

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

TOME XXV

1950

N° 4

MÉMOIRES ORIGINAUX

UTILISATION DES MATIÈRES PLASTIQUES EN HISTOLOGIE NORMALE ET PATHOLOGIQUE

Par **Maurice-F. CHAMPEAU**

Nous présentions, il y a trois ans, à la Société Anatomique de Paris, un nouveau procédé d'étude de l'os, mis au point en collaboration avec le Prof. Leroux.

Ce procédé permettait d'étudier les pièces osseuses, non décalcifiées, par polissage après inclusion à la paraffine. L'examen se faisait à l'Ultropak de Leitz ou à la loupe binoculaire.

Mais cette technique, qui permettait d'étudier les tissus en place sans les traumatiser par des coupes ou par la manipulation de ces coupes et même de pratiquer des recherches histochimiques (calcaire, sucres, etc.), présentait néanmoins quelques difficultés.

La paraffine avait l'inconvénient de graisser les surfaces de polissage, nécessitant ainsi l'emploi d'alcool et de rinçages à l'eau fréquents. Les surfaces polies étaient fragiles et se rayaient facilement, au point de devenir assez vite illisibles et de nécessiter ainsi un nouveau polissage.

C'est alors que nous eûmes connaissance, grâce au D^r Langeron, d'un procédé d'inclusion de petites pièces, telles que des insectes, dans les résines synthétiques, procédé mis au point par le D^r Coudert de Lyon qui nous le communiqua fort obligeamment.

Après de nombreux essais, nous avons pu appliquer ce procédé aux pièces histologiques, osseuses ou non, et en tirer des résultats qui nous paraissent nettement supérieurs à ceux obtenus avec la paraffine.

1° Préparation des pièces à inclure. — Les pièces sont préparées comme pour une inclusion à la paraffine.

Toutefois la déshydratation doit être particulièrement soignée et il vaut mieux insister sur les passages en alcool absolu et en toluène, si la pièce est un peu volumineuse.

Contrairement aux insectes, le volume de la pièce à inclure n'a aucune importance. La seule règle à respecter est que plus la pièce à inclure en résine est grande, plus elle doit être épaisse, et, par suite, plus les bains qu'elle doit subir doivent être prolongés.

A. Durée des bains. — *Alcools.* — La déshydratation des pièces est insuffisante quand, passées dans le toluène, elles laissent échapper un nuage laiteux ou opalescent.

Elle est correcte si l'on n'observe que de simples filets de réfringence variable, dus à l'alcool absolu se mêlant au toluène.

Toluène. — La pièce doit être de couleur sombre et translucide au moins sur les bords, si elle est très épaisse.

B. Passage en résine. — La pièce, au sortir du toluène, doit être passée dans un bain de résine synthétique non polymérisé.

Elle doit avoir complètement perdu sa transparence et repris un aspect très voisin de celui qu'elle avait dans le formol à 10 %.

2° Préparation de la masse d'inclusion. — On utilise le *métacrylate de méthyle* (*Plexiglass*) dont la dureté, la transparence et le point de fusion élevé nous ont donné toute satisfaction. Les récipients, en pyrex de préférence, seront d'une propreté absolue.

On évitera d'utiliser le métacrylate qui a servi au premier bain de la pièce et qui contient du toluène.

A. Préparation du métacrylate de méthyle. — Ce produit est vendu sous forme de *monomère*, liquide réfringent d'odeur forte et pénétrante, assez volatil.

Sous cette présentation il peut être additionné d'hydroquinone (réducteur s'opposant à une polymérisation spontanée) et peut être alors conservé à la température du laboratoire ; ou bien il est fourni pur et doit être mis en réserve au frigidaire et à l'obscurité.

S'il est additionné d'hydroquinone, il doit être distillé.

S'il est pur, il doit être employé tel quel.

3° Polymérisation. — Pour polymériser le méthacrylate :

1. Prendre 100 cm³ de liquide monomère. Y ajouter 3 à 4 gr. p. 100 de peroxyde de benzoyle (catalyseur oxydant). Filtrer après dissolution complète du peroxyde de benzoyle, de façon à obtenir un liquide parfaitement clair.

