

MANUEL DE MICROSCOPIE

M. LOCQUIN M. LANGERON

MASSON 

TH742-6
L1

7966264

MANUEL
DE
MICROSCOPIE

PAR

Marcel LOCQUIN et Maurice LANGERON



E7966264

MASSON

Paris New York Barcelone Milan

1978

MASSON S. A.
MASSON PUBLISHING U.S.A. INC.
TORAY-MASSON S.A.
MASSON ITALIA EDITORI S.P.A.

120, Bd Saint-Germain, 75280 Paris Cedex 06
14 East 60th Street, New York, N.Y. 10022
Balma 151, Barcelona 8
Via Giovanni Pascoli 55, 20133 Milano

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays.

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les «copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective» et, d'autre part que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite» (alinéa 1^{er} de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal.

© MASSON, Paris, 1978

ISBN : 2-225 49 270-0

Imprimé en Hongrie

MANUEL
DE
MICROSCOPIE

CHEZ LE MÊME ÉDITEUR

Du même Auteur

PRÉCIS DE MYCOLOGIE. Mycologie générale. Mycologie humaine et animale. Techniques, par M. LANGERON. 1952, 2e édition par R. VANBREUSEGHEM, 701 pages, 461 figures.

Autres ouvrages :

OPTIQUE. Formation et traitement des images. *Maîtrise de physique, troisième cycle, Ecoles d'ingénieurs*, par M. FRANÇON. 1972, 160 pages, 202 figures.

MICROSCOPIE QUANTITATIVE, par R. T. DE HOFF, F. N. RHINES. Traduit de l'américain par J. Montuelle. 1972, 404 pages, 143 figures, 36 tableaux.

THÉORIE PHOTOGRAPHIQUE APPLIQUÉE, par P. KOWALISKI. 1972, 422 pages, 338 figures, 4 planches hors texte.

TECHNIQUES HISTOLOGIQUES, par M. GABE. 1968, 1114 pages, 2 figures, 35 tableaux.

TECHNIQUES DE LABORATOIRE, sous la direction de J. LOISELEUR.

Tome I. — *Chimie physique. Chimie biologique*. 1963, 3^e édition, 1488 pages, 2 volumes, 378 figures, nombreux tableaux.

Tome II. — *Chimie clinique*. 1963, 3^e édition, 666 pages, 109 figures, nombreux tableaux.

RÉINTERPRÉTATION DES FROTTIS SANGUINS, par M. BESSIS. 1977, 276 pages, 342 figures en noir et en couleurs.

CELLULES DU SANG NORMAL ET PATHOLOGIQUE, par M. BESSIS. 1972, 816 pages, 490 figures, 23 planches hors texte en couleurs.

ABRÉGÉ DE CYTOLOGIE, par M. MAILLET. *Abrégés de médecine*. 1977, 2^e édition revue et complétée, 280 pages, 144 figures.

ABRÉGÉ D'HISTOLOGIE, par J. POIRIER et J.-L. RIBADEAU DUMAS. *Abrégés de Médecine*. 1974, 260 pages, 119 figures, 31 tableaux en couleurs.

ATLAS D'HISTOLOGIE. Travaux pratiques, coordonné par J. POIRIER et J.-L. RIBADEAU-DUMAS. 1977, 144 pages, 150 figures en couleurs, 150 schémas.

ATLAS MICROGRAPHIQUE DE CYTOLOGIE VÉGÉTALE, par S. LOISEAUX, F. NURIT et R. MACHE. 1974, 72 pages, 57 figures.

Périodique :

ARCHIVES D'ANATOMIE MICROSCOPIQUE. 4 fascicules par an.

Du même Auteur, chez d'autres Éditeurs.

CHROMOTAXIA. Code des couleurs (Français-Anglais-Allemand-Latin) +36 filtres Wratten, Paris, 1957. — GUIDE DES COULEURS NATURELLES. 1520 couleurs 24 planches — Sens, 1975. — LES CHAMPIGNONS, Coll. Que sais-je? 4^e édition P.U.F. Paris, 1978. — LES CHAMPIGNONS COMESTIBLES ET VÉNÉNEUX, en collaboration avec B. CORTIN. Nathan, éd. Paris. — DE TAXIA FUNGORUM. I. Syllabus. II. Illustrations. Paris. Sens 1974—77. — MYCOLOGIE DU GOÛT. J. F. GUYOT, éd. Paris, 1977. — FLORE MYCOLOGIQUE. J. F. GUYOT, éd. Paris, 1977.

AVANT-PROPOS

LE regretté MAURICE LANGERON et moi-même partageons deux passions communes, la Microscopie et la Mycologie. Elles nous ont tôt réunis, car après avoir correspondu avec lui immédiatement avant la dernière guerre, je l'ai rencontré à mon arrivée à Paris et nous avons vite compris qu'en chacun de nous existait un profil de personnalité très semblable. Au cours d'entretiens qui débutèrent en 1946 pour devenir vite hebdomadaires, nous passions en revue les développements alors spectaculaires de la microscopie instrumentale et de ses applications biologiques, notamment à la parasitologie et à la mycologie. Dès avant la parution de la septième édition de son classique Précis de Microscopie, qui sera la dernière rédigée de sa main, nous étions tombés d'accord sur la nécessité de prévoir une huitième édition, entièrement refondue dans un esprit nouveau que nous avions défini en commun. Sa mort ne m'a pas permis de parachever avec M. Langeron la réalisation de cette nouvelle œuvre.

