M.

C'est la solution de Kulschitzky n° II; la solution boriquée porte le n° I.

Ces solutions seront employées dans les méthodes suivantes.

Les fibres des coupes colorées ainsi sont bleues, d'un bleu vif; tout le reste n'est pas

coloré ou ne l'est que faiblement en jaune pâle. Cette coloration bleue est particulièrement nette lorsque l'on donne préalablement un bain de 24 heures dans une solution de carbonate de soude ou de carbonate de lithine.

### XIX. *Méthode de Max Wolters (41).*

I. — La pièce à couper doit durcir dans le liquide de Müller.

Le durcissement obtenu, on laisse la pièce dans de l'eau jusqu'à épuisement des sels chromiques. Changer l'eau fréquemment et aussi longtemps qu'elle se colore. Durcissement complémentaire dans de l'alcool. Enrobement à la celloïdine. Le bloc est coupé.

1° La coupe faite est immergée dans le liquide de *Kulschitzky* n° II. Le récipient est porté, pour la durée du bain, à l'étuve à une température de 45° C. Couvrir.

2° La coupe est plongée dans le liquide de Müller.

3° Pour le traitement subséquent, on suit exactement la méthode de *Pal*.

Les cellules ganglionnaires sont colorées en jaune ou en jaune brun, les fibres à myéline en bleu-noir.

II. — La pièce doit durcir dans le liquide d'*Erlicki*; même traitement préliminaire que dans la méthode de *Kulschitzky*.

1° La coupe faite passe pour 24 heures dans le bain suivant :

Solution de vanadium chloratum à 10 0/0 .....	2 parties.
Solution d'aluminium aceticum liquide à 8 0/0 .....	8 —

M.

2° Ce bain donné, la coupe est lavée à fond et pendant 10 minutes dans de l'eau distillée.

3° Elle passe pour 24 heures dans la solution de Kulschitzky n° II. Le récipient est porté à l'étuve à une température de 45° C.

4° Bain d'alcool à 80 0/0 jusqu'à ce que la coupe ait pris une belle couleur bleu-rouge clair.

5° Lavage à fond à l'eau distillée.

6° Bain d'alcool à 90-95 0/0.

7° Comme pour Pal.

Les cylindres des nerfs périphériques sont très distinctement colorés. Les cellules pyramidales de l'écorce du cerveau sont colorées en bleu foncé. Les éléments névrogliaux également. Les fibres tangentiales sont bien colorées et s'observent en grand nombre. Cette méthode, qui, suivant certains auteurs, surpasserait celle de Weigert et qui donne des résultats analogues à ceux obtenus par celle d'Exner, a été reprise et modifiée par *Kaes* ainsi qu'il suit :

*Modification de Kaes (42).* — Au lieu de ne laisser la coupe dans l'étuve que pour 24 heures, comme le conseille Wolters, *Kaes* l'y laisse pendant 2-3 jours à une température de 42-45° C., pour arriver à un résultat plus égal. L'acte de la différenciation est rapide et simple lors-

qu'on se sert d'une spatule faisant passoire, en platine, ou d'une passoire en porcelaine sur laquelle repose la coupe ; on plonge la passoire une fois dans le liquide de Müller, on la rince rapidement à l'eau distillée, puis, pour la différenciation selon Pal, on la plonge, s'il le faut, 6-10-15 fois consécutivement dans les liquides voulus jusqu'à différenciation suffisante. Lavages rapides. Pour les coupes sur lesquelles on désirerait étudier les plus fines fibres, il ne faut pousser la différenciation que jusqu'au point où l'écorce grise apparaît jaunâtre.

#### XX. *Méthode de Berkley (43).*

Cette méthode convient avant tout pour les recherches ayant trait à des pièces très fraîches. Pour peu que les tissus soient altérés par le ramollissement *post mortem*, elle ne réussit pas. La coloration peut être considérée comme permanente.

Les préparations terminées ont un aspect de noir de fumée. Les cylindraxés se colorent également. Sur des images réussies, on doit les apercevoir à travers la myéline, lorsque la coloration n'est pas trop forte. Lorsque la réduction des sels de chrome par le cuivre est modérée, on peut voir également des cellules colorées.

Toutes les pièces du cerveau, du cervelet et de la moelle, qui doivent subir le traitement, n'auront pas plus de 2,5 millimètres d'épais-

seur; la largeur, c'est-à-dire l'étendue d'une pièce, est assez indifférente.

Ces pièces sont durcies dans la solution de *Flemming* :

D'une solution aqueuse d'acide osmique à 2 0/0.....	4 parties.
D'une solution aqueuse d'acide chromique à 1 0/0.....	15 —
Acide acétique.....	1 partie.

M.

Ce bain durcissant aura une durée d'environ 20-30 heures, à une température d'étuve à 25° C.

En sortant de ce bain, les pièces passent, sans avoir été lavées, dans de l'alcool absolu, qu'on changera deux fois pendant les premières 24 heures. Lorsque les tissus sont suffisamment durcis, on immerge les pièces dans de la celloïdine pendant 12-24 heures avant de les couper.

Pendant qu'on coupe, mouiller largement la lame avec de l'alcool à 95 0/0. Les coupes doivent être très minces.

1° La coupe faite est lavée à l'eau distillée.

2° Elle passe dans une solution saturée d'acétate neutre de cuivre. Le récipient sera couvert. Durée du bain : 6-8-12 heures, ou bien 25-30 minutes dans l'étuve à 35-40° C. Laisser refroidir le liquide avant de sortir la coupe.

3° Lavage rapide à l'eau distillée.

4° Bain colorant.

Pour préparer la solution, prendre :

Eau distillée..... 50 c. cubes.

Qu'on fera bouillir dans un flacon; on ajoute :

D'une solution saturée de  
carbonate de lithine.... 2 c. cubes.

On continue à faire bouillir pendant une minute.

Ajouter :

D'une solution d'hématoxyline  
dans de l'alcool à 10 0/0.... 1,5-2 c. cubes.

Agiter vivement le flacon; boucher.

Laisser refroidir lentement; ne faire à la fois que de petites quantités de ce liquide, qui ne se conserve pas bien; le préparer un jour avant que de s'en servir. Le récipient qui contient la coupe immergée dans ce bain passe à l'étuve à 40° C., pour 15-25 minutes; laisser refroidir avant de le sortir.

5° Lavage à fond dans de l'eau distillée.

6° La coupe passe dans le liquide décolorant de Weigert, qu'on peut employer tel quel ou bien auquel on pourra ajouter le tiers de son volume d'eau.

La décoloration est un acte très important dans le procédé en question. Il faut que le liquide décolorant pénètre rapidement dans les tissus. D'autre part, l'action de ce liquide ne doit pas durer trop longtemps, parce que sans cela une quantité de petites fibres à myéline se décoloreraient complètement. Un bain de 1-3 minutes suffit en général.

7° Lavage à fond dans 2-3 bains d'eau distillée.



8° Bain d'alcool.

9° Essence de bergamote.

10° Xylol. Canada.

Avec ce procédé, on peut colorer en une heure une coupe, le bain cuprique et le bain colorant à l'étuve n'exigeant pas plus de 35-40 minutes. Les coupes sont colorées en noir-brun. La différence entre les substances blanche et grise est peu marquée. Sous le microscope, les fibres à myéline apparaissent en noir-bleu, la névroglie est jaune, les cellules sont décolorées. Dans la moelle, on peut constater les ramifications en T, les arborescences terminales et le réticulum des fibres à myéline les plus fines. Dans la substance cérébrale (blanche et grise), on peut voir une quantité de fibres colorées.

Souvent sur des préparations traitées de la sorte on peut découvrir les arborescences terminales contenant jusque dans leur ultime développement de la myéline, d'où émerge le cylindraxe terminal, à pointe effilée, libre ; enfin, des renflements de myéline, qui correspondent probablement aux étranglements de Ranvier, des nerfs périphériques.

### XXI. *Méthode de l'auteur (44).*

Lorsqu'on fait des coupes sous l'eau, dans le microtome de Gudden, on n'a guère en vue que des colorations de cellules et de cylindraxes ; la teinture des gaines à myéline exigeant des procédés spéciaux, nous avons

cherché, comme tant d'autres, un procédé qui permit d'obtenir d'une même pièce tantôt l'une, tantôt l'autre de ces colorations, ou tout au moins, et toujours pour les pièces coupées sous l'eau, une coloration convenable des gaines. Nos essais avaient porté sur 350 coupes en série ininterrompue de la moelle épinière et allongée d'un chat, sur quelques coupes d'une moelle d'oiseau et d'un caméléon, d'une moelle humaine et enfin d'une moelle d'un fœtus de 7 mois. Les pièces avaient séjourné les unes dans de l'alcool, les autres dans un liquide chromique; le chat avait durci au liquide de Müller. Notre procédé n'est applicable que pour la moelle; les essais tentés sur des morceaux d'écorce ou des ganglions du cerveau de l'homme n'ont pas été satisfaisants. Les coupes doivent être très minces.

Dans la règle, la pièce à couper doit durcir au bichromate potassique et être incluse dans le microtome de Gudden avant d'avoir rendu trop de sels chromiques dans le bain détergeant.

1° La coupe passe dans de l'eau distillée.

2° De là dans le bain colorant. Nous employons deux solutions : l'une forte pour les pièces qui ont été lavées à l'eau et qui ont rendu leurs sels chromiques dans un bain détergeant, dont les tissus, en un mot, sont peu imprégnés de sels chromiques; l'autre faible pour les pièces qui n'ont pas été lavées à l'eau avant d'être incluses dans le microtome et dont les tissus sont encore riches en sels chromiques. La différence de ces solutions git dans

la proportion de glycérine qu'elles contiennent et qui, suivant les cas, favorise plus ou moins énergiquement la coloration des gaines. Chaque solution doit être préparée de la façon suivante : dissoudre séparément l'hématoxyline dans l'alcool, l'alun dans l'eau distillée ; ajouter la glycérine à la solution aqueuse, agiter celle-ci, puis opérer le mélange des deux solutions, en agitant vigoureusement ; laisser reposer. Filtrer après 8 jours.

*Solution faible.*

Alcool.....	100 c. cubes.
Hématoxyline.....	2 gr.
Eau distillée.....	100 c. cubes.
Alun.....	2 gr.
Glycérine.....	100 c. cubes.

*Solution forte.*

Alcool.....	120 c. cubes.
Hématoxyline.....	2 gr.
Eau distillée.....	130 c. cubes.
Alun.....	2 gr.
Glycérine.....	50 c. cubes.

Nous manipulons nos coupes en nous servant de verres de montre, en laissant la coupe sur le récipient et en l'arrosant des liquides employés, puis en vidant le verre de montre, en ayant soin de fixer la coupe à ce moment pour qu'elle ne glisse pas.

La durée du bain colorant varie de 12-24 heures ; pour les pièces non lavées, de 12-18 heures ; pour les pièces lavées, de 18-24 heures.

3° Le bain colorant donné, la coupe est lavée à l'eau de *fontaine* fraîche (eau du robinet).

net du laboratoire), en veillant à ce qu'elle immerge complètement dans l'eau. Changer l'eau, c'est-à-dire laver jusqu'à ce que la coupe ne rende plus de couleur. L'eau de fontaine fixe l'hématoxyline, croyons-nous, dans les gaines et la dissout peu, moins assurément que l'eau distillée.

4° Elle passe dans le liquide de réduction de Weigert, modifié par nous :

Eau distillée.....	200 c. cubes.
Ferricyanure de potassium.	6 gr.
Borax.....	4 —

M.

Pendant que la coupe baigne dans ce liquide, agiter continuellement le bain au moyen d'une baguette de verre ou d'un manche d'aiguille à dissocier, etc. La coupe se décolore tantôt plus rapidement, tantôt plus lentement, ce qui tient à la nature de la pièce, au degré du durcissement, à l'épaisseur de la coupe, etc. A-t-on obtenu le degré de décoloration voulu, ce qui s'apprend par l'habitude, ou plus exactement par le contrôle microscopique (Nachet) des premières coupes traitées, on peut sortir la coupe.

5° On la lave alors à fond dans de l'eau distillée (nous préférons l'eau de fontaine).

6° On la déshydrate.

7° On l'éclaircit à l'essence de girofle.

8° Et on monte au Canada. Couvre-objet.

