

# Birla Central Library

PILANI (Jaipur State)

Class No :- 574.8  
Book No :- L662H  
Accession No :- 35577





# HISTOCHIMIE ANIMALE

MÉTHODES ET PROBLÈMES

## COLLECTION DES ACTUALITÉS BIOLOGIQUES

---

### Ouvrages parus :

- EPHRUSSI (B.)**, Assistant à l'Institut de Biologie physico-chimique. **La Culture des tissus.** 45 fr.
- ABELOOS (M.)**, Chef de travaux à la Faculté des Sciences de Caen. **La Régénération et les problèmes de la morphogénèse.** 50 fr.
- DALCQ (A.)**, Professeur à l'Université de Bruxelles, Correspondant de l'Académie de Médecine de Belgique. **L'Organisation de l'œuf chez les Chordés. Étude d'Embryologie causale.** 65 fr.
- LISON (L.)**, Assistant à la Faculté de Médecine de Bruxelles. **Histochimie animale. Méthodes et problèmes.** fr.

### Ouvrages en préparation :

- AVEL (M.)**, Chef de travaux à la Faculté des Sciences de Paris. **Le Sexe.**
- BROUHA (Dr L.)**, Agrégé de la Faculté de Médecine de Liège. **Hormones et croissance.**
- OBERLING (Ch.)**, Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris. **Le Système réticulo-endothélial dans ses rapports avec la Pathologie.**
- PARAT (M.)**, Chef de travaux à la Faculté des Sciences de Paris. **La Cellule.**
- TEISSIER (G.)**, Sous-Directeur de la Station biologique de Roscoff. **La Croissance.**
-

COLLECTION DES ACTUALITÉS BIOLOGIQUES  
SOUS LA DIRECTION DE M. ROBERT LÉVY

---

# HISTOCHIMIE ANIMALE

## MÉTHODES ET PROBLÈMES

PAR

**L. LISON**

ASSISTANT A L'UNIVERSITÉ DE BRUXELLES  
ASSOCIÉ DU FONDS NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Avec une Préface de M. Pol GÉRARD



GAUTHIER-VILLARS, ÉDITEUR  
55, Quai des Grands-Augustins, — PARIS (VI<sup>e</sup>)  
1936

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

## PRÉFACE.

---

Histochimie : terme de création récente, qui exprime pourtant une aspiration profonde, bien que timide, des premiers histologistes, celle de reconnaître dans une cellule, par des réactions chimiques appropriées, les différents produits qu'elle forme et transforme pendant sa vie, et d'en déduire une représentation de son métabolisme.

Pendant une longue période — celle des coupes en série et des colorations électives — ces préoccupations passèrent à l'arrière-plan, pour faire place à d'autres, d'ordre purement morphologique.

Ce fut le mérite d'A. Prenant d'avoir, en 1910, réuni en une courte revue la somme de nos connaissances en Histochimie (qu'il appelait Microchimie) et d'avoir montré tout l'intérêt de telles études.

Depuis lors, nombre de travaux histochimiques ont vu le jour, éparpillés dans de nombreuses revues d'accès parfois difficile, et consacrés le plus souvent à un sujet limité et précis. Aucun ouvrage général n'a encore paru qui condense, en les soumettant à la critique, les documents publiés jusqu'ici.

C'est la tâche à laquelle M. Lison a consacré ses efforts. Comme le lecteur le verra, il ne s'est pas borné à faire de son travail un recueil de « recettes » histochimiques, classées en un ordre agréable et utile. Il a cru devoir dégager tout d'abord et mettre en pleine lumière les principes suivant lesquels une recherche histochimique doit être conduite. C'est là un point capital sur



lequel personne avant lui n'avait insisté fortement. Lorsqu'on passe au crible de la critique les documents accumulés depuis une trentaine d'années, on s'aperçoit en effet qu'un grand nombre de recherches histochimiques pèchent par la base, soit que leur auteur ne se soit pas rendu compte de la valeur des réactions proposées, soit qu'il n'ait pas délimité exactement les conditions de son emploi : localisant ce qui n'était pas localisable, décelant ce qui n'était pas décelable, distinguant l'une de l'autre des espèces chimiques non discernables par la technique proposée.

La partie spéciale, où M. Lison traite des procédés destinés à mettre en évidence les différents corps ou fonctions chimiques, porte également sa marque personnelle. Il y a condensé le fruit d'une expérience déjà longue.

Cette mise au point de nos connaissances histochimiques était nécessaire et sera la bienvenue. En l'acceptant dans cette Collection des Actualités biologiques, M. Robert Lévy a voulu fournir aux biologistes, dans le domaine de l'Histo chimie, un guide et un stimulant. Je crois que cet espoir ne sera pas déçu.

Pol GÉRARD.

Bruxelles, le 7 mai 1935.

---

---

# HISTOCHIMIE ANIMALE

## MÉTHODES ET PROBLÈMES

---

---

### PREMIÈRE PARTIE.

#### HISTOCHIMIE GÉNÉRALE.

---

#### CHAPITRE I.

##### INTRODUCTION HISTORIQUE.

---

L'Histochimie, que l'étymologie définit « la chimie des tissus », est une science aussi vieille que l'Histologie elle-même. A l'aurore de la Biologie moderne, les chercheurs, les « curieux de la nature » se trouvaient devant le triple problème des êtres organisés : le problème de la structure, le problème de la constitution, le problème du fonctionnement; les deux premiers statiques, le troisième dynamique. Il ne leur venait pas à l'esprit de dissocier fondamentalement ces trois grandes questions. Aussi peut-on dire que lorsque les travaux impérissables de BICHAT eurent isolé définitivement le concept de « tissu » se trouvèrent créées du même coup l'Histologie descriptive, l'Histochimie et l'Histophysiologie. BICHAT n'étudiait-il pas, en effet, à propos de chacun des 21 tissus qu'il décrivait, « sa répartition dans les différentes parties de l'organisme, sa texture, ses propriétés, son action physiologique »? A vrai dire, dans l'œuvre de BICHAT, on trouve peu de données proprement chimiques; mais la Chimie, à son époque, était encore très rudimentaire. Lorsque, plus tard, l'Histologie eut trouvé sa technique dans l'emploi du microscope et son fil conducteur

dans la théorie cellulaire, on n'en sépara point l'étude de la chimie des tissus, pas plus que celle de leur physiologie. La pénétration entre la Chimie organique et la Morphologie était complète : l'Histochimie, « cette partie de la science qui s'occupe de la constitution chimique des éléments et des tissus, des substances qui les composent, de leur mode de pénétration, de leur origine, de leur valeur dans les fonctions des éléments et des tissus, de leur transformation, de leur substitution, de leur élimination, etc. » (FREY, 1871), formait une partie essentielle de l'étude des tissus, au même titre que la description de leur structure. Jusque vers la première moitié du XIX<sup>e</sup> siècle, tous les manuels et traités d'Histologie consacraient une place importante à la chimie tissulaire, ou, comme l'on disait à l'époque, à la « description des éléments et principes médiats et immédiats de l'organisation ».

Le célèbre Traité d'Histologie de S. HENLE, le plus important de cette époque, était intitulé : *Anatomie générale, histoire des principes immédiats et éléments du corps humain* (Leipzig, 1841). Tous les ouvrages contemporains étaient conçus à peu près sur le même plan, qui révèle bien la place que la chimie occupait dans les préoccupations des histologistes. Allant du simple au complexe, l'auteur étudiait successivement les substances qui concourent à la formation des cellules, puis les cellules, puis les tissus, enfin les organes. Ainsi le plan général du livre *Anatomie de texture ou Histologie*, de BURGGRAEVE (1845) comprend, d'après l'auteur : « 1<sup>o</sup> les éléments généraux de l'organisation, ceux qui leur sont communs avec les autres corps de la nature (1); 2<sup>o</sup> les éléments propres de l'organisation, ceux que les corps vivants se préparent à eux-mêmes au moyen des éléments généraux (2); 3<sup>o</sup> les parties primaires de l'organisation, celles auxquelles la vie a déjà imprimé une existence individuelle (3); 4<sup>o</sup> la conversion des parties primaires en parties secondaires (4); 5<sup>o</sup> la conversion des parties secondaires en systèmes organiques. »

Réciproquement, les Traités de Chimie physiologique, de « Zoochimie » accordaient une large place aux descriptions anatomiques. C'est ce qu'on observe, par exemple, dans le livre de MULDER : *Versuch einer allgemeinen*

(1) C'est-à-dire les corps inorganiques.

(2) Les corps organiques.

(3) Les cellules.

(4) Les tissus.

*physiologischen Chemie* (Brunswick, 1844), le troisième volume du grand *Traité de Chimie physiologique*, de LEHMANN (Leipzig, 1883), le *Nouveau système de Chimie organique*, de RASPAIL. Dans les mêmes pages de ces volumes, comme dans le remarquable *Lehrbuch der physiologischen Chemie* (Leipzig, 1866), de KÜHNE, on trouve décrites la structure morphologique des tissus et leur composition chimique, telle qu'on la connaissait alors. Il existait même de véritables Traités de Chimie appliquée aux tissus, tels que le *Traité de Chimie anatomique*, en quatre volumes de ROBIN et VERDEIL et le *Traité d'Histochimie* de SCHLOSSBERGER : *Die Chemie der Gewebe des gesammten Thierreichs* (Leipzig-Heidelberg, 1856).

Plus tard, l'étude de la chimie des tissus se sépara de l'histologie proprement dite, quitta le domaine de la Morphologie, pour s'intégrer dans la Physiologie. La *Chimie anatomique* devint la *Chimie physiologique* et finit par s'ériger en discipline indépendante. Comme le dit très bien POLICARD, « chacune de ces Sciences — l'Histologie et la Chimie biologique — se laissa dominer par sa technique. Elles utilisaient des techniques de plus en plus spécialisées et trop différentes. Chacune d'elles prit son autonomie, avec ses techniques particulières et ses cadres spécialisés ». Cette scission s'accomplit vers le milieu du XIX<sup>e</sup> siècle. FREY peut être considéré comme le dernier des histochimistes de la vieille école. Dans son ouvrage bien connu, *Traité d'Histologie et d'Histochimie*, il se plaignait amèrement que tous les nouveaux Traités d'Anatomie microscopique traitaient l'Histochimie en marâtre.

Lorsque les développements techniques de l'Histologie — et surtout la méthode des coupes et la pratique des colorations histologiques — imprimèrent à celle-ci le merveilleux essor du début de ce siècle, du même coup, ils la firent se circonscrire plus étroitement encore dans le cadre morphologique; les préoccupations physiologiques et plus encore les questions de chimie passèrent au second plan. L'Histologie devint une science purement formelle; on pouvait la considérer comme le type de la science descriptive, opposable aux sciences physiologiques.

De cette conception par trop étroite, on tend nettement à revenir vers une idée plus compréhensive de l'Histologie — et c'est là une évolution féconde. L'histologiste contemporain ne se contente plus d'une sèche description de formes et de structures. Cette description n'est qu'une partie de l'étude de la matière vivante; il veut l'harmoniser avec la recherche de sa constitution intime et avec l'observation de son dynamisme fonc-

tionnel. L'objet de l'Histologie, il le conçoit comme une étude plus générale de l'être vivant : structure, constitution, fonction. Dans le cadre des techniques nécessitées par la recherche microscopique, il rétablit les trois disciplines fondamentales de l'étude de l'être vivant normal envisagé en soi : de même que dans le domaine macroscopique, il existe une anatomie, une physiologie et une biochimie, il existe une histologie descriptive, une histophysiologie, une histochimie.

Mais cette Histochimie que l'on voit réapparaître dans le cadre de l'Histologie moderne diffère profondément de l'Histochimie d'il y a cent ans ; elle en diffère tellement que l'on peut dire que c'est une science toute récente, créée *de novo*.

Ce n'est pas tant que son but ou sa raison d'être ait beaucoup changé depuis cette époque. La constitution chimique d'un organe, révélée par l'analyse biochimique normale, est une connaissance globale. L'histologiste, qui connaît la complexité de structure de cet organe, qui la *voit* dans son microscope, voudrait préciser davantage. Il demande, non pas seulement le total d'un bilan chimique, mais aussi son détail. Il voudrait savoir, non pas seulement qu'il se trouve telle substance dans tel organe, mais *où* elle s'y trouve. Et chacune de ces structures si fines qu'il est capable de distinguer, il voudrait en pouvoir déterminer la constitution exacte.

D'où la raison d'être de l'Histochimie : établir en quelque sorte « l'image chimique » des tissus, des cellules. Cette raison d'être est la même aujourd'hui qu'autrefois ; et, par exemple, les lignes de FREY, qui datent de 1871, sont encore actuelles : « Rien de plus facile pour le micrographe que de distinguer, dans la cellule, cet élément le plus ordinaire de l'organisme, une enveloppe, un contenu, un noyau, des nucléoles : l'analyse chimique est obligée de s'arrêter en face de si petits détails. La plupart des tissus, par leur nature composée, s'offrent presque toujours au chimiste sous la forme d'un assemblage d'éléments multiples qu'il ne saurait séparer avec les moyens qu'il a à sa disposition. »

Ce qui fait différer profondément l'Histochimie moderne des anciennes recherches, ce sont à la fois les méthodes et les résultats. L'Histochimie vieille manière n'était en somme qu'une partie à peine spécialisée de la Chimie biologique et se servait des méthodes mêmes de celle-ci. Dans un cas comme dans l'autre, il s'agissait tout d'abord d'isoler des substances à l'état de pureté, puis d'en effectuer l'analyse par les méthodes classiques

de la Chimie. En Chimie physiologique normale, on opérât sur des organes, voire sur des organismes entiers; dans le cas d'une recherche histochimique, on travaillait sur un tissu ou même sur des cellules que l'on isolait comme on pouvait. Mais, dans tous les cas, l'opération comprenait en principe la destruction totale de la structure tissulaire.

L'Histochimie moderne, au contraire, exige fondamentalement que la structure soit respectée. L'analyse histochimique doit être conduite de telle sorte que l'identification chimique soit effectuée au sein même du tissu, sans que la morphologie en soit changée. Elle estime en effet que le but même de l'Histochimie, « la découverte des constituants des tissus par les moyens chimiques » (MANN), ne peut être rempli que si la localisation des substances étudiées est intégralement respectée et donc la structure du tissu intacte. L'Histochimie est donc — pour employer un terme assez peu harmonieux mais adéquat, créé par H. VOSS — une véritable « histotopochimie ».

Ces exigences nécessitent évidemment des techniques particulières; et il suffit d'un coup d'œil même superficiel pour voir combien l'Histochimie actuelle diffère de l'Histochimie des anciens auteurs. On n'utilise plus comme auparavant les méthodes de la Chimie analytique. On n'essaie pas d'isoler ni de purifier la substance étudiée, au prix d'un travail souvent long et délicat; bien au contraire, on s'efforce par tous les moyens de ne pas la séparer des structures avoisinantes.

A différence de méthodes, différence de résultats. En premier lieu, l'Histochimie est une science purement qualitative; c'est évident, sans grandes explications. Mais, de plus, dans l'état actuel de son développement, elle ne peut guère prétendre à autre chose que d'identifier des *fonctions* chimiques et non pas des *individus* chimiques. Elle ne peut encore établir de façon précise la formule de constitution développée de chaque élément morphologiquement présent dans le cytoplasme. Elle doit se borner dans la plupart des cas à identifier des groupes de substances, non pas des substances parfaitement définies. Par exemple, l'histochimiste ne cherchera pas à distinguer si telle substance qu'il étudie est l'éther-sel glycérique de l'acide stéarique ou bien celui de l'acide palmitique; il sera satisfait s'il peut prouver qu'il a affaire à un glycéride en général. On verra, dans le cours de cet ouvrage, que beaucoup des réactions des histochimistes sont bien en réalité des *réactions de groupe*.

Différente par son esprit, par ses méthodes, par ses résultats de l'ancienne

chimie des tissus, l'Histo chimie moderne s'est donc constituée en science propre, entièrement nouvelle. On peut donc la considérer à bon droit comme une science jeune, encore très peu évoluée. Assurément, elle a déjà permis d'étudier avec fruit et de résoudre d'intéressants problèmes. Cependant, au fur et à mesure qu'elle progresse, se posent en bien plus grand nombre des problèmes nouveaux, bien plus ardues, bien plus compliqués, et ce qui a été fait apparaît comme une bien petite chose à côté de ce qui reste à faire. Par une critique impitoyable des méthodes actuellement utilisées, par une amélioration des techniques, on peut estimer que l'Histo chimie pourra encore réaliser des progrès considérables et parvenir à des résultats importants et d'ordre général. Certainement, l'horizon recule devant nous au fur et à mesure qu'il s'élargit, et de nouveaux problèmes surgissent avant même qu'on ait pu résoudre ceux qui se posaient; mais n'est-ce pas là, à la fois, la raison et l'avenir de toute science?

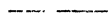
#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

Ouvrages généraux d'Histo chimie ou renfermant des considérations générales sur l'Histo chimie :

HERTWIG (G.), *Histochemische Methoden*, in *Von Möllendorff's Hbd. der mikr. Anat. des Mensch. : I. Lebendige Masse* (Berlin, Springer, 1929). — HERXHEIMER, *Technik der pathologisch-histologisch Untersuchungen* (Wiesbaden, 1912). — JOLLY (J.), *L'histophysiologie et les tendances modernes de l'Histologie*, 1926 (*Paris médic.*, 16, p. 445). — KLEIN, *Praktikum der Histochemie* (Berlin, 1929). — MACALLUM (A. B.), *Die Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie in der biologischen Forschung (Erg. Physiol., 7, 1908, p. 552); Die Methoden der biologischen Mikrochemie. Hbd. der biochem. Arbeitsmethoden* (Berlin, Urban et Schwarzenberg, 1912). — MANN, *Physiological Histology. Methods and Theory* (Oxford, 1912). — PARAT (M.), *A review of recent developments in histochemistry (Biol. Rev., 2, 1927, p. 285)*. — PATZELT (V.), *Animale Histochemie*, in *Fortschritte der Mikrochemie* (Leipzig, Deuticke, 1928). — PRENANT (A.), *Méthodes et résultats de la Microchimie (Jl. Anat. Physiol., 46, 1910, p. 343); L'Histo chimie (Rev. gén. Sc., 32, 1921, p. 581)*. — POLICARD (A.), *Considérations sur l'Histo chimie (Bull. Ass. Anat., 1, 1933)*. — ROMEIS (B.), *Histochemische Methoden*, in *Taschenbuch d. mikr. Techn.* (Munich, Oldenburg, 1932); *Histochemische Methoden*, in *Methodik d. wiss. Biol.*, I (Springer, Berlin, 1928). — TURCHINI (J.), *L'avenir de la recherche histologique (Disc. de récept. à l'Acad. des Sc. et Lettres Montpellier)*, in *Languedoc médical*, II, 1928, p. 214.

## CHAPITRE II.

### LES CONDITIONS D'EXACTITUDE DE L'ANALYSE HISTOCHIMIQUE I. CONDITIONS MORPHOLOGIQUES. LE PROBLÈME DE LA FIXATION HISTOCHIMIQUE.



L'Histo chimie, science morphologique par certains côtés, science chimique de l'autre, doit à la fois participer des méthodes de ces deux disciplines. Et c'est cela qui rend souvent sa tâche extrêmement difficile. En effet, la recherche histo chimique d'une substance dans un tissu doit satisfaire à deux sortes d'exigences; les unes morphologiques : la conservation exacte de la *localisation* de la substance recherchée — ce qui entraîne comme corollaire, le respect de la forme des tissus; les autres, chimiques : la mise en évidence de façon adéquate et *spécifique* de la substance envisagée. Une analyse histo chimique ne pourra être considérée comme *exacte* que si elle satisfait pleinement à ces conditions.

A l'heure actuelle, il y a encore malheureusement bien des cas où la sagacité du chercheur se trouve déjouée et où l'on ne parvient pas, soit à maintenir rigoureusement la localisation de la substance recherchée, soit à la caractériser chimiquement avec certitude. Dès lors, on doit se rendre compte exactement de la situation; on doit s'avouer qu'on fait peut-être de l'Histologie, ou qu'on fait peut-être de la Chimie, mais qu'on ne fait pas d'Histo chimie.

On veut, par exemple, rechercher histo chimiquement l'urée. L'urée est très aisée à identifier par une réaction très sensible et caractéristique : avec le xanthidrol en solution dans l'acide acétique, elle forme un précipité insoluble de dixanthylurée, très facilement reconnaissable. Cependant, la recherche histo chimique de l'urée est sans valeur. En effet, l'urée n'existe dans les tissus qu'à l'état dissous. Il s'agit donc de la précipiter *in situ* dans la position exacte où elle se trouvait sur le vivant. Cette précipitation *in situ* est *impossible* : lors de la fixation, le xanthidrol, molécule très lourde



et peu diffusible, ne peut pénétrer assez vite dans le tissu pour précipiter certainement en place l'urée, molécule extrêmement diffusible, une des plus diffusibles que l'on connaisse parmi les substances organiques. De plus, en milieu colloïdal, — et qui plus est, en milieu colloïdal en pleine dénaturation (par l'action de l'acide acétique), — la précipitation se trouve grandement influencée et des transports de substance peuvent s'ensuivre. Dans ce cas, les conditions chimiques de recherche d'une substance sont remplies, mais les desiderata morphologiques ne sont pas réalisés. On a fait de la chimie, non dans un tube à essai, mais dans une pièce anatomique; mais cela n'est pas faire de l'histochemie.

Il arrive d'autre part que, sur des éléments intra-cellulaires dont la localisation est sûre, on applique des réactifs sans valeur signalétique, sans spécificité chimique bien tranchée. Dans ce cas, on fait de l'histologie descriptive, mais pas de l'histochemie. Et si l'on peut, au moyen de ce réactif, distinguer l'une de l'autre deux structures ou deux espèces cellulaires, on aura effectué des discriminations d'ordre histologique, peut-être précieuses en morphologie, mais auxquelles on ne peut attribuer de signification chimique. Il est parfaitement légitime de distinguer des structures par le fait qu'elles « prennent » ou ne « prennent » pas les colorants à base d'hématoxyline, mais il ne faut pas en déduire, comme le fait GUTSTEIN, que les premières sont composées de « lipoïdes acides », uniquement parce que leur colorabilité est annihilée par un traitement à l'alcool acidulé.

Il importe donc, avant d'étudier dans le détail les réactions spéciales proposées en vue de la recherche histochemique des différents corps chimiques, de préciser les conditions générales dans lesquelles doit être effectuée une réaction histochemique pour qu'on puisse la considérer comme exacte.

Ces conditions sont de deux ordres, avons-nous dit déjà. Nous étudierons plus spécialement dans ce chapitre les conditions morphologiques et réserverons pour le chapitre suivant les conditions chimiques.

\*  
\* \*

La condition morphologique essentielle de l'Histochemie est *une localisation topographique exacte et précise de la substance à rechercher*; et comme cette localisation ne peut être reconnue que si les rapports avec les

éléments cytologiques ambiants sont parfaitement conservés, cette condition entraîne comme corollaire l'intégrité structurale du tissu étudié.

La perfection sera donc atteinte lorsque : 1<sup>o</sup> la substance étudiée sera conservée à l'endroit où elle existait sur le vivant ; 2<sup>o</sup> lorsque le tissu sera histologiquement fixé de façon optimum.

En définitive, le problème morphologique de l'Histochimie se ramène à la question de la fixation. Celle-ci aura un double effet : fixer la substance *in loco* et fixer le tissu au sens histologique du mot.