Avec Albert Policard et Marcel Bessis nous avons entrepris la rédaction et la publication en 1957 d'un Traité de Microscopie qui n'avait la prétention, ni de remplacer le Précis de Langeron, ni même d'en prendre la suite car il est resté irremplaçable par la somme d'informations qu'il contient.

Ces deux ouvrages, parus chez Masson et Cie étant maintenant épuisés, et la microscopie photonique ayant beaucoup évolué depuis vingt ans, j'ai repris le plan que nous avions élaboré jadis, calmement isolés dans son laboratoire de la rue de l'École de Médecine, et j'ai décidé de le mener à terme, avec la précieuse collaboration de notre commun éditeur, dans ce nouveau Manuel de Microscopie.

Lorsque l'usager du microscope est confronté avec un objet nouveau dans sa recherche, il se trouve souvent dans une situation très inconfortable. Dans la littérature il trouvera, certes, sans trop de peine, si ses connaissances systématiques et anatomiques sont suffisantes, un autre objet, de structure analogue, à partir duquel il pensera pouvoir mettre au point une méthode d'étude efficace. Continuant ses recherches bibliographiques, il est alors plongé dans un monde de perplexités : comment choisir le meilleur fixateur, parmi les centaines de formules publiées, les meilleurs colorants parmi des milliers dont beaucoup sont homonymes ou synonymes, enfin et surtout, retenir une ou deux techniques d'application, parmi les dizaines de milliers publiées, sans compter leurs variantes. Se penchant sur des recueils encyclopédiques, tels les McClung, les Bolles Lee il se perdra sans fil logique directeur s'il n'a pas déjà lui-même une solide pratique de l'histologie et de la cytologie ; feuilletant des ouvrages spécialisés, il sera vite dépaycé par la pluralité des techniques convergentes ou rebuté par l'omission dans les textes de détails essentiels à la réussite de ses manipulations. S'il cherche un fil logique, il peut le trouver dispersé dans des ouvrages, plus physico-chimiques que biologiques et il lui faudra un effort de synthèse auquel il est souvent peu préparé pour en tirer l'essentiel.

C'est pourquoi, malgré le pessimisme justifié qu'affichait M. Gabe en 1968, quant à la possibilité de rédaction contemporaine d'un Manuel de Microscopie, qui condense en un ouvrage maniable, à la fois un choix logique parmi les milliers de recettes tinctoriales évoquées plus haut, la description d'une précision opératoire concise, mais n'omettant aucun détail essentiel à la réussite et un esprit critique assez audacieux pour aller à la

fois à contre courant de certaines modes inutiles voire néfastes et remettre par contre en valeur des techniques très utiles mais oubliées, j'ai entrepris, seul hélas, puisque Maurice Langeron n'est plus à mes côtés pour le faire avec moi, la rédaction tant attendue par les lecteurs de langue française de ce nouveau Manuel de Microscopie.

Il se place tout naturellement aux éditions Masson à côté du merveilleux ouvrage de M. Gabe: Techniques Histologiques, qui le complète avant la lettre en le prolongeant dans le domaine plus spécifiquement histochimique.

Il contient essentiellement les techniques d'applications biologiques liées directement au microscope photonique, laissant le quantitatif aux ouvrages plus spécifiques comme l'ouvrage précité.

Par rapport aux ouvrages homologues contemporains, qui sont, fait curieux, presque tous épuisés et non encore réédités, il se distingue par ses choix critiques, ses exposés progressifs et son extensité:

— Choix critiques puisque j'ai éliminé les double-emplois, choisi les meilleurs réactifs, sans redouter d'aller parfois à contre courant des modes contemporaines, comme celles qui font préférer, à tort par exemple, l'alcool à l'acétone, le toluène au benzène, les fixateurs de Hollande ou de Zenke aux Bouin et Kopsch-Regaud, pour des opérations de routine pratiquées dans presque tous les laboratoires. — Choix progressifs aussi, puisqu'à partir du meilleur réactif, ou de la meilleure technique opératoire, je cite les variantes d'usage général puis les adaptations plus spécifiques. — Enfin extensité, puisque grâce à des tableaux généraux, grâce aux rappels de notions générales indispensables, grâce enfin à un survol méthodique de presque toutes les méthodes fondamentales utilisées en microscopie photonique contemporaine, ce Manuel permettra, je l'espère, à chacun, quelle que soit sa spécialité, de trouver les informations nécessaires tant à l'application possible de techniques connues à l'objet de ses recherches que le développement de techniques profondément nouvelles.