Un grand nombre de coupes ont été traitées par nous de cette façon ; le procédé est assez

simple et n'exige pas plus de temps que la coloration au carmin. Mais sur la plupart de ces coupes la coloration des fibres à myéline n'est pas très nette ni toujours égale. Pour obtenir un résultat plus satisfaisant, nous procédons, après le bain de réduction, c'est-à-dire dès que dans le bain de réduction la différenciation commence à se produire, de la façon suivante :

5° *bis*. Lavage à l'eau de fontaine.

6° La coupe passe dans le bain décolorant suivant :

Sonlutio de potasse caustique à 10 0/0.....	2 c. cubes.
Eau distillée.....	10 —
Éther sulfurique.....	1 c. cube.

M.

Agiter.

Nous plongeons la coupe dans une certaine quantité de ce liquide et agitons le bain (manche à aiguille, baguette de verre). La coupe s'y décolore très promptement. Il faut opérer rapidement, un séjour un peu trop prolongé dans ce bain provoquant une décoloration complète. En l'y laissant un peu plus, un peu moins longtemps, on obtient à volonté toutes les nuances de la décoloration, ou d'une coloration définitive.

7° Le ton voulu est-il obtenu, ce qui, nous le répétons, se fait très rapidement, on transporte la coupe dans un récipient contenant de l'eau distillée, on lave rapidement et en battant l'eau. Si la décoloration continuait dans l'eau dis-

tillée, on emploierait de l'eau de fontaine, qui l'arrêtera.

8° Bain d'alcool, essence de girofle, etc., Canada.

Pour la transparence, nous préférons maintenant le traitement à la créosote (2-3 minutes), à la térébenthine (5-10 minutes) et le Canada, ou bien l'éclaircissement au carbol-xylool (5 minutes) et monter au Damar ou au xylool-Canada.

La quantité de solution colorante employée est versée après le bain sur le filtre (entonnoir) qui recouvre le flacon. Lorsque l'hématoxyline est de bonne qualité, la solution se conserve assez longtemps. Quand on n'en a pas l'emploi, nous filtrons la solution une fois par semaine.

La même quantité de liquide de réduction (de Weigert) peut servir à traiter 3-5 coupes; ensuite, elle n'est plus utilisable. La quantité nécessaire du liquide décolorant (le nôtre) doit être préparée à nouveau pour chaque fois; mais on en emploie très peu. La solution potassique rend la coupe un peu visqueuse, gluante; elle glisse alors très facilement hors du récipient. Attention à l'y fixer convenablement.

*Ehrlich* avait déjà employé la glycérine combinée à l'hématoxyline pour colorer ses coupes; mais il décolorait ensuite dans de l'alcool acidifié. Ce procédé ne nous a jamais donné de bons résultats.

Notre procédé avec les bains de réduction et de décoloration est, en somme, expéditif et peu coûteux. Les préparations obtenues sont

égales ; le ton de la coloration peut être à volonté plus ou moins intense, suivant la longueur de l'acte de la décoloration ; les coupes se conservent bien. Les fibres à myéline, souvent les plus fines, sont colorées en un beau bleu très pur ; les cellules se colorent très irrégulièrement ; quand elles le sont, elles sont teintes en rouge-jaune ou rouge-brun.

Cette méthode peut s'appliquer aux séries de coupes faites sous l'eau et peut, à l'occasion, rendre service. Nous l'avons publiée dans la *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, Bd VII, 1890, après avoir soumis nos préparations à l'appréciation d'autorités scientifiques qui s'étaient déclarées satisfaites.

## XXII. *Méthode de Kaiser* (45).

La pièce à durcir est plongée dans le liquide de Müller. Après quelques jours d'immersion (2-3), on coupe la pièce en petits morceaux cubiques de 1-2 millimètres d'épaisseur et on laisse ceux-ci, pour 5-6 jours encore, dans le liquide durcissant. De là, les morceaux passent dans le liquide de *Marchi* :

Liqueur de Müller.....	2 parties.
Solution d'acide osmique à 1 0/0.....	1 partie.

M.

où ils séjourneront environ 8 jours.

On lave les morceaux et on les plonge dans de l'alcool à 70 0/0, pour le durcissement com-

plémentaire. Enrobement à la celloïdine. On coupe.

1° La coupe faite est plongée pendant 5 minutes dans le mélange suivant :

Perchlorure de fer...	} aa	1 partie.
Eau distillée.....		
Alcool rectifié.....		3 parties.

M.

2° On sort la coupe de ce bain et on la rince dans une quantité suffisante d'une solution d'hématoxyline de Weigert ; on jette cette première quantité et on la remplace par une nouvelle dose de solution, qu'on chauffe pendant quelques minutes jusqu'à dégagement de bulles d'air.

Le liquide ne doit pas bouillir, ce qui occasionnerait un ratatinement de la celloïdine.

3° La coupe est lavée à l'eau distillée.

4° Différenciation selon Pal. Les coupes sortant du bain oxalique seront immédiatement rincées dans de l'eau ammoniacquée, ce qui neutralise l'acide oxalique et provoque une coloration plus intense.

5° Traitement subséquent selon Pal.

Pour obtenir des coupes à coloration double, la pièce doit être durcie dans le liquide de Müller. On la lave pendant quelque temps à l'eau et on la durcit complémentirement dans de l'alcool à 70 0/0.

1° La coupe faite est traitée au perchlorure de fer.

2° Puis à l'hématoxyline, comme plus haut.



3° Lavage à l'eau distillée.

4° Différenciation d'après Pal (après l'acide oxalique, lavage à l'eau ammoniacale).

5° Elle passe pour 1/2-1 minute dans le bain suivant :

Fuchsine.....	0 gr. 10
Alcool rectifié.....	100 gr.

M.

Ou bien dans un bain de naphtylamine pour 3-5 minutes :

Brun de naphtylamine.....	1 gr.	—
Alcool rectifié.....	100	—
Eau distillée.....	200	—

M.

Cette coloration double ne peut pas être employée pour les coupes de pièces traitées par le liquide de Marchi.

Les fibres nerveuses sont brunes ou noires quand les coupes ont été traitées à l'osmium. Le pigment et le nucléole des cellules ganglionnaires restent plus ou moins fortement colorés en noir-brun.

Après coloration double, les fibres à myéline sont bleues, les fibres sans myéline colorées en brun ou en rouge.

L'emploi de perchlorure de fer au lieu d'acétate de cuivre, comme dans la méthode de Weigert, a un avantage : la liqueur ferrique imprègne rapidement les coupes à froid de façon à se combiner avec l'hématoxyline, combinaison dont la couleur bleue devient plus

vive lorsqu'on chauffe un peu, comme nous avons vu, la solution hématoxylinique pendant le bain.

## B. — AUTRES MÉTHODES.

### XXIII. *Méthode d'Exner* (46).

Les pièces qui doivent fournir des coupes colorées suivant cette méthode doivent être traitées le plus tôt possible après la mort du sujet. Plus elles sont fraîches, plus les chances de voir réussir la procédure sont grandes. Suivant les circonstances et le degré plus ou moins élevé de la température ambiante, elle peut réussir encore avec des pièces qui auraient été enlevées 8-12 heures après la mort d'un sujet. Les pièces enlevées au cerveau ou à la moelle spinale sont coupées en morceaux de tout au plus 1 centimètre cube d'épaisseur et qu'on plongera aussi rapidement que possible dans une solution d'acide osmique à 1 0/0.

Il faut employer de grandes quantités de liquide, au moins un volume 10 fois plus considérable que celui des morceaux. Changer le liquide le second jour de l'immersion.

Le 5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> jour après l'immersion, les morceaux sont lavés à fond dans de l'eau distillée et peuvent alors être coupés. On peut les enrober à la celloïdine ou à la paraffine, ou les couper tels quels, fixés sur un bouchon.

Ils se conservent, au reste, assez bien pendant un certain temps dans la solution osmique.

Avant d'enrober les morceaux, on les plongera pour quelques secondes dans de l'alcool absolu.

1° La coupe faite passe immédiatement dans de la glycérine.

2° Transporter le tout sur un porte-objet.

3° Sur le porte-objet ajouter à la goutte ou à la quantité de glycérine dans laquelle immerge la coupe une goutte d'eau ammoniacée (liqueur d'ammoniaque caustique, 1,0; eau distillée, 50,0; M.), fraîchement préparée.

4° Après un instant, mais pas de suite après, recouvrir le tout d'une lamelle.

Les coupes doivent être très minces.

Les fibres nerveuses à myéline, même les plus fines, sont colorées en gris ou en gris-noir. Les préparations ne se conservent pas.

#### XXIV. *Méthode de Bellonci (47).*

Le procédé suivant a été employé surtout pour des pièces du S. N. C. d'animaux.

Il peut être considéré comme une modification de la méthode d'*Exner*; cependant, il offre de certains avantages que cette dernière n'a pas et constitue certainement un perfectionnement de cette méthode.

La pièce destinée à fournir des coupes est durcie dans une solution d'acide osmique à 1/2-1 0/0. La durée du bain est de 14-20 heures. Les pièces ou morceaux doivent être peu épais. Les coupes seront faites à *la main* (au rasoir),

de suite après le bain. Mouiller le rasoir avec de l'alcool à 70°.

1° La coupe faite passe pour quelques minutes dans de l'eau distillée.

2° Puis dans de l'alcool à 80°, où elle séjournera pendant 3-4 heures.

3° Nouveau lavage de quelques minutes dans de l'eau distillée. Pendant ce bain, on place la coupe sur le porte-objet.

4° Dès qu'une coupe est étalée sur le porte-objet, on la recouvre d'une lamelle couvre-objet et on instille *sous* la lamelle quelques gouttes d'ammoniaque.

L'effet de ce réactif est vraiment extraordinaire. L'ammoniaque provoque une transparence de la substance nerveuse qui ressemble à celle du verre; les fibres à myéline restent tout à fait noires et se détachent si nettement du fond translucide des autres parties de la coupe qu'il est très facile d'en poursuivre tout le parcours.

Les coupes peuvent être épaisses; cela facilite même l'étude des fibres dans leur trajet, parfois contourné et sinueux. On peut se servir de ce procédé pour des coupes faites au microtome, après enrobement à la celloïdine. Cependant, il faudra avoir soin, dans ce cas, de laver de temps en temps les préparations obtenues, en instillant, toujours sous la lamelle couvre-objet, une goutte ou deux d'eau distillée, etc. Des séries de coupes peuvent être traitées de cette manière.

## CHAPITRE VII

### Coloration des cellules et des gaines de myéline ; méthodes mixtes.

(III<sup>e</sup> groupe.)

#### A. — MÉTHODES AU MOYEN D'AGENTS COLORANTS DIVERS.

##### XXV. *Méthode de Sahli à la fuchsine acide* (53).

I. — La pièce est durcie au bichromate de potasse suivant les règles établies pour la coloration de Weigert (Voir cette méthode).

1° La coupe faite est lavée à l'eau pendant 5-10 minutes au plus.

2° Elle passe dans le bain colorant constitué par une solution aqueuse concentrée de bleu de méthylène. Durée du bain : plusieurs heures (jusqu'à coloration bleu foncé).

3° La coupe est rincée à l'eau.

4° Elle passe dans le bain d'une solution saturée de fuchsine acide (*Säure fuchsin*) dans de l'eau.

5° Lavage à l'alcool.

6° Bain prolongé à l'eau, où la coloration se différencie. On obtient alors de belles images; les cylindraxes sont colorés en rouge, les gaines de myéline en bleu.

Si l'on remplace, au 5°, l'alcool par de l'alcool contenant 1/100 ou 1/1000 de potasse caustique, et qu'on continue la procédure après le bain à l'eau, en baignant :

7° A l'alcool; en traitant :

8° Par l'essence de cèdre, et en montant :

9° Au baume dissous dans de l'essence de cèdre, on obtient des images encore plus nettes.

Les cylindraxes sont toujours rouges, mais les gaines se montrent tantôt rouges, tantôt bleues, différence de coloration qui provient, suivant Sahli, d'une différence dans la nature des tubes nerveux.

II. — Méthode pour la coloration spécifique des gaines par le bleu de méthylène seul. Pièces durcies comme pour Weigert.

1° La coupe faite passe pour un temps variable (de quelques minutes à quelques heures) dans le bain colorant suivant :

Eau.....	40 parties.
Solution saturée de bleu de méthylène dans l'eau.....	24 —
Solution de borax à 50/0.....	16 —

M.