Il importe, tant au point de vue théorique que pratique, de distinguer deux cas. Dans le premier, la substance à étudier histochimiquement se trouve à l'état figuré dans le protoplasme et la fixation devra simplement en assurer la parfaite conservation.

Dans le second, la substance se trouve à l'état dissous dans les humeurs ou le suc cellulaire et la fixation devra en outre la *précipiter* « *in loco* ».

#### I. — FIXATION HISTOCHIMIQUE DES SUBSTANCES FIGURÉES OU EXISTANT EN LIAISON AVEC UN SUBSTRAT FIGURÉ.

C'est évidemment lorsque la substance à étudier se trouve préformée à l'état figuré que les difficultés sont les moins grandes.

Il suffit, en effet, de choisir un fixateur qui ne dissolve pas, qui n'altère pas la substance recherchée, et qui ne renferme pas de produits dont les réactions interfèrent avec celles de la substance en question. Ce sont là des choses évidentes *a priori*. Ainsi, si l'on veut rechercher des corps gras, il faudra éviter les fixateurs à base d'alcool, qui les dissolvent. Si l'on veut différencier les différents corps gras les uns des autres, il faudra éviter de les laisser séjourner trop longtemps dans des solutions formolées, qui les altèrent. Si l'on veut rechercher les éléments minéraux *in toto* dans un tissu, on devra fixer dans un liquide exempt de toute matière minérale, car les substances inorganiques du fixateur se confondraient avec celles du tissu lui-même.

Ces desiderata — d'ordre négatif, puisqu'ils ne visent que la suppression d'agents défavorables à la bonne conservation de la substance recherchée — se comprennent d'eux-mêmes.

En revanche, d'autres conditions encore sont nécessaires pour obtenir une fixation histochimique optimum, et celles-ci sont très souvent méconnues.

*Il faut toujours choisir, parmi les fixateurs possibles, les fixateurs histologiquement les meilleurs.* Cette condition est importante, et elle l'est d'autant plus que la recherche demande plus de finesse : pour une simple localisation topographique, un fixateur médiocre pourra donner des résultats passables; pour une localisation cytologique, une fixation cytologique impeccable est de rigueur.

Beaucoup d'histologistes, lorsqu'ils veulent effectuer une étude histo-chimique, croient bien faire en s'adressant à des fixateurs dits « indifférents » (?). Le plus souvent, ils choisissent l'alcool absolu ou bien le formol. Ils ont crainte d'employer les fixateurs reconnus les meilleurs en technique histologique. C'est là une erreur. A. PRENANT, le premier, a insisté sur ce point. « Toutes les fois qu'on pourra le faire sans inconvénient, c'est au contraire à ces derniers (les agents fixateurs les plus fidèles de la technique histologique) qu'il faudra s'adresser de préférence. Les observations de M<sup>lle</sup> ASVADOUROVA sur la présence du fer dans les cellules pigmentaires des Amphibiens sont instructives à cet égard. Pour obtenir plus sûrement la réaction (1), elle ne s'était adressée d'abord qu'à des pièces fixées par l'alcool, l'alcool absolu-chloroforme ou le formol. Dans ces conditions, les coupes offraient, à côté d'enclaves bleues suffisamment délimitées, des plages diffusément colorées. En employant au contraire des pièces bien fixées par les liquides de FLEMMING ou de BOUIN, ces plages diffuses se sont montrées extrêmement rares. L'existence de ces dernières était due évidemment à une fixation défectueuse. » Malgré ces données, la plupart des manuels techniques actuels conseillent encore de rechercher le fer sur des pièces fixées à l'alcool absolu et même sur des pièces non fixées. C'est méconnaître le principe ci-dessus énoncé. En effet, le liquide de BOUIN, par exemple, fixe les tissus incomparablement mieux que l'alcool — qui est un des plus mauvais fixateurs qui existent — et n'influence aucunement la détection du fer.

Voici un autre exemple : la qualité de la fixation cytologique joue un rôle important dans la recherche de l'acide thymonucléique par la réaction nucléale.

Le fixateur original de FEULGEN-ROSSENBECK — une solution saturée de sublimé — considéré comme « indifférent » chimiquement vis-à-vis des

---

(1) La réaction du bleu de Prusse.

nucléines, produit une forte vacuolisation et un gonflement des chromosomes (BERG, BAUER).

C'est après une fixation au CHAMPY ou au FLEMMING-HEITZ (Flemming sans acide acétique), qui comptent parmi les meilleurs fixateurs de la chromatine, que leur structure se conserve le mieux et supporte le mieux les manipulations de la réaction. Après le ZENKER, le HELLY, le BOUIN-ALLEN, bons fixateurs de la chromatine, mais non les meilleurs, l'hydrolyse nécessaire à la réaction produit un léger gonflement des chromosomes. Après le CARNOY ou le PETRUNKEVITSCH, on a un fort gonflement; on notera que ces deux derniers fixateurs ne sont pas de bons fixateurs nucléaires (BAUER).

La nécessité d'employer, parmi les fixateurs possibles, les fixateurs histologiquement les meilleurs trouve sa justification dans différentes considérations.

En premier lieu, la localisation d'une substance au sein du cytoplasme ne peut s'effectuer que si le cytoplasme lui-même est bien fixé. Pour étudier par exemple les rapports d'une enclave ferrugineuse avec le chondriome, encore faut-il que celui-ci soit conservé.

D'autre part — et ceci semble plus important — la conservation de la substance recherchée elle-même peut souvent dépendre de la fixation au sens histologique du mot.

Il y a des substances qui sont figurées dans le cytoplasme parce qu'elles y sont réellement insolubles, les cristaux de guanine par exemple. Mais ce fait est assez exceptionnel. Beaucoup de substances qu'on trouve à l'état figuré dans le cytoplasme sont en réalité solubles, soit dans les fixateurs, soit dans les liquides servant à l'inclusion; elles sont pourtant parfaitement conservées, parce qu'elles sont liées, adsorbées en quelque sorte par un substrat figuré, généralement protéique. Dans ce cas, *la fixation de la substance recherchée dépendra de la fixation histologique du substrat qui la supporte.*

Il est aisé de trouver des exemples typiques de ce comportement.

Lorsqu'un colorant colloïdal acide, par exemple le bleu de trypan, est athrocyté<sup>(1)</sup> par une cellule du système réticulo-endothélial, il se « colle » solidement sur du matériel cellulaire, probablement protéique. Après

---

(1) Le terme « athrocytose » créé par BURIAN, repris par GÉRARD et CORDIER, traduit le terme allemand « *speicherung* ».

fixation histologique, ce complexe devient pour ainsi dire indissociable; le colorant, pourtant soluble dans l'eau et dans l'alcool, ne peut plus en être extrait, et les granules visibles dans les cellules résistent aux traitements les plus énergiques. Cette fixation du bleu de trypan dépend de la qualité de la fixation des protides tissulaires en général et la localisation du colorant est d'autant plus exacte que le fixateur est histologiquement meilleur. PFUHL a montré que le formol, souvent recommandé pour la fixation des colorations vitales au bleu de trypan, conduit à des résultats faux. Souvent, par la fixation au formol, de fines granulations se décolorent; de plus, le colorant diffuse et va imprégner d'autres structures, incolores *in vivo*. Le formol, médiocre fixateur histologique, fixe donc mal les granulations de bleu de trypan athrocyté. Pour obtenir une bonne fixation de celles-ci, on emploiera de préférence le SUSA, le BOUIN, par exemple. Ces fixateurs, notons-le bien, ne précipitent pas le colorant *in vitro*; seulement, ils ont un grand pouvoir coagulant envers les protides des cellules et comptent parmi les meilleurs fixateurs histologiques généraux.

La fixation du colorant est donc assurée, non pas parce qu'il est insoluble dans les liquides utilisés, mais parce qu'il est lié à une protéine. De la qualité de fixation de celle-ci dépendra donc la qualité de la fixation du bleu.

Ce qui est vrai pour le bleu de trypan, l'est aussi pour de nombreuses substances existant à l'état figuré dans le cytoplasme. Presque toujours, leur fixation est assurée grâce à l'intermédiaire d'une albumine cellulaire.

Nous devons donc nous élever avec force contre la préférence souvent donnée aux fixateurs « indifférents », et qui ne sont d'ailleurs pas si indifférents qu'on ne le dit; nous devons de même réagir contre la tendance à effectuer des réactions histochimiques sur des tissus frais, lorsqu'il y a moyen de les effectuer sur des tissus fixés. Le problème de la fixation en Histochimie n'est pas autre chose que le problème de la fixation histologique en général.

## II. — FIXATION DES SUBSTANCES NON FIGURÉES.

Lorsque la substance que l'on veut rechercher histochimiquement se présente dans le cytoplasme, non à l'état figuré, mais à l'état dissous, le problème se présente tout autrement. Le fixateur doit en effet précipiter la substance sous une forme insoluble et *cette précipitation doit s'effectuer rigoureusement « in situ »*.

Trouver un liquide précipitant intégralement une substance donnée n'est pas chose bien compliquée et l'on verra dans la partie de cet ouvrage consacrée à l'Histochimie spéciale que de nombreuses formules ont été proposées pour les différentes substances à mettre en évidence. En revanche, on doit se demander si la précipitation ainsi obtenue est rigoureusement précise au point de vue topographique.

La question est importante, tout spécialement en Histophysiologie. Si l'on veut, par exemple, étudier l'élimination rénale des chlorures ou de l'urée, on est bien obligé de précipiter ceux-ci sous forme de combinaison insoluble; leur excrétion s'effectue toujours sans apparition de stades figurés (1). Si la précipitation ne s'est pas effectuée *exactement* à l'endroit où la substance se trouvait, l'image visible sur les coupes sera trompeuse et la théorie de l'histophysiologie rénale qu'on en tirera sera sans base.

Après avoir longuement scruté la question, nous devons nous résoudre à déclarer que la précipitation *in situ* d'une substance dissoute dans les tissus est extrêmement aléatoire. Dans l'état actuel du problème, aucune substance cristalloïde soluble n'a pu être localisée de façon satisfaisante, à moins de préexister sous forme figurée ou d'être en liaison adsorptive avec un élément protoplasmique quelconque fonctionnant en quelque sorte comme « support ».

On doit même dire plus : les méthodes de précipitation par des fixateurs liquides, telles qu'on les a pratiquées jusqu'ici resteront toujours fortement suspectes. Nous n'avons plus guère d'espoir qu'en de nouvelles techniques, malheureusement fort complexes, comme la méthode de congélation d'ALTMANN-GERSH.

Notre opinion pourra paraître sévère. Nous nous attacherons à la justifier.

Tout d'abord, pour que la précipitation s'effectue *in loco*, il faut que le réactif soit parvenu sur place avant que la substance à précipiter s'en soit éloignée. Cette condition n'est le plus souvent pas réalisée. Elle ne l'est *jamais* lorsque la pièce à étudier est simplement prélevée et plongée dans le fixateur choisi. Tous les fixateurs, quels qu'ils soient, ne pénètrent que

---

(1) Nous voulons dire par là, qu'au cours de l'excrétion, il ne leur arrive jamais de précipiter dans le cytoplasme sous forme de combinaison insoluble. Bien entendu, nous ne prétendons pas que leur excrétion ne peut s'accompagner de modifications dans les éléments figurés du cytoplasme lui-même, tels que le chondriome, l'appareil de GOLGI, etc.

lentement dans les tissus et n'y progressent qu'à raison de quelques millimètres au plus par heure. Inutile donc d'essayer d'effectuer une précipitation *in loco* en immergeant simplement une pièce dans le réactif; les résultats obtenus par une technique aussi grossière seraient absolument inexacts.

On pourrait espérer obtenir des résultats convenables en portant le fixateur aussi rapidement que possible aux cellules. On a préconisé souvent d'injecter le fixateur dans l'organe à étudier par voie artérielle et beaucoup ont considéré ce procédé comme satisfaisant *a priori* : le fixateur ne vient-il pas immédiatement à proximité des cellules à fixer? Un autre procédé consiste à congeler le tissu frais et à y pratiquer des coupes par congélation avec un microtome dont le rasoir est également refroidi. Les coupes, encore congelées, sont immédiatement plongées dans le réactif précipitant. L'épaisseur des coupes étant très minime (10 à 20  $\mu$ ), le réactif, dans la pensée des expérimentateurs, parvient très vite à l'intérieur même des cellules. Cette méthode, largement utilisée déjà par MØLGAARD et MACALLUM, a trouvé un regain d'actualité par les perfectionnements qui lui ont été apportés par SCHULTZ-BRAUNS.

En réalité, aucune de ces méthodes ne peut donner de résultats satisfaisants en Histo chimie. Dès que l'on s'adresse à des tissus et non à des cellules isolées, on n'arrive pas à porter le réactif suffisamment vite aux cellules. Alors que la substance à rechercher est presque toujours une molécule légère, très diffusible (ions chlore, iode, potassium; urée), le réactif précipitant est presque toujours une molécule lourde, peu diffusible (sel d'argent, de palladium, cobalthexanitrite de Na, xanthyrol). Inévitablement, la substance à rechercher sera sortie de la cellule avant que le réactif y soit entré. De plus, comme l'agent précipitant utilisé est presque toujours un réactif précipitant également les protéines, il bloque le passage devant lui en coagulant les matériaux constitutifs des cellules et s'oppose lui-même à sa propre pénétration.

Qu'on ne croie pas que nous exagérons à plaisir les difficultés. L'expérimentation nous montre le bien-fondé de ces objections.

Voici quelques exemples : il est aisé, par l'observation intravitale ou supravitale, de localiser les colorants vitaux, tels que le rouge neutre. Le rouge neutre est précipitable intégralement par un grand nombre de réactifs. Or, toutes les tentatives effectuées jusqu'ici pour le précipiter intégralement *in loco* et en obtenir des préparations durables ont échoué,

exception faite pour certaines colorations vitales de cellules isolées. Pourtant, les essais ont été nombreux (PRZESMICKY, GOLOVINE, COLOMBO, VONWILLER, SKRAUP, MITAMURA, HU, TCHEOU-TAI CHUIN, ARNOLD, et d'autres). De même, des essais nombreux de GÉRARD et CORDIER, auxquels nous avons nous-même participé, nous ont convaincu qu'il était impossible de fixer convenablement les colorants acides non athrocytables pendant leur élimination rénale. Pourtant leur précipitation, *in vitro*, est aisée. Pour qu'un colorant soit « fixable », il faut qu'il soit en liaison avec un substratum dans la cellule; dans ce cas, comme nous l'avons dit à propos des études de PFUHL, sa fixation est assurée, non par sa propre précipitation, mais par celle du substrat protéique auquel il est rattaché. Si le colorant est à l'état libre, il est impossible d'empêcher sa diffusion, avant que le réactif l'ait précipité.

Voici encore un exemple : les marques colorées au bleu de Nil ou au brun Bismarck, si utilisées depuis VOGT en Embryologie, sont faciles à fixer histologiquement sur les œufs d'Amphibiens. L'observation montre que là, le colorant se localise sur le vitellus et sur les grains de pigment. Mais lorsque ces substrats figurés manquent, comme, par exemple, chez l'œuf de Truite, la fixation histologique des marques vitales est impossible (PASTEELS, communication personnelle). Et cependant, on ne manque pas de réactifs précipitant ces colorants.

A des conclusions identiques aux nôtres arrivent GERSH et STIEGLITZ, à propos de la détection histochemique des iodures. Si l'on perfuse un animal préalablement injecté d'iodures par un réactif précipitant ceux-ci, le précipité est nettement localisé autour des vaisseaux; cela démontre évidemment que l'iodure a voyagé à la rencontre du réactif. Si l'on congèle la pièce par le CO<sup>2</sup> solide, qu'on coupe par congélation et qu'on reçoive les coupes congelées dans le réactif précipitant, — ou bien si l'on congèle par l'air liquide, déshydrate dans le vide à — 20°, pratique une inclusion à la paraffine (procédé GERSH-ALTMANN) et qu'on plonge les coupes dans le réactif précipitant, — on obtient un résultat décevant : le précipité se forme, mais il se *forme en dehors de la coupe*, dans le liquide ambiant. L'iodure a diffusé de la coupe plus vite que le réactif n'a pu y pénétrer, même quand il s'agit de coupes n'ayant pas plus de 5  $\mu$  d'épaisseur!

On le voit donc, il est impossible d'obtenir une précipitation rigoureusement topographique d'une substance dissoute dans le cytoplasme, car



on ne peut jamais faire parvenir le réactif avant que la substance ait pu être mobilisée.

On peut cependant se demander si, en opérant de façon très soigneuse, on ne peut réduire cette cause d'erreur à un minimum et ainsi obtenir des résultats approximatifs mais acceptables.

Même dans cette hypothèse, d'autres influences perturbatrices viennent s'ajouter et enlever toute valeur au résultat final. Admettons que le réactif parvienne à la substance dans un moment assez court pour que la localisation n'en soit que peu troublée. Encore faut-il que la précipitation s'effectue instantanément et au lieu même où la rencontre s'effectue. Or, rien n'est moins certain. Assurément, dans des tubes à essai, on peut vérifier si l'action du réactif est bien instantanée; seulement, cela n'a aucune signification. En milieu colloïdal — et le milieu cellulaire l'est évidemment — les phénomènes de précipitation sont fortement troublés. La précipitation peut être retardée, et parfois dans des proportions énormes : l'addition de colloïdes est d'ailleurs un moyen très souvent utilisé en technique et dans l'industrie pour retarder les précipitations.

En outre, la précipitation en milieu colloïdal prend des caractères très spéciaux; fréquemment, se produisent des précipitations périodiques, dont les anneaux de LIESEGANG constituent le type le plus connu. On sait en quoi consiste ce remarquable phénomène : dans un gel où une substance se trouve répartie uniformément, la pénétration d'un réactif précipitant produit un précipité à allure périodique. Au lieu d'obtenir un précipité réparti uniformément dans le gel, on aboutit à des figures à allure concentrique : des zones de précipitation dense alternent avec des zones où aucun précipité ne se forme. Il y a eu en quelque sorte déplacement de substance pendant la précipitation.

Dans des milieux protéiques comme ceux qui constituent les tissus, l'introduction d'agents précipitants peut produire des précipités périodiques et des anneaux de LIESEGANG. Un exemple est connu de tous les histologistes : ce sont les lignes de FROMMANN (1864). Ces figures se produisent lorsqu'on effectue sur le frais une imprégnation argentique de fibres nerveuses à myéline. Ce sont des stries parallèles entre elles, perpendiculaires à l'axe de la fibre nerveuse, se dessinant en noir sur le cylindre axe, de part et d'autre des étranglements de Ranvier. Elles sont produites par la diffusion du sel argentique, ayant pénétré au niveau de l'étranglement et se propageant le long du cylindre axe, entre celui-ci et la gaine

de myéline. MACALLUM et MENTEN expliquaient les lignes de FROMMAN par l'existence de formes métastables et labiles du sel d'argent. En réalité, il s'agit d'une précipitation périodique du type des anneaux de LIESEGANG. MACALLUM lui-même a rencontré de telles figures en essayant de localiser les chlorures dans les tissus en les précipitant au moyen de sels d'argent; il les trouve d'ailleurs, non seulement dans les tissus nerveux, mais également dans des fragments de foie, de muscle, d'estomac, etc. LLOYD a reconnu que, dans les plantes, une localisation précise du potassium était impossible, à cause de la formation d'anneaux de LIESEGANG : en revoyant le mémoire de MACALLUM sur la recherche histochemique du potassium, nous avons retrouvé dans les figures qui l'illustrent des exemples absolument typiques de ce phénomène; l'auteur ne semble pas d'ailleurs s'être aperçu du fait.

Les déplacements de substance sous forme d'anneaux de LIESEGANG ne sont d'ailleurs pas les seuls possibles. Les anneaux de LIESEGANG frappent par leur caractère rythmique. Cependant, quand toutes les conditions nécessaires pour les former ne sont pas réalisées, on peut obtenir des déplacements de substance s'effectuant de façon anarchique en quelque sorte. C'est ainsi qu'on peut obtenir, à partir d'une substance uniformément répartie dans un gel, de gros précipités épars et fort distants les uns des autres, au lieu d'un fin précipité serré et uniformément réparti. Dans ce cas, qui paraît assez fréquent, le déplacement paraît s'être effectué au profit des particules précipitées en premier lieu, agissant comme centre d'attraction. Agissent également très souvent comme centres d'attraction lors de la précipitation des structures préformées de la cellule : ainsi, lors de tentatives effectuées pour précipiter des substances dans les tissus, on voit fréquemment le précipité se localiser de préférence au contact de membranes cellulaires ou d'interfaces cellulaires, à la périphérie de la lumière d'un tube, à la surface de basales. Ce sont là des indices nets d'irrégularités graves dans la précipitation.

Résumons : nous croyons impossible la précipitation *in loco* d'une substance dans un tissu, lorsque cette substance existe simplement à l'état dissous et n'est pas en liaison avec un substrat figuré (ou précipitable à l'état figuré) de la cellule. Dans ce cas, en effet, le réactif ne peut parvenir assez vite à la substance et, même s'il y arrivait, la précipitation ne s'effectuerait ni instantanément ni localement, parce que se produisant en milieu colloïdal.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

ASVADOUROVA (A. N.), *Ass. Anat.*, 1909. — BAUER (H.), *Z. Zellf.*, 15, 1932. — BERG (W.), *Z. mikr.-anat. Forsch.*, 7, 1926, p. 421. — COLOMBO (G.), *Z. wiss. M.*, 20, 1903, p. 282. — GERSH (I.) et STIEGLITZ (E. J.), *Anat. Rec.*, 57, 1933, p. 185. — GOLOVINE, *Z. wiss. M.*, 19, 1902, p. 176. — GUTSTEIN (M.), *Virch.*, 265, 1927, p. 805. — FROMMANN, *Virch.*, 31, 1864, p. 151. — HU (C. H.), *Proc. exp.*, 29, 1931, p. 258. — LIESEGANG (R. E.), *Z. wiss. M.*, 31, 1914. — LLOYD (F. E.), *Flora*, 18, 1925, p. 369. — MACALLUM (A. B.), *J. Physiol.*, 32, 1905, p. 95; *Erg. Physiol.*, 7, 1908, p. 590; *Abd. Bio.*, V, 2, 1912, p. 1099. — MACALLUM et MENTEN (T. L.), *Proc. Roy.*, 77, 1906, p. 181. — MOELGAARD (H.), *An. H.*, 43, 1911, p. 503. — MITAMURA (T.), *Zbl. Path.*, 33, 1923, p. 593. — PFUHL (W.), *Z. Zellf.*, 13, 1931, p. 783. — PRENANT (A.), *Rev. gén. Sciences*, 32, 1921, p. 581; *Jl. Anat. et Physiol.*, 56, 1912, p. 343. — PRZESMICKI, *Sitzber. Gesell. f. Morph. und Physiol.*, 1899. — SCHULTZ-BRAUNS (O.), *Virch.*, 273, 1929, p. 1; *Zbl. Path.*, 50, 1931, p. 273; *Klin. W.*, 10, 1931, p. 113; *Z. wiss. M.*, 48, p. 161; *Zbl. Path.*, 54, 1932, p. 215. — SKRAUP (S.), *B. d. chem. Ges.*, 49, 1916, p. 2142. — TCHEOU TAI CHUIN, *Biol.*, 103, 1930, p. 871. — VOGT (W. A.), *Entw. Mech.*, 106, 1925, p. 542.