MARCEL LOCQUIN

AVERTISSEMENT

La collecte des informations, pour réunir dans un Manuel comme celui-ci, ce qui est essentiel à la pratique de la Microscopie contemporaine, nécessite un travail de longue durée constamment remis à jour. Le regretté Maurice Langeron y consacrait chaque jour au moins une heure! Actuellement le dépouillement systématique des grands périodiques d'Analyse (Abstracts) permet un recueil assez complet des publications pour peu qu'on prenne soin de s'informer dans toutes les disciplines qui utilisent le Microscope. Mais la meilleure des sources reste la consultation des ouvrages d'ensemble, des mises au point lors des colloques ou congrès et la lecture des grands périodiques de Microscopie. En Microscopie photonique, il n'y en a plus de récent en langue française, alors qu'il y en a un en Microscopie électronique, richement illustré. Une enquête périodique et systématique auprès d'un échantillonnage de laboratoires représentatifs de l'ensemble de la Microscopie, permet de tester les techniques et les tours de main. Cet échantillonnage est transnational, car il est évident qu'il faut se garder en cette matière de tout chauvinisme, et rechercher la meilleure technique où qu'elle soit pratiquée. Trop nombreux sont ceux qui nous ont ainsi aidé pour que nous puissions les remercier individuellement. Il y a longtemps en effet que Maurice Langeron avait renoncé, avant la cinquième édition de son Précis, à vérifier par lui-même la valeur des techniques qu'il citait. Pour assurer à nos choix la meilleure qualité possible en dépit du nombre des techniques citées, Marcel Locquin a tenu à assister lui-même aux séquences de la manipulation dans un laboratoire spécialisé, toutes les fois qu'il n'a pas pu lui-même les mettre en œuvre. Il a particulièrement pratiqué personnellement: la chimie des colorants et des fixateurs à l'Institut de Chimie de Lyon et chez Rhône Poulenc, l'optique à l'Institut d'Optique guidé par Françon et Nomarski, la colorimétrie et la Microscopie électronique au laboratoire de Physique du Muséum, Prof. Y. Le Grand, avec le Microscope en tant qu'instrument chez Wild puis en en fabriquant, la photographie à la Société Lumière, la cinémicrographie au Collège de France avec J. Dragesco, la télémicroscopie avec la Sté Thomson puis Philips, le contraste de phase et le contraste interférentiel avec la Sté Wild, la polarisation avec M. M. Cotton et Manigault à Bellevue, la spodographie au laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine de Lyon avec A. Policard, la spectrographie d'étincelles au laboratoire de l'identité judiciaire avec le Prof. Sannié, les sources avec la Sté Claude Paz et Silva, les traitements de surfaces et les filtres interférentiels avec la Sté GAB, les lampes éclair ainsi que les lasers avec la Sté Orthotron, les techniques végétales et mycologiques au laboratoire de cryptogamie du Muséum avec le Prof. R. Heim, les techniques palynologiques et micropaléontologiques aux laboratoires du Muséum avec G. Deflandre, de Micropaléontologie de l'Université de Paris VI avec Mme Taugourdeau et M. Lashkar, au laboratoire de l'Ecole pratique des Hautes études avec M. Taugourdeau, les techniques hématologiques et cytologiques au laboratoire du Centre de transfusion sanguine avec M. Bessis, les techniques de documentation avec la Phototechnique et M. Cordonnier, la microphotométrie avec la Sté Europélec, les techniques parasitologiques et mycologiques à l'Institut de

Parasitologie avec M. Langeron, les techniques protistologiques au Collège de France avec E. Fauré Fremiet, les techniques d'automatisation dans l'analyse des images au CENFAR avec le Dr Le Gô; que tous reçoivent ici mes remerciements les plus sincères, sans oublier tous ceux qui, autour d'eux, ont facilité ma tâche.

ABRÉVIATIONS

Unités: Micron: μm , millimicron: $\text{m}\mu\text{m}$, Angström: \AA , litre: l, millilitre: ml (= cm^3), degré thermique: $^\circ$, degré d'alcool: $^\circ$, normalité d'un acide ou d'une base: N, acidité-basicité: p_H , potentiel d'oxydoréduction: Γ_H , longueur d'onde: λ , heure: h, poids: gramme: g, contraste: γ , densité optique: δ , seconde: sec, minute: mn.

Atomes: c'est la liste des abréviations conventionnelles chimiques: Na, K, Mg, Cr etc.