2. Porter ce liquide dans un ballon en pyrex au bain-marie. Chauffer *très progressivement* jusqu'à ébullition. A partir de ce moment, surveiller très attentivement la marche de l'opération.

Les bulles qui s'échappent du sein du liquide sont d'abord petites, nombreuses et fines. Puis elles deviennent assez vite grosses et moins abondantes. A partir de ce moment, la réaction peut s'emballer et il convient d'avoir, à proximité du bain-marie, un cristalliseur plein d'eau très froide pour y plonger le ballon, au cas où cette éventualité viendrait à se produire.

En même temps que les bulles se dégagent, on constate que des zones de réfringence variable apparaissent au sein du liquide. Le liquide devient progressivement plus visqueux, puis enfin sirupeux. Quand il a atteint la consistance d'un sirop très épais, il est bon à utiliser et doit alors être refroidi immédiatement. Il peut être conservé quelques heures à la glacière, mais tend à se polymériser complètement plus ou moins vite et spontanément.

Si la réaction s'emballer, on constate que les bulles deviennent brusquement très abondantes ; le liquide se met à mousser abondamment et sa température augmente rapidement. On peut arrêter ce processus en refroidissant le plus vite possible le contenu du ballon, par agitation circulaire rapide dans le bac d'eau très froide.

Si l'on n'a pas agi assez rapidement, la réaction continue et se termine quand tout le contenu du ballon est devenu une masse blanche écumeuse et vitrifiée.

Il sera bon de faire quelques essais sur de petites quantités de méthacrylate.

3. A ce moment de l'opération, on a d'un côté une pièce à inclure baignant dans le méthacrylate de méthyle non polymérisé, de l'autre un récipient contenant le méthacrylate amené à la consistance d'un sirop épais.

On prend alors la pièce à inclure et on la porte dans le méthacrylate sirupeux. Il faut veiller, à ce moment, à ne pas inclure de bulles d'air sous la pièce ; à ce que la pièce ne flotte pas, ce qui se produit souvent avec l'os et certains tissus particulièrement cavitaires. Nous parons à cet inconvénient de deux manières :

a. Soit en maintenant la pièce en profondeur avec une petite tige en polymère fixée dans le couvercle du moule à polymériser.

b. Soit en procédant à une polymérisation partielle du liquide, au fond du récipient, en le chauffant modérément par en-dessous et en y appliquant la pièce. Cette façon de faire nous a paru moins pratique que la précédente, mais elle évite la formation de défauts dans le bloc d'inclusion autour de la tige de maintien.

4. *Fin de la polymérisation.* — On porte alors la pièce, après avoir fermé aussi hermétiquement que possible son moule en pyrex (avec une lame de verre rodée, par exemple) dans l'étuve à 60°, où elle reste pendant 24 heures environ.

Il convient de surveiller très attentivement le début de l'opération, tant que la surface du liquide en voie de polymérisation reste fluente.

En effet, c'est à cette période que la réaction s'emballe souvent de façon imprévisible. Des bulles apparaissent autour de la pièce, en particulier à sa face inférieure, se multiplient brusquement et l'on finit par obtenir une pièce cuite, incluse dans une substance bulleuse et vitrifiée.

On peut arrêter la réaction en refroidissant énergiquement le moule.

Dès que la surface n'est plus fluente, même si elle est encore dépressible, ces inconvénients ne sont plus à craindre et on doit continuer l'opération à la même température, jusqu'à ce que la surface, tâchée au doigt, soit aussi dure que du verre.

4° **Démoulage.** — A ce moment, la température du moule et de son contenu avoisinant encore 60°, on les plonge brusquement dans de l'eau très froide ; on entend quelques craquements secs et répétés, dus à la rétraction et au décollement du bloc (on voit ici la nécessité d'employer du Pyrex).

La pièce se démoule alors facilement, revêtant l'aspect qu'elle présente sur la fig. 1, dans la partie non travaillée.