Laisser reposer un jour et filtrer.

2° On lave la coupe soit à l'eau, soit à l'alcool, jusqu'à différenciation nette des substances.

3° Essence de cèdre.

4° On monte au Canada.

Les gaines sont colorées en bleu, les cellules sont verdâtres, les noyaux de la névroglie bleus. Les préparations ne se conservent pas.

XXVI. *Méthode d'Adamkiewicz  
à la safranine (54).*

*Méthode simple.* — L'auteur a le premier attiré l'attention sur la safranine, qui colore les gaines en rouge ou jaune-rouge, les cellules nerveuses ou tout au moins leurs noyaux et les cellules névrogliales en violet ou bleu-violet. Si la fibre est altérée pathologiquement ou qu'elle soit vraiment dégénérée, elle ne se colore plus, alors même que le processus pathologique ne serait qu'à la période de début (?). Les pièces doivent durcir dans une solution de bichromate de potasse. Après durcissement, lavage à l'eau.

1° La coupe faite passe dans un bain d'eau distillée, préalablement acidifiée au moyen de quelques gouttes d'acide nitrique. Durée du bain : 2-3 minutes.

2° Bain colorant. Pour obtenir la solution colorante, prendre de la safranine n° 0; en verser en quantité suffisante dans un volume donné d'eau distillée, de façon à ce que le liquide prenne la couleur d'un vin de Bourgogne très chargé de couleur. Les coupes peuvent rester à peu près indéfiniment dans

ce bain, elles ne se surcolorent presque jamais.

3° La coupe colorée est lavée dans de l'alcool ordinaire.

4° Elle passe dans l'alcool absolu, additionné de quelques gouttes d'acide nitrique. La réaction acide de ce bain doit être faible. Durée ordinaire d'un bain de déshydratation.

5° Cela fait, on couvre la coupe d'essence de girofle, dans laquelle la coupe rendra une majeure partie de sa couleur. Il faut la laisser dans l'essence aussi longtemps qu'elle en rend, c'est-à-dire jusqu'à décoloration suffisante.

6° Baume de Canada. Couvre-objet.

Cette méthode est prônée dans plus d'un traité d'anatomie des centres nerveux; elle a rendu certainement des services à son auteur; cependant, elle ne nous a pas satisfait.

*Méthode double.* — 1° Laver la coupe à l'eau distillée.

2° Puis à l'eau acidifiée avec de l'acide nitrique.

3° Bain dans la solution concentrée de safranine.

4° Rincer à l'alcool ordinaire.

5° Lavage à l'alcool absolu.

6° Essence de girofle jusqu'à ce que la coupe ne rende plus de couleur.

7° Lavage à l'eau distillée.

8° Puis bain dans de l'eau acidulée à l'acide acétique.

9° Colorer complémentirement dans une solution de bleu de méthylène.



10° et 11° Laver aux deux alcools, comme il est dit plus haut.

12° et 13° Essence de girofle. Baume de Canada.

Adamkiewicz croit avoir démontré par cette méthode l'existence de zones chromoleptiques entourant la substance grise de la moelle, pénétrant entre les cordons latéraux et envahissant en partie les cordons postérieurs (?).

### XXVII. *Méthode de Nikiforoff* (55).

Cette méthode est une modification et constitue, de fait, un perfectionnement de la méthode I (simple) d'Adamkiewicz (54).

Les pièces doivent durcir dans une solution de bichromate de potasse.

Le durcissement obtenu, elles passent, sans avoir été lavées à l'eau, dans de l'alcool ordinaire pour acquérir un durcissement complémentaire.

1° La coupe prise sur la lame du microtome est immergée dans l'alcool.

2° Elle passe dans le bain colorant. Le liquide colorant est constitué par une solution saturée, tout au moins concentrée, de saffranine dans de l'eau distillée pure ou phéniquée à 5 0/0. Durée du bain : 24 heures.

3° Lavage complet et soigneux dans l'alcool ordinaire, en agitant la coupe dans le liquide, jusqu'à ce que la substance grise se détache franchement, par une coloration plus claire, du fond de la substance blanche plus colorée.

4° La coupe passe ensuite dans la solution suivante :

Chlorure d'or.....	1 gr.
Eau distillée.....	500 —

M.

où elle reste immergée jusqu'à ce que la substance grise commence à se colorer en violet.

5° On sort à ce moment la coupe et on la lave soigneusement à l'eau distillée.

6° Cela fait, on la baigne dans de l'alcool absolu, jusqu'à ce que la substance grise se détache franchement, par une coloration violette, de la substance blanche, qui reste rouge.

7° Passer rapidement à l'essence de girofle. Dès que la transparence est obtenue :

8° Lavage au xylol.

9° Baume de Canada. Couvre-objet.

### XXVIII. *Méthode d'Aronson à la galléine* (56).

En étudiant les combinaisons qui s'opèrent dans le processus de la coloration entre les sels chromiques, d'une part, et les divers agents colorants, de l'autre, Aronson a trouvé que la galléine donnait des résultats très satisfaisants. Les morceaux de la moelle ou du cerveau, de même des portions d'un nerf périphérique doivent durcir dans le liquide de Müller ou dans celui d'Erlicki. Il est préférable d'employer successivement les deux liquides et de

durcir d'abord dans le premier et complé-  
tairement dans le second.

Les pièces qui auront durci dans le liquide  
de Müller seront *seules* plongées subséquem-  
ment dans un bain cuprique, les autres  
(Erlicki) pas.

1° La coupe faite passe pour 12-24 heures  
(sans étuve) dans le bain colorant.

Dans une étuve et à la température de 37° C.,  
le bain durera 1-3 heures.

Formule de la solution colorante :

Pâte de galléine.....	3-4 c. cubes.
Alcool.....	20 —
Eau distillée.....	100 —
Solution concentrée de bi- carbonate sodique.....	3 gouttes.

M.

2° Lavage à l'eau distillée.

3° Différenciation au bain de permanganate  
de potasse selon Pal, ou avec le liquide de  
Weigert. Aronson emploie aussi pour cette dif-  
férenciation son procédé par oxydation au  
chlorure de chaux.

Versez dans une cupule de verre quelques  
gouttes du mélange suivant :

Solution concentrée et aqueuse de chlorure de chaux.....	} Parties égales.
Eau distillée.....	

M.

Plongez-y la coupe jusqu'à différenciation  
des fibres.

4° La différenciation obtenue, la coupe passe dans une solution concentrée de carbonate de lithine ou de soude, jusqu'à ce qu'elle soit colorée en rouge. Les fibres sont rouges, les cellules colorées en brun jaunâtre.

On peut substituer une coloration bleue à cette coloration rouge, de préférence alors sur des coupes différenciées selon Pal, en laissant pour 24 heures la coupe dans un bain d'eau distillée, additionné de quelques gouttes d'une solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène. Lavage à l'eau, à l'alcool, jusqu'à ce que la coupe ne rende plus de couleur.

5° Traitement à l'eau distillée.

6° Bain de déshydratisation, etc., comme pour *Pal*.

#### XXIX. *Méthode de Ströbe* (57).

Pour remédier aux résultats, parfois incomplets, obtenus au moyen des méthodes usuelles de coloration dans les cas de dégénérescence, où les cylindraxes des faisceaux dégénérés ne sont qu'imparfaitement colorés, l'auteur préconise le procédé suivant (*Neurologisches Centralblatt*, n° 7, avril 1893) :

Les pièces sont durcies dans le liquide de Müller. Durcissement complémentaire dans l'alcool. Enrobement à la celloidine.

1° La coupe faite passe pendant 1/2-1 heure dans un bain d'une solution aqueuse d'aniline-bleu.

2° Lavage rapide dans de l'eau distillée.

3° La coupe est lavée pendant environ une minute, ce qui dépend du plus ou moins d'épaisseur de la coupe, dans de l'alcool alcalinisé.

Pour préparer cet alcool, verser 20 gouttes d'une solution de potasse caustique dans de l'alcool absolu à 10/0, dans une cupule contenant une quantité suffisante d'alcool. Pendant ce bain, la couleur de la coupe passe du bleu au brun.

Dès que le virage est obtenu :

4° On lave soigneusement la coupe dans une abondante quantité d'eau distillée.

5° Coloration complémentaire à la saffranine. Pour cela faire, mélangez un volume d'une solution concentrée (saturée) aqueuse de saffranine avec un volume d'eau distillée. Durée de ce bain colorant : 1/2 heure.

6° Déshydratisation à l'alcool (Voir méthode à la saffranine), etc.

Les cylindraxes apparaissent alors colorés en bleu vif, les noyaux sont rouges, la substance névroglie est bleu clair; les parties dégénérées sont colorées en bleu foncé, les gaines de myéline en bleu très pâle. L'auteur assure que les préparations se conservent bien.

### XXX. *Méthode de Mallory* (59).

Cette méthode permet d'une façon assez simple la coloration des cylindraxes, des éléments névroglie et des cellules jusque dans

les ramifications ultimes de leurs prolongements.

L'auteur emploie une combinaison d'acide molybdique de phosphore et d'hématoxyline :

Molybdate de phosphore à	
10 0/0.....	1 c. cube.
Hématoxyline.....	1 gr.
Eau distillée.....	100 —
Hydrate de chloral.....	6-10 —

Cette solution doit mûrir au soleil pendant 8 jours; la filtrer avant que de s'en servir.

La coupe est suffisamment colorée après 10-60 minutes d'immersion dans le liquide. Pour le bain décolorant, on se sert d'alcool à 50 0/0. Durée du bain: 1/2-1 heure.

Traiter subséquemment et monter comme pour les autres méthodes. *Merkel* (33) s'était déjà servi d'un mélange de 1 partie de solution concentrée de molybdate d'ammoniaque et 1-2 parties d'eau, à laquelle il ajoutait une pincée de limaille de fer. Des coupes des centres nerveux se colorent dans le liquide en 5-15 minutes (*Gierke*) (60).

#### B. — PSEUDO-IMPRÉGNATIONS MÉTALLIQUES AVEC COLORATION.

##### XXXI. Méthode à l'or, selon *Cohnheim* (4, 32, 48).

Les pièces doivent durcir dans une solution de bichromate de potasse. Elles sont traitées subséquemment comme pour la méthode au

carmin. On peut couper au microtome à glissoir ou dans celui de Gudden.

1° La coupe faite passe dans de l'eau distillée.

2° Bain dans le liquide aurique (chlorure d'or) à 1/2 0/0, qui ne sera pas acidifié. La durée de ce bain est de 3/4 d'heure ; il doit se donner dans une chambre noire. Employer les précautions usitées dans les opérations photographiques.

3° Lavage à l'eau distillée très faiblement acidifiée avec de l'acide acétique. Cet acte se passe également dans la chambre noire ou dans un local peu éclairé. Pour donner le bain, immerger les coupes dans une grande quantité de liquide. Employer une soucoupe blanche.

4° Cela fait, on expose rapidement le tout à l'action de la lumière solaire (en plein soleil) ou, à défaut, à celle d'une vive lumière blanche (neige, nuages blancs), de façon à obtenir une réduction rapide et énergique. La réduction opérée, laisser la coupe exposée pendant 48 heures encore à l'action de la lumière.

5° Lavage à l'eau distillée.

6° Bain d'alcool.

7° Essence de girofle.

8° Monter au baume de Canada.

Conserver les préparations à l'abri de la lumière.

XXXII. *Méthode à l'or, selon Gerlach (50).*

Durcir une moelle pendant 15-20 jours dans

une solution de bichromate d'ammoniaque à 4-20/0.

1° La coupe faite séjourne pendant 10-12 heures, et ce, jusqu'à coloration légèrement violette, dans une solution de chlorure double d'or et de potassium à 1 pour 10,000, additionnée d'une trace d'acide chlorhydrique.

2° On sort la coupe de ce bain et on la lave dans de l'eau distillée, additionnée d'acide chlorhydrique (1 pour 2-3,000).

3° De là, elle passe pour 10 minutes dans le mélange suivant :

Acide chlorhydrique.....	1 partie.
Alcool à 60 degrés.....	1,000 parties.

4° Lavage à l'alcool absolu.