Molécules: même remarque. Cependant: eau = aq.,

Autres: dist. = distillé, qs = quod satis = ce qu'il faut pour faire ..., MEB = SEM = Microscope électronique à balayage, MET = TEM = Microscope électronique par transmission, U. V. = ultra-violet, I. R. = infra-rouge, R. X. = rayons X, abs. maxi.: absorption maximale à:, p. m. = poids moléculaire, ∞ infini, $^\circ\text{K}$ = degré Kelvin, sol. = solution, aa = quantités égales.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	V		
AVERTISSEMENT	VII	Les microscopes interférentiels	41
ABRÉVIATIONS	VIII	Le contraste de phases	42
1. — <i>Instruments et techniques instrumentales</i>	1	Le microscope polarisant	44
I. — PRINCIPES DE BASE	2	Etude des anisotropies biologiques en	
Lumière et couleurs	2	lumière polarisée	49
La formation des images	5	Microscopie par fluorescence	51
Conventions mécaniques	6	Télémicroscopie	52
Les aberrations	7	IV. — L'ENREGISTREMENT DES IMAGES	53
La profondeur de champ	7	La photomicrographie	53
La planéité de champ	7	La photomacrographie	57
L'image microscopique en optique ondu-		L'éclairage en photomicrographie	57
latoire	8	Les filtres colorés	59
Le grossissement utile	10	Différences chromatiques à l'émission	
L'immersion homogène des objectifs	11	et à la réception	61
Les traitements antireflets	11	Opérations à effectuer en noir et blanc	62
II. — INSTRUMENTS DE BASE	11	Opérations à effectuer en couleurs	62
A. — <i>La mécanique du Microscope</i>	11	Compensation équilibrée des couleurs	62
Les Microscopes inversés	13	Variations et défauts dans les émulsions	
Stéréomicroscopes et		couleur	63
Microstéréoprojecteurs	15	Les émulsions	64
Principales sources de lumière	15	Le temps de pose	64
Les lampes-éclair électroniques en		Aire de mesure du temps de pose	64
photomicrographie	18	Développement	65
B. — <i>Emploi du Microscope</i>	19	Tirage sur papier	65
Manière de saisir et de transporter le		Classement	65
Microscope	19	Transposition des contrastes	65
Mise en place du Microscope	19	Effets spéciaux en photomicrographie	65
Installation du Microscope	19	L'équidensitométrie	66
Mise au point du Microscope	19	V. — SYNTHÈSES	67
Mise au point des objectifs à immersion	20	Les photosynthèses oculaires et photo-	
Causes d'erreur dans la mise au point	21	graphiques	67
Manœuvre de la vis micrométrique et		Les photos stéréoscopiques	68
observation microscopique	21	Les reconstructions graphiques	68
Choix des objectifs et des oculaires	23	Les reconstructions plastiques	68
C. — <i>L'observation microscopique</i>	24	Les reconstructions cinégraphiques	68
Conditions de la vision microscopique	24	La cinémicrographie	69
Conséquences pratiques	26	Le dessin au microscope	71
Précautions à prendre dans un		Les artefacts	73
laboratoire de microscopie	28	VI. — MESURES	73
Variation de l'intensité lumineuse	29	Méthodes de mesures	73
Méthodes fondamentales d'éclairage en		VII. — TECHNIQUES SPÉCIALES	77
fond clair	29	Le repérage des objets	77
Dépistage systématique des causes d'une		Les platines spéciales et surplatines	78
mauvaise image	32	Examen au microscope sous hautes	
III. — PRINCIPALES MÉTHODES INSTRUMENTALES	34	pressions	79
Observations en fond noir	34	L'automation en microscopie	79
Examen en lumière réfléchie	36	Micirurgie	80
Microscopie en infra-rouge	38	VIII. — UTILISATION DE LA LUMIÈRE MONO-	
Microscopie en ultra-violet	39	CHROMATIQUE	85
Les modulateurs pupillaires	40	Les monochromateurs	85

Les spectrographes	86	Arrêt de la fixation	122
Microspectrographe à étincelles et spectrographie d'émission	86	Fixateurs des structures inframicroscopiques	122
Les microphotomètres et microspectrophotomètres	86	III. — ÉCLAIRCISSEMENT	123
IX. — MICROANALYSE STÉRÉOLOGIQUE	88	Déminéralisation et ramollissement ..	123
Numération	88	Ramollissement de la kératine et de la chitine	124
Morphométrie et stéréologie	90	Macération	124
Les microquantimètres	92	Dépigmentation	124
X. — MICROANALYSE PHYSICOCHIMIQUE	92	IV. — L'OBSERVATION VITALE	125
Microélectrophorèse des cellules	92	L'examen vital	125
Microméthodes thermiques	93	Les colorations vitales	127
Microréfractométrie	93	Méthodes de préparation pour l'examen in vivo des microorganismes	127
Autoradiographie	95	Les milieux équilibrés	132
Historadiographie	95	Osmodialyse	134
Spodographie	96	V. — TECHNIQUES SPÉCIALES	135
XI. — MICROANALYSE ÉLECTRONIQUE	97	Lames minces par polissage	135
Microscope électronique à balayage ..	97	Dissociations	135
Le microscope électronique par transmission	101	Les intensificateurs de contraste	136
Microscope électronique à très haute tension	105	Dessiccation, déshydratation	136
Microscope électronique à excitation ultra-violette	106	Déshydratation en milieu liquide	137
Microscope protonique	106	Réactifs éclaircissants désalcoolisants ..	138
Microscope ionique	106	Réactifs déshydratants permettant de passer directement dans la paraffine ..	138
XII. — MICRODÉTERMINATIONS PHYSIQUES	106	Réactifs éclaircissants permettant de passer de l'Éthanol à 95° à la paraffine ..	138
Microdétermination de la pression osmotique	106	VI. — LES MÉTHODES D'INCLUSION	139
Les techniques de séparation différentielle	107	Milieux non aqueux d'inclusion	139
Ultracentrifugation des cellules	107	Milieux aqueux d'inclusion	139
Détermination du poids sec des constituants cellulaires	108	Inclusion à la paraffine	139
Détermination des constituants par absorption spécifique	108	Inclusion à la celloïdine ou collodion ..	143
2. Méthodes de fixation, d'examen, de coupe et de montage	109	Inclusion aux résines époxy, au méthacrylate, aux polyesters	144
I. — MÉTHODES PRÉPARATOIRES	110	Inclusion en milieu hygrophile	144
Les préparations-tests ou de référence ..	110	Inclusions mixtes: gel-paraffine	145
Régénération du matériel desséché	111	VII. — LES COUPES	146
Mélanges conservateurs	112	Les microtomes	146
II. — MÉTHODES DE FIXATION	113	Appareils automatiques à affûter les rasoirs	151
La fixation	113	Microtomisation	151
Les fonctions de la fixation	113	Insuccès et remèdes lors des coupes à congélation	154
Degrés de fidélité dans les fixations ..	114	Étalement et collage des coupes	156
Les fixateurs simples	114	Mauvaises coupes à la paraffine: causes et remèdes	157
Les mélanges fixateurs	118	Déparaffinage avant coloration	160
Compatibilités	120	Coupes ultrafines pour le microscope électronique par transmission	160
Temps de fixation	120	Préparation des membranes support pour la microscopie électronique	160
Les fixateurs cytologiques	120	Fixation-conservation des pièces de petit volume	161
Compatibilités d'inclusion	121	VIII. — MONTAGE DES PRÉPARATIONS	162
Pénétration	121	La préparation microscopique	162
Compatibilités de colorations	121	Milieux temporaires d'observation	164
Décalcification	122	Montages permanents	165
Quantité à mettre en œuvre	122	Indices de visibilité	167
Choix en fonction de l'objet	122	Étanchéité: luts et vernis	167

