

PROCÉDÉ DE MONTAGE DES ECHANTILLONS PARASITOLOGIQUES DANS LES VERRES SYNTHÉTIQUES

Par J. COUDERT et Ch. BAUD

La difficulté de renouveler les échantillons d'insectes mis à la disposition des étudiants au cours des séances de travaux pratiques, nous a amenés à rechercher un procédé de montage dans un milieu homogène, transparent et résistant, qui en permette l'examen minutieux à la loupe binoculaire, tout en les mettant à l'abri des maladresses d'observateurs novices.

Des recherches avaient déjà été entreprises au Laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine de Lyon, sous la direction de M. le Professeur Policard, concernant l'emploi des résines polyvinyliques comme masse d'inclusion histologique ; elles sont condensées dans la thèse de P. Bourdon (1942). D'autre part, W.-O. Puckett (1940-1941) avait préconisé, pour le montage de pièces embryologiques, les verres synthétiques de la série acrylique.

Nous inspirant de ces travaux, nous avons mis au point une technique applicable aux Arthropodes et aux Vers.

Nous avons dû abandonner les procédés d'enrobage direct à chaud, dans la masse en fusion de polymères fusibles à basse température : les bulles d'air sont difficiles à éliminer et le polissage des blocs est impossible. Nous n'avons pas obtenu non plus de bons résultats en plaçant les pièces dans un polymère dissous dans un solvant volatil, qu'on laisse ensuite évaporer ; la rétraction très importante provoquée par le départ du solvant entraîne des déformations importantes ou la production de bulles d'air.

Notre procédé consiste essentiellement à disposer la pièce à conserver dans un monomère liquide dont on provoque la polymérisation sur place, pour aboutir à la formation d'une substance présentant les caractères d'un verre synthétique.

Nous avons utilisé :

1° *l'acétate de vinyle* (qui présente l'inconvénient d'un durcissement lent et d'une moins grande dureté) ;

2° *le méthyl-acrylate de méthyle* (d'un emploi plus délicat, mais

donnant des résultats bien supérieurs par la transparence et le beau poli des pièces terminées) ;

3° le *styrolène monomère* (dont les propriétés sont intermédiaires).

La technique est sensiblement la même avec les trois produits. Nous décrirons successivement la préparation de la pièce, la mise en train de la polymérisation, l'inclusion, la polymérisation finale et la finition.

I. Préparation de la pièce. — Pour que l'inclusion se passe dans de bonnes conditions la pièce doit être déshydratée et imprégnée de monomère. On peut faire passer la pièce dans une série d'alcools à taux progressifs, jusqu'à l'alcool absolu, puis passer par le toluène et deux bains successifs de monomère pur. Nous trouvons plus simple, pour les Arthropodes, de les dessécher en bonne position à l'étuve, puis de les plonger directement dans le monomère pur. De toute façon il sera prudent de débarrasser les pièces de l'air qu'elles contiennent par passage sous la cloche à vide ou plus simplement par une ébullition de quelques secondes dans le bain de toluène. Faute de cette précaution les pièces flottent au moment de l'inclusion et surtout émettent des bulles d'air, dont on ne peut se débarrasser au cours de la polymérisation finale. Quelques minutes de séjour dans chaque bain de monomère suffisent pour que la pièce soit prête à inclure.

II. Mise en train de la polymérisation. — Le monomère livré au laboratoire ne peut être conservé pur : c'est un corps volatil, et qui se polymérise spontanément à la température du laboratoire, si on l'enferme dans un récipient hermétique. Il est en général additionné d'un inhibiteur (corps anti-oxygène) le plus souvent : hydroquinone. Il convient de l'en débarrasser tout d'abord. Nous préférons le purifier par distillation, procédé plus simple et plus rapide que l'agitation avec une solution de potasse suivie de lavage et de déshydratation. Nous utilisons l'appareil schématisé ci-contre (fig. 1) analogue à celui décrit par Bourdon dans sa thèse, et qui permet de conduire les deux opérations successives : purification et polymérisation, de façon très rapide et très simple.

On purifie par distillation la quantité de monomère qui sera immédiatement utilisée. Pour cela, le bec Bunsen est placé sous le ballon A. Le réfrigérant est mis en marche, et le tube à essai B tenu par un support est à très faible distance sous le tube sortant du réfrigérant. Les billes de verre placées dans le ballon permettent une ébullition régulière sans l'emploi de bain-marie. Il convient

d'utiliser un appareil monté d'une seule pièce, sans autres joints que les bouchons de liège, les vapeurs de monomère attaquent le caoutchouc et lui empruntent une coloration désagréable. Une fois distillée la quantité voulue de monomère, on écarte le bec, on sépare le ballon A.