5° Essence de girofle.

6° Baume de Canada.

Le durcissement dans le bichromate d'ammoniaque doit être aussi prompt que possible. Après la première semaine, en général, la susceptibilité des éléments pour la coloration commence à diminuer; à partir du 12<sup>e</sup>-15<sup>e</sup> jour quelquefois elle est déjà nulle ou à peu près.

Les tissus ne doivent pas être mis en contact avec de l'alcool avant le bain aurique; pour mouiller éventuellement la lame du microtome il faudra donc employer un autre liquide qu'un mélange alcoolique (eau distillée).

Il faut toujours employer peu de solution aurique pour un bain. La durée de ce bain sera de 12 heures en général. Les préparations à l'or suivant Gerlach sont incomparable-



ment belles au point de vue de la démonstration des fibrilles nerveuses les plus fines.

*Schiefferdecker* (49) recommande le chlorure d'or pour l'étude des réseaux des fibres nerveuses de coupes transversales. Il fait baigner la coupe dans un bain de chlorure d'or à 1 pour 500 ou 1 pour 10000, suivant les cas, pendant 1-3 heures. Laver ensuite à l'eau acidifiée à l'acide acétique à 1/2-1 0/0. Lavage à l'alcool, etc. Monter au baume.

### XXXIII. *Méthode à l'or, de Freud* (51).

Les pièces peuvent durcir dans le liquide de Müller ou dans une solution simple de bichromate de potasse. Au sortir du liquide durcissant, elles seront lavées superficiellement. On coupe.

1° La coupe faite est lavée à l'eau distillée.

2° Elle passe dans la solution suivante :

Solution de chlorure d'or	} Parties égales.
à 10 0/0.....	
Alcool à 95 0/0.....	

M.

Elle séjourne dans ce bain pendant 4-6 heures.

3° Lavage à fond dans de l'eau distillée.

4° On sort la coupe au moyen d'une spatule en platine, ou sur un morceau de papier à filtrer blanc (Josèphe), et on la plonge dans le mélange qui suit et qu'on aura préparé peu de temps auparavant :

Potasse caustique .....	1 partie.
Eau distillée .....	6 parties.

M.

La coupe ne reste immergée dans ce bain que pendant 2-3 minutes seulement.

5° Lavage soigneux dans de l'eau distillée.

6° On transporte la coupe, en se servant toujours d'une spatule en platine (bien essuyée !), dans une quantité suffisante d'une solution d'iodure de potassium à 100/0. Au bout de 5-10 minutes, la coupe a pris la couleur voulue.

7° Lavage à l'eau distillée.

8° Bain d'alcool.

9° Essence de girofle.

10° Baume de Canada. Couvre-objet.

Pour éviter un ratatinement de la coupe, il est prudent de l'étendre sur un porte-objet dans le bain d'iodure et de la sécher un peu avec un morceau de papier Josèphe au moment où on la sort de ce bain.

Les préparations obtenues par cette méthode se présentent bien et supportent l'examen au grossissement moyen. Les fibres sont colorées en bleu foncé, en rouge foncé ou même en noir, suivant la nature de la pièce. Cette méthode ne réussit cependant pas toujours ; les images qu'elle fournit sont souvent diffuses. Il importe de ne jamais toucher la coupe en traitement avec un instrument métallique autre que la spatule en platine.

Toutes les fois qu'on emploiera une méthode de coloration à l'or, il faudra se rappeler qu'il

vaut mieux employer des solutions faibles et donner un bain prolongé, que de vouloir activer la coloration par l'emploi d'une solution forte avec une durée d'immersion plus courte; en outre, que les solutions doivent être toujours fraîches; que, pour l'acidification, c'est à l'acide chlorhydrique qu'on donnera la préférence; et enfin que c'est sur des pièces fraîches et relativement peu durcies que la coloration aurique prend le mieux.

#### XXXIV. *Méthodes d'Upson; à l'or (52).*

Les pièces durciront dans une solution simple de bichromate de potasse, d'abord à 1 0/0, ensuite à 2 et à 2 1/2 0/0. Le liquide de Müller ne convient pas. La solution durcissante doit être très fréquemment renouvelée; les récipients seront placés en un lieu sombre. Les pièces trop dures ne peuvent pas convenir pour ces méthodes. Le durcissement obtenu, laver la pièce rapidement à l'eau distillée et l'immerger dans de l'alcool à 50 0/0. Changer le liquide lorsque les précipités sont trop abondants.

Après 2-3 jours, la pièce passe dans de l'alcool à 95 0/0 et on l'y laisse jusqu'à ce qu'elle ait pris une coloration verte ou verdâtre caractéristique, ce qui s'obtient, en général, après 2-3 semaines; il faut parfois plus longtemps. L'alcool se souille vite et doit être renouvelé de temps en temps.

Lorsque la pièce a la couleur voulue, il faut

la couper le plus tôt possible; pour cela, on la fixe sur un bouchon au moyen de quelques gouttes de celloïdine B; sans enrobage complet. Couper au microtome à glissoir. Les coupes peuvent être conservées pendant quelques jours dans de l'alcool à 80 0/0; mais le mieux sera de les traiter de suite. Au fur et à mesure de leur fabrication, on les recueille dans de l'alcool à 80 0/0. Upson a institué pour le traitement subséquent deux méthodes :

*Méthode I.* — 1° La coupe faite et recueillie dans l'alcool à 80 0/0 passe directement dans le bain suivant :

Chlorure d'or.....	1 gr.
Eau distillée.....	100 —

auquel on ajoute (en volume) 2 0/0 d'acide chlorhydrique. Durée du bain : 1-2 heures, ce qui dépend de la nature de la pièce, de l'épaisseur des coupes (elles doivent être très égales et très minces) et de l'âge de la solution. Durée moyenne : 2 heures.

2° Laver superficiellement à l'eau distillée.

3° La coupe passe dans le liquide suivant :

Solution de potasse caustique	
à 10 0/0.....	5 c. cubes.

Ajouter : *ferri*-cyanure (et non pas *ferro*-cyanure) de potassium, une trace, c'est-à-dire gros comme une tête d'épingle en général.

Cette solution doit être préparée à frais pour chaque nouvelle fois. Le *ferri*-cyanure doit être tout à fait dissous. Agiter le liquide. Laver

vos doigts. Durée du bain : 1/2 minute.

4° Laver à fond dans de l'eau distillée.

5° Bain dans une quantité suffisante de solution de potasse caustique à 10 0/0. Durée du bain : 1/2 minute. Ce bain a pour tâche d'éliminer le ferri-cyanure, dont la présence occasionnerait plus tard un précipité bleu.

6° Laver à fond dans l'eau distillée. Pendant ce bain, on prépare le liquide de *réduction n° I* :

Solution d'acide sulfureux.	5 c. cubes.
Teinture d'iode à 3 0/0....	10-15 gouttes.

M.

Ce mélange doit se faire dans un tube gradué.

7° Dès que le mélange est obtenu, on sort la coupe en la pêchant soit avec un morceau de papier Josèphe, soit avec la spatule en platine, et on la dépose telle quelle sur une cupule. Cela fait, on reprend le mélange de réduction I et on y ajoute *une* goutte d'une solution de perchlorure de fer (du Codex allemand) et l'on agite. A ce moment, on arrose la coupe avec une quantité suffisante de liquide, de façon à la couvrir complètement, mais en empêchant que la coupe nage, car, dans ce cas, on ne la saisirait, plus tard, plus assez rapidement ; la coupe rougit presque instantanément. On se hâte de verser le liquide et de plonger la cupule et la coupe dans un récipient plus grand, contenant de l'eau distillée.

8° Lavage rapide à l'eau, dans laquelle la coloration rouge s'accroît encore ; puis, vive-

ment, après avoir placé la coupe sur un porte-objet, on donne :

9° Le bain de déshydratisation d'une durée moyenne de 5-10 minutes.

10° Essence de girofle.

11° Baume de Canada. Couvre-objet.

Dans le liquide réductif, la coupe doit se colorer en rouge ; mais, comme la manipulation, aussi rapidement menée qu'elle soit, peut faire durer le bain au delà du temps prescrit, il faut se contenter d'une coloration rose et, dès qu'on constate celle-ci, sortir la pièce et la plonger dans l'eau, où elle rougit plus énergiquement.

On peut se passer du bain au ferri-cyanure et le remplacer simplement par le bain à la solution de potasse caustique à 10 0/0. Durée du bain : également 1/2 minute.

*Méthode II.* — Préparer à l'avance les solutions suivantes :

Solution A. — Ajouter à une certaine quantité de teinture d'iode à 3 0/0 autant de chlorure de zinc qu'il en faut pour colorer le liquide en jaune ou jaune-blanc. Cette solution se conserve bien. C'est la solution de zinc.

Solution B. — Préparer une solution saturée de phosphate de fer dans de l'eau distillée (*ferrum phosphoricum*). C'est la solution de fer.

1° La coupe faite passe dans le liquide suivant :

Solution de chlorure d'or à 10/0. 5 c. cubes.

D'une solution saturée de vanadate d'ammoniaque..... 10 gouttes.  
 Acide chlorhydrique..... 3 —

M.

Durée de ce bain : 2 heures.

2° Laver à l'eau distillée.

3° La coupe passe ensuite dans le liquide suivant, pour 1/2-1 minute :

Solution de potasse caustique à 10 0/0..... 5 c. cubes  
 Solution de vanadate d'ammoniaque..... Trace.  
 Solution de permanganate de potasse à 10 0/0..... 10 gouttes.

M.

4° Lavage à l'eau distillée. Pendant que la coupe séjourne dans l'eau, préparer le *liquide de réduction n° II* :

Solution de zinc (a)..... 15 gouttes.  
 Eau distillée..... 3 c. cubes.  
 Solution de fer (b)..... 3-5 gouttes.  
 Solution d'acide sulfureux.. 3 c. cubes.

M.

Au moment où l'on ajoute l'acide sulfureux, il se forme un précipité abondant et concentré; c'est à cet instant précis que la coupe doit être plongée dans le liquide réductif. Prendre les mêmes précautions que pour la méthode I.

5° Lavage à l'eau distillée (où la coloration s'accentue).

6° Bain d'alcool absolu.

7° Essence de girofle; et 8° Canada, etc.

On peut remplacer le vanadate d'ammoniaque par une quantité correspondante d'acide chlorhydrique, le phosphate de fer par le nitrate de fer. Suivre les prescriptions de la méthode à la lettre; avoir les solutions à portée de la main; les solutions seront préparées dans l'ordre que nous indiquons. Ces méthodes paraissent, à première vue, un peu compliquées; cependant, avec un peu d'habitude, elles ne donnent pas plus de peine que d'autres qui passent pour simples. Il est souvent possible de juger déjà macroscopiquement si une pièce se prête à ces méthodes. Si sur une coupe faite au rasoir, la substance grise est grisâtre, blanchâtre, et la substance blanche foncée, comme noire, la pièce ne donnera pas de bons résultats; c'est dire que la différence de couleur entre la substance blanche et la substance grise ne doit être que très peu marquée. Il est bon de débiter par la méthode I. Elle est plus simple; en outre, au moyen du bain de potasse caustique, on peut constater la différence de coloration dont nous parlons entre les substances grise et blanche. Ces méthodes appliquées exactement fournissent des résultats surprenants. Les préparations faites par l'auteur, que nous avons eues sous les yeux, défient toute critique; celles que nous avons obtenues nous-même sont fort belles. Les cellules et les cylindraxes sont colorés en un beau rouge, les gaines sont incolores; d'autres fois, suivant la nature de la pièce et sa teneur en sels chromiques, les gaines seules le sont



et les cellules sont moins ou pas colorées.

XXXV. *Méthode au palladium (30-5).*

Les pièces doivent durcir dans le liquide de Müller. Ne jamais les laisser en contact avec de l'alcool. La lame du microtome sera mouillée avec de l'eau. Dans les différentes manipulations auxquelles on soumet les coupes, se servir d'instruments non métalliques.

1° La coupe faite est immergée pendant 5 minutes dans le mélange suivant :

Chlorure de palladium.....	1 gr.
Eau distillée.....	2,000 —

M.

La quantité de liquide employé ne peut pas servir une seconde fois.

Le flacon qui contient cette solution sera enveloppé de papier rouge ou noir et sera placé, hermétiquement bouché, dans une chambre noire.