Autre méthode de polymérisation. — Une fois la pièce portée dans le sirop demi-polymérisé, on obture hermétiquement le moule et on l'abandonne à lui-même, de préférence dans une pièce chauffée et au soleil. En 4 à 8 jours, la polymérisation s'est produite spontanément. Nous employons cette méthode, qui donne des résultats plus fins et supprime les incidents, pour les pièces d'études et de recherches.

5° **Polissage.** — En général, les surfaces des blocs d'inclusion sont suffisamment unies pour constituer une surface d'observation excellente.

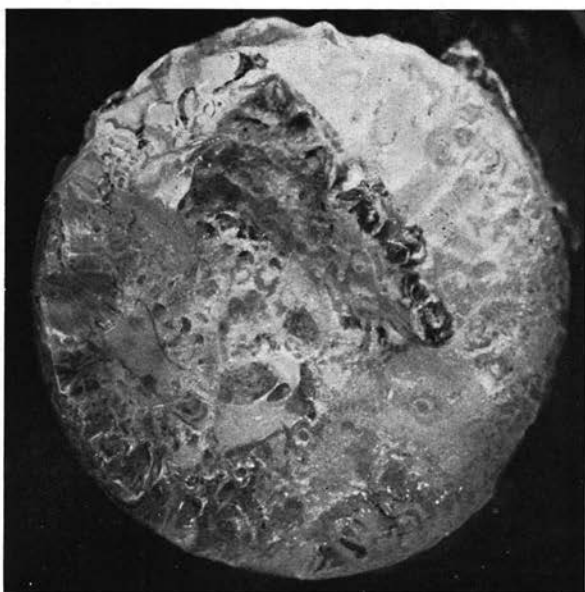


FIG. 1. — Inclusion manquée. Emballement de la réaction.
Masse d'inclusion bulleuse. Pièce blanche et cuite.



FIG. 2. — Dent et gencive. Pièce incluse en cours de polissage après dégrossissage au papier de verre.



FIG. 3. — Pièce incluse terminée. — Premier métatarsien présentant une vaste géode dont une extrémité antérieure (à droite) est mise à nu et polie avant coloration et dont l'extrémité postérieure est préparée pour la macroscopie, avec une surface polie protectrice de méthacrylate.

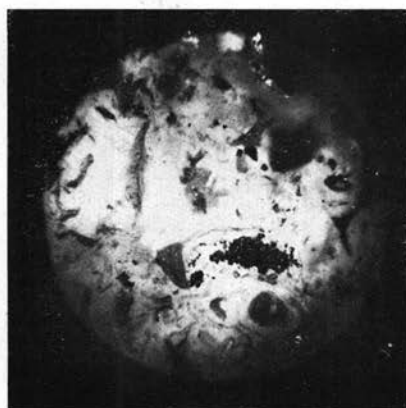
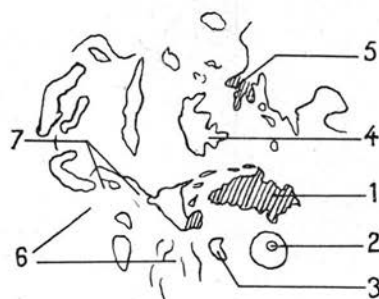


FIG. 4. — Examen à l'ultropak d'un mycetome à grains noirs de l'orteil, après inclusion au méthacrylate, polissage et coloration à l'hématoxyline $\times 5$.



1) grain noir coupé en totalité ; 2) lamelle osseuse avec vaisseau central ; 3) petit séquestre osseux ; 4) séquestre osseux sous lequel se voient, en haut et en bas, par transparence, des grains noirs ; 5) grain noir adhérent au tissu de granulation bordant la géode osseuse ; 6) capillaires et tissu de granulation ; 7) tissu de granulation, entre deux lamelles osseuses, dans lequel, à gauche, se développe un grain noir.

Mais comme nous voulions mettre à nu une des surfaces de la pièce pour la colorer et l'observer selon la technique de l'examen à l'Ultropak, nous avons été amené à procéder de la façon suivante :

Si le bloc est trop épais, dégrossir rapidement à la scie égoïne, puis terminer le dégrossissage à la meule émeri, en évitant l'échauffement de la surface. On peut procéder à sec.