3. <i>Colorants</i>	169	Colorations des noyaux par les laques progressives d'hématéine	224
I. — PRINCIPAUX COLORANTS	170	Trichromes et dichromes	225
Anthraquinones	170	Marche générale des opérations	226
Azines	170	II. — MÉTHODES SPÉCIALES EN HISTOLOGIE ANIMALE	227
Azoïques (Mono-)	171	Coloration du sang et des parasites endo- cellulaires	227
Azoïques (Poly-)	171	Coloration des tissus osseux et cartila- gineux	228
Cyanines, Quinolines	173	Coloration des fibres musculaires	229
Diazonium, Tétrazonium, Tétrazolium	173	Coloration du système nerveux	229
Indulines	174	Colorations bactériologiques	231
Nitro-colorants	174	Coloration des tissus contenant du collagène	232
Oxazines	175	Coloration du glycogène et du galacto- gène	233
Pyrazolones	175	Colorations d'étude des téguments	234
Quinone-oximes	175	Les pigments	234
Phtalocyanines	175	III. — MÉTHODES SPÉCIALES EN HISTOLOGIE VÉGÉTALE	239
Thiazines	175	Spores et kystes	239
Triarylméthanés	176	Techniques végétales	239
Xanthènes	178	Techniques myco-phyto-pathologiques	248
Thiazoles	179	Techniques mycologiques	250
Polyméthines	179	IV. — MÉTHODES SPÉCIALES EN PROTISTOLOGIE	252
Colorants minéraux	179	<i>Techniques protistologiques</i>	252
Colorants naturels	180	Amibes	253
Fluorochromes	180	Sporozoaires	257
II. — SYNONYMIE DES PRINCIPAUX COLORANTS	182	Flagellés	268
4. <i>Teintures et imprégnations</i>	197	Infusoires	274
I. — MÉTHODOLOGIE	198	Spirochètes et organismes spirales	279
Généralités	198	V. — MÉTHODES MYCOLOGIQUES EN ZOO- PATHOLOGIE	287
Observations	198	VI. — OBSERVATIONS ANNEXES	293
Matières colorantes	199	Observations aux techniques éliminées	293
Modalités	200	Automates de fixation-imprégnation- coloration	294
Teintures neutres	201	Réalisation de grandes séries	294
Imprégnations en masse	202	6. <i>Colorations cytologiques sans spécificité</i> <i>cytochimique</i>	297
Colorations négatives	203	I. — CYTOLOGIE GÉNÉRALE	298
Infiltration, injection	203	II. — COLORATION DES ORGANITES INTRA- CELLULAIRES	301
Automation des colorations	203	III. — CYTODIAGNOSTIC CARCINOLOGIQUE	302
II. — APPLICATIONS	204	Colorations	302
<i>Colorations subsppécifiques</i>	204	IV. — CONCLUSION	305
Colorations composites	204	7. <i>Annexes</i>	307
Pouvoir réducteur	205	I. — VOCABULAIRE TECHNIQUE	308
Composés minéraux	205	II. — CONSTANTES PHYSICO-CHIMIQUES	320
Recherche des cations	205	III. — VOIES BIBLIOGRAPHIQUES	334
Recherche des cations et des anions	209	IV. — INDEX	339
Recherche globale des anions	210		
Eosinophilie ou acidophilie	210		
Cyanophilie ou basophilie	210		
Groupes aldéhydiques	211		
Phénols naturels ou introduits	212		
Lipides	214		
Protides	216		
Polyosides	217		
Oxydases	219		
Acides nucléiques	219		
Iodophilie	220		
5. <i>Colorations topologiques</i>	223		
I. — MÉTHODES PANOPTIQUES GÉNÉRALES	224		