2° La coupe est lavée dans de l'eau distillée.

3° Elle passe dans une quantité suffisante du mélange suivant :

Chlorure d'or.....	1 gr.
Eau distillée (environ).....	5 litres.

M.

Ce mélange doit être légèrement acidifié par de l'acide chlorhydrique.

4° La soucoupe blanche qui contiendra ce

bain est exposée, pendant environ 24 heures en tout, à l'action de la lumière (intensité moyenne), jusqu'à ce que les différents faisceaux de fibres accusent franchement une coloration violet foncé.

5° Laver la coupe à fond dans plusieurs eaux.

6° Bain d'alcool.

7° Essence de girofle.

8° Résine de Damar.

Ces préparations ne supportent pas l'examen au grossissement fort; elles donnent des tableaux d'ensemble convenables, mais à la condition de les examiner au grossissement faible ou moyen. Toutes les fibres ne sont pas toujours teintées, ou également teintées; le plus souvent, les grosses seulement sont colorées. Au lieu d'employer une solution à 1/5000 d'or, on peut se servir d'une solution à 1/2-1 0/0; dans ce cas, il faut exposer à la lumière (pas au soleil!) moins longtemps.

*Schiefferdecker* (49) colore les coupes longitudinales de la moelle dans une solution de palladium à 1 pour 10000. Bain de 3-5 heures de durée, jusqu'à coloration en bleu clair. Pour les coupes transversales, employer le chlorure d'or.

## CHAPITRE VIII

### Imprégnations métalliques.

(PRÉCIPITÉS NON COLORÉS)

(IV<sup>e</sup> groupe.)

A. — MÉTHODES FONDAMENTALES DE GOLGI.

XXXVI. *Méthode au nitrate d'argent  
de Golgi (61).*

Dans son excellent traité d'histologie et de technique microscopique, *Stöhr* préconise, comme celui donnant les meilleurs résultats, le procédé suivant :

Les morceaux du S. N. C. destinés à être traités doivent être enlevés du cadavre dans un état de fraîcheur le plus complet possible. Les morceaux de la moelle épinière, comme ceux de la substance cérébrale, du cervelet ou de la moelle allongée, ne doivent, en général, ne pas avoir plus de 2-3 centimètres de côté. Il est essentiel d'employer les plus grands soins de propreté dans le cours des manipula-

tions préliminaires, et de ne toucher les morceaux que très délicatement et sans les serrer.

On plongera les morceaux aussi rapidement que possible dans une large quantité de liquide de Müller, qu'on renouveliera fréquemment dans la suite. Six semaines environ suffisent pour les durcir. A ce moment-là, on peut les traiter.

Préparer alors les solutions suivantes :

*Solution a :*

Solution de nitrate d'argent	} aa 25 c. cubes.
à 1 0/0.....	
Eau distillée.....	

M.

*Solution b :*

Solution de nitrate d'argent à	
1 0/0.....	60 c. cubes.
Eau distillée.....	20 —

Le morceau qu'on a l'intention de traiter est sorti du liquide de Müller et, sans lavage préalable à l'eau, on le place sur une cupule en verre. On l'arrose avec le tiers à peu près de la solution *a*. Il se forme immédiatement d'abondants précipités bruns ou rouge-brun. Le liquide qui vient d'être souillé est jeté. On verse sur le morceau le second tiers de la solution *a*. Les précipités sont moins abondants que la première fois; on jette également cette seconde portion du liquide, puis on verse le troisième tiers de la solution *a* de la même façon; au bou, d'un instant, on le jette éga-

lement. La cupule ne contient plus que le morceau; celui-ci est reluisant alors et tout couvert d'une quantité de petites paillettes (des précipités) métalliques.

On sort délicatement le morceau en le tenant entre deux petits morceaux de papier Joseph et on le place dans une autre auge ou cupule très propre, au fond de laquelle on aura déposé une petite couche de papier à filtrer blanc, le morceau sur le papier. Cela fait, on arrose le tout avec la solution *b*, de façon à ce que le morceau soit abondamment recouvert de liquide. Il séjournera dans ce bain jusqu'à nouvel ordre. Les morceaux peuvent rester des mois entiers dans cette solution, sans danger aucun pour la suite de la procédure. A partir de ce moment, le morceau peut être coupé.

Dans la règle, les morceaux se font au rasoir, qu'on mouille avec de l'eau distillée; on fera les coupes en coupant perpendiculairement à la surface du morceau, et non pas horizontalement, c'est-à-dire parallèlement à la surface, et comme si on voulait tailler le morceau à la façon d'un crayon. On peut aussi fixer le morceau avec quelques gouttes de celloïdine B sur un bouchon et couper au microtome.

La première coupe est tout à fait opaque, fortement colorée en rouge-brun; on ne peut pas l'utiliser, il faut la jeter. Les coupes suivantes sont meilleures, mais il faut parfois en sacrifier quelques-unes avant d'arriver à en avoir de convenables.

1° Un certain nombre de coupes obtenu, on

les place de suite sur un porte-objet. On enlève l'eau qui les baigne encore, en l'aspirant avec un morceau de papier Joseph et on recouvre chacune des coupes d'une goutte de glycérine. Pas de couvre-objet. On examine la préparation à un grossissement faible ou moyen. On découvre alors, à côté de nombreux précipités noirs, qui sont surtout abondants à la périphérie et qui ne se laissent pas éviter, les cellules avec leurs prolongements. Toutes les cellules ne sont pas visibles; quelques-unes seulement d'entre elles sont imprégnées de particules métalliques. Les coupes qui suivront, celles qui seront prises plus avant dans le morceau ne montrent que de rares cellules et, finalement, n'en montrent plus du tout. Parmi les coupes ainsi placées sur le porte-objet et examinées à la glycérine, on choisit les mieux réussies et on les fait passer telles quelles dans un bain d'eau distillée.

2° On les y lave soigneusement pendant 1-2-5 minutes.

3° De là, on les transporte dans le bain d'alcool absolu.

4° Cela fait, on les plonge pour 2-5-8 minutes dans la créosote pure (3 c. cubes environ dans une auge à oiseaux), en veillant à ce que les coupes qui reviennent très facilement à la surface du liquide avant d'être complètement lubrifiées par la créosote, restent immergées dans le liquide. Elles ne doivent pas y flotter.

5° Après ce bain, on plonge la coupe dans une quantité suffisante de térébenthine (5 c.

cubes dans une auge) et on l'y laisse pendant 5-10 minutes. L'immersion complète s'y fait mieux que dans la créosote.

6° A ce moment, on place la ou les coupes sur le porte-objet, on essuie soigneusement le verre et on recouvre chacune des coupes d'une goutte de Damar. Pas de couvre-objet.

On placera les préparations très à plat dans un endroit sec, plutôt frais, à l'abri de la lumière. Tant que la couche de Damar ne sera pas complètement sèche, on ne peut examiner la préparation qu'au grossissement moyen (80 fois, par exemple); en employant un objectif puissant, on court le danger d'engluier le verre au contact du Damar; l'objectif est alors malaisé à nettoyer et, comme pour dissoudre le Damar il faut employer du chloroforme ou de l'alcool absolu, on court le risque de déluter les lentilles de l'objectif. Lorsque la couche de Damar est sèche, qu'elle ne colle plus au doigt, on peut examiner la préparation au grossissement puissant (250-300 fois).

Un assistant du professeur *Golgi* nous a indiqué le procédé suivi dans le laboratoire de ce savant; c'est, depuis lors, aussi à cette méthode que nous nous tenons. Pour éviter des répétitions, nous nous bornons à un exposé succinct du traitement, qui est plus expéditif que celui proposé par Stöhr, mais dont les résultats, au point de vue de la conservation des coupes, lui sont inférieurs. Le procédé de Stöhr est plus exact, plus méthodique; tout y est minutieusement pesé et mesuré, et son

principal mérite git, à notre sens, en ceci : que, par l'acte de l'examen à la glycérine, on peut constater de suite si les coupes à traiter ultérieurement présentent des cellules imprégnées en suffisante quantité et d'une façon satisfaisante, ou non ; dans ce dernier cas, on passe à d'autres coupes ou à d'autres morceaux, sans perdre de temps, de la peine et des ingrédients au traitement subséquent de coupes n'offrant pas d'intérêt spécial. Toutefois, les éléments histologiques sont, dans cet état d'imprégnation métallique, si délicats, si fragiles, que, moins on aura de manipulations à leur faire subir, mieux cela sera pour leur intégrité future.

Les pièces à durcir doivent être aussi fraîches que possible ; elles seront durcies dans le liquide de Müller. Changer le liquide une fois au moins chaque semaine, et en tous cas toutes les fois que l'on constate du trouble ou un début de moisissures. Le récipient qui les contient doit être couvert et placé dans un endroit complètement à l'abri de la lumière. On distinguera pour le traitement subséquent les morceaux plus petits qui auront environ 1 centimètre de côté et les morceaux plus gros. Le durcissement varie, suivant la grosseur des pièces, de 1 1/2-2-3 mois. Le récipient doit être bien fermé. Le durcissement obtenu, on sort les pièces à traiter et on les plonge telles quelles dans une abondante quantité d'une solution de nitrate d'argent à 1 0/0.

Au bout de 24 heures ou moins, suivant



l'intensité des précipités qui se forment, on jette cette première quantité et on la remplace par son équivalent en volume d'une solution de nitrate d'argent à 1 1/2 0/0. Les petites pièces (1 centimètre de côté) y séjourneront 1-2-3 jours; les morceaux un peu plus gros, quelques jours de plus; les morceaux plus gros encore, 10-15-20 jours. Les bains de nitrate doivent être préparés et donnés dans un endroit sec et à l'abri de la lumière; les récipients seront placés dans un meuble fermant hermétiquement.

Après ce bain, les morceaux passent dans de l'alcool à 50 0/0, en général pour 24 heures, puis dans de l'alcool toujours plus concentré à 60, 70, 80, 90 0/0, ce qui s'obtient en quelques jours, pour arriver à l'alcool à 95 0/0, dans lequel ils pourront séjourner des mois.

Quand on est pressé de couper, ces différentes stations dans de l'alcool progressivement renforcé peuvent être réduites à quelques heures, de façon à arriver à l'alcool à 95 0/0 au bout de 24 heures. Ce n'est alors cependant qu'un expédient; les bains successifs doivent se donner également dans un endroit clos et à l'abri de la lumière, les récipients toujours couverts. On coupe alors au microtome ou au rasoir, en fixant la petite pièce entre deux morceaux de moelle de sureau ou de papier Josèphe, ou sur un bouchon au moyen de celloïdine B. Mais, dans ce dernier cas, il faudra conserver le petit bloc dans de l'alcool à 85-90 0/0. Pas d'enrobement propre-

ment dit. Mouiller la lame de l'instrument avec de l'alcool à 80-90 0/0.

1° Les coupes seront transportées, au fur et à mesure de leur fabrication, dans de l'alcool de même force.

2° La coupe est plongée pour 3-5 minutes dans de la créosote.

3° Puis pour 5-10 minutes dans de la térébenthine.

4° La placer sur un porte ou couvre-objet. Essuyer soigneusement.

5° Couvrir chaque coupe d'une goutte de Damar. Pas de lamelle couvre-objet.

Pour transporter les coupes d'un bain dans l'autre se servir d'une spatule en platine, ou de fines pincettes, ou d'un morceau de papier Josèphe. Comme les coupes sont en général petites ou très petites, et que la manipulation avec un porte-objet est parfois malaisée, on remplace le plus souvent ce dernier par un couvre-objet ou une lamelle sur lesquels on place la ou les coupes. La préparation est-elle sèche, on fixe ce couvre-objet, mais renversé (les coupes en bas), sur un porte-objet en bois, d'une épaisseur d'un porte-objet en verre et sur lequel on aura découpé un disque d'environ 2-3 centimètres de diamètre; le couvre-objet ou la lamelle reposera par ses angles sur les bords de cet espace libre; on l'y fixe avec une goutte de Damar ou de Canada (le verre en haut, les coupes en bas), de façon à ce que les coupes se trouvent être situées vers le milieu de l'espace libre. On a ainsi un porte-

objet facile à manier, et toute possibilité d'engluer l'objectif disparaît; en outre, la poussière ne peut pas souiller les coupes.