La surface à examiner ayant été mise à nu, ce dont on s'assure en l'examinant à jour frisant, continuer et terminer le polissage en passant par des papiers de verre de grain décroissant, puis des poudres à polir, tripoli et rouge d'Angleterre.

Plus le poli est fin, et l'on s'en assurera par contrôle à l'Ultropak, plus la coloration sera fine.

6° Coloration. — On peut pratiquer sur la surface mise à nu toutes les colorations usitées en histologie, hémateïne-éosine, trichrome Masson, etc...

La seule règle à modifier est celle du temps. Quel que soit le temps d'application d'un colorant, étant donnée la minceur de la surface à colorer qui n'excède pas un micron, aucune surcoloration n'est à craindre. Nous avons pratiqué sur ces blocs des colorations en masse, des trichromes de Masson, des recherches de calcaire, des recherches de phosphore avec un égal succès. Le seul inconvénient de cette technique est que la surface colorée reste toujours très mince par rapport aux tissus sous-jacents, et que l'on éprouve souvent quelques difficultés à interpréter les images ainsi fournies.

Toutefois, un bon entraînement de lecture à l'Ultropak de Leitz ou à la loupe binoculaire permet de compenser rapidement ce défaut et d'interpréter correctement et rapidement les images obtenues.

Les colorations en masse présentent à nos yeux le grave inconvénient de foncer considérablement la pièce. Or, dans l'Ultropak, les plans sous-jacents des tissus servent de couche réfléchissante à la lumière qui traverse la zone colorée, la rendant ainsi bien visible. Des plans sombres profonds rendent évidemment la lecture plus difficile. Mais cet inconvénient de lecture est, à nos yeux, largement compensé par la finesse, la solidité et le durable des préparations obtenues par cette méthode.

Nous avons procédé à des essais répétés sur la pièce de la fig. 1 qui est un orteil atteint de madurellomycose provenant du Sénégal. Polie, puis colorée à l'hémateïne-éosine, la pièce fut montée comme une préparation ordinaire pendant huit jours sans qu'aucune modification (bulles d'air en particulier) y survienne.

Puis la première coloration fut effacée par un simple passage au papier de verre double zéro. Après polissage et coloration au trichrome vert lumière que l'on contrôle à l'Ultropak, la pièce est alors laissée pendant quinze jours dans une poche de vêtement où elle voisine avec des clés et des pièces de monnaie. Les photographies prises à l'Ultropak et publiées dans ce texte montrent mieux qu'un long commentaire l'état de la surface colorée à ce moment.

RÉSUMÉ

Nous avons mis au point, en partant d'une part d'un procédé original utilisant la paraffine et donnant des surfaces lisibles microscopiquement à l'Ultropak, de l'autre d'une méthode originale d'inclusion d'insectes dans des résines synthétiques, une nouvelle technique donnant des pièces macroscopiques de conservation indéfinie, d'emmagasinage facile, pouvant permettre la création de collections cent fois moins difficiles à entretenir que les collections en bocaux.

L'intérêt de cette technique est doublé du fait que les pièces sont également étudiables par voie microscopique.

Les tissus inclus dans les matières synthétiques plastiques conservent leur colorabilité pour toute une gamme de colorants.

Les colorations obtenues, si elles sont, parfois, un peu trop fines, conservent toute leur sélectivité.

Les surfaces ainsi préparées pour l'examen microscopique à l'Ultropak ou à la loupe binoculaire sont d'une solidité incomparablement plus grande que celle des coupes préparées par les méthodes habituelles.

Ce double avantage doit rendre cette nouvelle technique précieuse, à la fois du point de vue de l'enseignement et du point de vue de la recherche.

BIBLIOGRAPHIE

- COUDERT (J.) et BAUD (Ch.). — *Ann. de parasitologie*, XXI, 1946, 177-182.
LANGERON (M.). — *Précis de microscopie*. Paris, Masson et Cie, 7^e édition, 1949, p. 297, 512, 725-726.
LEROUX et CHAMPEAU (M.-F.). — *Soc. anatomique de Paris*, 1^{er} mars 1945.

Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris
(Directeur : Prof. H. Galliard)
Section de mycologie (Chef de service : D^r M. Langeron).