CONTENTS

1. — <i>Instruments & Instrumental techniques</i>	1	4. — <i>Staining & Impregnation</i>	197
I. — Basic principles	2	I. — Methods	198
II. — Basic instruments	11	II. — Applications	204
III. — Main instrumental methods	34	5. — <i>Topological Dyes</i>	223
IV. — Image recording	53	I. — General panoptic methods	224
V. — Synthesis	67	II. — Methods for animal histology	227
VI. — Measurements	73	III. — Methods for plant histology	239
VII. — Specialized techniques	77	IV. — Methods for protistology	252
VIII. — Use of monochromatic light	85	V. — Mycological methods in zoopathology	287
IX. — Stereologic microanalysis	88	VI. — Remarks	293
X. — Physicochemical microanalysis	92	6. — <i>Cytological staining without cytochemical</i> <i>specificity</i>	297
XI. — Electron microanalysis	97	I. — General cytology	298
XII. — Physical microdetermination	106	II. — Staining intracellular organelles	301
2. — <i>Methods of fixation, examination,</i> <i>cutting & mounting</i>	109	III. — Carcinological cytodiagnostic	302
I. — Preliminary methods	111	IV. — Conclusion	305
II. — Fixation methods	113	7. — <i>Annex</i>	307
III. — Bleaching methods	123	I. — French, German & English technical word list	308
IV. — Observation of living specimens	125	II. — Physicochemical data	320
V. — Specialized techniques	135	III. — Bibliography	333
VI. — Embedding methods	139	IV. — Index	339
VII. — Cutting methods	147		
VIII. — Mounting of specimens	162		
3. — <i>Dyes</i>	169		
I. — Main dyes	170		
II. — Synonyms of dyes. Glossary	182		

1/

**INSTRUMENTS
ET TECHNIQUES
INSTRUMENTALES**

I. — PRINCIPES DE BASE

LUMIÈRE ET COULEURS

Le flux lumineux qui s'échappe d'un objet peut être analysé de différentes façons. Pour cela on dispose d'unités dont voici les définitions:

c = vitesse de la lumière dans le vide = 299.776 Km/seconde.

λ = longueur d'onde = $\frac{c}{\nu}$, ν étant la fréquence.

μm = μ = micron = 10^{-4} cm.

$\text{m}\mu$ = millimicron = 10^{-7} cm.

\AA = angström = 10^{-8} cm.

n = indice de réfraction; n_{D20} = indice de réfraction pour la raie D jaune du Sodium à 20° Celsius

Sur la figure 1 on a représenté l'échelle des radiations au sein desquelles se trouve l'octave des radiations

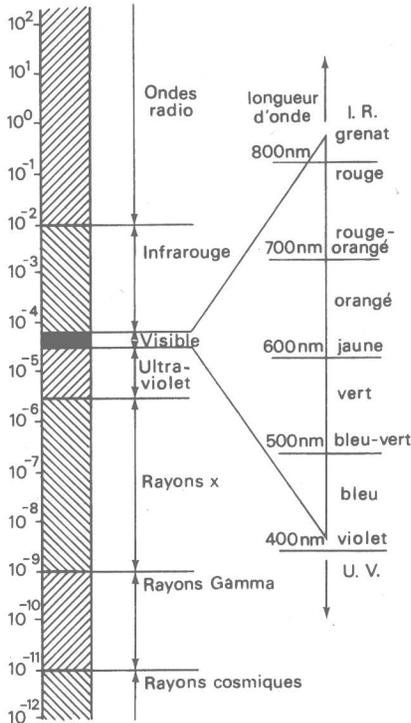


FIG. 1. — Echelle des radiations. À gauche, longueur d'ondes en mètres; au milieu: domaines conventionnels; à droite: dilatation du visible et domaines conventionnels des sensations colorées.

tions visibles par l'œil, un soixante dixième environ du total connu. En microscopie, l'exploration en ultraviolet et en infrarouge porte le domaine connu à trois octaves à peine.