---

## CHAPITRE III.

### LES CONDITIONS D'EXACTITUDE DE L'ANALYSE HISTOCHIMIQUE : 2. CONDITIONS CHIMIQUES. HISTOCHIMIE ET ANALYSE CHROMATIQUE.

---

Les conditions morphologiques de l'analyse histo chimique ayant été définies dans le précédent chapitre, il nous reste à en examiner les conditions chimiques.

La condition fondamentale que l'on doit exiger à ce point de vue d'une méthode histo chimique, c'est qu'elle soit une méthode chimique. Vérité de La Palisse, en apparence, mais trop souvent méconnue!

Quoique EHRLICH, MANN, PRENANT, POLICARD, PARAT et d'autres aient déjà insisté sur ce sujet, il nous paraît bon d'y revenir, afin de prévenir de fâcheux malentendus.

L'Histo chimie, ne constituant en somme qu'une application très spéciale de la Chimie analytique, doit avoir recours aux méthodes mêmes de celle-ci, convenablement adaptées aux conditions spéciales de l'étude microscopique des objets.

L'identification de la substance s'effectuera donc, comme on le ferait en Chimie analytique qualitative, soit par la détermination de constantes physiques caractéristiques — solubilité dans les différents solvants, action sur la lumière polarisée, fluorescence, absorption sélective du spectre, etc. — soit par la recherche de réactions chimiques spécifiques. Dans les deux cas, la méthode à utiliser sera calquée sur celle que l'on emploie dans le domaine macroscopique, et la différence portera plus sur les modalités que sur le principe. Les réactions histo chimiques doivent donc pouvoir être reproduites *in vitro*, dans des tubes à essai et être ou pouvoir être exprimées par des équations chimiques.

Or, les méthodes histologiques normales qui ont été parfois considérées comme pouvant être utilisées en Histo chimie ne répondent pas à ces conditions.

Dans cet ordre d'idées, il importe de ne pas confondre l'*Histochimie* et l'*Analyse chromatique*.

On sait quelle place importante tiennent dans la technique micrographique moderne les méthodes de colorations histologiques et les méthodes d'imprégnation par les sels d'argent ou d'or. En utilisant les affinités inégales des éléments cellulaires ou tissulaires pour des colorants ou des sels métalliques, on parvient à les différencier mieux qu'on ne pourrait le faire par aucune autre méthode. Ainsi, l'emploi de colorants appropriés permet de procéder à une véritable *Analyse chromatique* de la matière organisée. Méthode combien précieuse, puisqu'elle est à la base même de l'immense majorité des travaux morphologiques actuels, combien féconde, puisque son introduction a été cause du merveilleux essor de la Cytologie et de l'Histologie modernes!

Il s'en faut de beaucoup cependant que l'on soit fixé sur la signification de cette *Analyse chromatique*. Nous voyons des structures se colorer différemment par différents colorants et nous en concluons — à juste titre — qu'elles diffèrent; nous voyons leur colorabilité varier, et nous en concluons qu'elles varient. Mais que représentent ces différences, que représentent ces variations? C'est ce que nous sommes bien empêchés de dire, car nous ignorons quels sont exactement les mécanismes qui commandent les affinités chromatiques ou les affinités pour les sels métalliques. Depuis quarante ans, on s'évertue à résoudre le problème des colorations histologiques, sans pouvoir aboutir à des conclusions fermes et à une théorie groupant rationnellement tous les faits observés. Ce n'est pas ici le lieu de discuter ces théories — on les trouvera exposées dans les revues générales de EISENBERG, G. HERTWIG, v. MÖLLENDORFF, LISON; on se contentera de dire qu'on ne sait pas encore au juste pourquoi tel élément « prend » un colorant et tel autre ne le prend pas.

L'*Analyse chromatique*, méthode merveilleuse pour *différencier* les structures des êtres vivants, ne permet pas de les *définir* chimiquement. *Ce n'est pas une méthode histochimique.*

Nous ne pourrions mieux exprimer la distinction entre l'*Analyse chromatique* et l'*Histochimie* que ne l'a fait A. PRENANT dans une page magistrale.

« Tout procédé de technique histologique qui n'aboutit pas à donner un nom chimique précis à un constituant des tissus doit être rayé de la catégorie des opérations chimiques. Les plus fidèles procédés et les plus

couramment employés de cette technique, les méthodes de coloration au moyen de laques ferrique, chromique, vanadique d'hématoxyline, le procédé photographique au nitrate d'argent réduit, et tant d'autres, bien que la réaction colorée soit raisonnée, ne sont cependant pas des méthodes microchimiques, parce que nous ne connaissons pas le rôle chimique que joue dans la réaction l'élément histologique qu'on se propose de mettre en évidence et, par conséquent, nous ignorons ce qu'il est chimiquement. Ainsi, ne faut-il pas s'étonner que le plus souvent, malgré leur éléction très grande pour certains éléments et certains tissus, ces méthodes ne soient pas spécifiques et ne représentent en somme que des réactions banales. On sait, par exemple, que la méthode de l'hématoxyline au fer de Benda et Heidenhain colore une foule d'éléments et d'organites cellulaires qui ont peut-être un fonds commun de constitution chimique mais qui diffèrent certainement entre eux chimiquement autant qu'ils sont morphologiquement dissemblables.

» On ne peut même élever au rang de réactions microchimiques les colorations électives que prend une substance à l'exclusion de toutes les autres et qui permettent de la distinguer de celles-ci. Les méthodes de coloration des fibres collagènes, des fibres élastiques sont moins que de la Microchimie.

» En jetant un coup d'œil sur les procédés en usage pour la coloration des fibres collagènes et comparant ces procédés les uns aux autres, nous pourrions nous rendre compte de ce qui leur fait défaut pour être des réactions microchimiques vraies. Des méthodes cependant très différenciatrices et très précieuses pour déceler les moindres traces de substance collagène, la méthode de VAN GIESON (hématoxyline, acide picrique et fuchsine acide) la mienne (éosine, hématoxyline ferrique, vert Lumière), manquent de toutes les qualités théoriquement requises : elles sont purement empiriques.... Mais même l'emploi comparatif et méthodique qu'a fait UNNA de teintures variées propres à colorer la substance collagène n'est pas une opération microchimique. Car, bien que l'auteur différencie le collagène du protoplasma par la méthode Säurefuchsin-orange; de la substance musculaire lisse par la méthode Wasserblau-orcein; de l'élastine par la méthode Säurefuchsin-orcein, malgré ces différenciations successives, la matière collagène n'est pas encore caractérisée; ces procédés tinctoriaux, même réunis, ne sont pas une réaction microchimique de la matière collagène.

» Nous voulons donc proscrire sévèrement de la liste des réactions microchimiques toutes les méthodes et techniques qui ne peuvent être expliquées et qui ne mènent pas à la diagnose d'un corps chimique précis existant dans les tissus. »

Il en résulte donc que l'immense majorité des méthodes de coloration histologique et d'imprégnation métallique, restées inexplicées ou en tout cas discutées, ne peuvent valoir comme méthodes histochimiques. Ne sont utilisables que quelques rares méthodes employant des colorants (colorants pour lipides, Soudan, Scharlach, Noir soudane B, Bleu B.Z.L.) ou des sels métalliques (réaction argentaffine), dont le mécanisme est entièrement élucidé et dont la valeur signalétique est indiscutable.

La nécessité de ne considérer comme histochimiques que des réactions sûres au point de vue analytique est généralement reconnue par les auteurs français et anglais. Les auteurs allemands se montrent beaucoup moins sévères en général et certains continuent à confondre Analyse chromatique et Histochemie. Par exemple, le livre de UNNA, *Histochemie der Haut*, élève assurément l'analyse des tissus au moyen des méthodes de coloration à un degré de finesse et de subtilité qui n'a guère été dépassé, mais il ne renferme pas un mot d'Histochemie véritable. Tous les éléments différenciés par les techniques de coloration de UNNA ne peuvent être définis au point de vue chimique. De même, la grosse monographie de BIEDERMANN, *Histochemie der quergestreiften Muskelfasern*, ne renferme, à peu de chose près, que des données d'ordre descriptif pur et ne définit rien de la Chimie microscopique du muscle.

Ayant ainsi précisé la distinction nécessaire entre l'Histochemie et l'Analyse chromatique, il nous reste à étudier les conditions que doit remplir une réaction chimique pour pouvoir être utilisée en Histochemie. Il s'en faut en effet, et de beaucoup, que toute réaction utilisable en Microchimie le soit aussi en Histochemie. Les conditions spéciales nécessitées par les techniques histologiques rendent souvent impossible l'application histochimique de méthodes microchimiques éprouvées. Comme le dit POLICARD, les bonnes techniques histochimiques sont rares, parce que le problème est en fait d'une extrême difficulté.

On doit exiger d'une réaction histochimique — outre les conditions définies dans le chapitre précédent concernant le respect de l'intégrité

morphologique des tissus — qu'elle soit sensible, qu'elle soit spécifique et qu'elle soit sûre.

En premier lieu, la réaction doit être d'une extrême sensibilité. Les quantités de substance présentes dans une coupe histologique sont en effet extrêmement réduites, tant en valeur absolue — c'est-à-dire en masse pondérale — qu'en valeur relative, c'est-à-dire en concentration, en pourcentage par rapport aux autres éléments cellulaires. Il est donc évident qu'on devra toujours avoir recours à des réactions d'une très grande sensibilité. On discutera plus loin les limites que cette condition apporte à l'Histochimie actuelle.

La réaction doit être spécifique. Une réaction histochimique digne de ce nom doit caractériser chimiquement la substance ou le groupe de substances recherché avec certitude. Elle ne peut laisser d'équivoque. Une réaction destinée à mettre en évidence tel individu chimique ne doit fournir de résultat positif que pour la substance recherchée, à l'exclusion de toute autre. Cette condition est essentielle en Histochimie si l'on veut que les résultats obtenus aient une valeur définitive et puissent servir de base stable à des interprétations d'ordre biologique général. Si la réaction n'est pas spécifique, si l'identification de la substance mise en évidence n'est pas rigoureusement certaine, c'est la porte ouverte à des confusions sans fin. Combien d'auteurs n'avons-nous pas vu essayer de déceler des substances par des méthodes sans aucune spécificité, en décrire minutieusement la localisation là où il y avait en réalité d'autres substances, quelquefois même les trouver dans des tissus ou des cellules où l'on a pu prouver qu'elles n'existent pas, et tirer de tout cela des déductions physiologiques qu'avec la meilleure volonté du monde on ne peut que qualifier de fantaisie. On verra, en parcourant les pages de ce livre consacrées à l'Histochimie spéciale, combien peu de réactions sont pleinement satisfaisantes à ce point de vue. Aussi, insistons-nous sur la nécessité de contrôler minutieusement les réactions proposées et nous attacherons-nous tout spécialement à la discussion de leur spécificité.

Il y a des cas où l'on peut faire usage de réactions dont la spécificité est douteuse, par exemple lorsque l'on recherche dans l'organisme des substances étrangères au métabolisme normal, qu'on y a introduites artificiellement. Dans ce cas, en effet, il suffira d'avoir recours à un témoin normal pour s'assurer de l'absence chez celui-ci de la substance recherchée. Ainsi, on pourra mettre en évidence les sels de mercure injectés à un



animal, en se basant sur la formation d'un sulfure noir par l'action d'un sulfure alcalin. La réaction n'est pas spécifique, car le fer donne le même résultat. Il suffit d'avoir des pièces de contrôle dans lesquelles la recherche du fer sera effectuée, pour supprimer toute équivoque.

Lorsqu'on ne dispose pas de réaction spécifique d'une substance, on peut quelquefois atteindre à une certitude en se servant du recouplement de plusieurs réactions. Cette manière de procéder est parfaitement légitime, à condition qu'il s'agisse de réactions dont le domaine de spécificité est différent. L'emploi de réactions en apparence différentes, mais en réalité basées sur un même principe et dont la signification est exactement pareille, ne peut que mener à de grosses erreurs. Ainsi, on veut rechercher le phosphate de calcium; que l'on ne croie pas pouvoir conclure avec certitude en se servant du recouplement de la méthode de MACALLUM (au sulfure de plomb) par les méthodes de ROEHDE. Ces méthodes, qui ne sont pas spécifiques du phosphate de calcium, paraissent au premier abord fort différentes. Un examen plus approfondi montre que ces deux réactions sont données par la substance fondamentale de l'os, et qu'elles se ramènent en réalité à une imprégnation par un métal lourd. Leur signification est à peu près équivalente et leur concordance ne montre que les affinités de la substance fondamentale de l'os pour les métaux lourds, et non pas la présence du phosphate de calcium.

Enfin, nous devons parler d'une source d'erreur importante, qui se rencontre fréquemment. Certaines réactions sont en théorie parfaitement spécifiques, au point de vue chimique pur elles apparaissent très logiquement combinées, et pourtant, en Histo chimie, elles donnent ou peuvent donner des résultats absolument faux. Nous voulons parler des *réactions indirectes*; dans celles-ci, l'intervention de facteurs physico-chimiques vient fausser l'application de raisonnements trop exclusivement chimiques. Voici en quoi consiste cette erreur, trop souvent négligée par beaucoup d'auteurs et sur laquelle il est bon d'insister fortement.

Dans certaines réactions, on met en évidence la substance recherchée en faisant agir un réactif donné; il y a formation d'un produit de réaction caractéristique, immédiatement identifiable. Nous parlons dans ce cas d'une *réaction directe*. Ainsi, pour mettre en évidence l'ion ferrique, on fait agir un ferrocyanure alcalin et il y a formation de bleu de Prusse, immédiatement reconnaissable à sa belle couleur bleu foncé.

Dans d'autres cas, on fait agir un réactif qui donne naissance à un

produit de réaction non identifiable immédiatement; ce produit de réaction, on le met alors en évidence secondairement en faisant agir sur lui un réactif convenable. Ainsi LILIENTFELD et MONTI, pour mettre en évidence le phosphore, transforment celui-ci en phosphomolybdate d'ammonium très peu soluble, par l'action du molybdate d'ammonium. Le phosphomolybdate n'est pas identifiable immédiatement sur une coupe histologique. Aussi, pour le faire apparaître, les auteurs, après avoir lavé soigneusement pour éliminer toute trace du réactif, traitent-ils par un réducteur. Il se forme de l'oxyde de molybdène bleu. Comme on le voit, la dernière réaction utilisée est en réalité une réaction du molybdène et le phosphore n'est mis en évidence qu'indirectement, par la formation intermédiaire de phosphomolybdate. De telles méthodes sont utilisées couramment en Analyse chimique; elles sont bonnes parce qu'on peut éliminer entièrement, par des traitements convenables, toute trace de molybdate d'ammonium en excès. Mais, en Histologie, il n'en est pas ainsi. On travaille, non pas sur des substances isolables dans des tubes à essai, mais sur des constituants cellulaires. Des propriétés physico-chimiques de celles-ci, on ne peut faire abstraction. Or, les phénomènes d'adsorption qui se présentent à leur niveau viennent troubler profondément les réactions indirectes. En effet, les protides tissulaires sont capables d'adsorber et de retenir énergiquement un nombre considérable de substances, parmi lesquelles on doit citer les métaux lourds. Lorsqu'on a traité une coupe par du molybdate d'ammonium, celui-ci se fixe énergiquement au niveau de certains éléments cellulaires et les lavages les plus soignés et les plus prolongés ne parviennent pas à les en débarrasser. Un lavage qui dure des mois ne parvient pas à l'enlever complètement du collagène (MACALLUM). Dans la réaction de LILIENTFELD et MONTI, le molybdate adsorbé par les colloïdes des tissus, et *qu'on ne peut pas enlever*, interfère fatalement avec le phosphomolybdate effectivement formé et la réaction doit être considérée comme sans valeur histochimique.

Toutes les réactions indirectes où il est fait usage de métaux lourds, qu'on met secondairement en évidence par un réactif approprié, sont passibles des mêmes critiques, et l'on est toujours obligé de formuler les plus expresses réserves à leur sujet.

Une mention toute spéciale doit être accordée ici aux réactions histo-chimiques où l'on utilise des sels d'argent. Les méthodes histo-chimiques argentiques sont très nombreuses et il importe de ne pas s'illusionner

sur leur valeur signalétique. On doit distinguer très soigneusement, ainsi que l'indique CORDIER, entre deux grands groupes de réactions argentiques.

Dans le premier, on doit ranger les réactions où l'on traite la préparation par un sel d'argent, *sans l'intervention d'aucun agent réducteur*, physique ou chimique, appliqué soit avant, soit après le traitement à l'argent. Dans ce cas, l'apparition d'un précipité noir d'argent métallique est le signe d'une réaction chimique définie : la réduction du sel d'argent par une substance présente dans le tissu étudié. De telles réactions de réduction d'un sel d'argent par les éléments mêmes d'un tissu sont relativement rares. A l'époque où CORDIER écrivait, on n'en connaissait qu'une : la *réaction argentaffine* dans laquelle les éléments réducteurs réduisent le nitrate d'argent ammoniacal en un temps de quelques heures. A l'heure actuelle, on en connaît une autre : c'est la réaction décrite tout récemment par GIROUD et LEBLOND comme caractéristique de la vitamine C ; ici, il s'agit de la réduction instantanée de nitrate d'argent neutre ou acide. Les réactions qui appartiennent à ce groupe ont une valeur histochimique incontestable. Ce sont en effet, d'après la classification adoptée plus haut, des réactions histochimiques *directes* : le sel d'argent est le réactif mettant en évidence le caractère réducteur d'une substance, dans les conditions où la réaction est effectuée.

Dans le second groupe, au contraire, on doit comprendre les réactions argentiques du type indirect. Toutes ces réactions se ressemblent extrêmement. On traite d'abord par un sel d'argent, puis par un agent réducteur, soit la lumière, soit un réducteur chimique. Beaucoup de ces méthodes sont données comme méthodes d'imprégnation argentique et n'ont pas de prétentions histochimiques. Ce sont les très nombreuses méthodes utilisées de façon si courante dans l'étude histologique du tissu nerveux et du tissu conjonctif ; méthodes de CAJAL, de BIELCHOWSKY, d'ACHUCARRO, etc. D'autres sont proposées dans le but de mettre en évidence des composés chimiques définis : chlorures, phosphates, dérivés puriques. Toujours, il s'agit d'obtenir un précipité argentique insoluble, chlorure, phosphate, urate et, après lavage à l'eau, de réduire ce sel d'argent en argent métallique par l'action réducteur chimique, d'un révélateur photographique ou autre. L'objection capitale qu'on peut opposer à toutes ces méthodes est celle qui est commune à toutes les réactions histochimiques indirectes. Peut-on espérer, par un lavage de quelques heures, enlever toute trace du sel argentique qui imprègne le tissu ? On

peut en douter, étant donnés les phénomènes d'adsorption énergétique que présentent les éléments d'une coupe histologique. Qu'on se rappelle la ténacité avec laquelle une coupe retient les colorations histologiques, c'est-à-dire, en somme, les colorants adsorbés au niveau des structures cellulaires.

De plus, on doit bien avouer que ces réactions se ressemblent trop entre elles et ressemblent trop à certaines méthodes d'imprégnation argentine pour qu'on puisse leur attribuer une valeur spécifique aussi absolue que celle que leurs auteurs leur attribuent. Ainsi, la méthode de KOSSA pour la détection du phosphate de calcium est identique à une méthode de HOLLANDE qui met en évidence les urates. La méthode récemment proposée par GOHS pour la recherche du calcium pourrait tout aussi bien s'appeler méthode de CAJAL, mais alors elle mettrait en évidence l'appareil réticulaire interne de GOLGI. Les méthodes de LESCHKE, MACALLUM, MACDONALD, GROEBBELS, pour la recherche des chlorures peuvent s'appeler méthodes de DECKHUYSEN, de BERGH, et alors imprègnent les limites cellulaires. La méthode de CIACCIO pour les purines est à peu de chose près identique à une méthode de HOYER qui imprègne les fibres nerveuses. Et ainsi de suite. On est donc bien loin d'avoir affaire à des réactions spécifiques. Elles ne sont spécifiques que sur le papier, lorsqu'on raisonne en chimiste, en faisant ainsi abstraction de toute considération physico-chimique. Un chimiste ne considère que des corps purs et vous dira par exemple que, parmi les sels d'argent, seuls les chlorure, bromure et iodure noircissent à la lumière, en solution nitrique. Cela est exact, mais, en présence d'impuretés organiques, à peu près tous les dérivés argentiques sont capables d'être réduits dans les mêmes conditions. Une méthode de recherche histochimique des chlorures, se basant sur la photosensibilité de ceux-ci, manque donc en réalité de toute spécificité.

En conclusion, il faut se montrer extrêmement défiant envers les réactions argentiques de type indirect : on ne peut guère les considérer que comme des méthodes complémentaires, permettant tout juste de confirmer les données obtenues par d'autres méthodes. Mais les utiliser de confiance comme méthode de détection histochimique signalétique de telle ou telle substance, c'est s'exposer à de graves erreurs.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

BERGH, *An. H.*, 1899. — CIACCIO (C.), *An. A.*, 33, 1908. — CORDIER (R.), *Bull. Hist.*, 4, 1927, p. 161. — DECKHUYSEN, *An. A.*, 1899. — EHRLICH (P.), *Enzyklopädie der Mikr. Technik*, 1903 (Berlin-Wien, Urban et Schwarzenberg). — EISENBERG, article *Färbungen* in *Enzykl. d. mikr. Techn.*, III Aufl. 1926 (Berlin-Wien, Urban et Schwarzenberg). — GIROUD et LEBLOND, *Biol.*, 115, 1934. — GÖHS (W.), *Zbl. Path.*, 28, 1933, p. 273. — GROEBBELS, *Pflüger*, 193, 1922, p. 128. — HERTWIG (G.), *Die mikr.-anat. Unters. Meth.*, in *V. Möllendorff Handbuch d. mikr. Anat. d. Mensch.*, I, 1929 (Berlin, Springer). — HOLLANDE (A. Ch.), *Bull. Hist.*, 8, 1931, p. 176. — HOYER (H.), *A. mikr. Anat.*, 1876. — VON KOSSA, *Ziegler*, 29, 1901, p. 163. — LESCHKE (E.), *Z. klin. M.*, 81, 1915, p. 14. — LILIENFELD et MONTI, *Lincei*, 1, V, 1892; *Hoppe-S.*, 17, 1893; *Z. wiss. M.*, 9, 1893, p. 3. — LISON (L.), *Ann. et Bull. Soc. Roy. Sc. Med. Nat. Bruxelles*, 34, 1933. — MANN, *Physiological Histology. Methods and theory* (Oxford, 1902). — VON MÖLLENDORFF (W.), *Erg. An.*, 25, 1924, p. 1. — PARAT (M.), *Biol. Rev.*, 2, 1927, p. 285. — POLICARD (A.), *Ass. Anat.*, 8, 1933, p. 1. — PRENANT (A.), *Jl. Anat. Physiol.*, 56, 1912, p. 343.

## CHAPITRE IV.

### POSSIBILITÉS ET LIMITES DE L'HISTOCHIMIE.

---

Les considérations qui ont été développées dans les deux chapitres précédents au sujet des conditions d'exactitude des analyses histo-chimiques nous permettront de mieux délimiter les possibilités et les bornes de l'Histochimie, tout au moins dans l'état actuel de son développement.