### XXXVII. *Méthode au sublimé de Golgi.*

Les pièces destinées à être traitées ainsi doivent avoir durci dans le liquide de Müller ou dans une solution de bichromate potassique à 2 0/0. Elles doivent être de petites dimensions, environ  $1/2-1-1\ 1/2$  centimètre de côté. Le liquide durcissant doit être fréquemment changé et être employé en larges quantités. Lorsque ces petits morceaux approchent du terme de leur durcissement, on peut porter le titre de la solution à 2  $1/2-3-3\ 1/2$  0/0. Les petits morceaux y séjourneront 20-30 jours, les plus gros 2-3-4 mois.

Le durcissement obtenu, les morceaux passent dans la solution suivante :

Sublimé corrosif .....	0 gr. 25
Eau distillée.....	100 gr.

M.

Ou bien :

Sublimé corrosif.....	0 gr. 50.
Eau distillée.....	100 gr.

M.

C'est affaire de tâtonnement et dépend le plus souvent de la nature de la pièce. Il faut changer la solution aussi longtemps qu'elle se colore en jaune.

C'est à la fin de cette période qu'on pourra le mieux employer la solution à 50 0/0. Après 5-8-10 jours de ce bain, suivant le volume des morceaux et leur degré d'imprégnation, ce dont on pourra s'assurer au moyen de coupes d'essai faites au rasoir (les petits morceaux sont quelquefois prêts à être coupés 4-5 jours après leur immersion dans ce bain), on pourra couper définitivement. La réaction la plus énergique a lieu d'ordinaire après 10 jours. En général, l'imprégnation se fait d'autant mieux que les pièces séjourneront plus longtemps dans ce bain; si l'on n'est pas pressé de couper, on peut les y laisser presque indéfiniment. A la fin de cette imprégnation, les pièces ont à peu près l'aspect de la substance cérébrale à l'état frais. Pour être coupés, les morceaux sont traités comme ceux préparés au nitrate d'argent. Il n'est pas nécessaire de faire des coupes très minces.

1° Les coupes faites doivent être soigneusement et très abondamment lavées dans de l'eau distillée; 2°, 3°, etc., exactement comme il est dit plus haut.

Au grossissement moyen, on aperçoit un certain nombre de cellules nerveuses et névrogliques qui apparaissent fortement colorées en noir. Les prolongements avec leurs ramifications sont très nets et se détachent d'une manière agréable pour l'œil du fond de la préparation.

Ce n'est pas le lieu de relever le mérite si considérable des méthodes de *Golgi*, en cher-

chant à énumérer les immenses services rendus ainsi à la science par ce savant. Tout le monde sait que c'est grâce à ses méthodes que nous sommes arrivés enfin à la connaissance exacte des prolongements protoplasmiques et nerveux, de leur mode de terminaison, etc. Les méthodes les plus récentes, greffées sur les procédés de *Golgi*, ont permis à *Ramon y Cajal*, à *von Kælliker*, à d'autres encore, des découvertes d'ordre supérieur relativement aux fibres sensibles, aux collatérales, aux arborescences terminales, etc., toutes choses qui jettent une lumière nouvelle dans l'étude du S. N. C. et qui ne se seraient pas produites encore, sans les premiers travaux de *Golgi* et la vulgarisation rapide de ses méthodes.

Dans le cours des modifications apportées à ces méthodes fondamentales, les spécialistes se sont appliqués à perfectionner les différents actes dont elles se composent. Ces perfectionnements portent principalement sur une imprégnation plus égale et plus complète sur toute l'étendue des prolongements et de leurs ramifications, plus fixe sur le corps même des cellules et sur une meilleure conservation des préparations.

Quand on examine une coupe selon *Golgi*, on constate qu'un nombre très restreint seulement de cellules sont convenablement imprégnées sur un espace donné, que les cellules nerveuses sont en moins grand nombre que les cellules névrogliales, et l'on a formulé le

reproche que ces méthodes n'imprégnassent pas les éléments nerveux en assez grande quantité. Loin de présenter un inconvénient, ce fait constitue un avantage en ce que l'examen d'une image est facilité par la concentration de l'œil sur des éléments nettement isolés. Si toutes les cellules étaient également imprégnées, il ne serait pas possible, dans le fourmillement dans lequel se trouvent ces éléments, d'en séparer l'une de l'autre assez pour pouvoir en étudier avec fruit les prolongements nerveux et protoplasmiques.

Ce qu'on peut reprocher avec raison à ces méthodes, c'est l'irrégularité de distribution des précipités le long du trajet d'un prolongement nerveux et des fibres en général, plus encore que sur les corps mêmes des cellules. Elles sont, en somme, capricieuses. Un second reproche très fondé a trait à la conservation des coupes. Les combinaisons ou précipités formés se résorbent facilement, et les préparations deviennent assez vite inutilisables pour l'étude. *Greppin* a cherché à remédier au mal par sa méthode qui permet l'emploi du couvre-objet. *Fick* (64), pour empêcher cette résorption, cette fonte des précipités, au moins dans une certaine mesure, propose de chauffer légèrement le porte-objet, pour favoriser l'évaporation plus rapide du liquide employé pour monter la coupe.

*Schwald* a cherché à rendre les préparations plus durables, en saturant tous les liquides employés dans la méthode avec du bichromate d'argent. Il paraît que les résultats sont

parfois satisfaisants. En outre, pour empêcher la formation de précipités en excès, cet auteur plonge les morceaux qui doivent être coupés, et après le bain de durcissement, dans de la gélatine. Après le bain d'argent, la gélatine se dissoudrait dans un bain d'eau chaude (?).

Nous passons maintenant aux modifications des méthodes de Golgi, qui constituent de réels perfectionnements ; quant aux autres qui apparaissent continuellement, nous préférons les passer sous silence jusqu'à ce que l'épreuve du temps ait sanctionné les résultats qu'elles prétendent fournir.

## B. — MODIFICATIONS DES MÉTHODES DE GOLGI.

### XXXVIII. *Méthode de Flechsig* (63).

Cette méthode a pour but de colorer les éléments myéliniques des fibres, tout en démontrant la connexion des prolongements nerveux avec le réticulum des fibres de la substance grise. Les pièces traitées de cette manière par Flechsig avaient pour la plupart séjourné un an dans une solution de sublimé corrosif à 1 0/0, après leur durcissement dans le liquide de Müller ou dans une solution de bichromate de potasse à 2 0/0. Après durcissement, les pièces passent dans la solution au sublimé et peuvent donc y séjourner très longtemps ; on coupe.

1° La coupe faite passe dans un bain d'alcool à 96 0/0.

2° Bain de couleur qui dure 3-8 jours, à une température de 35° C. dans l'étuve.

Solution colorante :

Extrait de campêche du Japon.	1 gr.	
Alcool absolu.....	10 —	
Eau distillée.....	900 —	
Solution saturée de sel de Glau-ber.....	} aa 5 gr.	
Solution saturée d'acide tar-trique.....		

M.

3° Chaque coupe passe isolément dans 3 c. cubes d'une solution de permanganate de potasse à 1/4-1/5 0/0, et y reste aussi longtemps que la solution n'a pas perdu sa coloration bleuâtre. Ce virage obtenu, les coupes passent dans la solution suivante, où elles sont décolorées.

4° Solution décolorante :

Acide oxalique.....	} aa 1 gr.	
Sulfure de potasse.....		
Eau distillée.....	200 —	

M.

Si la décoloration n'est pas obtenue du coup, on reportera les coupes dans le bain n° 3, puis dans le bain n° 4, et ainsi de suite jusqu'à ce que la coupe ait perdu sa teinte jaunâtre.

5° La coupe passe alors dans le mélange suivant :

Alcool absolu.....	20 c. cubes.
Solution de chlorure d'or et de potasse à 1 0/0.....	5 gouttes.

M.



jusqu'à ce que les précipités de sublimé, qui, vus en pleine lumière, apparaissent blanchâtres, soient devenus entièrement noirs, et jusqu'à ce que les faisceaux des fibres nerveuses aient pris une teinte bleuâtre.

6° Lavage dans le liquide suivant :

Eau distillée.....	20 gr.
Solution de cyanure de potassium à 5 0/0.....	1 goutte.

M.

Sur ce liquide, la coupe ne doit que flotter (pas d'immersion).

7° Bain d'alcool.

8° Essence de lavande.

9° Canada.

Les fibres nerveuses sont rouges (couleur du carmin), les cellules ganglionnaires et les prolongements protoplasmiques restent colorés en noir fumé.

### XXXIX. *Méthode de Ziehen (62).*

1° Les pièces, qui doivent être coupées en petits morceaux cubiques et provenir d'une portion du S. N. C. parfaitement fraîche, ne durcissent pas dans un liquide chromo-potassique ; elles sont immédiatement plongées dans la solution suivante :

Solution de chlorure d'or	} Parties égales.
à 1 0/0.....	
Solution de sublimé corrosif à 1 0/0.....	

M.

Les pièces séjournent dans ce bain pendant au moins 3 semaines; le mieux sera de les y laisser pendant plusieurs mois (1-5). Ce n'est que tout à fait exceptionnellement et pour de courts instants qu'on pourra se servir de l'étuve, mais à une température peu élevée. Pourvu qu'on emploie de grandes quantités de liquide, il n'est pas nécessaire de changer ce bain durcissant fréquemment. Les pièces acquièrent dans ce liquide une coloration métallique rouge-brun. Après durcissement convenable, une pièce peut être coupée sans avoir passé par un enrobement spécial; il suffira de la coller sur un bouchon et de procéder aux coupes.

2° Les coupes faites sont plongées dans de l'alcool; elles y prennent une couleur bleue ou noire, qu'on reconnaît en les examinant au grossissement moyen, et qui paraît plutôt brune ou noir brun à l'œil nu.

3° Le bain donné, on immerge les coupes, pour un temps qui varie en durée et qui dépend de l'épaisseur des coupes, dans le bain de différenciation, constitué par une solution de lugol au 1/4, ou à défaut dans une solution alcoolique de teinture d'iode au 1/4.

4° Lavage soigneux dans de l'alcool absolu.

5° Essence de girofle.

6° Baume de Canada.

Il faut éviter le contact avec des instruments métalliques. A l'examen microscopique, éviter que la lumière solaire directe ne frappe la platine sur laquelle repose le porte-objet.

Les résultats de la méthode sont les suivants : les fibres à myéline et celles sans myéline, les cellules nerveuses avec leurs prolongements sont colorées en bleu-gris. Le nombre des cellules colorées est plus grand que dans les préparations obtenues par les méthodes de Golgi ; les ramifications des prolongements sont moins nombreuses. Le noyau et le nucléole des cellules sont nettement colorés et différenciés l'un de l'autre. Les contours des cellules et des noyaux sont particulièrement nets, l'intérieur même des cellules est peu coloré (imprégné) et apparaît comme saupoudré de bleu-noir (précipités métalliques) et *presque* transparent !

La coloration et la décoloration, c'est-à-dire la différenciation, ne sont pas toujours constantes. Avec un peu d'exercice dans la manipulation du bain au lugol ou à l'iode, on arrive assez facilement à saisir le moment où le bain doit cesser. L'étude comparative des coupes non différenciées et des différenciées est instructive. L'auteur a essayé, en outre, sa méthode sur des pièces durcies dans une solution de bichromate potassique ; les pièces passaient après durcissement dans le bain d'or et de sublimé, et y séjournaient plusieurs semaines. Il coupait ensuite et différenciait avec l'iode. Le corps même des cellules apparaissait alors tout à fait incolore, très exactement défini ; les prolongements protoplasmiques étaient nettement dessinés en noir, par le fait des précipités particuliers à la procédure. Ces

préparations sont excellentes pour l'étude de la continuité du prolongement protoplasmique et du prolongement nerveux avec les différents territoires de la cellule. Le grand avantage de la méthode paraît se trouver dans le fait que les fibres à myéline se colorent régulièrement et que la structure intime du corps de la cellule n'est pas marquée, comme cela a lieu dans les préparations traitées selon Golgi, par un amalgame noir qui ne laisse rien distinguer.

#### XL. *Méthode de Greppin (65).*

Les coupes du S. N. C. qu'on voudrait colorer suivant cette méthode doivent, de même que les pièces d'où elles proviennent, avoir été traitées suivant la méthode de Golgi ou celle de Ramon y Cajal et de von Kœlliker.