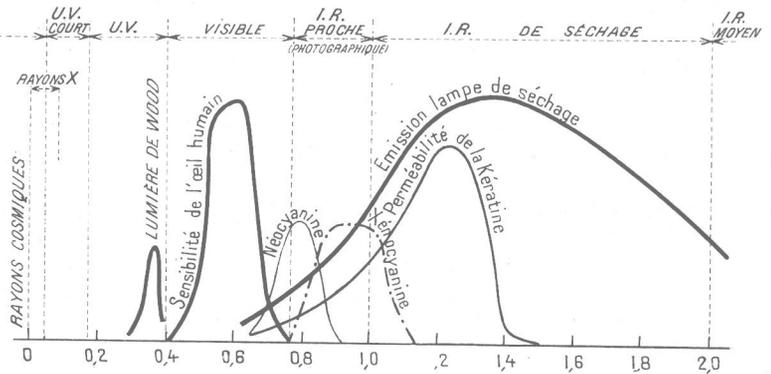
Les expériences d'interférence et de diffraction de Young et Fresnel au début du 19^e siècle ont prouvé l'existence dans la lumière, d'un élément variant périodiquement à la fois dans le temps et dans l'espace. En un point donné, la lumière prend donc un grand nombre de fois par unité de temps la même valeur, c'est sa fréquence ν ou périodes par seconde. Dans l'espace la distance qui sépare deux surfaces d'onde ayant le même état lumineux est la longueur d'onde λ . Les deux sont reliés par la relation $\lambda = \frac{c}{\nu}$.

L'aspect périodique, ondulatoire, ne permet pas d'interpréter facilement les processus d'émission et d'absorption de la lumière, alors qu'il rend bien compte des phénomènes de propagation. Pour interpréter ceux-ci on admet une discontinuité, une quantification de l'énergie transportée par la lumière. Cette quantification est multiple, comme l'a montré Max Planck en 1905, d'une quantité élémentaire dite quantum d'énergie: $\epsilon = h\nu$. Chaque quantum est présent dans l'onde de lumière sous forme d'un photon qui est son corpuscule élémentaire mais qui ne peut exister au repos. Suivant l'expression d'Yves le Grand, la lumière est en quelque sorte formée d'un «flot de particules désincarnées».

Les Sources ponctuelles sont des sources vues par l'observateur ou par la pupille d'entrée de l'instrument sous un angle petit de quelques minutes d'arc au maximum. Plus la source est ponctuelle plus l'éclairage est dit «cohérent»; on verra plus loin l'importance de ce concept.

Les Sources étendues sont peu cohérentes ou partiellement cohérentes ou incohérentes. Elles sont dites primaires, si elles sont lumineuses par elles-mêmes, ou alors secondaires si elles modifient une partie de rayonnement reçu. Le fait de placer une surface diffusante devant une source cohérente produit une source secondaire incohérente. On évitera donc d'utiliser cet accessoire toutes les fois que la

FIG. 2. — Rapports entre les domaines Infra-Rouge, Visible et Ultra-Violet. D'après M. Déribéré, 1944.



cohérence de la source doit être conservée: en contraste de phase, en contraste interférentiel ou en lumière polarisée notamment. Notons au passage qu'un faisceau laser a une très grande cohérence, ce qui rend possible certains phénomènes optiques spéciaux comme l'holographie.

La **Radiance** et la **Brillance** sont deux concepts homologues dont le premier s'applique à un volume et le second à une surface. Seule la radianse du ciel ou d'une décharge dans un gaz peut nous intéresser, mais la brillance des sources est de la plus haute importance en microscopie. On a démontré en effet qu'à ouverture égale d'un système optique c'est la brillance de la source et elle seule qui détermine la luminosité de l'image produite par le microscope. La course aux brillances élevées des sources a donc été un facteur déterminant des progrès du microscope.

Le **Rayonnement** d'une source peut avoir deux structures différentes: il peut être soit continu, soit discontinu, dans ce dernier cas on parle d'un spectre de raies; certaines sources sont un mélange des deux. L'excitation d'un gaz: sodium, mercure, produit un spectre de raies, le chauffage d'un filament de tungstène un spectre continu. Un spectre continu est caractérisé par sa courbe spectrale d'énergie, un spectre de raies par la longueur d'onde et l'intensité de chaque raie.

L'**Oeil** est un récepteur de rayonnement fondamental puisqu'il n'existe pratiquement pas d'instrument optique qui puisse se passer d'un œil pour exploiter directement ou indirectement l'image en dépouillant les résultats photographiés ou affichés ou enregistrés.

Les **Photocellules**, ou photosenseurs, appartiennent à différentes catégories suivant leur mode de fonction-

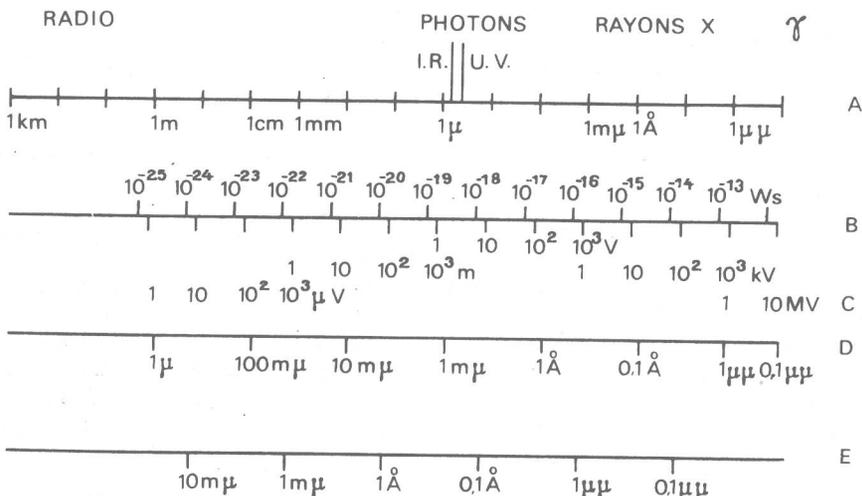


FIG. 3. — Données physiques sur les ondes et particules utilisées en microscopie. A, longueurs d'onde; B, quanta d'énergie; C, accélération des électrons; D, longueur d'onde associée aux électrons; E, longueur d'onde associée aux protons.

nement. Nous n'entrerons pas dans les détails; ils sont traités dans les ouvrages d'électronique et d'opto-électronique.