En tout premier lieu, il y a des domaines qui ne sont pas encore accessibles à l'Analyse histo-chimique et dans lesquels les tentatives effectuées jusqu'ici, quoique nombreuses, doivent être classées comme infructueuses. Il s'agit de la recherche histo-chimique des substances existant dans les milieux tissulaires à l'état dissous, lorsqu'elles n'y existent point en liaison avec des éléments figurés des cellules. Nous avons vu en effet que, dans ces cas, la substance peut bien être mise en évidence par des réactifs appropriés, mais qu'on n'est jamais certain de la rigoureuse exactitude de sa localisation histologique. L'expérience ne répond point aux conditions morphologiques exigées pour une Analyse histo-chimique exacte.

L'erreur est évidemment d'autant plus marquée que la diffusibilité de la substance envisagée est plus grande. Elle est donc maximum pour les substances cristalloïdes de poids moléculaire bas et de haute diffusibilité; alors, l'Analyse histo-chimique ne pourra pas être effectuée, même de façon grossière et approchée. C'est le cas, par exemple, pour les chlorures, bromures, iodures, sulfates, phosphates solubles et pour l'urée. La diffusibilité de ces corps est telle qu'il ne faut pas songer à les précipiter *in situ*. — D'autres substances dissoutes, de poids moléculaire plus élevé et de diffusibilité moins grande, pourront être recherchées avec une approximation suffisante, pourvu que l'on s'entoure de garanties convenables et que les résultats soient passés au crible d'une critique impartiale, mais sévère. C'est le cas, par exemple, pour la détection histo-chimique de beaucoup de sels de métaux lourds, sels de fer, de plomb, etc., pour les ferrocyanures et pour certaines

substances organiques à molécule suffisamment grosse, comme l'urate de pipérazine. Et encore, beaucoup de prudence est-elle nécessaire, car malgré tout il existe des cas limites où l'on éprouve les plus grandes difficultés à se rendre compte si, oui ou non, il y a eu déplacement de substance lors de la fixation. Enfin, lorsque les substances sont colloïdales, leur fixation pourra généralement être effectuée de façon satisfaisante; c'est le cas, par exemple, pour le glycogène.

Lorsque la substance, quoique soluble, existe dans les tissus en liaison avec un élément figuré des cellules, ou lorsqu'elle existe elle-même à l'état figuré, il devient le plus souvent très aisé de satisfaire aux conditions morphologiques de l'Analyse histochimique, et la mise en évidence de la substance étudiée ne dépend plus que des réactions chimiques utilisées.

Nous avons dit plus haut que ces réactions devaient être sensibles et spécifiques. Ici, nous ne discuterons pas les limites apportées à l'Histo-chimie par le fait que les réactions proposées ne se montrent pas suffisamment spécifiques. Il s'agit, en effet, de cas d'espèces, et il est difficile de discuter la question en général. Contentons-nous de dire que si le nombre de réactions réellement parfaites à cet égard est assez restreint à l'heure actuelle, nous avons la ferme conviction que de gros progrès pourront être encore accomplis dans l'avenir. La Chimie analytique s'enrichit constamment par l'introduction de réactions nouvelles, et il en est certainement parmi elles qui seront applicables à l'Histo-chimie.

Reste alors la question de la sensibilité des réactions. C'est là un problème d'une très grande importance, car, au fond, c'est de lui que dépend en grande partie l'avenir de l'Histo-chimie.

Certes, on dispose actuellement en Chimie analytique de réactions extrêmement sensibles pour certaines substances. Mais le sont-elles assez pour qu'on en puisse déceler des quantités aussi extraordinairement réduites que celles qu'on trouve dans une cellule? Peut-on espérer que ces réactions permettront de suivre les aspects de son métabolisme au sein même des tissus?

On a quelquefois été fort pessimiste à cet égard et annoncé que la détection d'une substance donnée, non seulement n'a pas été réalisée jusqu'ici, mais n'est même pas réalisable parce que les quantités de cette substance qui pourraient se trouver dans une cellule sont trop faibles pour pouvoir être décelées. C'est pour cette raison, par exemple, que POLICARD et

LEULIER ont nié la possibilité de mise en évidence du phosphore dans les cellules par des méthodes histochimiques.

Pour approfondir cette question, nous devons tout d'abord rappeler quelques notions introduites par les microchimistes. Les microchimistes allemands appellent *Erfassungsgrenze*, ou limite théorique de sensibilité d'une réaction, la plus petite quantité absolue d'une substance que la réaction est capable de déceler. Cette quantité s'évalue généralement en microgrammes ( $\mu$ ), valant un millième de milligramme et correspondant donc dans l'échelle des poids au  $\mu$  dans l'échelle des longueurs. Ils appellent *Empfindlichkeitsgrenze* de la réaction, ou limite pratique de sensibilité, la concentration minimum à laquelle la substance est décelable en solution; on exprime généralement cette limite en disant en combien de parties de solvant une partie de substance est encore décelable (1 : 10 000; 1 : 100 000, etc.).

Des histochimistes, surtout parmi ceux qui s'occupent de l'Histochemie végétale, ont voulu transposer dans le domaine de l'Histochemie les notions de sensibilité déterminées par les microchimistes et arrivent ainsi à des conclusions fort peu encourageantes, comme on va le voir.

Les limites théoriques de sensibilité des réactions microchimiques les plus sensibles que l'on connaisse oscillent entre 10  $\gamma$  et 1/100<sup>e</sup> de  $\gamma$ ; or, on peut démontrer assez facilement que les quantités de substances qui sont présentes dans les cellules — abstraction faite des gros amas de réserve — doivent osciller entre 1/100<sup>e</sup> et 1/1 000 000<sup>e</sup> de  $\gamma$  (BRUNSWICK). Prenons un exemple, tel qu'il est cité par KLEIN, d'après MAYRHOFER : « ..., le fer, en tant qu'agissant par action catalytique de surface, doit être impossible à déceler histochimiquement. Dans la littérature, on donne, en effet, comme limite de sensibilité théorique des réactions 0,002  $\gamma$  de fer. Supposons le cas le plus simple, une cellule cubique de 30  $\mu$  de côté, ayant donc un volume d'environ 30 000  $\mu^3$ . La densité du protoplasme étant supposée égale à 1, le poids total de la cellule est donc 0,03  $\gamma$ . Donc, la quantité de fer qui devrait se trouver dans la cellule étant égale à 0,002  $\gamma$ , ce fer devrait y exister à une concentration d'environ 10 pour 100, ou bien il devrait y avoir des complexes cellulaires suffisamment gros pour atteindre cette limite de la sensibilité. Or, en fait, le fer n'existe dans les cellules qu'à un taux de 0,005 à 0,01 pour 100. »

GICKLHORN s'est déjà élevé contre cette manière de voir. « De tels calculs sont certainement instructifs du point de vue du chimiste, mais



pour le biologiste ils ne sont guère probants, car ils se rapportent à de tout autres conditions. En effet : 1° dans les substrats biologiques, les champs de réactions microchimiques sont inhomogènes, et accepter l'existence d'éléments cellulaires homogènes comme une simplification favorable est illusoire; 2° la condition essentielle de tels raisonnements, c'est-à-dire la répartition diffuse d'une substance donnée, n'est pas réalisée; 3° les limites de sensibilité données dans la littérature, et qui valent pour des milieux de réactions homogènes, ne peuvent constituer des étalons pour les réactions dans des substrats structurés; au contraire, dans ce cas, ces derniers sont à déterminer. » Les considérations énoncées par GICKLHORN sont à coup sûr exactes : il est faux de considérer qu'une quantité donnée d'une substance, telle qu'on peut la déterminer par une analyse microchimique forcément globale, se trouve répartie de façon uniforme. L'histologiste sait, au contraire, que cette quantité se trouve souvent concentrée au niveau de certains organites de la cellule. Mais, à ces considérations de l'auteur allemand, on peut en ajouter d'autres, dont la portée nous paraît beaucoup plus considérable.

Les auteurs qui se sont occupés des limites de l'Histochemie se basent sur les chiffres de sensibilité théorique maximum fournis par les microchimistes. Cette façon de procéder constitue une erreur. Les données établies par les microchimistes sont valables uniquement pour les conditions dans lesquelles ils travaillent. Il est évident que la sensibilité d'une réaction dépend énormément des conditions dans lesquelles elle s'effectue. Lorsque la microchimie n'était pas née et que les chimistes effectuaient leurs réactions dans des tubes à essai de dimensions courantes, la sensibilité de la réaction du bleu de Prusse dans la recherche du fer n'allait guère plus loin que 0<sup>mg</sup>,02. Par l'emploi du microscope et en opérant sur des microgouttes de 1<sup>mm</sup><sup>3</sup>, les microchimistes sont arrivés à pousser la sensibilité de cette réaction jusqu'à la limite de 0,002  $\gamma$ ; ainsi, l'emploi de modalités techniques appropriées a permis de multiplier la sensibilité de la réaction initiale par 10 000. Mais ce n'est pas tout : les conditions dans lesquelles opère l'histochemiste sont telles que la réaction du bleu de Prusse est chez lui encore beaucoup plus sensible que chez le microchimiste.

Prenons un exemple concret. Il n'est pas difficile pour un histologiste de reconnaître dans une coupe une granulation de bleu de Prusse de 1  $\mu$ . de diamètre. Cette granulation, supposée sphérique, a un volume

égal à  $0,5 \mu^3$  approximativement, ou bien  $0,5 \times 10^{12}$  centimètres cubes. Si nous supposons que la densité du bleu de Prusse est égale à 2 (chiffre un peu arbitraire, mais qui ne doit pas être très loin de la vérité), le poids de cette granulation sera de  $1 \times 10^{12}$  grammes; soit  $1 \times 10^6 \gamma$ .

Or, lorsqu'on fait agir du ferrocyanure de potassium sur le composé ferrique à mettre en évidence, le poids de bleu de Prusse  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}\text{Fe}^{4+}$  (poids moléculaire 872) qui se forme est environ quatre fois plus grand que celui du fer contenu dans le composé initial ( $4 \text{ Fe} = 224$ ). Par conséquent, la plus petite quantité de fer décelable histochimiquement par la méthode au bleu de Prusse n'est pas inférieure à  $2,5 \times 10^{-7} \gamma$ . La réaction histochimique du fer se révèle donc 10 000 fois plus sensible que la même réaction effectuée par un microchimiste, et l'on se trouve dans l'ordre de sensibilité réclamé par BRUNSWICK, pour que les réactions histochimiques puissent être utilisées avec fruit.

Les limites de sensibilité des réactions histochimiques sont donc, en valeur absolue, comprises dans des limites extraordinairement basses et les conclusions pessimistes de certains auteurs ne doivent pas être généralisées (!).

Il est curieux de remarquer que les méthodes histochimiques dépassent — et de beaucoup — en sensibilité l'une des méthodes analytiques considérées comme les plus sensibles : l'Analyse spectrale. La sensibilité de celle-ci est unanimement considérée comme formidable, « légendaire », comme dit URBAIN. Or, ses limites normales oscillent entre 0,1 à 0,01  $\gamma$  de substance. La réaction histochimique du fer est environ 50 000 fois plus sensible!

Le problème des possibilités de l'Histochimie doit être en réalité posé tout différemment qu'il ne l'a été. Il existe bien, nous l'avons montré, des réactions suffisamment sensibles pour pouvoir déceler les quantités formidablement réduites de substance qui existent dans les cellules. Ceci est vrai quand on considère les valeurs absolues de ces quantités; si l'on nous permet d'employer dans ce domaine la terminologie allemande, telle qu'elle a été définie plus haut, nous dirons que l'*Erfassungsgrenze* des réactions histochimiques est satisfaisante. En revanche, nous manquons

---

(<sup>1</sup>) POLICARD (*Bull. Hist.*, 11, mai 1934, p. 216) observe que, par microincinération, on peut arriver à déceler  $3,75 \times 10^{-7} \gamma$  de fer, grâce à la coloration jaune des cendres. C'est encore un exemple de l'extrême sensibilité des réactions histochimiques.

réellement de données sur les limites de sensibilité relatives, c'est-à-dire leur *Empfindlichkeitsgrenze*. Une quantité de  $2,5 \times 10^{-7} \gamma$  de fer est décelable histochimiquement, comme nous l'avons vu, si elle est concentrée au niveau d'une granulation de  $1 \mu$  de diamètre. Mais le serait-elle encore si la même quantité se trouvait répandue uniformément dans un organite de  $10 \mu$  de diamètre? Il est bien possible que non. Il est bien évident que cette sensibilité relative dépend avant tout de la visibilité du bleu de Prusse, c'est-à-dire en somme de l'intensité de sa coloration.

Lorsqu'on effectue la réaction au ferrocyanure, chacun des ions ferriques présents dans la préparation réagit. Mais pour que la coloration apparaisse, dans les conditions de l'observation microscopique, il faut qu'il y ait un nombre suffisant de molécules de bleu de Prusse réunies les unes près des autres.

Exprimons cela en données numériques, et disons qu'il faudra une concentration en fer de tant de  $\gamma$  par  $\mu^3$  pour qu'apparaisse sous le microscope la teinte bleue caractéristique de la réaction. Si cette limite ne se trouve pas atteinte, on obtiendra une réaction négative, non parce qu'il n'y a rien, mais parce qu'on ne voit rien. Il serait hautement désirable d'essayer de déterminer, pour des réactions bien connues en Histochemie, ces limites relatives de sensibilité. L'histologiste peut déceler du fer dans les tissus, c'est entendu; mais il n'a aucune idée de la proportion qui s'y trouve, ni à quelle concentration il se trouve. Il y a là une grosse lacune et la solution de ce problème d'Histochemie quantitative serait certainement susceptible d'ouvrir un champ nouveau d'investigations et de permettre d'intéressantes déductions histophysiologiques.

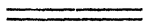
Il nous reste, pour terminer ce chapitre, à examiner dans quelle mesure les facteurs de solubilité peuvent intervenir pour limiter la sensibilité des réactions. On sait, en effet, que les réactions en Microchemie sont pratiquement limitées à cause de la solubilité du produit de réaction. Ainsi, le chlorure d'argent étant soluble à raison de 1,7 partie pour 1 million d'eau, il devient impossible de rechercher le chlore en dessous d'une concentration correspondante, soit 1 partie de chlore dans 2 380 000 parties d'eau, quelle que soit d'ailleurs la quantité absolue de liquide dont on dispose, et par conséquent la quantité totale de chlorure mise en jeu. On peut penser que le même phénomène peut se présenter en Histochemie, et que certaines réactions deviennent impossibles parce que le produit de réaction peut disparaître de la coupe par solubilisation. Il est évident que

si une coupe histologique renferme en tout quelques  $\gamma$  d'une substance, supposée même aussi peu soluble que l'est le chlorure d'argent, il suffira d'un simple lavage à l'eau pour en dissoudre une notable partie. Heureusement pour l'histo chimiste, cela n'est guère vrai qu'en théorie. En pratique des lavages même assez prolongés ne dissolvent pas dans des coupes histologiques des substances dont la solubilité est assez appréciable. Par exemple, l'acide urique est soluble dans 14 000 parties d'eau froide. Cependant, on peut laver à l'eau pendant un temps prolongé des tissus renfermant de l'acide urique sans que celui-ci disparaisse des coupes, alors que l'on a fait passer des quantités d'eau bien supérieures à celles qui seraient nécessaires pour le dissoudre. Les solubilités des substances en Histo chimie ne sont plus du tout ce qu'elles sont en Chimie macroscopique, et ce fait rend possible beaucoup de réactions qui, théoriquement, ne pourraient être appliquées.

Pour résumer ces considérations sur les possibilités et les limites de l'Histo chimie, nous dirons que celles-ci ne peuvent encore être précisées à l'heure actuelle et demandent de nouvelles recherches. Les conditions spéciales du travail histo chimique sont en effet très différentes de celles que les microchimistes sont habitués à considérer. D'une part, certaines réactions, courantes en Microchimie, ne peuvent être transposées en Histo chimie parce que les conditions morphologiques exigées par celles-ci ne sont pas remplies. D'autre part, quand les réactions sont applicables, leurs limites de sensibilité sont tout autres, tant au point de vue théorique qu'au point de vue pratique, que celles que les microchimistes ont définies. On ne peut donc transposer en Histo chimie les notions établies en Chimie analytique normale. Tout problème histo chimique doit être envisagé en lui-même, en fonction des conditions spéciales de sa réalisation.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

BRUNSWICK (B.), *Naturwiss.*, 11, 1923. — GICKLHORN (J.), *Prot.*, 2, 1927, p. 89. — MAYRHOFER (A.), *Mikrochem.*, 3, 1925. — POLICARD et LEULIER (A.), *Bull. Hist.*, 2, 1925, p. 22.



## CHAPITRE V.

### MÉTHODES GÉNÉRALES DE L'HISTOCHIMIE. L'ANALYSE HISTOCHIMIQUE PAR L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES.

En Histologie, de même qu'en Chimie analytique qualitative, l'identification d'une substance peut s'effectuer soit par la détermination de ses constantes physiques, soit par la recherche de ses réactions chimiques caractéristiques.

Les réactions chimiques des diverses substances feront l'objet de l'Histochimie spéciale.

Dans ce chapitre général, on étudiera les principales propriétés physiques qui peuvent servir en Histochimie à la recherche des substances, et l'on essaiera d'en définir la valeur signalétique.

En Histochimie animale, ces déterminations physiques sont beaucoup moins importantes qu'en Histochimie végétale. Celle-ci dispose en effet de techniques extrêmement intéressantes et précises, qu'on ne peut songer pour diverses raisons à appliquer en Histochimie animale : par exemple, les procédés de mesure des points de fusion, de micro-sublimation, la mesure des indices de réfraction, les mesures microcristallographiques (1).

En Histochimie animale, quelques méthodes physiques peuvent cependant être très utilement employées. Nous en dirons ici quelques mots.

#### I. — CARACTÈRES DE SOLUBILITÉ. LA CHROMOLYSE.

Parmi les constantes physiques les plus importantes des substances chimiques, on doit considérer leurs caractères de solubilité dans les divers solvants. La détermination de ces caractères, courante en Chimie analytique, a

---

(1) Sur ce sujet, voir TÜNMMANN et ROSENTHALER, *Pflanzenmikrochemie*, 1931 (Berlin, Borntraeger).

été proposée souvent en Histochemie en vue de l'identification des substances.

La valeur des indications ainsi fournies est très inégale. La plus grosse difficulté provient sans aucun doute du fait que la solubilité des substances, dans une coupe histologique, est très fortement influencée par l'action de différents facteurs. Les solubilités se trouvent modifiées par la présence d'impuretés : par exemple, les lipines pures sont insolubles dans l'acétone, mais en mélange avec d'autres corps gras, elles s'y dissolvent aisément. Ou bien les solubilités sont changées parce que la substance se trouve dans les préparations sous un état physique différent de celui sous lequel elle est considérée habituellement en Chimie macroscopique. C'est le cas, par exemple, pour les protides; en Biochimie, on peut les distinguer les uns des autres par leurs solubilités dans différentes solutions salines. Ces notions ne peuvent être transportées en Histochemie, car, dans les coupes, les protides ne sont certainement pas dans le même état physique que les protides étudiés par les biochimistes. Ou bien encore, la solubilité se trouve modifiée parce que la substance est adsorptivement liée à un substrat insoluble; nous avons déjà cité le cas du trypanblau, soluble dans l'eau, qui devient absolument insoluble lorsqu'il est athrocyté.

Il en résulte que seule aura une signification rigoureuse en Histochemie une mesure de solubilité effectuée sur une substance dont on est certain qu'elle est à l'état pur, et dont on connaît de façon précise l'état physique. Seules, les substances à l'état cristallin répondent pleinement à cette condition. Nécessairement, elles sont pures et leur état physique est défini. Malheureusement, les substances à l'état cristallin sont rares dans les cellules; les seules qui aient quelque importance sont des dérivés des purines : acide urique, guanine, etc. Pour ces substances, la recherche des caractères de solubilité a une valeur diagnostique indiscutable; c'est même un des moyens les plus sûrs que l'on possède actuellement pour les identifier et les différencier.

Dans tous les autres cas, les solubilités ne pourront constituer que des documents d'intérêt accessoire. Par exemple, les corps gras en général sont définis essentiellement en Biochimie par leur solubilité dans les solvants désignés sous le nom générique de solvants des corps gras; en Histochemie, il n'en est pas de même et l'on montrera plus loin que ce caractère, quoique important, n'a pas la même signification primordiale.

C'est surtout dans l'étude des protides qu'on a fait jouer un grand rôle à l'étude des caractères de solubilité. Malheureusement ces recherches,

si elles peuvent avoir un grand intérêt au point de vue structural et morphologique, n'ont qu'une signification histochimique bien mince.

Notre position à l'égard de ces méthodes est la même que celle que l'on doit avoir envers les procédés de coloration histologique; ce sont des méthodes excellentes pour différencier morphologiquement les différentes structures les unes des autres; ce sont de mauvaises techniques histo-chimiques : elles ne *définissent* pas.

L'action de différents réactifs et de solvants, dans le but de différencier les structures et les éléments tissulaires, a été mise à profit depuis très longtemps, bien avant que l'on ne parlât de colorations histologiques. On en trouve déjà les premiers germes au XVIII<sup>e</sup> siècle, dans les travaux de BICHAT. En faisant agir à des concentrations et pendant des temps convenables divers solvants : eau, alcool, éther, solutions acides, solutions alcalines, solutions de sels, sur des tissus fixés ou vivants, on peut dissoudre électivement certaines structures, tout en laissant d'autres intactes, et ainsi procéder à leur analyse. A l'heure actuelle, comme moyen d'investigation morphologique, cette méthode a presque disparu, supplantée par les techniques de coloration, beaucoup plus commodes; en revanche, certains la proposent encore comme méthode histochimique.

Un exemple typique est celui des caryologues qui, il y a une cinquantaine d'années, s'efforcèrent de définir les éléments du noyau (CARNOY, ZACHARIAS, SCHWARTZ, HEINE), et dont les recherches ont été reprises plus récemment par GROSS et PRATJE avec des résultats pas toujours très concordants. Ayant constaté des différences de solubilité entre les différents constituants du noyau : chromatine, reticulum, suc nucléaire, nucléole, membrane, ils avaient fait de chacun de ceux-ci des entités chimiques distinctes : nucléine, linine, paralinine, pyrénine, amphipyrénine, lanthanine, œdématine. Dès 1893, ZIMMERMANN faisait remarquer très justement que les résultats d'une telle méthode sont de tout autre nature que ceux que fournit l'étude chimique des substances nucléaires. Comme l'écrivait PRENANT, linine, pyrénine, etc., ne sont pas des entités chimiques; elles n'ont pas d'existence en dehors de la forme qu'elles ont dans le champ nucléaire. « Ce sont des aspects, non des substances » (POLICARD). Tous les auteurs qui se sont occupés de la question depuis lors ont reconnu que les résultats des auteurs cités sont très problématiques et que leur « Histo-chimie » du noyau est une construction purement arbitraire et théorique (voir, par exemple, MEYER, TISCHLER, G. HERTWIG).