1° La coupe colorée par un de ces procédés passe directement dans une faible solution aqueuse d'acide hydrobromique (2-3 0/0).

Elle y séjourne jusqu'à ce qu'elle ait pris une coloration blanchâtre (les précipités de chromure d'argent s'y transforment probablement en précipités de bromure d'argent).

2° Lavage rapide à l'eau distillée.

3° Lavage à l'alcool.

4° On transporte la coupe dans une cupule contenant de l'essence de girofle. La coupe nage ou flotte sur l'essence.

5° On expose le tout à la lumière solaire

aussi intensive que cela est possible pendant quelques minutes.

Les éléments nerveux, qui sous l'action de l'acide hydrobromique s'étaient presque complètement décolorés, réapparaissent maintenant énergiquement colorés en noir, et restent tels dans la suite.

6° La coupe est montée au Canada. *Couvre-objet.*

Pour obtenir une coloration double, on fait passer la coupe, après le bain d'essence de girofle, dans un bain d'alcool. Cela fait, on la laisse pour 6-10 heures dans une solution d'acide chromique à 1/2 0/0, on la colore à l'hématoxyline selon Weigert ou Pal et on lui fait subir le traitement subséquent prévu par ces méthodes et la méthode de Greppin. Cet acte du procédé peut être sensiblement raccourci si, au lieu d'employer une solution d'acide chromique froide, on chauffe le liquide contenant la coupe dans une cupule de porcelaine jusqu'à abondant dégagement de vapeur.

Lorsqu'après avoir ainsi traité une coupe jusque et y compris le n° 5 (bain d'essence de girofle) et l'exposition solaire, on la plonge dans une solution d'hyposulfate de soude à 1 0/0 (*natrium subsulfurosum*), on obtient de belles images, plus nettes que les autres, parce que les précipités formés en dehors des cellules se dissolvent dans ce bain, et que l'imprégnation intra-cellulaire seule persiste.

Les coupes ainsi traitées se conservent

longtemps intactes; on emploie des couvre-objets (lamelles).

On essaiera aussi les modifications suivantes, apportées par *Greppin* à la méthode de Golgi :

I. — Immédiatement après une autopsie, ou bien après un très court séjour dans le liquide de Müller, on plonge de petits morceaux des pièces à examiner dans le liquide suivant :

Solution d'acide hyperosmique à 1 0/0.....	2 parties.
Solution de bichromate de po- tasse à 2 0/0.....	8 —

M,

où ils durcissent.

Après 2-3 jours de ce bain, on traite les morceaux au nitrate d'argent.

Le procédé de Golgi est ainsi accéléré. Le plus souvent, on voit une grande quantité d'éléments bien imprégnés.

II. — Au lieu d'employer le nitrate d'argent, *Greppin* se sert du sublimé, mais dans les conditions suivantes :

Les pièces qui auront séjourné au moins 6-8 semaines dans le liquide de Müller passent directement dans une solution aqueuse de sublimé corrosif à 1/2 0/0. On changera chaque jour le liquide. Après 3-4 semaines, on obtient de belles images, qui sont plus durables lorsqu'on les traite subséquentement encore, suivant *Pal*, dans une solution de sulfide de soude à 1 0/0.

XLI. *Méthode de von Kœlliker  
et Ramon y Cajal (67).*

La méthode qui va être décrite, et qui a donné à ces savants des résultats si remarquables, ne peut être employée que sur des pièces provenant d'embryons ou tout au plus de sujets nouveau-nés.

On enlève délicatement, et en faisant attention à ne jamais toucher les pièces en cause avec les doigts, le S. N. C. dans son entier (moelle spinale et cerveau) avec les enveloppes (dure-mère spinale et cérébrale) intactes. Pour cela faire, il faut se servir de pincettes et de ciseaux courbes et pointus, ou d'un scalpel à pointe effilée.

1° Ces organes sont soigneusement étendus sur la table de travail, puis on fend la dure-mère spinale et médullaire dans toute sa longueur et en la rabattant de chaque côté, de façon à mettre à nu le tissu nerveux proprement dit. Avec un rasoir, on fera des sections transversales sur la moelle spinale, de façon à obtenir des morceaux de 3-4 millimètres de longueur, mais en coupant de telle sorte qu'ils continuent à rester attachés par un de leurs côtés externes à la dure-mère, qu'on ne sectionne donc pas. Cela permettra pour chaque morceau une orientation exacte. Cela fait, on sectionne le cerveau en 2-3 morceaux principaux, la moelle allongée et les parties avoisinant la moelle spinale également en plusieurs

morceaux de quelques millimètres de côté chacun.

2° Une partie de ces morceaux est immergée de suite, soit par groupes, soit chaque morceau isolément, dans une large quantité du liquide suivant :

Solution de bichromate de potasse à 3 0/0.....	4 parties.
Solution d'acide osmique à 1 0/0	1 partie.

M.

Au point de vue de la quantité à employer, il faut compter au moins 40-50 centimètres cubes pour chaque petit morceau à traiter, davantage pour les gros. Quelques heures après cette immersion, on changera le liquide. Mais, comme le prix de l'acide osmique est très élevé, on pourra se servir de nouveau de la première quantité de liquide employée pour le premier bain pour les morceaux qui suivront. La quantité employée pour le second bain pourra servir également plus tard comme second bain.

3° Après avoir séjourné 1-1 1/2 jour dans le mélange, les morceaux passent dans une quantité suffisante d'une solution de nitrate d'argent à 1/4 0/0. Durée du bain : 1/4-1/2 heure.

4° De ce premier bain de nitrate les morceaux passent dans une seconde solution de nitrate d'argent et à 0,75 0/0, dans laquelle ils doivent rester pendant 30-48 heures. Pour ce bain également, il faut employer de grandes quantités de liquide.



5° En sortant de ce bain, les morceaux sont plongés dans de l'alcool à 40 0/0. A partir de ce moment, on peut couper, ou bien avec un rasoir en tenant le morceau entre les doigts, ou bien, ce qui vaut mieux, au microtome, après avoir enrobé le morceau à la celloïdine.

Si l'on se décide à enrober le morceau, il faudra, au préalable, lui donner un bain d'une heure dans de l'alcool absolu et, cela fait, l'arroser de celloïdine en le laissant également pendant une heure s'imprégner convenablement dans cette substance. De suite après ces manipulations, les morceaux devront être coupés, car, pour peu qu'ils attendent alors, ils s'altèrent et finissent par se gâter complètement. On ne peut pas les conserver tels quels plus de 24 heures.

6° Les coupes faites au microtome — avoir soin de mouiller abondamment la lame avec de l'alcool à 40 0/0 — passent pour 1/4 d'heure dans de la créosote.

7° Puis, pour quelques minutes, dans la térébenthine.

8° On les monte au baume de xylol, sans les couvrir d'une lamelle. Les morceaux qui n'auraient pas été coupés peuvent se conserver encore un certain temps dans l'alcool à 40 0/0 (ceux qui n'ont pas été enrobés), mais à la longue ils s'altèrent et au bout de 2-3 semaines ils ne sont plus utilisables. Les coupes, par contre, qu'on plongera dans de l'alcool à 40 0/0 s'y conservent encore assez longtemps, jusqu'à

plusieurs mois même, d'après ce qu'ont pu observer les auteurs.

*Golgi* (68) a modifié ce procédé en ceci : qu'il accélère le durcissement en remplaçant la liqueur de Müller par le mélange suivant :

Solution d'acide osmique à 1 0/0.	2 volumes.
Solution de bichromate de potasse à 2 0/0.....	8 —

qui diffère quelque peu de celui employé par Ramon y Cajal et von Kœlliker. En sortant de ce bain, les morceaux passent dans une solution de nitrate d'argent à 75 0/0, où ils séjournent de 24 heures à quelques jours. Les coupes faites à la main, après enrobement superficiel à la celloïdine ou sur le morceau tel quel, sont lavées rapidement dans de l'alcool à 40 0/0 et déshydratées à l'alcool absolu. Térébenthine, créosote, xylol, Canada.

Le liquide employé par Ramon y Cajal a la formule suivante :

Bichromate de potasse....	3 volumes.
Acide osmique.....	25 —
Eau distillée.....	100 —

et diffère, comme on le voit, un peu du liquide préconisé par von Kœlliker.

#### XLII. *Méthode d'Obregia* (69).

L'auteur applique aux coupes provenant de pièces traitées suivant la méthode au nitrate d'argent de *Golgi* le virage des photographes.

Sous l'action du chlorure d'or, le chromate d'argent se transforme en chromate d'or.

1° Les coupes faites passent, sans être lavées à l'eau, dans le mélange qui suit :

D'une solution de chlorure d'or	
à 1 0/0.....	8-10 gouttes.
Alcool absolu.....	10 c. cubes.

Ce mélange doit être préparé à nouveau pour chaque fois et être exposé pendant une demi-heure à l'action de la lumière diffuse avant que de l'employer. La durée de ce bain, qui doit se donner dans une chambre noire, est de 15-20 minutes.

2° La coupe est rincée dans de l'alcool à 50 0/0.

3° Lavage rapide à l'eau distillée.

4° Bain de 5-10 minutes dans une solution d'hyposulfite de soude à 10 0/0.

5° Lavage à fond dans de l'eau.

A ce moment, on peut colorer complémentaiement au carmin ou à l'hématoxyline, etc. On déshydrate et on monte.

Dans le bain aurique, les images s'effacent quelque peu, les fines ramifications nerveuses se décolorent.

Pas d'instruments métalliques durant tout le cours de ces manipulations. *Golgi* (3) lui-même applique actuellement le procédé du virage pour ses coupes et recommande pour la coloration complémentaire (ou double) l'emploi d'une solution très diluée de carmin acide.

XLIII. *Méthode de Cox* (70). ▶

La modification suivante a pour but principal de rendre l'imprégnation métallique plus égale, de façon à ce qu'un plus grand nombre de cellules avec leurs prolongements complets puissent être reconnues sur une seule et même coupe.

L'auteur fait agir le sublimé et le bichromate simultanément sur les tissus, au moyen de la solution suivante, dans laquelle un morceau séjournera deux ou plusieurs mois avant d'être coupé:

Solution de bichromate de	}	ã 20 volumes.
potasse à 5 0/0.....		
Solution de sublimé corro-		
sif à 5 0/0.....		
Eau distillée.....	30-40	—

M.

Le traitement des coupes est le même que pour la méthode de Golgi.

Pour réduire la réaction acide du liquide de durcissement au minimum, l'auteur ajoute au mélange en question 16 volumes d'une solution de chromate de potasse jaune à 5 0/0 et à réaction alcaline.

Sur des coupes provenant de pièces n'ayant séjourné que peu de jours dans ce liquide (2-4 jours), on constate dans les cellules et les prolongements des précipités granuleux jaunes. En traitant ces coupes avec une solution

faible d'ammoniaque ou de carbonate de soude, les précipités deviennent noirs.

L'imprégnation en question consiste probablement dans une réduction de sublimé, mis en contact avec le bichromate potassique, en une nouvelle combinaison mercurique. Cette réduction-imprégnation dans l'intimité des tissus n'est pas constante cependant (3).

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

---

### *Sources où l'on pourra puiser pour détails complémentaires.*

1. ROBIN, *Traité du microscope et des injections*, etc. ; Paris, J.-B. Baillière, 1877.
2. STÖHR. *Compendium der microscopischen Technik und Histologie* ; Iena, Fischer, 1892. V Ed.
3. HERMANN (F.). In *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, etc. I Bd. Technik ; Wiesbaden, Bergmann, 1892.
4. FOL (H.). *Lehrbuch der vergleichenden microscopischen Anat.*, etc. ; Leipzig, 1885.
5. BOLLES-LEE et HENNEGUY. *Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique* ; Paris, O. Doin, 1887.
6. STRASSER. Das Schnitt-Aufklebe-Microtom, etc., in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, VII Bd, 1891.
7. BERNHARD. Kleiner Tropfapparat für Microtome, in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, VIII Bd, 1891.
8. GUDDEN. In *Archiv für Psychiatrie*, V Bd, 1875.