La polymérisation doit être mise en route par chauffage du monomère pur en présence d'un catalyseur : le peroxyde de benzoyle, poudre blanche que l'on ajoute dans la proportion de 3 à

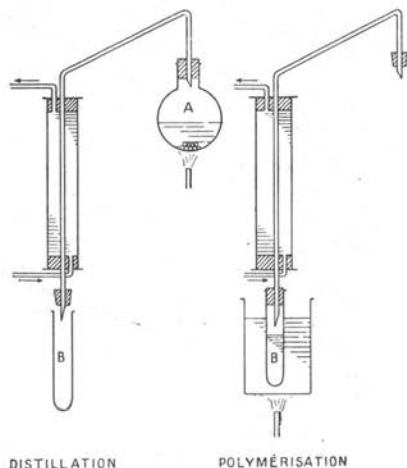


FIG. 1. — Schéma de l'appareil servant à la polymérisation. A, ballon renfermant le produit à purifier par distillation et des billes de verre. B, tube où se rassemble le produit distillé. R, réfrigérant.

5 p. 100. La quantité de catalyseur, estimée approximativement, est ajoutée dans le tube, après la distillation. La dissolution se fait instantanément. Nous préférons effectuer la polymérisation par chauffage au bain-marie, à la pression atmosphérique, sous réfrigérant ascendant, comme demandant une surveillance moins étroite et permettant d'arrêter l'opération de façon plus précise. Pour cela, le ballon A étant enlevé, le tube B contenant l'échantillon de monomère pur, additionné de catalyseur, vient coiffer le bouchon monté sur le tube efférent du réfrigérant. On chauffe au bain-marie de façon à obtenir une ébullition très modérée. Au bout de 15 à 20 minutes, on constate que les bulles montent du fond du tube de façon plus lente. Il convient de surveiller alors l'opération de plus près. En cas d'ébullition brutale, il faut arrêter le chauffage et refroidir

rapidement le tube débranché, en le plongeant dans l'eau froide. On arrête l'opération de la même façon, quand on juge, d'après la montée des bulles, que l'on arrive à la consistance d'un sirop épais. Il faut se rappeler que la polymérisation, phénomène endothermique dans sa phase d'amorçage, devient à ce moment exothermique et très brutale (explosive) à cette température, et aboutirait à la prise en masse du contenu du tube, emprisonnant de nombreu-

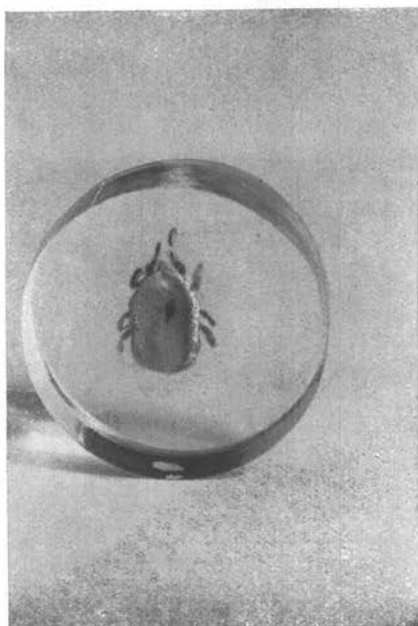


FIG. 2. — Objet monté en bloc de verre synthétique :
Ornithodoros erraticus.

ses bulles. La suite de l'opération se pratiquera donc à une température plus basse. Le monomère amené à ce point va servir immédiatement à la coulée de la pièce. On peut cependant le conserver à la glacière pendant quelques heures.

III. Inclusion et polymérisation finale. — Le monomère en voie de polymérisation est coulé dans un moule de forme et de dimension voulues, fermant hermétiquement pour éviter les pertes par évaporation. Le moule le plus simple que préconise W.-O. Puckett est constitué par un tube de verre large, à fond plat, que l'on casse une fois l'opération terminée. La pénurie de verrerie nous a amenés à

utiliser des moules récupérables, fragments de tubes courts, ouverts aux deux bouts, que l'on ferme avec deux bouchons de liège bien ajustés, recouverts d'une couche de cellophane, choisie dans un échantillon résistant à l'action du monomère. Les extrémités du tube de verre doivent être coupées franc et rodées, car le chauffage au chalumeau de la tranche de section forme un bourrelet s'opposant au démoulage. Nous utilisons aussi des tubes métalliques de 6 cm. de haut, à section circulaire ou carrée, en cuivre ou en alu-