On en dira autant de toutes les recherches effectuées par des méthodes analogues en vue d'éclaircir la constitution chimique de formations tissulaires ou cellulaires. On a ainsi étudié, dans des recherches dont la liste, trop longue, ne peut être donnée ici : la solubilité ou l'insolubilité des granulations des mastocytes, des leucocytes, des cellules de Paneth, des cellules muqueuses, des éléments des fibres musculaires striées, de formations cristalloïdes diverses, des fibres collagènes ou élastiques, des « Kitt-substanzen », etc., dans des liquides divers, solutions diluées ou concentrées, chaudes ou froides, acides (acétique, chlorhydrique, nitrique, phosphorique, etc.), alcalines (soude, potasse, ammoniacque, carbonates, etc.), salines (chlorure de sodium, sulfate de sodium, sulfate d'ammonium, etc.). Ces méthodes sont intéressantes pour effectuer des distinctions morphologiques entre diverses formations. Il est inadmissible en revanche de considérer des tests de ce genre comme des réactions histochimiques. Trop de facteurs interviennent en effet pour faire varier les caractères de solubilité et, partant, ne permettent pas de leur attribuer une valeur signalétique certaine. Le plus ou moins de résistance d'un élément cellulaire envers une solution d'acide, de base, de sel, etc. est en effet conditionné tout autant par son état physique, sa texture, son degré de cohésion, que par sa solubilité réelle. De plus, d'après WERMEL, le gonflement causé par ces réactifs sous l'action d'actions osmotiques joue certainement un rôle difficilement analysable : des structures à trame très serrée, difficilement solubles, peuvent gonfler par action osmotique, perdre leur cohésion et passer secondairement en solution. On observe en effet, dans certaines structures, qu'il n'existe pas de démarcation nette entre gonflement et passage en solution.

Par ailleurs, on peut remarquer, avec WERMEL également, que beaucoup des solubilisations obtenues par les procédés utilisés ne sont pas des réactions de solubilité pure. Ce sont plutôt des *destructions* hydrolytiques ou autres sous l'action des acides, des bases présents dans le réactif. Ce fait introduit encore des facteurs difficilement contrôlables. Enfin, les protides tissulaires sont des mélanges ou bien des combinaisons plus ou moins lâches avec d'autres substances (lipides) et, par conséquent, il est illusoire de comparer leur comportement à celui des substances que les biochimistes ont isolées et caractérisées.

On ne doit pas parler de variétés histochimiques de mucines, par exemple, ou de granulations de mastocytes, parce que, suivant l'âge ou l'espèce



animale considérée, les unes sont plus résistantes que d'autres envers certains solvants. Des variations dans leur état physique ou la présence d'impuretés peuvent causer de telles différences. On peut conclure qu'elles diffèrent, mais on ne peut pas affirmer en *quoi* elles diffèrent, pas plus qu'on ne peut affirmer qu'elles sont composées de telle ou telle substance chimiquement définie.

C'est ici le lieu de parler de la *chromolyse*. Cette méthode, imaginée par UNNA, consiste à conjoindre les techniques de solubilisation fractionnée et les colorations histologiques.

UNNA part de l'idée que les colorations histologiques sont des phénomènes purement et exclusivement chimiques. Une coloration histologique serait donc, pour UNNA, un véritable réactif, parfaitement spécifique pour des entités chimiques déterminées. Mais, de l'application immédiate de ces réactifs, on ne pourrait rien déduire. En effet, les éléments structuraux microscopiques ne sont pas des corps chimiques purs; ce sont des mélanges, et c'est pour cette raison qu'on peut souvent aussi bien colorer une même structure par des colorants appartenant à des classes opposées, comme par exemple par des colorants basiques et des colorants acides. En dissolvant électivement par des réactifs convenables certains constituants de ces mélanges, on arriverait à obtenir les autres à l'état pur, en quelque sorte; c'est alors que les caractères de solubilité acquerraient une signification chimique précise. En fait, c'est donc la solubilisation ou la non-solubilisation d'une structure qui servirait à en isoler les éléments constitutifs; les colorations histologiques serviraient en quelque sorte d'indicateur.

Mieux que de longues explications, un exemple fera saisir l'esprit de ce procédé. UNNA étudie l'épithélium à grandes cellules d'un condylome. Tout d'abord, une coupe par congélation est colorée au vert de méthyle-pyronine phéniqué (mélange de deux colorants basiques). Les membranes nucléaires, les caryosomes sont colorés en bleu vert par le vert de méthyle, les nucléoles et les cytoplasmes en rouge par la pyronine. Une deuxième coupe est placée dans l'eau distillée à la température du corps pendant 12 heures, puis colorée au vert de méthyle-pyronine. On obtient le même résultat, mais les cytoplasmes restent incolores. UNNA en conclut qu'il existe dans les cytoplasmes une albumine acide (1), soluble dans l'eau, qu'il

---

(1) Acide, parce qu'elle se colore par un colorant basique.

appelle *cytose*. Une troisième coupe est bouillie 12 heures dans une solution à 2 pour 100 de NaCl; par coloration au vert de méthyle-pyronine, les éléments nucléaires se colorent, toujours en vert, mais la pyronine ne colore plus rien. Il existerait donc dans les nucléoles un albuminoïde acide, la *globuline*. Une quatrième coupe, traitée à froid par l'acide chlorhydrique à 5 pour 100, puis par le vert de méthyle-pyronine, reste incolore. UNNA en conclut que tous les albuminoïdes acides sont dissous, y compris la *nucléine* des formations nucléaires, colorable par le vert de méthyle. Si cette dernière coupe, incolore par le vert de méthyle, est traitée par l'hémalun, on voit les caryosomes et le nucléole se colorer, tout comme si la coupe n'avait pas été traitée par l'acide chlorhydrique. Pour UNNA, il existerait dans ces formations une « couche moyenne » (*Mittelschicht*) d'une albumine basique (?!) (1), colorable par l'hémalun, la *mésoplastine*, qui n'est dissoute que par HCl à 15 pour 100. Et encore, dans ce cas, il reste à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau une couche « fondamentale » (*Grundschicht*) d'une albumine, basique cette fois, colorable par des colorants acides comme le Bordeaux.

Il n'est pas possible de donner une idée, même superficielle, des idées auxquelles UNNA aboutit en poussant à fond sa méthode.

La chromolyse a été assez peu employée en dehors de l'école de UNNA. Signalons seulement ici les travaux de SCHUMACHER et de GUTSTEIN.

Contre les conceptions de UNNA se sont élevées de grosses objections, dont les principales sont celles de VON MÖLLENDORFF. UNNA, nous l'avons déjà dit, est un partisan acharné de la théorie chimique des colorations histologiques. Le fait qu'un substrat se colore par un certain colorant est, d'après lui, un phénomène purement chimique. Si donc, après traitement par un réactif, on voit que le substrat ne se colore plus par ce même colorant, c'est que la substance qui réagissait avec le colorant a disparu, est dissoute; ce point pour UNNA est évident, *a priori*. Mais VON MÖLLENDORFF qui, dans des études remarquables, a observé que l'état physique des substrats à colorer, et particulièrement leur « densité de structure », joue un rôle très important dans le mécanisme de la coloration, objecte que le réactif a très bien pu modifier l'état physique du substrat, et plus particulièrement sa « densité de structure »; une telle modification peut parfaitement changer du tout au tout la faculté de s'unir à un colorant

---

(1) UNNA pense que l'hémalun est un colorant acide (?).

donné. Les données de UNNA, ne tenant pas compte du facteur physique des colorations, ne peuvent donc être envisagées qu'avec le plus grand scepticisme.

A ces graves objections de VON MÖLLENDORFF, auxquelles UNNA n'a pu répondre que par des faux-fuyants, nous n'ajouterons rien, si ce n'est que la combinaison de deux techniques qui n'ont rien d'histo-chimique — la recherche des protides par des dissolutions fractionnées et la méthode des colorations histologiques — ne peut fournir de données histo-chimiques.

WERMEL, dans une très intéressante étude, a d'ailleurs bien montré, par un exemple concret, que l'Histo-chimie des protides, telle que l'a construite UNNA, est bien loin de l'Histo-chimie réelle. UNNA, on l'a vu dans l'exemple cité, considère comme étant la nucléine l'élément du noyau colorable par le vert de méthyle et soluble dans l'acide chlorhydrique à 5 pour 100. Or, on possède actuellement une réaction histo-chimique très précise et très sûre des nucléines du type de l'acide thymonucléique, la réaction nucléale de FEULGEN-ROSSENBECK. En effectuant cette réaction nucléale sur des coupes traitées par H Cl à 5 pour 100 et dans lesquelles toute colorabilité par le vert de méthyle a disparu, on constate que les nucléoprotides n'ont pas été le moins du monde altérés; la réaction nucléale persiste même après action de H Cl à 25 pour 100, qui détruit la colorabilité du noyau par l'hémalum. On doit donc bien en conclure que la chromolyse de UNNA n'a pas de valeur histo-chimique. Bien entendu, on pourrait s'en servir pour des études de Morphologie pure, mais là elle ne paraît pas non plus appelée à un grand avenir.

## II. — MICROSPECTROSCOPIE. HISTOSPECTROGRAPHIE.

L'analyse spectroscopique appliquée à l'Histo-chimie peut faire l'objet de trois méthodes essentiellement différentes. Dans la première, on cherche à déterminer le *spectre d'absorption* des substances; c'est l'objet de la *Microspectroscopie*. Dans la seconde, homologue de l'Analyse spectrale, on étudie le *spectre d'émission* de la substance placée dans une étincelle électrique; c'est l'*Histospectrographie*. Une troisième application du microspectroscope à l'Histo-chimie est l'étude des spectres de fluorescence; on l'étudiera ci-dessous au chapitre de l'Histofluorescopie.

### 1. *Microspectroscopie.*

Le microspectroscope ou plus exactement l'oculaire microspectroscopique est un instrument qui, monté à la place d'un oculaire normal de microscope, permet d'étudier le spectre de la lumière provenant de la préparation. Il comprend en principe tous les organes d'un spectroscope normal : le collimateur, la fente, le prisme (ou le réseau) et l'oculaire.

Le microspectroscope, instrument très en faveur chez les microchimistes et les physiologistes, n'a reçu que très peu d'applications histochimiques. On peut comprendre ce fait, si l'on se réfère aux possibilités de l'instrument. Celui-ci permet de déterminer le spectre d'absorption de substances colorées de la préparation — avec plus ou moins d'exactitude suivant le soin apporté à sa construction et l'habileté de l'observateur. Seulement, pour que cette détermination soit possible dans une coupe histologique mince, il faut que la substance étudiée soit en assez grande quantité et qu'elle soit assez colorée; on ne doit pas compter, sauf rares exceptions, obtenir un spectre d'absorption d'une substance si elle n'apparaît pas déjà assez fortement colorée à l'examen microscopique normal. L'instrument n'est donc pas sensible : il peut servir à déterminer la nature d'une substance, mais non à la mettre en évidence dans une coupe lorsqu'elle n'y existe qu'en petite quantité.

De plus — et c'est là l'inconvénient le plus grave — il ne permet pas d'effectuer une recherche localisée; ce que l'on voit dans un microspectroscope, c'est le spectre fourni par tout un faisceau lumineux et non pas une image de l'objet. On peut rétrécir le faisceau dans certaines limites et ainsi circonscrire le champ des investigations, mais pas assez pour que l'on puisse arriver à une localisation suffisante. On peut obtenir une localisation à un tissu, rarement à une cellule, jamais à un élément cytologique.

L'étude microspectroscopique en Histochemie se trouve donc limitée à la détermination de la nature des pigments, mais non à leur mise en évidence, ni à leur localisation. Encore faut-il que ces pigments aient un spectre assez caractéristique : un spectre mal limité, sans maximum appréciable, n'a pas une signification bien grande.

Malgré ces imperfections, nous avons tenu à signaler le microspectroscope car certaines recherches assez récentes font entrevoir de nouvelles possibilités d'application. Nous faisons allusion aux belles recherches de

KEILIN sur le cytochrome et à celles de BORST et KÖNIGSDRÖFFER sur les porphyrines. Dans le livre important que ces derniers auteurs ont consacré à ce sujet, on trouvera, dans l'étude des pigments sanguins et de leurs dérivés, quelques notions intéressantes acquises grâce à l'observation des spectres d'absorption. Nous le signalons enfin, parce que, en Histo-fluoroscopie, le microspectroscope est un instrument indispensable pour l'étude des spectres de fluorescence.

Par ailleurs, le microspectroscope s'est beaucoup perfectionné dans ces derniers temps. On dispose maintenant d'instruments beaucoup plus perfectionnés que le modèle bien connu d'ABBE : ce sont, par exemple, les microspectroscopes de HARTRIDGE, de SCHUMM, de BORST et KÖNIGSDRÖFFER (STEINHEIL, constructeur), de SORBY-BROWNING (SEIBERT, constructeur). On peut donc espérer que les possibilités de la Microspectroscopie en Histo-chimie s'en trouveront élargies.

## 2. *Histospectrographie.*

Très différente de la Microspectroscopie est l'Histospectrographie, et très différentes également en sont les possibilités. « Elle consiste essentiellement à faire jaillir une étincelle électrique en un point préalablement repéré d'une coupe, à prendre un spectre de raies (spectre d'émission) de cette étincelle et à rechercher dans le spectrogramme obtenu les raies caractéristiques des divers éléments. La méthode histospectrographique peut être rangée parmi les applications de la spectrographie à l'Analyse chimique. Elle diffère par contre de l'Analyse chimique ordinaire parce qu'elle implique une localisation topographique histologique » (POLICARD).

L'Histospectrographie a été mise au point, d'une part par WALTHER et Werner GERLACH, d'autre part par POLICARD et MOREL. Les méthodes employées par ces auteurs sont quelque peu différentes, mais se ramènent au fond à un même type. Une coupe de tissu frais ou fixé est étalée sur une plaque d'une substance conductrice. Au-dessus d'un point microscopiquement repéré de cette coupe, on dispose une électrode taillée dans une substance convenable (graphite, or, platine, aluminium, etc.). Entre cette électrode et la plaque conductrice, on fait alors jaillir une étincelle de haute fréquence qui détruit la coupe au point préalablement repéré. De l'étincelle, on prend un spectrogramme; dans ce spectrogramme, on retrouve, à côté des raies de la substance de l'électrode et des raies de l'air, les raies carac-

téristiques des éléments entrant dans la constitution de la coupe. Par l'identification de ces raies, on peut donc déterminer de façon très sûre les éléments de la coupe.

L'appareillage nécessaire est assez compliqué et comprend : un appareil destiné au repérage des coupes; un dispositif d'étincelage, comprenant, outre les électrodes, un appareil de haute fréquence assez puissant; un spectrographe à équipement de quartz; enfin, un dispositif permettant l'examen et le repérage des spectrogrammes.

On trouvera les détails sur les appareils et sur la technique à suivre dans les travaux des auteurs cités, et dans la récente Thèse de PETEY.

L'Histospectrographie est une méthode très sensible. On sait, en effet, que la quantité minimum d'un élément capable de provoquer l'apparition des raies ultimes (c'est ainsi que l'on appelle depuis DE GRAMMONT les raies qui sont les dernières à disparaître quand la quantité de l'élément diminue progressivement) est extrêmement réduite; suivant les cas, sa valeur oscille entre 0,01  $\gamma$  et 0,1  $\gamma$ ; soit de un cent-millième à un dix-millième de milligramme. De plus, il semble bien, quoique cela n'ait pas encore été réalisé à l'heure actuelle, que l'Histospectrographie permette une détermination quantitative de l'élément recherché. C'est également une méthode parfaitement spécifique : l'identification obtenue est rigoureusement exacte. L'Histospectrographie répond donc de façon absolument parfaite aux conditions chimiques de l'Analyse histochemique, telles que nous les avons définies plus haut : méthode rigoureusement spécifique et d'une énorme sensibilité. On remarquera cependant qu'elle ne permet d'identifier que la présence des éléments et non pas de décider sous quelle forme ni dans quelle combinaison ils se trouvent.

Si, chimiquement, l'Histospectrographie est une méthode parfaite, histologiquement elle se trouve limitée.

Elle ne permet qu'une localisation topographique approchée. En effet, le spectre enregistré est celui qui correspond au territoire détruit par l'étincelle. Or, les techniques actuelles emploient des coupes épaisses (un demi-millimètre) et l'étincelle produit dans cette coupe un trou circulaire ayant de 0,5 à 1<sup>mm</sup> de diamètre au minimum. Le volume de tissu détruit n'est donc pas inférieur à 0<sup>mm</sup><sup>3</sup>,5. Il semble très difficile de descendre en dessous de cette limite : on n'arrive pas à obtenir des micro-étincelles suffisamment petites, ni surtout suffisamment fixes pour localiser la destruction à un territoire beaucoup plus petit, de l'ordre de grandeur

d'une cellule par exemple. D'autre part, si l'on arrivait à diminuer notablement la quantité de substance détruite, on se demande si l'on trouverait des spectrographes assez lumineux et des plaques assez sensibles pour réaliser un spectrogramme convenable.

Dans l'état actuel des choses, l'Histospectrographie ne permet donc qu'une localisation histologique assez grossière; elle permet d'étudier des tissus, non pas des cellules. Arrivera-t-on un jour à la rendre plus précise à ce point de vue? Nous l'espérons, sans trop y croire. La méthode est, chimiquement, d'une telle fidélité et d'une telle sensibilité qu'elle acquerrait une importance énorme si elle arrivait à une localisation plus poussée.

Quoi qu'il en soit, malgré sa création très récente, l'Histospectrographie a déjà à son actif des résultats très intéressants, surtout dans le domaine de l'Histochimie pathologique. On en trouvera un aperçu dans la Revue générale de POLICARD, récemment parue dans *Protoplasma*.

### III. — MICROFLUOROSCOPIE, MICRO-SPECTRO-FLUOROSCOPIE.

*Généralités.* — La Microfluoroscopie est, en Histochimie animale, une méthode de recherche extrêmement précieuse, qui a déjà fourni des résultats importants et dont l'avenir paraît brillant. Elle consiste essentiellement en la mise en évidence et l'identification des substances par leurs propriétés fluorescentes.

Un corps est dit fluorescent lorsque, frappé par une radiation d'une longueur d'onde donnée, il émet de l'énergie radiante sous une ou des longueurs d'onde différentes, toujours *plus grandes* que celle des radiations excitatrices (loi de STOKES). Ce sont les radiations de courte longueur d'onde qui présentent au maximum le pouvoir d'exciter la fluorescence des corps. Les phénomènes de fluorescence apparaissent donc avec le maximum de netteté lorsqu'on emploie comme radiations excitatrices des rayons ultraviolets, comme l'a observé KOHLER (1906) le premier.

Les radiations ultraviolettes, comme on le sait, sont invisibles. Les radiations émises sous leur action par les corps fluorescents sont de longueur d'onde plus grande et appartiennent donc au domaine du visible. Les corps fluorescents examinés en lumière ultraviolette paraîtront donc illuminés, tandis que les autres seront obscurs. Étudiée au spectroscopie,

la lumière ainsi émise par les corps fluorescents donne un spectre caractéristique de la substance étudiée, dans les conditions de l'expérience.

Il y a très longtemps que l'on a observé que certains organes ou certains tissus se montrent fluorescents à la lumière solaire. Ainsi, dès 1867, BREWSTER et, en 1896, HELMHOLTZ avaient remarqué la fluorescence du cristallin. L'emploi de la lumière ultraviolette comme source de radiations excitatrices fut réalisé également assez tôt en vue de recherches sur les tissus ou les organes. Ainsi, R. DUBOIS, en 1909, étudia la *pyrophorine* que l'on trouve dans le sang et les organes lumineux des insectes photogènes, en particulier du Pyrophore, H. STUBEL mit en évidence de l'hématoporphyrine dans les téguments des lombrics, v. PROWAZEK dans divers organismes.

Aucune de ces recherches n'avait été effectuée au moyen du microscope. Ce furent HEIMSTADT, chez REICHERT et LEHMANN chez ZEISS qui construisirent les premiers microscopes à fluorescence. Ces appareils, appréciés des chimistes et spécialement des microchimistes, ne reçurent guère d'applications biologiques. Ce ne fut qu'en 1924 que l'École montpelliéraine, sous l'impulsion du chimiste DERRIEN et de l'histologiste TURCHINI, montra par de nombreux exemples les possibilités de l'étude des fluorescences en Biologie et vulgarisa en quelque sorte ce nouveau procédé d'étude. Depuis cette époque, la Microfluoroscopie biologique a fait l'objet de nombreuses applications. La plupart sont d'ordre purement morphologique : malgré leur intérêt, on n'en parlera pas ici et nous nous contenterons d'un rapide aperçu sur les données histochimiques acquises, après avoir donné quelques indications sur les dispositifs d'examen utilisés.

### 1. Dispositifs utilisés.

Un dispositif microfluoroscopique comprend, en principe, trois parties : une source lumineuse riche en rayons ultraviolets, un filtre destiné à arrêter les radiations visibles superflues, un dispositif destiné à concentrer les rayons ultraviolets sur l'objet et un microscope.

La source lumineuse est, soit une lampe à vapeur de mercure à paroi de quartz, soit une lampe à arc à électrodes métalliques. La firme REICHERT emploie ainsi un arc jaillissant entre des électrodes de fer spéciales, fournissant une source très intense et très riche en radiations ultraviolettes.



Comme filtre, on utilise souvent l'écran de WOOD, à l'oxyde de nickel, transparent pour l'ultraviolet entre 3000-4000 Å; l'écran de APPERT, perfectionnement de l'écran de WOOD, ne laisse guère passer que l'ultraviolet de 3650 Å. De bons filtres sont également constitués par le « Schwarz Uviol-glas » de la Société HANAU et par le filtre « Corex G. 986 A. » de CORNING qui, combinés avec une solution semi-saturée de sulfate de cuivre, sont sélectifs pour 3660 Å.

Le dispositif destiné à concentrer les rayons ultraviolets sur l'objet est assez variable; ses constituants optiques sont de préférence en quartz ou en verre spécial (uviol, ultravit, etc.), quoique le verre ordinaire soit assez transparent pour l'ultraviolet long employé et puisse être utilisé sans grand inconvénient.

POLICARD éclaire les objets en lumière latérale en concentrant les rayons au moyen d'une loupe et examine au binoculaire de Greenough. Ce procédé ne permet pas l'emploi de forts grossissements (jusqu'à 160 fois environ). TURCHINI, METZNER utilisent un microscope ordinaire, sans aucun changement. L'éclairage de la préparation est donc effectué par transparence, comme dans l'appareil de LEHMANN-ZEISS. Dans ce cas, il est absolument nécessaire d'empêcher les rayons ultraviolets provenant de l'éclairage de parvenir à l'œil de l'observateur sous peine de lésions inflammatoires graves; on y parvient en interposant au-dessus de l'oculaire du microscope un écran de verre imperméable aux ultraviolets (verre Euphos ou analogue).

L'éclairage latéral — éclairage à fond noir — est utilisé dans l'appareil de HEIMSTADT construit par REICHERT. La même firme fabrique d'ailleurs des miroirs du type Lieberkühn permettant un éclairage en lumière incidente. De tous ces dispositifs, d'après BORST et KÖNIGSDÖRFFER, on doit préférer l'éclairage latéral sur fond noir. La préparation est portée sur une lame de verre ordinaire ou mieux de quartz ou de verre uviol. Elle doit être incluse dans un milieu non fluorescent, généralement l'eau ou la glycérine. Le baume du Canada ne peut être utilisé à cause de sa forte fluorescence.