9. OBERSTEINER (H.). *Anleitung beim Studium, etc., der nervösen centralorgane, etc.*; Leipzig, Wien, Tœplitz, Denticke, I. Ed, 1888.
10. FLEMMING (W.). Notizen zur Färbtechnik, in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, I Bd, 1884.
11. BENDA. Ein neues Härtungsmittel, in *Verhandlungen d. Anatom. Gesellschaft Würzburg*, 1888.
12. VON KAHLDEN. *Technik der histologischen Untersuchungen*; Iena, Fischer, 1890.
13. MARCHI et ALGERI. *Rivista sperimentale di fren.*, t. XI, 1885.
14. KULTSCHITZKY. Zur Kenntniss der modernen Fixiermethoden, etc., in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, IV Bd, 1887.
15. LASKOWSKI. *Embaumement et conservation des sujets*, 1886.
16. SCHWALBE. *Lehrbuch der Neurologie*; Erlangen, Besold, 1881.
17. STIEDA. Ein neues Verfahren, etc., in HERMANN (3).
18. SUCHANNEK. Technische Notiz über Verwendung des Anilinöls, etc., in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, VII Bd, 1890.
19. CIAGLINSKI. In HERMANN (3), Ein Beitrag für micros. Technik, *ibid.*, 1891.
20. WEIGERT. Zur Markscheidenfärbung, in *Deutsche medicin. Wochenschrift*, 1891.
21. WEIGERT. Schnittserien, etc., in (9), in (12), in (30), in (2), in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, 1889.
22. STRASSER. Schnittserien, ihre Nachbehandlung bei Paraffineinbettung, in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, VII Bd, 1891.
23. OBREGIA. Schnittserien und Photoxyllinplatten, in *Neurolog. Centralblatt*, 1890.

24. DARKSCHEWITSCH. In VON KAHLDEN, *op. cit.*
25. GIACOMINI. Collodion-gélatine pour coupes volumineuses, in BOLLES-LEE, *op. cit.*
26. APATHY. Erfahrungen in d. Behandlung d. Nervensystems, etc., in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, IX Bd, 1892.
27. FOREL (A.). Untersuchungen über die Haubenregion, etc., in *Archiv für Psychiatrie*, VII Bd, 1877.
28. DEITERS. *Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark*; Braunschweig, 1865.
29. GERLACH. In FRIEDLÄNDER, *op. cit.*, in VON KAHLDEN, in OBERSTEINER, STÖHR, *op. cit.*
30. FRIEDLÄNDER. *Microscopische Technik*, II Ed; Berlin, Ed. Fischer, 1884.
31. SCHMAUS. Technische Notizen zur Färbung der Axencylinder, in *Münchener med. Wochenschrift*, 1891, n° 8.
32. HONEGGER. *Vergleichend. anatomische Untersuchungen über den Fornix*; Genève, Aubert, 1890.
33. HENLE et MERKEL. *Handbuch der Nervenlehre*, 1871.
34. EHRLICH (P.). Ueber die Methylenblaureaction, etc., in *Deutsche med. Wochenschrift*, 1886.
35. JELGERSMA. Anilin blue-black, in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, III Bd, 1886.
36. NISSL. In *Neurologisches Centralblatt*.
37. REHM. In ASCH, Färbungs Methoden von Rehm, in *Neurologisches Centralblatt*, n° 9, 1892.
38. WEIGERT. In *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, 1884, in *Fortschritt der Medicin*, 1884.
39. PAL. In OBERSTEINER, in STÖHR, in VON KAHLDEN, *op. cit.*
40. KULSCHITZKY. Ueber eine neue Methode d. Hæmatoxylinfärbung, in *Anatomischer Anzeiger*, IV Bd, 1889.



41. WOLTERS (Max). Drei neue Methoden für Mark und Axencylinderfärbung, in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, VII Bd, 1890.
42. KAES. Die Anwendung der Wolterschen Methoden, in *Neurolog. Centralblatt*, 1892, n° 9.
43. BERKLEY. Die Osmium, Kupfer, Hæmatoxylinfärbung, in *Neurolog. Centralblatt*, 1892, n° 9.
44. MERCIER (A.). Zur Mark scheidenfärbung, in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, 1890.
45. KAISER. Osmium-Eisen-Hæmatoxylinfärbung, in *Neurolog. Centralblatt*, 1893, n° 11.
46. EXNER. In *Sitzungsberichte der K. K. Akademie d. Wissenschaft*; Wien, 1881.
47. BELLONCI. *Riserche comparative sulla struttura dei centri nervosi*, etc. ; Roma, 1880.
48. COHNHEIM. *Virchow's Archiv*, XXXVIII Bd, 1866.
49. SCHIEFFERDECKER. *Archiv für microscopische Anatomie*, 1874.
50. GERLACH. *Strickers Handbuch*, p. 678.
51. FREUD. *Archiv für Anatomie und Physiologie*, 1884, p. 453.
52. UPSON. In A. MERCIER, Die Upsons'schen Methoden, etc., in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, VII Bd, 1890.
53. SAHLI. Säurefuchsin, etc., in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, 1885.
54. ADAMKIEWICZ. Neue Rückenmarkstincturen, in *Sitzungsberichte der K. K. Akademie*; Wien, 1884, LXXXIX Bd.
55. NIKIFOROFF. Microscopisch-technische Notizen, in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, VIII Bd, 1891.
56. ARONSON. Ueber Anwendung des Galleins, für Färbung d. Centralnervensystems, in *Centralblatt für med. Wiss.*, 1890.

57. STRÖBE. *Neurolog. Centralblatt*, 1893, n° 7.
58. VASSALE. Nuovi metodi d'immagine, etc., in *Neurolog. Centralblatt*; Referat, 1892.
59. MALLORY. Phospho-molybdic acid-hæmatoxylin, in *Anatom. Anzeiger*, VI Bd, 1891.
60. GIERKE. *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, I Bd, p. 96.
61. GOLGI. *Sulla fina anatomia degli organi centrali*; Milano, Hoepli, 1886.  
GOLGI. In STÖHR, *op. cit.* (2), in OBERSTEINER, *op. cit.* (9), etc.
62. FLECHSIG. *Leitungsbahnen im Gehirn*, 1876, in VON KAHLDEN, *op. cit.* (12).
63. ZIEHEN. Eine neue Färbungs Methode d. Centralnervensystems, in *Neurologisches Centralblatt*, 1891, n° 10.
64. FICK. Zur Technik der Golgischen Färbung, etc., in *Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie*, VIII Bd, 1891.
65. GREPPIN. Beitrag zur Kenntniss der Golgischen Untersuchungs Methoden, in *Archiv für Anatomie und Physiolog. anat.*, 1889.
66. VON KÆLLIKER. Zur feineren Anatomie des Centralnervensystems. Das Rückenmark, in *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*; Leipzig, Engelmann, 1890.
67. RAMON Y CAJAL. In VON KÆLLIKER, *op. cit.* (66), in HERMANN, *op. cit.* (3).
68. GOLGI. Sulla struttura delle fibre nervose midollate periferiche e centrale, in *Archiv. per la Science med.*, 1880, vol. V.
69. OBREGIA. Technische Mittheilungen, in *Virchow's Archiv*, p. 122.
70. COX. Impregnation des Centralnervensystems mit Quecksilber Salzen, in *Archiv für microscopische Anatomie*, XXXVII B1, 1891.

71. NEELSEN. *Grundriss der pathologisch-anatomischen Technik für praktische Aerzte und Studierende*; Stuttgart, Enke, 1892.
72. EDINGER (L.). *Zwölf Vorlesungen über der Bau der nervösen Centralorgane für Aerzte und Studierende*; Leipzig, Vogel, 1892.
73. *Archives de Neurologie* (Paris), années 1890-1893.

# PLAN & TABLE DES MATIÈRES

---

## CHAPITRE PREMIER

	Pages
A. — Instruments d'étude et de travail.....	1
B. — Instruments accessoires.....	22

## CHAPITRE II

DURCISSEMENT DES PIÈCES	30
-------------------------	----

## CHAPITRE III

A. — Traitement subséquent des pièces durcies.	59
B. — Enrobement à la paraffine.....	68
C. — Enrobement à la celloïdine.....	76
D. — Inclusion dans le microtome de Gudden..	84

## CHAPITRE IV

A. — Fabrication des coupes aux différents microtomes.....	89
B. — Manipulations subséquentes des coupes ..	99
C. — Systèmes des coupes en séries.....	119
1° Système des plaques de Weigert.....	119
2° Système des feuillets de Strasser.....	128
3° Système des plaques d'Obregia.....	133
4° Système de Darkschewitsch.....	138
5° Système de Giacomini.....	140

## DEUXIÈME PARTIE

<i>Méthodes de coloration et d'imprégnation.....</i>	143
------------------------------------------------------	-----

## CHAPITRE V

## COLORATION DES CELLULES AVEC LEURS PROLONGEMENTS

A. — Méthodes au carmin et ses composés.....	148
1° Méthodes au carmin-ammoniaque.....	153
<i>a.</i> selon Gerlach.....	153
<i>b.</i> selon Fritsch.....	155
<i>c.</i> selon Stöhr.....	156
<i>d.</i> selon Honegger.....	157
2° Méthode au carmin-borax (Grenacher)...	158
3° Méthode au carmin-cochenille (Czokor)...	159
4° Méthode au carmin-alun (Grenacher)....	160
5° Méthode au carmin-uranium (Schmaus)..	161
6° Méthode au carmin-lithine (Orth).....	162
7° Méthode au picro-carmin.....	163
<i>a.</i> selon Ranvier.....	163
<i>b.</i> selon Stöhr.....	165
8° Méthode double de Mathias Duval.....	163
9° Méthode au carmin-acide de Zuppinger.	169
B. — Méthodes aux couleurs d'aniline, etc....	170
10° Méthode à l'aniline blue-black.....	173
<i>a.</i> selon Jelgersma.....	173
<i>b.</i> selon Schmaus.....	175
11° Méthode à la nigrosine.....	176
<i>a.</i> méthode de notre laboratoire.....	176
<i>b.</i> selon Bewan-Lewis.....	178
<i>c.</i> selon Martinotti à la picro-nigrosine.	178
12° Méthode au bleu d'aniline de Zuppinger.	179
13° Méthode au brun de vésuvine.....	182
14° Méthode de Nissl.....	183
15° Méthodes de Rehm.....	185

## CHAPITRE VI

## COLORATION DES GAINES DE MYÉLINE

A. — Méthode à base d'hématoxyline.....	190
-----------------------------------------	-----

16° Méthodes de Weigert.....	190
<i>a.</i> primitive, fondamentale.....	190
<i>b.</i> modifiée, rapide.....	195
17° Méthode de Pal.....	197
18° Méthode de Kulschitzky.....	201
19° Méthode de Max Volters.....	203
20° Méthode de Berkley.....	205
21° Méthode de l'auteur.....	208
22° Méthode de Kaiser.....	214
B. — A base d'autres agents colorants.....	217
23° Méthode d'Exner.....	217
24° Méthode de Bellonci.....	218

## CHAPITRE VII

### COLORATION DES CELLULES ET DES GAINES

A. — Méthodes de coloration au moyen d'agents colorants divers.....	220
25° Méthode de Sahli à la fuchsine acide....	220
26° Méthode d'Adamkiewicz à la safranine..	222
27° Méthode de Nikiforoff.....	224
28° Méthode d'Aronson à la galléine.....	225
29° Méthode de Ströbe.....	227
30° Méthode de Mallory.....	228
B. — Pseudo-imprégnations métalliques avec coloration.....	229
31° Méthode à l'or, selon Cohnheim.....	229
32° Méthode à l'or, selon Gerlach.....	230
33° Méthode à l'or, de Freud.....	232
34° Méthode à l'or I et II d'Upson.....	234
35° Méthode au palladium.....	240

## CHAPITRE VIII

### IMPRÉGNATIONS MÉTALLIQUES

A. — Méthodes fondamentales de Golgi.....	242
36° Méthode au nitrate d'argent de Golgi...	242
37° Méthode au sublimé de Golgi.....	250
B. — Modification de ces méthodes.....	254
38° Méthode de Flechsig.....	254

39° Méthode de Ziehen.....	256
40° Méthode de Greppin.....	259
41° Méthode de von Kœlliker et Ramon y Cajal.....	262
42° Méthode d'Obregia.....	265
43° Méthode de Cox.....	267
Index bibliographique.....	269