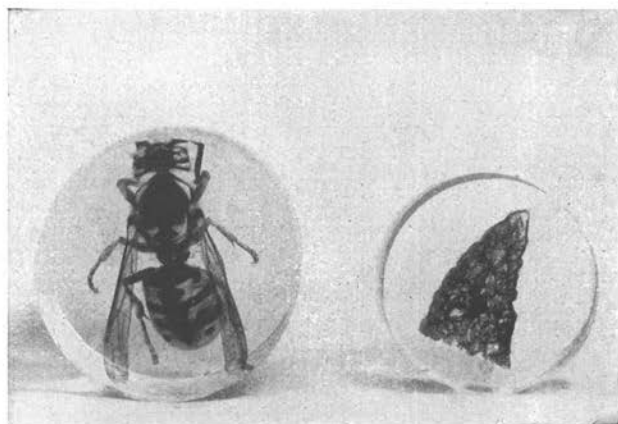


FIG. 3. — Objets montés en blocs de verre synthétique :
A gauche : *Vespa germanica* ; à droite : pièce anatomique.

minium, fermés aux deux extrémités par des bouchons de liège recouverts de cellophane.

Pour que la pièce terminée n'affleure pas la face inférieure du bloc, il convient de disposer au fond du moule une première couche qui sera polymérisée avant d'introduire la pièce elle-même, de façon à constituer une dalle de base de 2 à 4 mm. d'épaisseur.

La pièce, retirée du monomère, est disposée dans le moule et noyée dans une couche épaisse de monomère partiellement polymérisée, obtenu comme nous l'avons indiqué précédemment. Le moule est fermé hermétiquement et porté à l'étuve à 56°. Normalement, un séjour de 24 à 36 heures amène la polymérisation à un degré de dureté suffisant pour permettre le démoulage. Toutefois, si la polymérisation préalable n'a pas été poussée à un degré suffisant, le durcissement ne se produit pas dans le délai normal. La pièce n'est pas perdue pour autant, il suffit de laisser le moule bien fermé à l'étuve ; au bout d'un temps variable, pouvant aller jusqu'à 8 jours, la polymérisation complète finira par se produire.

Pour démouler, on jette le moule dans l'eau froide. Au bout de quelques minutes un craquement sec indique en général le décollement du bloc que l'on fait glisser comme un piston dans le moule ouvert aux deux bouts.

De légères variantes de cette méthode sont à apporter pour l'emploi des deux autres produits.

L'acétate de vinyle demande une surveillance beaucoup moins étroite lors de la mise en train de la polymérisation. Il est beaucoup plus facile de saisir le moment où l'on arrive à la consistance voulue, et l'on risque moins une polymérisation brusquée. Par contre, le séjour à l'étuve sera en général plus long. Avec ce produit, la température de l'étuve pourra, sans risquer l'apparition de bulles, être poussée jusqu'à 80°. Avec le styrolène, que sa facilité de polymérisation place entre les deux précédents, la température de l'étuve pourra également être poussée à 80°.

IV. Finition. — Le bloc démoulé présente des bavures et une face supérieure en ménisque. On le dégrossit avec du papier de verre moyen, puis on le polit en utilisant des papiers à grains de finesse décroissante, ou à la meule émeri. On termine par un polissage final sur disque de drap humide enduit d'une poudre à polir l'argenterie.

Il est difficile d'inclure des objets de grandes dimensions (plus de 6 cm. de diamètre), car il se produit au centre du bloc un échauffement générateur de bulles qui restent incluses. Toutefois, des pièces présentant des bulles superficielles peuvent être sauvées : on les recouvre d'une couche de toluène, et l'on porte le moule refermé à l'étuve pendant 24 heures : on évapore ensuite le toluène en laissant le moule ouvert. Les pièces de petites dimensions, susceptibles de s'égarer, peuvent être collées sur des lames plus grandes de Plexiglas ou de verre, au moyen de dissolution du produit dans le toluène ou de baume de Canada.

Si ce procédé conserve parfaitement les couleurs propres des Insectes et permet de sauvegarder les détails les plus fins des poils ou des écailles, il supprime par contre les couleurs dues à des irisations, ou à des pigments liposolubles. Les papillons, par exemple, perdent en général leurs brillantes couleurs.

Le procédé est applicable également à des Vers, à condition de les déshydrater de façon très progressive pour éviter de fâcheuses rétractions. De petites pièces anatomiques ou de dissection ont été également montées par ce procédé.

Laboratoire de parasitologie et Institut d'histologie de la Faculté de médecine de Lyon.