L'optique du microscope ne doit en rien différer d'une optique normale, puisqu'on n'observe que des rayons visibles. Cependant, les objectifs à spath-fluor doivent être évités parce que fluorescents. Les objectifs à immersion seront utilisés avec une huile spéciale non fluorescente, et non avec de l'huile de cèdre. On trouvera plus de détails sur les dispositifs utilisés dans les travaux de POLICARD, METZNER, HAITINGER, NAUMANN,

SINGER, qui décrivent des appareils réalisables avec des moyens simples, de HEIMSTÄDT, LEHMANN, KOGEL, BORST et KÖNIGSDÖRFFER qui décrivent des appareils plus perfectionnés et surtout plus lumineux. Les modèles actuels permettent pour la plupart de passer instantanément de l'éclairage normal à l'éclairage ultraviolet et de l'éclairage à fond clair à l'éclairage à fond noir.

## 2. *Histo-fluoro-spectroscopie et fluoro-spectrographie.*

La constatation de la fluorescence d'un corps est un fait intéressant, mais ne permet pas de tirer des conclusions précises et fermes sur sa nature chimique. La couleur sous laquelle apparaît la substance peut bien être une indication, mais en tout cas extrêmement vague. Ainsi, les fluorescences rouges sont presque toujours dues à des porphyrines; ce serait cependant une grosse erreur de croire qu'une fluorescence rouge permet d'affirmer l'existence d'une porphyrine (DERRIEN, DHÉRE). Ce n'est qu'en étudiant le *spectre de fluorescence* qu'on peut arriver à des données précises. Les corps fluorescents donnent, en effet, des spectres d'émission généralement très caractéristiques et qui permettent de les reconnaître aisément. Cette étude s'effectue au moyen du microspectroscope ou du microspectrographe monté sur un microscope de fluorescence. Nous renvoyons à ce que nous avons dit plus haut au sujet de ces instruments.

A l'heure actuelle, nous ne connaissons guère que BORST et KÖNIGSDÖRFFER qui aient utilisés en Histochemie la spectroscopie de fluorescence, de façon quelque peu étendue. Leur très remarquable étude sur les porphyrines est à lire par tous ceux qui veulent se documenter sur la question et se rendre compte des possibilités analytiques de cette méthode.

POLICARD a essayé de tracer spectrophotométriquement la courbe d'intensité spectrale de la lumière de fluorescence émise. Son procédé, assez primitif, n'a à notre connaissance jamais été repris.

## 3. *Applications histochimiques de la fluoroscopie.*

Les applications histologiques de la fluoroscopie sont très nombreuses, ainsi que nous l'avons déjà indiqué. Par contre, les applications réellement histochimiques — c'est-à-dire celles où la fluoroscopie a permis de déceler et d'identifier une substance chimique déterminée — sont plus restreintes. Elles peuvent être classées sous deux chefs. Dans la première catégorie,

nous rangerons les recherches où la fluoroscopie a permis d'identifier chimiquement des substances inconnues, présentes dans des tissus normaux ou pathologiques. Dans la seconde, nous réunirons les études où la fluoroscopie a permis de rendre visibles des substances chimiques connues introduites dans l'organisme et qu'on n'avait pu mettre en évidence par d'autres méthodes.

A l'heure actuelle, le premier groupe comprend exclusivement des travaux ayant trait à la recherche des porphyrines.

L'étude fluoroscopique de tissus animaux y a révélé l'existence de nombreuses fluorescences. Beaucoup d'éléments cellulaires ou tissulaires s'illuminent en lumière de Wood et prennent les couleurs les plus variées : blanc, jaune, rouge, vert, bleu, violet, etc. Ces faits ont pu donner lieu à d'intéressantes constatations morphologiques, mais généralement n'ont pas eu de signification histochimique : la nature du corps fluorescent n'a pu être déterminée, et cela pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le plus souvent, les caractéristiques des fluorescences n'ont pas été serrées d'assez près, les caractères spectroscopiques de la lumière émise n'ont pas été déterminés. Mais ensuite, même si l'on disposait de cette documentation, on serait bien embarrassé de rapporter une fluorescence définie à un corps chimique défini. Nous constatons par exemple une fluorescence jaune et nous en avons étudié le spectre; muni de ce fait, il nous faudra chercher, parmi toutes les substances chimiques connues, celles qui ont une fluorescence jaune et, parmi celles-ci, celle qui donne le spectre de la substance inconnue. On comprend que, devant un tel problème, on se trouve souvent réduit à l'impuissance. Il faut cependant espérer qu'en présence du nombre toujours croissant de documents concernant les spectres de fluorescence des substances chimiques connues, on arrivera un jour à identifier les corps fluorescents — inconnus — décelables dans les tissus.

Malgré ces difficultés de l'Analyse histochimique par voie fluoroscopique, des résultats très importants ont été obtenus dans un domaine où, précisément, l'Analyse chimique fluoroscopique avait été elle-même activement poussée.

Un certain nombre de fluorescences rouges en Histologie ont pu en effet être rapportées de façon certaine à la présence de *porphyrines*, dont la nature a pu être précisée spectroscopiquement. Les premières recherches sur ce sujet sont dues à *DERRIEN* et *TURCHINI*, montrant la présence d'une porphyrine dans le segment calcigène de l'oviducte de la Poule; l'examen

spectroscopique prouva qu'il s'agissait de l'ooporphyrine. Peu après, les mêmes auteurs découvrirent que la glande de HARDER chez le genre *Mus* renferme de l'ooporphyrine histologiquement décelable. Depuis cette époque, on trouve d'assez nombreux cas d'identification histochimique des porphyrines par la microfluoroscopie. On les examinera plus en détail au chapitre porphyrines (voir p. 255).

Dans ce domaine, on peut dire que l'Histofluoroscopie a ouvert un nouveau chapitre de l'Histo chimie, et que ses résultats ont été plus que des promesses.

Dans une deuxième catégorie de recherches histofluoroscopiques, nous rangeons les travaux où l'emploi de la lumière ultraviolette a permis de mettre en évidence et de localiser des substances chimiques connues introduites expérimentalement dans l'organisme. Pour que de telles recherches réussissent, il faut que la matière fluorescente ne subisse pas dans le milieu intérieur des modifications lui faisant perdre ses propriétés fluorescentes, ni que sa fluorescence puisse être confondue avec une fluorescence propre des tissus.

Les recherches effectuées dans cet ordre d'idées sont assez nombreuses, et ici encore c'est à TURCHINI que sont dues les premières études expérimentales. Cet auteur a ainsi pu localiser dans les tissus les substances suivantes : esculine, acridine, acriflavine, érythrosine, bromhydrate de quinine, salicylate de soude. CARNOT et COQUOIN ont également cherché à localiser les salicylates par leur fluorescence. JOSEPH, élève de TURCHINI, observe par la même méthode que l'esculine (utilisée en thérapeutique dans les affections du système veineux) se localise dans la partie conjonctive de la média et de l'intima des vaisseaux, après avoir traversé l'endothélium, et que l'hydrastinine (qui agit sur l'utérus par l'intermédiaire, pense-t-on, du système nerveux) se localise dans les centres nerveux et dans les muscles de l'utérus. TRUC, également élève de TURCHINI, a étudié l'élimination rénale de l'acridine, de la gonacrine, de la tryptaflavine. Citons également les observations intravitalles de F. P. FISCHER sur les colorations de l'œil par la fluorescéine. Très intéressantes sont les observations intravitalles de ELLINGER et HIRT, de HARTOCH, effectuées en lumière ultraviolette incidente après injection de fluorescéine et de tryptaflavine, de même que les études effectuées par SINGER, GRAFFLIN et EISENBERG, sur l'élimination rénale de la fluorescéine et de l'acridine; nous regrettons de ne pouvoir en parler avec plus de détails. Enfin, signalons les résultats de

v. JANCZO sur la localisation de quelques substances employées contre les trypanosomes : les dérivés de l'acridine se localisent *in vivo* exclusivement sur le blépharoplaste, tandis que les dérivés du styryle s'accumulent principalement sur le noyau végétatif. Ces recherches, auxquelles on peut joindre celles toutes récentes de HAITINGER et HAMPERL, QUERNER, montrent l'intérêt que peuvent présenter la méthode histofluoroscopique, soit en vue d'éclaircir des points douteux d'Histophysiologie, soit dans le but de préciser l'action de médicaments utilisés en Chimiothérapie.

#### IV. — EMPLOI DE LA LUMIÈRE POLARISÉE.

L'emploi des examens en lumière polarisée constitue une méthode générale importante en Histochimie.

Nous ne détaillerons pas ici les principes, ni la description, ni le mode d'emploi du microscope polarisant. Ces notions sont assez connues des biologistes. Éventuellement, on trouvera des renseignements complémentaires à ce sujet dans les ouvrages de SCHMIDT et de LANGERON.

Dans les recherches biologiques, le microscope polarisant sert principalement à déceler l'anisotropie ou l'isotropie optique des objets, et ce n'est que très accessoirement qu'on recherche d'autres caractères optiques. Il est bon de savoir cependant que les possibilités du microscope polarisant dépassent de beaucoup l'emploi qu'en font les biologistes. Le microscope polarisant est devenu un instrument d'une très grosse importance pour le minéralogiste et pour le pétrographe. Il permet en effet d'effectuer un très grand nombre de mesures optiques et cristallographiques, par exemple la détermination des sections principales d'une lame cristalline, la détermination des retards, l'allongement optique, la recherche des valeurs de biréfringence, la dispersion des axes optiques, la détermination du signe optique, la mesure de l'angle des axes optiques dans les cristaux biaxes, la recherche du système cristallin, etc. Toutes ces mesures ne peuvent pas toujours être effectuées sur du matériel biologique et leur intérêt n'est pas toujours immédiat ; cependant, il en est qui permettent de résoudre des problèmes qu'il n'est guère possible d'aborder autrement. On trouvera des détails sur la théorie et la pratique de ces déterminations dans le livre de SCHOEP, et de très nombreux exemples d'applications au matériel biologique dans les travaux de M. PRENANT et surtout de SCHMIDT.

Ainsi que nous venons de le dire, le microscope polarisant, pour le biologiste, sert surtout à reconnaître l'anisotropie ou l'isotropie optique des corps. Pour définir les utilisations de la polarisation à l'Histochimie, il est bon de rappeler les causes qui peuvent rendre les corps biréfringents, ou, si l'on veut, quelles sont les différentes espèces d'anisotropie :

1<sup>o</sup> *L'anisotropie cristalline.* — C'est la plus anciennement connue ; elle est présentée par tous les cristaux, sauf par ceux du système cubique. Elle est due à une disposition géométrique particulière des molécules de la substance, de façon à former un réseau spatial tridimensionnel.

2<sup>o</sup> *La biréfringence micellaire* est due à une certaine orientation de micelles au sein d'une substance colloïdale. Cet état est en quelque sorte intermédiaire entre l'état cristallin et l'état amorphe ; d'où le nom de substances semi-isotropes que l'on décerne quelquefois aux substances qui présentent ce phénomène. Les corps semi-isotropes ont donc certaines propriétés des cristaux (biréfringence), mais n'en ont pas certaines autres (plans de clivage, constance des arêtes, détermination des formes, etc.). Exemple : fibres collagènes.

3<sup>o</sup> *La biréfringence de tension* se produit dans des corps isotropes soumis à l'action de certaines contraintes mécaniques. Cette anisotropie est accidentelle, parce qu'elle n'est pas liée à la nature même des corps, mais à des causes extrinsèques. Exemple : verre comprimé, verre refroidi brusquement.

4<sup>o</sup> *La biréfringence par diffraction* se produit au niveau de certaines formations très fines et est produite par la diffraction de la lumière au contact de ces formations. Sa caractéristique principale est de disparaître quand l'objet est placé dans un milieu ayant le même indice de réfraction que lui. Exemple : flagelles.

On voit, par cette énumération, qu'un corps biréfringent n'est pas nécessairement cristallin, comme on l'entend quelquefois dire à tort.

En Histochimie, on n'a guère à considérer que les substances cristallines. Les substances présentant de la biréfringence pour d'autres causes ne sont généralement pas définies chimiquement et leur étude relève uniquement de la Morphologie.

On peut distinguer, parmi les substances cristallines, entre les cristaux proprement dits et les sphérocristaux. Les cristaux proprement dits, facilement reconnaissables en général à leurs caractères externes (forme, facettes,

angles entre les faces, etc.) présentent toutes leurs molécules disposées parallèlement les unes aux autres. On connaît leurs propriétés optiques entre nicols croisés : examinés parallèlement à leur axe optique, ils restent obscurs ; examinés perpendiculairement à leur axe optique, ils présentent, pour une rotation complète de la platine du microscope, quatre positions d'illumination et quatre positions d'extinction. Ceci, bien entendu, pour les cristaux uniaxes.

Dans les sphérocristaux, au contraire, toutes les molécules sont disposées concentriquement ou bien radiairement à partir d'un centre. Sous nicols croisés, l'objet (qui n'est pas nécessairement de forme sphérique) apparaît éclairé, sauf une croix obscure, dont les branches, perpendiculaires entre elles, sont parallèles aux plans de polarisation du polariseur et de l'analyseur. Il est souvent intéressant de déterminer le *signe d'un sphérocristal*. Si l'on intercale entre polariseur et analyseur un gypse rouge de premier ordre, dont le grand indice est dirigé à  $45^\circ$  du plan de polarisation du polariseur, le sphérocristal est positif lorsque les quadrants  $0^\circ-90^\circ$  et  $180^\circ-270^\circ$  sont bleus, les deux autres quadrants  $90^\circ-180^\circ$  et  $270^\circ-360^\circ$  étant jaunes. Il est négatif dans le cas contraire.

On rencontrera fréquemment, dans le cours de cet ouvrage, des applications du microscope polarisant. Citons quelques exemples : recherche des purines, acide urique, guanine, etc. ; différenciation des différentes formes minéralogiques du calcaire : calcaire amorphe, calcite, aragonite, vaterite ; mise en évidence du complexe digitonine-cholestérol, dans la recherche histochimique du cholestérol ; différenciation des diverses espèces de lipides, etc. La valeur signalétique des données fournies par l'examen polariscopique constitue des cas d'espèce et ne peut être discutée en général ; on n'en parlera donc pas ici et l'on discutera chaque problème en particulier.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

### 1. Solubilités-Chromolyse.

CARNOY, *La Biologie cellulaire* (Lierre, 1884). — HEINE, *Hoppe-S.*, 21, 1895. — HERTWIG (G.), in *Von Möllend. Hdb.*, I (Berlin, 1929, Springer). — MEYER (A.), *Morphologische und physiologische Analyse der Zelle* (Iena, 1920). — VON MÖLLENDORFF (W.), *Münch. K. W.*, 77, 1933, p. 933; *Erg. Anat.*, 25, 1924, p. 1. — PRATJE (A.), *Biol. Zbl.*, 40, 1920, p. 88; *Z. Anat.*, 62, 1921, p. 171. — SCHUMACHER (J.), *Chem. d. Zelle u. Gewebe*, 13, 1926, p. 191 et 220; *Derm. W.*, 86, 1928, p. 106, 207 et 1412; *Zbl. Bakt.*, 109, 1928,

p. 181. — SCHWARTZ, *Beitr. Pflanz. Physiol.*, 5, 1887. — TISCHLER (G.), *A. Zellf.*, 5, 1910. — UNNA (P. G.), *Chromolyse in Abderh. Hdb.*, V, 2, 1921; *Derm. W.*, 77, 1923, p. 1424; *Chromolyse, in Enz. mikr. Techn.*, III Aufl. 1926 (Berlin-Wien, Urban et Schwarzenberg). — WERMEL (E.), *Z. Zellf.*, 5, 1927, p. 400. — ZACHARIAS (E.), *Bot. Ztg.*, 1883; *Ber. Deutsch. bot. Gesellsch.*, 11, 1893; 14, 1896; 16, 1898; *Progr. Bot.*, 3, 1909. — ZIMMERMANN, *Beih. z. Bot. Zbl.*, 3, 1893.

## 2. Microspectroscopie-Histospectrographie.

BERNOIT (W.), *Z. exp. M.*, 90, 1933, p. 421. — GERLACH (Wa. et We.), *Arch. f. Gewebepath.*; 2, 1931; *Virch.*, 282, 1931, p. 208; 287, 1932, p. 135; *Derm. W.*, 95, 1932, p. 1497. *Die chemische Emissionsspektralanalyse : II. Anwendung in Medizin, Chemie und Mineralogie*, 1933 (Leipzig, Voss). — MOREL et POLICARD (A.), *Soc. Chim.*, 51, 1932, p. 1125; *Bull. Hist.*, 9, 1932, p. 22. — PETEY (M.), *L'Histospectrographie* (imprimerie de Trévoux, 1933). — POLICARD, MOREL et RAVAUULT (P. P.), *Acad.*, 194, 1932, p. 201. — POLICARD et MOREL (A.), *Acad.*, 194, 1932, p. 491; *La médecine du travail*, 4, 1932, p. 56; *Bull. Hist.*, 9, 1932, p. 57 et 139. — POLICARD (A.), *Prot.*, 19, 1933, p. 626; *Bull. Hist.*, 10, 1933, p. 94. — POLICARD, DUFOUR, ANSTETT et PETEY, *Bull. Hist.*, 10, 1933, p. 57.

## 3. Fluoroscopie (voir également au chapitre des Porphyrines).

ARLOING, POLICARD et LANGERON, *Biol.*, 92, 1925, p. 261. — BORST (M.) et KÖNIGSDÖRFFER Jr (H.), *Untersuchungen über Porphyrin, mit besonderer Berücksichtigung der Porphyrin congenita* (Leipzig, 1929, Hirzel). — CARNOT et COQUOIN, *Biol.*, 94, 1926. — DERRIEN et TURCHINI (J.), *Ass. Anat.*, 20, 1925, p. 177; *Biol.*, 92, 1925, p. 1028. — DHERE (Ch.), *Biol.*, 108, 1931, p. 864. — DUBOIS (R.), *A. Zool.*, 5<sup>e</sup> série, 2, 1909, p. 471. — ELLINGER et HIRT (A.), *Abderh. Hdb.*, V, 2, p. 1753; *Z. Anat.*, 90, 1929, p. 791. — FISCHER (F. P.), *Kolloidchem. Beih.*, 28, 1929, p. 333. — GRAFFLIN (A. L.) et EISENBERG (M. J.), *Anat. Rec.*, 59, 1934, p. 449. — HAITINGER (M.), *Mikroch.*, N. F., 2, 1930, p. 81; 5, 1932, p. 429; *Z. wiss. M.*, 50, 1933, p. 195. — HAITINGER (M.) et HAMPERL (H.), *Z. mikr.-anat. Forschg.*, 33, 1933, p. 193. — HARTOCH (W.), *Z. exp. M.*, 79, 1931, p. 538. — HEIMSTAEDT (O.), *Z. wiss. M.*, 28, 1911, p. 330. — VON JANCISO, *Klin. W.*, 11, 1932. — JOSEPH, *Ass. Anat. Londres*, 119, 1927. — KEILIN (D.), *Proc. Roy. S.*, 98, 1925, p. 312; 100, 1926, p. 129; 106, 1930, p. 418. — KOGEL (G.), *Mikroch.*, 7, 1929, p. 305. — METZNER (P.), *Z. wiss. M.*, 45, 1928, p. 51; *Mikroch.*, N. F., 3, 1931, p. 72. — LEHMANN (H.), *Physik. Zeitschr.*, 13, 1922, p. 35; *Z. wiss. M.*, 30, 1913, p. 417. — NAUMANN (H.), *Mikrokosmos*, 22, 1929, p. 199. — POLICARD (A.), *Acad.*, 179, 1924, p. 1287; *Bull. Hist.*, 2, 1925, p. 167 et 317. — QUERNER (F.), *Z. mikr.-anat. Forschg.*, 32, 1933, p. 444. — SINGER (E.), *Sc.*, 1932, p. 289. — STÜBEL (H.), *Pflüg.*, 142, 1911, p. 1. — TRUC (E.), *Arch. mal. reins et org. gén. urin.*, 5, 1930, p. 1. — TURCHINI (J.) et DERRIEN (E.), *Biol.*, 91, 1924, p. 637. — TURCHINI (J.), *Assoc. Anat.*, 19, 1924; *Biol.*, 93, 1925, p. 1088; *Assoc. Anat.*, 21, 1926; *Soc. Polon. Anat. et Zool.*, 1927, Suppl. 111. — VON PROWAZEK (S.), *Zool. Anz.*, 42, 1913, p. 374. — POLICARD (A.), *Biol.*, 91, 1924, p. 1423.



#### 4. *Lumière polarisée.*

PRENANT (M.), *Biol. Rev.*, 2, 1927, p. 365. — SCHMIDT (W. J.), *Abderh. Hbd.*, V, 2, 1929, p. 1337 et 1835; *Die Bausteine des Tierkörpers in polarisiertem Licht.* (Bonn, 1924, Cohen). — SCHOEP (A.), *Transmission de la lumière dans les cristaux et détermination de leurs constantes optiques principales à l'aide du microscope* (Gand, 1927, Herckenrath).

# DEUXIÈME PARTIE.

## HISTOCHIMIE SPÉCIALE.

### SECTION I.

#### Éléments minéraux.

### CHAPITRE VI.

#### RECHERCHE DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX *IN TOTO*. MICRO-INCINÉRATION.

La mise en évidence des éléments inorganiques d'un tissu, envisagés *in toto*, s'effectue de façon très élégante par la *micro-incinération*.

Cette méthode consiste à pratiquer des coupes histologiques du tissu à étudier et à les minéraliser en les portant au rouge; les éléments organiques sont brûlés et seules restent en place les substances minérales fixes, sous forme de cendres. Lorsque l'opération a été convenablement conduite, la combustion respecte intégralement la topographie des tissus, et l'image que dessinent les cendres — on l'appelle *spodogramme* — est la traduction parfaite de la localisation des substances minérales de la coupe.

La micro-incinération est une méthode très ancienne et avait déjà été appliquée par les histochimistes de l'ancienne école. RASPAIL (1833) semble bien avoir été le premier à se rendre compte de son intérêt. Il avait porté au rouge, sur une lame de verre, une écaille d'un bulbe d'oignon : « En l'examinant alors au microscope, observait-il, on croirait que ce tissu n'a été nullement altéré et que son organisation est restée intacte. » Depuis cette époque, plusieurs auteurs, sporadiquement, ont de nouveau eu l'idée

de se servir de cette technique. Ainsi, chez les plantes, elle fut utilisée par MOLISCH, sur des tissus animaux par LIESEGANG (1910), HERRERA (1912), M. PRENANT (1919) et SCHÖLLER (1922). Mais c'est surtout POLICARD et son école, depuis 1924, qui l'ont perfectionnée, en ont montré l'intérêt par de nombreuses applications et l'ont en quelque sorte vulgarisée. Depuis lors, elle a été employée sur une grande échelle, et jusqu'à l'heure actuelle, on peut compter une bonne centaine de travaux basés sur l'emploi de cette technique. Elle s'applique à tous les cas où l'on veut se rendre compte de la teneur et de la répartition des éléments minéraux en général dans les tissus; en revanche, comme on le verra plus loin, elle se prête mal à la mise en évidence d'un élément déterminé, à part de rares exceptions.

*A. Fixation et préparation des coupes.* — Il est évident *a priori* que la fixation des tissus et la préparation des coupes destinées à la micro-incinération doit être effectuée de façon à conserver aux éléments minéraux leur localisation telle qu'elle existait *in vivo*. On note d'assez grandes divergences entre les auteurs sur les moyens à employer pour atteindre ce but. Les uns ont voulu que la méthode mette en évidence les sels dissous dans les humeurs, les vacuoles et les espaces intercellulaires; les autres ont négligé systématiquement ceux-ci pour ne tenir compte que des composés soit insolubles, soit fixés aux éléments constitutifs du cytoplasme. Aussi, quelques précisions sont nécessaires.