Les **Surfaces photosensibles** enregistrent suivant leurs structures les densités en noir et blanc ou les couleurs.

Ces récepteurs ont en commun une caractéristique: ils n'enregistrent que les amplitudes ou degrés de gris dans l'image mais jamais les phases.

Le **Corps noir** est en optique un concept d'un intérêt théorique considérable. Il n'est utile en microscopie que comme référence à un étalon. Les corps non noirs sont en général tous les corps que l'on observe au microscope.

Les **Ampoules à incandescence** munies d'un filament chauffé par effet Joule sont encore les sources les plus couramment utilisées. Leur courbe spectrale d'énergie varie rapidement avec l'ampérage (Fig. 21). Leur *température de couleur* est une façon commode de repérer la longueur d'onde dominante de leur spectre d'énergie.

L'**Hétérogénéité rétinienne** limite le pouvoir séparateur de l'œil. On sait maintenant que cônes et bâtonnets sont reliés à leurs voisins par de véritables unités de calcul ce qui rend caduques toutes les hypothèses que l'on a pu faire pour déduire de leurs dimensions le pouvoir séparateur théorique de l'œil. De plus il oscille perpétuellement autour d'une position moyenne, en fait il explore plus qu'il ne fixe.

L'œil a une **Mémoire** complexe spatio-temporelle. Il établit une continuité apparente là où des images discontinues se succèdent ce qui permet la cinématographie. Il semble que ce phénomène soit plus psychique que physiologique. Il serait à l'image des discontinuités dans notre pensée consciente que masque une apparente continuité de notre conscience, à l'état de veille bien entendu.

Le **Champ visuel** est toujours plus grand que celui de l'instrument dans lequel l'œil regarde. L'opérateur, pour explorer rapidement ce qu'il voit, doit s'entraîner à la « vision périphérique ». Il doit pouvoir abolir consciemment la vision centrale au profit de la vision périphérique sans déplacements du globe oculaire. C'est absolument indispensable pour acquérir les mécanismes d'exploration rapide champ par champ, mécanismes dont la lecture rapide des textes n'est qu'un cas particulier.

Les **limites du visible** varient suivant les observateurs et suivant l'intensité de la lumière reçue. La

visibilité maximale passe du jaune au vert lorsqu'on diminue les éclairements.

Il est illogique que l'image oculaire au microscope soit analogue à un trou de lumière au fond d'un tunnel noir. Pour obtenir une meilleure acuité associée à un plus grand confort il faudrait un éclairage auxiliaire faible de la périphérie du champ. Aucune expérience n'a encore été faite dans ce sens en microscopie.

L'**Ultra-violet** est nocif pour l'œil; de plus il excite la fluorescence du cristallin et nimbe les images d'un brouillard bleuté.

L'**Éclairage** au niveau de la rétine règle par réflexe le diamètre de la pupille d'entrée de l'œil. Au microscope ce réflexe est sans effet sur le flux admis dans l'œil puisque la pupille de sortie de l'oculaire a un diamètre en général bien plus petit aux forts grossissements. Ceci explique que l'œil soit facilement ébloui par un éclairage trop intense. De plus la sensibilité de la rétine change très rapidement dès que le faisceau incident s'écarte de l'axe de l'œil, c'est l'effet Purkinje. En réalité tout se passe comme si l'œil était constitué de deux récepteurs fonctionnant différemment en sensibilité comme en longueur d'onde en plein jour et au crépuscule.

■ La plupart des objets examinés au microscope sont: soit colorés naturellement, soit teints artificiellement. Il est donc absolument essentiel d'avoir présents à l'esprit les notions suivantes de colorimétrie pour tirer le meilleur parti de son instrument.

La **Couleur blanche** n'est blanche que par rapport à un étalon. Cet étalon est conventionnel: c'est la lumière du jour à 5200 °K; on sait que la « température de couleur » varie largement au cours d'une journée et au fil des mois.

Un rayonnement **Monochromatique** est entièrement déterminé par sa longueur d'onde et son flux.

Un **Rayonnement coloré** est entièrement défini par son flux et deux variables supplémentaires: un fond blanc plus une couleur monochromatique. Dans la pratique on préfère procéder à la synthèse des couleurs par addition de trois variables colorées: c'est la synthèse trichrome couramment utilisée en photographie et en impression. Mais il faut dans ce cas que les lumières colorées soient à bandes larges, non monochromatiques.

Toute couleur a sa complémentaire c'est-à-dire la couleur qui par synthèse additive donne du blanc, par exemple le jaune et le bleu-violet; ces couleurs