Tout d'abord, afin d'éviter les pertes par dissolution dans les liquides fixateurs, on a préconisé des coupes dans des tissus frais, non fixés. C'est à un tel procédé que s'est arrêté SCHULTZ-BRAUNS.

Comme les coupes dans les tissus non fixés présentent de grosses difficultés techniques, l'auteur emploie une méthode spéciale de coupes par congélation (microtome muni d'un dispositif refroidissant énergiquement le rasoir). Les coupes, aussitôt qu'elles sont effectuées, sont portées sur une lame de verre sèche et immédiatement desséchées à la flamme d'un bec Bunsen. Les organes riches en lipides et spécialement les tissus nerveux, doivent en être débarrassés par un séjour de 3 à 5 heures dans de l'éther anhydre, sinon il se produit lors de l'incinération un boursoufflement et un charbonnement considérable (SCHEIDE). TSCHOPP délipide en passant 10 minutes dans un mélange alcool-chloroforme à parties égales. La micro-incinération proprement dite s'effectue ensuite.

Cette méthode, on doit bien le dire, est d'application assez incertaine. La confection des coupes est assez délicate, malgré le dispositif de SCHULTZ-BRAUNS; il n'est jamais possible d'obtenir des coupes minces, condition

nécessaire de la recherche cytologique fine; 15  $\mu$ , dans les cas les plus favorables 10  $\mu$ , sont le minimum sur lequel il faille compter. Les coupes ne sont jamais d'épaisseur uniforme et restent presque toujours plissées et fortement recroquevillées. Enfin, il est loin d'être certain que la congélation soit sans influence sur la répartition des sels solubles dans les tissus. Les études de CHAMBERS et HALE sur la vitesse de congélation des cellules et des tissus, et les considérations développées par SCOTT laissent entrevoir bien des doutes à ce sujet.

C'est aussi une méthode de congélation que préconise GERSH, comme donnant une image exacte de la répartition des sels à l'état vivant. Cette méthode, perfectionnement d'une ancienne méthode d'ALTMANN, depuis longtemps oubliée, consiste à congeler le tissu par immersion dans l'air liquide, puis, à le déshydrater par évaporation dans le vide à  $-20^{\circ}$  C.; la glace à cette température a une tension de vapeur suffisante pour s'évaporer lentement sans laisser de traces. Une fois la pièce déshydratée, on imprègne de paraffine à l'étuve et l'on pratique l'inclusion. Cette méthode, hérissée de grosses difficultés techniques, nécessitant un matériel très coûteux, voire même dangereuse pour l'expérimentateur, ne paraît pas appelée à une grande extension. Au point de vue théorique, elle est d'ailleurs sujette à des causes d'erreur analogues à celles de la méthode de SCHULTZ-BRAUNS; de telles objections ont été soulevées par SCOTT.

A cette méthode rejetant l'emploi de tout fixateur histologique, il semble bien qu'il y ait lieu de préférer celles qui pratiquent la micro-incinération après fixation.

Tous les fixateurs ne conviennent pas dans ce but. Sont évidemment à proscrire tous les fixateurs susceptibles d'apporter au tissu des substances minérales étrangères; comme tous ceux qui renferment des sels inorganiques (sublimé, bichromates). D'autre part, le fixateur doit ne pas dissoudre ou extraire de façon notable les éléments minéraux du tissu. Les fixateurs acides, qui sont capables de solubiliser pas mal de sels, sont donc également à écarter. Les fixateurs aqueux entraînent les sels dissous dans les humeurs; on peut les employer si l'on néglige ceux-ci pour ne tenir compte que des éléments fixés aux constituants cytoplasmiques — en d'autres termes, des cendres des matières organiques — de beaucoup les plus intéressants au point de vue physiologique.

En théorie, l'alcool absolu serait le fixateur de choix: il n'y a guère de substance inorganique existant dans les tissus animaux qui y soit soluble

à un degré quelque peu appréciable. Mais il présente de gros inconvénients au point de vue histologique pur. Très médiocre fixateur des tissus, il rétracte beaucoup et défigure les détails cytologiques. En outre, il pénètre mal et cela seul rend ses avantages plus théoriques que réels; pendant le temps que s'effectue l'entrée du fixateur, les sels très diffusibles peuvent s'enfuir fort loin du lieu qu'ils occupaient dans le tissu vivant. Aussi, quoiqu'il ait été largement utilisé dans les études de micro-incinération, il vaut mieux le remplacer par des fixateurs moins mauvais au point de vue histologique. SCOTT recommande l'alcool-formol : la perte en sels par dissolution dans ce fixateur n'est guère plus élevée que celle qui se produit dans l'alcool absolu, et le fixateur est histologiquement bien meilleur.

De toute façon, quel que soit le fixateur choisi, il peut y avoir des pertes de matière minérale. Il n'y a pas encore accord sur la quantité absolue de sels échappant ainsi à la micro-incinération. POLICARD et OKKELS trouvent qu'une extraction à l'alcool absolu, puis au toluène, fait perdre à de la poudre de viande 10 à 15 pour 100 de son contenu minéral total. Mais ce cas semble exceptionnellement défavorable. Dans les tissus histologiquement fixés, le départ de sels doit être rendu beaucoup moins considérable par la présence des membranes cellulaires et des protides coagulés. La présence de lipides peut influencer beaucoup la solubilité des sels, même dans les liquides alcooliques (HENCKEL); dans ce cas, l'erreur commise devient difficilement appréciable. Disons cependant, pour en terminer avec cette question, qu'il ne faut pas s'exagérer ces pertes minérales pendant la fixation. SCOTT n'a pas pu trouver de réactions qualitatives positives pour le Na, Ca, Mg et K dans des liquides alcooliques ayant plusieurs fois servi à la fixation.

Après la fixation, on pratique une inclusion à la paraffine suivant les techniques histologiques classiques. On veillera cependant à un détail : tous les liquides doivent avoir été fraîchement filtrés pour éviter la présence de particules en suspension. On coupe habituellement en série, une coupe sur deux étant utilisée pour la micro-incinération; les autres, collées à l'albumine et colorées suivant les méthodes histologiques habituelles, servent de contrôle pour permettre une exacte localisation des cendres sur les coupes incinérées. Au début, on faisait des coupes assez épaisses (10-15  $\mu$ ), mais actuellement il est reconnu que les coupes très minces (3-5  $\mu$ ) s'incinèrent plus facilement et donnent des images bien plus nettes et plus lisibles. Les coupes destinées à la micro-incinération sont étalées, non sur de l'eau ou de l'albumine, mais sur de l'alcool tiède ou de l'huile de paraffine. L'alcool superflu est éloigné par évaporation, l'huile de paraffine par essorage au buvard; l'adhérence à la lame est toujours suffisante. Les organes riches en tissu fibreux

se rétractent souvent fortement pendant l'incinération. On évite cet inconvénient en faisant bouillir les pièces 10 minutes dans de l'alcool avant l'inclusion (POLICARD et RAVAUULT).

**B. Incinération.** — L'incinération s'effectue dans un four à moufle ou mieux dans le four électrique de POLICARD (COUPRIE, Lyon, constructeur) ou de SCHULTZ-BRAUNS (GERHARD, Bonn, constructeur). Il est essentiel que le début du chauffage s'effectue très progressivement, sinon des rétractions importantes, allant jusqu'au bouleversement total de la structure, sont à craindre. POLICARD chauffe pendant 15 minutes, la température finale atteignant 500°-600° (rouge très sombre). Un chauffage plus intense doit être évité. SCOTT chauffe pendant 35 minutes : 10 minutes pour atteindre 100°, le reste pour arriver à 650°. La température peut être mesurée au moyen d'un couple thermoélectrique relié à un millivoltmètre (HENCKEL), mais ce raffinement n'est pas indispensable.

L'incinération dans un courant d'oxygène (TSCHOPP) ne présente pas d'avantages bien marqués. En revanche, l'utilisation d'un courant d'azote (SCHULTZ-BRAUNS) améliore le résultat en diminuant la formation de produits goudronneux, généralement très résistants à la combustion et empêchant une combustion régulière. La température de la combustion peut être abaissée dans ce cas à 500°-530°, ce qui conserve beaucoup mieux les chlorures. Lorsque cette température est atteinte, on coupe le courant d'azote et laisse pénétrer l'air ; en quelques minutes, l'oxydation du carbone par l'air est complète et les cendres sont parfaitement blanches.

**C. Conservation et examen des spodogrammes.** — Les cendres sont très fragiles et souvent très hygroscopiques. Si on laisse les spodogrammes traîner à l'air, des sels font efflorescence et l'image microscopique perd beaucoup de sa clarté et de sa précision. On protège les spodogrammes par une lamelle posée à sec et lutée sur ses bords au moyen de paraffine ou d'un lut quelconque. Le montage au baume du Canada, parfois suggéré, doit être déconseillé : quelles que soient les précautions prises, il y a toujours déplacement de cendres ; de plus, à cause de l'indice de réfraction trop élevé du baume, beaucoup de détails disparaissent. Les mêmes objections peuvent être faites à l'enrobage au collodion, préconisé par POLICARD et OKKELS dans le but de pouvoir faire agir divers réactifs sur les cendres.

L'observation des spodogrammes sous faible grossissement se fera sur fond noir avec éclairage latéral oblique fourni par une forte lampe. Aux

forts grossissements, on examinera avec un condensateur à fond noir. L'ultropak peut également être employé.

Les spodogrammes seront toujours comparés avec des coupes témoins colorées par les méthodes histologiques habituelles. L'usage d'oculaires ou de microscopes de comparaison est avantageux, mais non indispensable.

*D. Valeur de la micro-incinération. Localisation.* — La micro-incinération ne nous paraît pas donner des résultats suffisamment sûrs dans la recherche localisée des éléments minéraux *solubles* : qu'on utilise des coupes de tissus frais ou de tissus fixés, la précipitation des sels ne peut s'effectuer de façon certaine à l'endroit même où ils se trouvaient pendant la vie de la cellule.

Au contraire, la micro-incinération donne des résultats excellents dans la recherche des sels minéraux insolubles dans l'eau et celle des composés minéraux liés aux molécules organiques. La combustion respecte beaucoup mieux qu'on pourrait le croire la morphologie des tissus et le spodogramme peut toujours être superposé à une coupe témoin colorée du tissu étudié. Les cendres dessinent en blanc la structure des tissus avec une fidélité tellement grande qu'il n'est souvent nul besoin de coupes témoins pour la reconnaître sans se tromper.

On notera que la micro-incinération est surtout une méthode topographique et convient moins bien à la Cytologie. Le spodogramme ne supporte pas toujours l'examen aux forts grossissements et les détails cellulaires ont une tendance à disparaître; même les noyaux ne sont pas toujours visibles. Cependant, des applications cytologiques très intéressantes ont été effectuées par SCOTT et par HORNING. Pour obtenir de tels résultats, il est indispensable de pratiquer des coupes très minces (3-5  $\mu$  maximum) et d'opérer avec le plus grand soin.

*Spécificité.* — On doit tout d'abord se demander quels sont les éléments minéraux rendus visibles par la micro-incinération et sous quelle forme ils sont présents dans le spodogramme. Les sels suivants sont conservés comme tels : NaCl, KCl,  $(\text{PO}_4)^{-2}\text{Ca}^3$ ,  $(\text{PO}_4)^{-2}\text{Mg}^3$ . A noter que si la température s'élève trop haut pendant l'incinération, le NaCl peut se volatiliser. Les carbonates sont transformés en les oxydes correspondants  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ . Le phosphate dipotassique est transformé en pyrophosphate  $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . Le

fer passe à l'état d'oxyde  $\text{Fe}^2\text{O}^3$ . La silice se combine généralement au calcaire pour donner des composés silicocalcaires complexes. Le soufre peut se perdre ou se combiner pour donner des sulfates qui sont conservés.

L'estimation quantitative des cendres a été tentée par SCHULTZ-BRAUNS et par SCOTT; les procédés de ces auteurs ne nous paraissent pas suffisamment au point pour valoir une description détaillée.

La micro-incinération ne permet pas de distinguer les divers éléments minéraux les uns des autres; tous les éléments minéraux des tissus soumis à la combustion donnent des cendres blanches. Un d'eux cependant fait exception et est facilement reconnaissable; c'est le fer qui donne de l'oxyde de fer  $\text{Fe}^2\text{O}^3$  rouge. Suivant leur teneur, les cendres ferrugineuses varient du jaune au rouge plus ou moins foncé. Seul donc, le fer peut être mis spécifiquement en évidence par la micro-incinération. Parfois, on peut aussi reconnaître la silice au fait que certaines de ses formes biréfringentes (quartz) conservent leur biréfringence après la micro-incinération. Quant aux autres éléments, on ne peut les distinguer histologiquement les uns des autres. C'est là un des plus gros défauts de la micro-incinération : elle ne donne qu'une vue globale des éléments minéraux des tissus et ne permet pas de les distinguer de façon certaine. A plusieurs reprises, on a tenté de résoudre la question tant bien que mal. Les résultats ont été maigres. MOREL a ainsi effectué des essais qu'il considère lui-même comme peu fructueux.

Tout ce qui peut se faire dans quelques cas, ce sont des réactions microcristallographiques. Au moyen d'une micropipette, manipulée à la main ou au micromanipulateur, on dépose à l'endroit à étudier une goutte très petite du réactif (pour la recherche de  $\text{Ca} : \text{SO}^1 \text{H}^2$  5 pour 100), on voit se produire dans la goutte même des cristallisations assez facilement identifiables ( $\text{CaSO}^1$ ,  $2 \text{H}^2\text{O}$  gypse, de forme lancéolaire). Ce procédé grossier ne permet pas de localisation précise.

HERRMANN s'est efforcé de différencier les différents éléments des cendres; il essaie ainsi de mettre en évidence les sels de Mg au moyen du réactif de HAHN (tétraoxyanthraquinone ou Bordeaux d'alizarine; donne une laque de magnésium violette) et les phosphates au moyen du réactif d'EMBDEN (nitrate de strychnine et de molybdène). Les résultats de ces méthodes ne nous semblent pas concluants, à cause surtout de la difficulté de maintenir la localisation des substances à étudier.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

Articles généraux : ANGELINI (G.), *Monit. Zool. Ital.*, 42, 1931, p. 319. — HENCKEL (K.O.), *Mikroveraschung in Abderh. Hbd.*, V, 2, 1929, p. 1470. — PATRASSI (G.), *Diagn. e Tecn.*



*Labor.*, 1, 1930, p. 958. — POLICARD et OKKELS, *Abderh. Hdb.*, V, 2, 1931, p. 1815. — *Anat. Rec.*, 44, 1930, p. 349. — SCHULTZ-BRAUNS, *Z. wiss. M.*, 48, 1931, p. 161. — SCOTT (G. H.), *Prot.*, 20, 1933, p. 133; *Amer. Jl. Anat.*, 53, 1933, p. 243. — TSCHOPP (E.), *Das Spodogramm*, in *V. Möllend. Hdb.*, 1, 1929, p. 1.

Articles spéciaux : BENOIT (W.), *Münch. med. W.*, 79, 1932, p. 1541. — CHAMBERS et HALE (H. P.), *Proc. Roy. S.*, 110, 1932, p. 336. — FLIASSOW (A.), *Derm. W.*, 1933, p. 683. — HACKMANN (Ch.), *Virch.*, 290, 1933, p. 749. — HERRERA (A. L.), *La terapeutica Moderna Mejico*, 1912, p. 122; *Acad.*, 180, 1925, p. 538. — HERRMANN (FR.), *Z. wiss. M.*, 49, 1932, p. 313. — JAKOBI et KEUSCHER (A.), *Psychiat.*, 79, 1927, p. 323. — LIESEGANG (R. E.), *Bio. Z.*, 28, 1910; *Z. wiss. M.*, 40, 1923. — MAC LENNAN (R. F.), *Sc.*, 1933, p. 367. — MOLISCH (H.), *Sitz. Akad. Wiss. Wien.*, 129, 1920, p. 261. — OSTERTAG (B. A.), *Psychiatr.*, 73, 1925, p. 643; 80, 1927, p. 662. — POLICARD (A.), *Biol.*, 89, 1923, p. 533; *Acad.*, 176, 1923, p. 1012; 177, 1923, p. 1187; *Soc. Chim.*, 33, 1923, p. 1551; *Bull. Hist.*, 1, 1924, p. 26; *Biol.*, 91, 1924, p. 1219; *Bull. Hist.*, 3, 1926; 4, 1927, p. 170. — POLICARD et PILLET (D.), *Biol.*, 92, 1927, p. 272. — POLICARD et DOUBROW (S.), *Ann. Anat. Path.*, 1, 1924, p. 163. — PRENANT (M. A.), *Zool.* 58, 1919, p. 219. — RASPAIL (F.), *Nouveau système de Chimie organique fondé sur des méthodes nouvelles d'observation* (Paris, 1833, Baillière). — SCHEID (K. F.), *Virch.*, 277 1930, p. 673. — SCHOELLER, *B. d. chem. G.*, 55, 1922. — SCHULTZ-BRAUNS, *Verh. d. Path. G.*, 26, 1931, p. 153. — SCOTT (G. H.), *Anat. Rec.*, 55, 1933, p. 75.

## CHAPITRE VII.

### ÉTUDE DES CATIONS.

#### I. — MÉTAUX ALCALINS.

##### SODIUM.

Le sodium n'a jamais été recherché en tant que tel en Histochimie animale. Les méthodes imaginées pour la détection du chlorure de sodium sont toutes basées sur la mise en évidence de l'anion chlore (*voir ce mot*).

\* \* \*

##### POTASSIUM.

Le nitrite double de cobalt et de sodium  $\text{CoNa}^2(\text{NO}^2)^6$  précipite immédiatement le potassium sous forme de cristaux jaune orangé de nitrite triple de cobalt, de sodium et de potassium  $\text{Co}(\text{NO}^2)^3(\text{K.Na})\text{NO}^2 + n\text{H}^2\text{O}$ ; comme ce composé est peu coloré, on transforme le cobalt en sulfure noir par l'action du sulfure d'ammonium. C'est sur ce principe qu'est basée la méthode de MACALLUM.

*Technique.* — MACALLUM plonge des cellules libres ou des coupes par congélation de tissus frais dans le réactif composé comme suit : 20<sup>cc</sup> nitrite de cobalt + 35<sup>cc</sup> nitrite de Na + 10<sup>cm<sup>3</sup></sup> acide acétique glacial + eau, q. s. ad 100; des vapeurs nitreuses se dégagent, attendre leur cessation. Lavage soigné à l'eau distillée glacée fréquemment renouvelée; puis montage de la préparation dans : 50<sup>cm<sup>3</sup></sup> glycérine à 50 pour 100 + 50<sup>cm<sup>3</sup></sup> solution concentrée de sulfure d'ammonium. Luter la préparation, qui ne se conserve que quelques mois.

Résultat : grains noirs, le reste de la préparation incolore.

Comme le nitrite de cobalt se trouve difficilement, VAN GULICK emploie un réactif dû à HAMBURGER : A, 50<sup>cc</sup> nitrate de cobalt + 25<sup>cm<sup>3</sup></sup> acétique glacial + 100<sup>cm<sup>3</sup></sup> eau; B, 50<sup>cc</sup> nitrite de soude + 100<sup>cm<sup>3</sup></sup> H<sup>2</sup>O; 6 volumes de A sont versés dans 10 volumes de B et, au moyen d'une trompe à eau, on aspire pendant 1 heure le NO<sup>2</sup> qui se forme.

Un réactif analogue est employé par ROHDENBURG et GEIGER.

Tous ces réactifs ne se conservent que quelques jours.

*Valeur.* — La spécificité de la réaction est assez satisfaisante. Les sels d'ammonium peuvent donner lieu à un précipité analogue à celui des sels de potassium, mais il est assez soluble dans l'eau froide et les rinçages répétés à l'eau distillée glacée, tel que les pratique MACALLUM, semblent suffisants pour l'éliminer. Parmi les substances organiques qu'on peut rencontrer chez les animaux, seule la créatine (et non la créatinine) fait précipiter le réactif dans des conditions analogues au potassium.

En revanche, l'exactitude de la localisation du potassium est très incertaine. Le réactif est très peu pénétrant, alors que la diffusibilité des sels de potassium est considérable. De plus, il donne lieu avec la plus grande facilité à la production de précipitations périodiques du type des anneaux de LIESEGANG. LLOYD, sur du matériel végétal, a trouvé fréquemment de tels phénomènes et en conclut au rejet de la méthode de MACALLUM. LIESEGANG, ayant effectué des constatations analogues, aboutit aux mêmes conclusions. Même lorsque l'on emploie des cellules isolées ou des fibrilles dissociées, des anneaux de LIESEGANG peuvent se produire. En revoyant les figures mêmes de MACALLUM, on en trouve des exemples absolument typiques, que l'auteur n'a d'ailleurs pas interprétés correctement. La méthode de MACALLUM est donc absolument sans aucune valeur pour la localisation histochimique du potassium. Les conclusions et les déductions physiologiques que des auteurs comme MACALLUM, VAN GULICK, JACOBI et KEUSCHER, W. SCHULTZE, ROHDENBURG et GEIGER, WATERMAN, WOERDEMANN ont cru pouvoir tirer d'observations effectuées au moyen de cette méthode ne nous paraissent donc pas pouvoir être retenues.

Nous croyons d'ailleurs la recherche du potassium irréalisable avec quelque précision en Histo chimie, dans les moyens actuels de la technique. En effet, le potassium ne semble pas exister chez les animaux sous forme liée, il n'est connu qu'à l'état ionique ou ionisable et sous forme dissoute. Quoi qu'on fasse, les mêmes objections se présenteront, même si l'on emploie d'autres réactifs précipitants, tels que le chlorure de platine ou le nitrite de cuivre et de plomb, employés en Histo chimie végétale. Jamais, en effet, on ne pourra être sûr de la localisation obtenue par de tels procédés.

\*  
\* \* \*

### THALLIUM.

Les composés du thallium, introduits dans l'organisme dans des buts thérapeutiques, peuvent être retrouvés par la méthode de BARBAGLIA. Les pièces sont fixées dans de l'alcool

à 95° iodo-ioduré. Le thallium précipite sous forme de cristaux insolubles d'iodure de thallium, facilement reconnaissables à leur couleur jaune.

## II. — MÉTAUX ALCALINO-TERREUX.

### CALCIUM.

Dans le métabolisme des animaux, le calcium a une très grande importance; c'est là un point sur lequel il n'est pas nécessaire d'insister. En Histochimie, dans les chapitres consacrés à l'étude des éléments minéraux, c'est celui du calcium qui, avec celui du fer, tient la place la plus importante. Malgré le nombre impressionnant de travaux qui lui ont été consacrés, on ne peut dire que son étude soit achevée; bien au contraire, elle est encore en pleine évolution. Beaucoup de recherches ont en effet été effectuées sur des bases techniques insuffisantes et devraient être revisées. Les méthodes préconisées pour la détection histochimique du calcium sont loin d'avoir toutes une valeur certaine; beaucoup sont rien moins que spécifiques.

Il y a même des méthodes couramment utilisées en vue de l'étude de la calcification, et qui ne sont même pas des réactions de calcium ou d'ions métalliques; ce sont en réalité des réactions dues à un substrat en voie de calcification. Ce sont certainement les études sur l'os et l'ossification qui ont contribué à embrouiller à plaisir le problème de la détection histochimique du calcium. La substance fondamentale préosseuse et osseuse est en effet capable d'adsorber fortement certains réactifs et est responsable de certaines réactions considérées comme spécifiques du calcium.

D'autre part, d'autres réactions supposées caractéristiques du calcium sont en réalité des réactions d'anions, par exemple des réactions d'ion phosphorique  $PO^4$  ou sulfurique  $SO^4$ ; ces réactions sont positives dans l'os, où le calcium existe à l'état de phosphates ou de sulfates, mais à proprement parler, elles n'indiquent pas la présence du métal.

Aussi, est-il nécessaire d'étudier de façon approfondie les méthodes de détection histochimique du calcium et d'en effectuer une critique serrée. Afin d'essayer d'introduire un peu de clarté dans cette question extraordinairement embrouillée, nous avons été obligé de la reprendre sur des bases nouvelles. La plupart des auteurs qui ont approfondi l'étude des techniques histochimiques du calcium l'ont fait en ayant spécialement en vue la recherche du métal dans les os, et cette préoccupation n'a pas

été sans imposer une tournure spéciale à leurs recherches. Il nous a semblé qu'il valait mieux au contraire étudier d'abord le problème dans sa généralité et de négliger les problèmes particuliers qui se posent à propos des os, organes complexes et nécessitant des techniques histologiques spéciales.

Le calcium peut se rencontrer dans les organismes sous des états très divers, relevant de méthodes d'études différentes, qu'il est logique d'examiner séparément. Tout d'abord à l'état dissous, en circulation dans l'organisme, par exemple sous forme de chlorure, de sulfate ou de lactate calcique, soit peut-être même sous forme colloïdale. Ensuite, à l'état insoluble, mais réagissant sous forme ionique, par exemple sous forme de carbonate, de phosphate ou de phosphocarbonate calcique. Enfin, à l'état masqué, c'est-à-dire engagé dans une combinaison où il ne réagit plus sous forme ionique. L'existence de cette dernière forme est extrêmement fréquente. On connaît dans les organismes animaux un grand nombre de substances dans les cendres desquelles on trouve des quantités souvent notables de calcium et qui ne réagissent pas avec les réactifs courants du calcium (qui sont tous des réactifs de calcium ionisé ou ionisable). Citons au hasard : l'hématogène (HUGOUNENQ et MOREL), des albumines et nucléo-albumines diverses (LÖNNBERG, HALLIBURTON), beaucoup de formations cytologiques très variées, en particulier les noyaux cellulaires (POLICARD et son école).

### 1. La précipitation des formes solubles du calcium.

En Histochimie végétale, la précipitation des sels solubles de calcium est une opération courante; on l'effectue en transformant le composé soluble en sulfate, en oxalate, en tartrate, en picrolonate de calcium (KISSER) ou en carbonate double de calcium et de potassium (MOLISCH).

En Histochimie animale, la recherche des formes solubles du calcium n'a préoccupé que quelques auteurs.

CRÉTIN nous semble avoir été le premier à mettre en évidence histochimiquement de telles formes au cours de l'ossification. Cet auteur admet que le premier stade de l'imprégnation calcaire dans l'os n'est pas le phosphate monobasique de calcium, mais une forme soluble, probablement colloïdale. On peut mettre cette forme en évidence, soit en utilisant le réactif gallo-formique (voir plus loin) sur des tissus frais, soit en la précipitant sous forme de sel insoluble, oxalate (sensibilité : 0,06  $\gamma$ ), tartrate (sensibilité : 0,03  $\gamma$ ) ou iodate (réaction de DENIGÈS).

RABL fixe les tissus dans un mélange à parties égales d'oxalate d'ammonium à 4 pour 100 et de formol neutre au quart, ou mieux dans une solution saturée à froid d'oxalate d'ammonium additionnée d'un peu de toluol (pour prévenir la putréfaction). Les sels solubles de calcium sont précipités sous forme de cristaux monocliniques d'oxalate calcique très facilement identifiables. D'après RABL, les phosphates et carbonates de calcium ne réagissent pas avec le fixateur. Après action du fixateur et lavage soigné, on peut décalcifier au moyen d'acide acétique ou d'acide phosphorique additionné d'un peu de formol. Ce traitement solubilise les phosphates et carbonates de calcium restés intacts lors de la fixation et respecte l'oxalate (qui est insoluble dans ces acides). La méthode proposée par RABL permettrait donc de distinguer entre les formes solubles et insolubles du calcium. FREUDENBERG a critiqué vivement ces conclusions. En effet, l'action quelque peu prolongée d'une solution neutre d'oxalate d'ammonium suffit pour transformer les phosphates et carbonates de calcium en oxalate de calcium, contrairement à l'opinion de RABL. A ces considérations, on peut en ajouter d'autres. Conformément aux idées développées dans le Chapitre II, on doit admettre que la localisation d'une substance dissoute par une méthode de précipitation est toujours très sujette à caution et l'on doit montrer une très grande prudence dans l'interprétation des images obtenues. Nous pouvons donc dire à tout le moins que la recherche histochemique des composés solubles du calcium n'est pas encore au point, et que les méthodes proposées ne peuvent être considérées comme sûres.

## 2. *Les réactions du calcium ionisé ou ionisable.*

Les réactions proposées pour la recherche du calcium ionisé ou ionisable sont nombreuses. Dédaignant l'ordre chronologique de leur découverte, nous les classerons d'après un ordre logique, suivant leur principe général.

A. *Réactions de cristallisation.* — Ces méthodes mettent en évidence le calcium par la formation de dérivés cristallins caractéristiques.

1<sup>o</sup> Réaction des cristaux de gypse. Cette réaction est considérée à bon droit par beaucoup d'auteurs comme la plus sûre que l'on connaisse pour identifier le calcium (SCHUEJENINOFF, SCHUSCIK, ROMEIS, POLICARD, SCHULTZE, SCHMORL, ASCHOFF, etc.).

SCHUEJENINOFF opère comme suit : placer la coupe dans l'alcool à 40° ; ajouter une goutte

d'acide sulfurique à 3 pour 100; il se produit rapidement une précipitation de cristaux de gypse, aisément reconnaissables à leur forme en fer de lance, quelquefois groupés en rosettes. — Pour identifier le calcium sur des coupes microincinérées, POLICARD dépose avec une micropipette une très petite gouttelette d'une solution d'acide sulfurique sur l'endroit à examiner; les cristaux de gypse se forment très rapidement.

La réaction du gypse est rigoureusement spécifique pour le calcium. Malheureusement, elle ne permet pas une localisation précise; c'est une méthode topographique, mais non pas une méthode cytologique. La précipitation ne s'effectue en effet qu'après dissolution du composé calcique et ne s'opère donc pas *in loco*. Il est d'ailleurs aisé de constater sur les coupes traitées par le procédé de SCHUEJENINOFF que les cristaux de gypse sont situés nettement sur un plan supérieur à celui de la coupe. Il y a donc toujours déplacement de substance. La méthode au sulfate calcique doit être considérée avant tout comme une méthode de contrôle, permettant d'affirmer à coup sûr la présence du calcium, mais non d'en préciser la topographie fine.

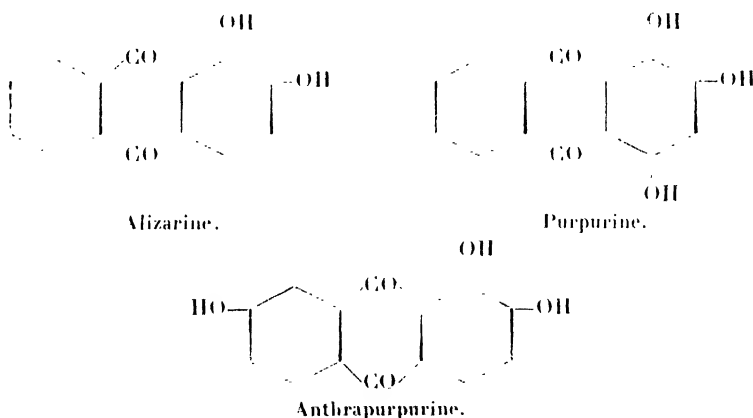
2° Réaction à l'acide iodique. La précipitation du calcium à l'état d'iodate, indiquée par DENIGÈS, a été appliquée par TURCHINI à l'Histo-chimie. Opérant sur des coupes microincinérées, TURCHINI les recouvre d'une solution d'acide iodique dans de la gélatine décalcifiée et obtient ainsi une précipitation localisée de cristaux d'iodate de calcium. L'emploi de gélatine pour assurer une localisation plus exacte en empêchant les transports grossiers de substance est un procédé intéressant. La réaction de DENIGÈS est assez spécifique: seuls interfèrent le strontium et le baryum, dont l'importance biologique est réduite.

B. *Méthodes aux laques.* — Ces méthodes ont pour principe la formation de laques calciques définies et vivement colorées.

Pour comprendre la signification de ces méthodes et en délimiter la spécificité, nous devons au préalable rappeler quelques notions concernant la formation des laques colorées. Certains colorants ont la propriété de se combiner avec des radicaux métalliques pour former des complexes définis, généralement peu solubles et très intensément colorés. Ces colorants sont appelés *colorants à laques* ou colorants pour mordants inorganiques; les radicaux métalliques capables de se combiner à eux sont des *mordants* et les complexes formés par l'union du colorant et du mordant sont des *laques*. Beaucoup de colorants à laques n'ont par eux-mêmes qu'un pouvoir

colorant extrêmement réduit; toujours leur affinité pour des fibres textiles ou des éléments histologiques est extrêmement faible. Au contraire, les laques qui en dérivent par combinaison avec un mordant approprié ont un grand pouvoir tinctorial. Enfin, la coloration des laques est généralement plus intense que celle du colorant initial et souvent de nuance différente. La nuance obtenue dépend d'ailleurs de la nature du mordant : ainsi la laque aluminique de l'hématéine est bleue, la laque ferrique est noire, la laque molybdique rouge, etc. Un colorant donné est capable le plus souvent de donner des laques avec divers mordants; rares sont les colorants à laques spécifiques, c'est-à-dire qui ne donnent une laque qu'avec un seul mordant (ainsi la tétraoxyanthraquinone-1.4.5.8, qui ne « tire » que sur le glucinium (GEORGEVICS). Cependant, pour qu'un métal puisse fonctionner comme mordant, il faut que sa valence soit au moins deux.

1° Laques de l'alizarine et de ses dérivés. Plusieurs dérivés hydroxylés de l'anthraquinone ont été proposés pour la mise en évidence du calcium. Ce sont la purpurine (introduite par GRANDIS et MAININI), l'anthrapurpurine (SALOMON), l'alizarine (CRETIN, CAMERON). L'examen de leur formule montre clairement leur parenté; on peut donc les étudier ensemble, car en fait les méthodes basées sur l'emploi de ces réactifs ont une signification sensiblement équivalente.



*Technique.* — Méthode à la purpurine d'après GRANDIS et MAININI : les tissus soit frais, soit fixés à l'alcool absolu et coupés soit par congélation, soit après inclusion, sont traités 5 à 10 minutes par une solution alcoolique saturée de purpurine. Les coupes sont alors traitées par une solution à 0,75 pour 100 de NaCl pendant quelques minutes. Traiter les



coupes par l'alcool à 70° jusqu'à ce que le liquide n'extrait plus de couleur; déshydratation, toluol, baume. Le calcium est coloré en rose ou rouge.

Méthode à l'anhrapurpurine : nous donnons les indications de SCHUSCIK de préférence aux indications originales de SALOMON, trop sommaires. Préparer une solution alcoolique saturée d'anhrapurpurine, à laquelle on ajoute une trace d'ammoniaque. Opérer comme pour la purpurine. Le calcium est coloré en lilas ou violet.

Méthode à l'alizarine (CRÉTIN) : employer une solution à 0,5 pour 100 d'alizarine sulfonique (alizarine S) additionnée à chaud d'une proportion équimoléculaire de sesquicarbonate d'ammonium. Temps de coloration 5 à 10 minutes à chaud (70°).

Au lieu de viser à obtenir la laque alizarine-calcium, il y a avantage à obtenir la laque alizarine-aluminium + calcium. CRÉTIN opère comme suit : mordancer 24 heures à froid ou 5 à 10 minutes à chaud dans : sulfate d'alumine, 7<sup>g</sup>,50 ; acide sulfurique à 66° B., 5<sup>cm<sup>3</sup></sup> ; eau, 500<sup>cm<sup>3</sup></sup>; puis colorer 24 heures à froid ou 10 minutes à chaud dans une solution à 0,5 pour 100 d'alizarine sulfonique. Laver à l'eau de source. Colorer le fond par une solution à 1 pour 100 de bleu coton C 4 B Poirier. Parties calcifiées en rouge vif, le reste en bleu.

La laque calcique de l'alizarine présente la particularité d'être très résistante aux acides et aux alcalis. CAMERON profite de cette propriété pour décolorer le fond de la préparation si celui-ci a pris le colorant en quantité notable : dans ce but, on traite alternativement par des solutions d'alcool alcalin (renfermant 10 pour 100 d'ammoniaque) et d'alcool acide, jusqu'à décoloration du fond. Une autre application très intéressante a été effectuée par CRÉTIN. Lorsqu'il s'agit d'étudier un os ou un tissu nécessitant une décalcification pour qu'on puisse en effectuer des coupes, on colore par l'alizarine, puis on décalcifie; la décalcification respecte la laque et on la retrouve aisément sur les coupes. Fixer dans une solution à 2 pour 100 de sulfalzarinate de sodium, additionnée de 20 pour 100 de formol. La pénétration du réactif est très lente et demande souvent plusieurs semaines. Ensuite, décalcifier par une solution étendue d'acide trichloracétique et d'acide acétique. Inclusion et coupe d'après les méthodes histologiques habituelles. Calcium en rose ou rouge.

D'autres méthodes, utilisant, à la place de l'alizarinesulfonate de sodium, l'alizarine elle-même, comme les méthodes proposées par ROEHL et par SPALTEHOLZ, semblent moins pratiques et donner des résultats inférieurs aux techniques citées ci-dessus.

Quelle est la valeur de ces méthodes?

En premier lieu, on est d'accord que tous les sels de calcium, quels qu'ils soient, donnent des réactions positives avec l'alizarine et ses dérivés. Cela résulte à l'évidence des essais faits *in vitro* par GRANDIS et MAININI, MACALLUM, SALOMON, SCHUSCIK, CAMERON, etc., par des méthodes plus ou moins variées et plus ou moins ingénieuses, Cependant, ces réactions sont peu sensibles et ne sont capables de mettre en évidence le calcium que là où il existe en quantité déjà assez considérable. MACALLUM a observé qu'*in vitro*, la purpurine ne précipite plus les sels de calcium sous forme de laque insoluble à partir d'une dilution de 1/800<sup>e</sup>; le même auteur

insiste sur le fait que la méthode à la purpurine ne permet pas de voir le calcium dans les protoplasmés cellulaires et n'est réellement utile que pour la mise en évidence des calcifications. Et même dans l'étude de celles-ci, les réactions peuvent ne pas être suffisantes. CAMERON observant, après beaucoup d'autres, que les parties les plus anciennement calcifiées se colorent souvent extrêmement mal par la purpurine et les autres dérivés de l'antraquinone, suggère que l'état physique des dépôts calcaires peut influencer fortement leur réactivité avec ces substances.

Reste alors la question de la spécificité de la réaction. Il semble bien tout d'abord, malgré l'avis contraire de LITTEN, que l'alizarine et ses dérivés, tels qu'ils sont employés dans les techniques décrites plus haut, ne sont pas capables de colorer des éléments organiques de la préparation, de façon à produire des réactions pouvant interférer avec celle qui est caractéristique du calcium. Nous avons déjà dit, en exposant le principe de ces réactions, que les colorants à laques, en l'absence de mordant, n'ont qu'un pouvoir colorant très réduit. L'expérience montre qu'il en est bien ainsi et que, sur des pièces bien décalcifiées, l'alizarine et ses dérivés ne donnent tout au plus qu'une coloration générale très diffuse, impossible à confondre avec la réaction donnée par le calcium (SCHUSCIK, CAMERON, MACALLUM). Cependant, si les substances organiques ne peuvent interférer avec la réaction du calcium, de grosses causes d'erreur peuvent être apportées par la présence de substances inorganiques. En effet, la formation d'une laque avec les dérivés de l'alizarine n'est pas spéciale à l'ion calcium; beaucoup d'autres ions sont capables de fournir des laques bien colorées dans les mêmes conditions (Cr, Al, Ba, Sr, Fe, etc.). Dans les tissus, c'est surtout le fer qui est à considérer, et cela d'autant plus que l'association entre le fer et le calcium est un phénomène extrêmement fréquent (*voir*, à ce sujet, une importante bibliographie dans CAMERON). A vrai dire, la coloration des laques ferriques de l'alizarine et de ses dérivés est différente de celle des laques calciques; elle est plus violacée et tire vers des nuances noirâtres. Mais cette différence est difficilement appréciable sur des coupes et il ne faut pas compter sur cette propriété pour effectuer une discrimination précise. Jusqu'à un certain point, on peut éliminer le fer, comme le font ROEHL et MASAO SUMITA, en traitant par une solution d'acide oxalique à demi-saturation à 37° pendant une heure: l'acide oxalique dissout le fer, tout en insolubilisant le calcium; nous disons jusqu'à un certain point, car il n'est jamais possible de savoir si du fer n'est pas retenu par

adsorption. Des autres métaux alcalino-terreux et lourds, rares dans les organismes animaux, on peut généralement faire abstraction; bien entendu, il faut que le fixateur histologique utilisé ne renferme pas de sels de ces métaux, ni qu'aucun mordant métallique ne soit utilisé dans les manipulations précédant la réaction; sont ainsi à proscrire les fixateurs renfermant du sublimé ou du bichromate.

En résumé, on dira donc que les réactions utilisant l'alizarine ou ses dérivés sont des réactions assez simples, manquant de sensibilité, et dont la spécificité est suffisante si l'on peut éliminer la présence du fer et de tous les autres métaux alcalino-terreux et lourds.

2<sup>o</sup> Laque de l'hématoxyline. L'hématoxyline, ou plutôt son produit d'oxydation, l'hématéine, est un colorant à laques. Comme on le sait, l'hématoxyline est incolore, l'hématéine un peu jaunâtre; ni l'une ni l'autre n'ont de pouvoir colorant. Au contraire, leurs laques sont très fortement colorées et ont un pouvoir colorant considérable.

Il importe, si l'on veut comprendre quelque chose aux applications de ces substances à l'Histochimie du calcium, de distinguer deux cas. Dans le premier, on utilise des solutions pures d'hématoxyline ou d'hématéine, *en l'absence de tout mordant*; dans le second, on se sert d'une solution d'une laque de l'hématoxyline, par exemple de sa laque aluminique ou hémalun. *Seules* les méthodes où l'on utilise le premier procédé peuvent être qualifiées d'histochimiques. Les autres ne sont pas autre chose que des méthodes de coloration et n'ont, en réalité, rien à voir avec la mise en évidence du calcium.

*Technique.* — Nous indiquons, à titre documentaire, une méthode où il est usage d'hématoxyline, celle de ROEHL, et une où il est fait usage d'hématéine, celle de LEUTERT.

Méthode de ROEHL : les coupes sont traitées par une solution à 1 pour 100 d'hématoxyline pure dans l'alcool, ni trop fraîche, ni trop mûre, pendant 5 à 10 minutes. Différencier dans l'eau distillée, à laquelle on a ajouté quelques gouttes d'ammoniaque, jusqu'à disparition complète de la coloration du fond. Rincer; coloration de fond à la safranine, montage au baume.

Méthode de LEUTERT : traiter 15 minutes par une solution concentrée alcoolique fraîche d'hématéine; laver 15 minutes à l'eau de source fréquemment renouvelée. Safranine; montage au baume. Dans les deux cas, les portions calcifiées doivent être en bleu noir et les noyaux rouges sur fond rose.

Quand on essaie de délimiter la spécificité de ces réactions, on ne tarde

pas à faire des constatations assez surprenantes. Si l'on s'avise de faire réagir *in vitro* des sels de calcium sur des solutions d'hématoxyline, comme l'ont fait par exemple MACALLUM, SCHUSCIK, E. COWPER EAVES, CAMERON, on constate bien l'apparition d'une coloration rougeâtre ou bleuâtre, mais très faible; et si l'on s'adresse à des sels insolubles de calcium, la réaction ne s'effectue que très lentement et le produit légèrement coloré qui prend naissance se dissout et diffuse dans la solution. Les essais effectués *in vitro* ne sont donc pas favorables à l'idée que l'hématoxyline ou l'hématéine peuvent servir de réactif histochimique du calcium. CAMERON observe de plus que sur des coupes d'os, soit frais, soit fixé au formol ou à l'alcool, ni l'hématoxyline ni l'hématéine ne produisent de coloration au niveau des parties calcifiées. S'il s'en produit une, elle est due à la présence de fer, comme on peut facilement s'en assurer. Après décalcification, il n'y a pas non plus de coloration, *sauf si l'on a employé au cours des manipulations histologiques des liquides renfermant des sels de chrome, de l'alun ou des sels d'or.*

Ces résultats permettent de comprendre pourquoi ROEHL et LEUTERT ont cru que l'hématoxyline ou l'hématéine constituaient des réactifs du calcium : ces auteurs se servaient couramment du liquide fixateur de MULLER, qui renferme du bichromate. C'est en réalité la substance fondamentale de l'os qui donne la réaction. Comme elle a une très grande affinité pour les sels métalliques, elle fixe fortement les sels de chrome et ce sont ceux-ci qui forment une laque avec l'hématéine. Les sels de calcium n'ont rigoureusement rien à voir avec ce processus. L'assertion que l'hématoxyline et l'hématéine colorent en bleu foncé les sels de calcium — assertion que l'on trouve dans beaucoup de Traités de technique histologique, et non des moindres — est radicalement fausse. Les méthodes de ROEHL et de LEUTERT n'ont pas de valeur histochimique.

Dans beaucoup de méthodes d'étude de l'os et de l'ossification, on utilise des solutions de laques de l'hématoxyline, par exemple sa laque d'aluminium ou hémalun. On sait depuis très longtemps (STRELZOFF, 1873) que l'hémalun colore intensément en bleu foncé les portions calcifiées des os. Cette coloration s'effectue toujours beaucoup mieux *après décalcification* que sur les pièces fraîches (STRELZOFF, COHN, ASCHOFF, SCHUSCIK et beaucoup d'autres). Elle est évidemment due aux affinités chromatiques de la substance fondamentale de l'os et ne constitue en rien une réaction histochimique. Il est parfaitement correct d'utiliser ces affinités pour une étude morphologique de la calcification, et en fait les méthodes utilisant les dérivés de l'hématoxyline ont rendu de très grands services. Seulement, il ne faut pas s'imaginer que l'on fait de l'histochimie et que l'on met par là en

évidence le calcium. Rien n'est plus faux. On fait seulement l'analyse chromatique du substrat sur lequel s'effectue la calcification.

3<sup>o</sup> Réactif gallo-formique. Ce réactif, dû à CRÉTIN, constitue une méthode extrêmement sensible de recherche du calcium. La composition du réactif n'est pas entièrement élucidée à l'heure actuelle, mais il s'agit probablement d'un colorant à laques s'apparentant aux gallocyanines. Avec les sels de calcium, il donne naissance à une coloration bleue très visible.

Préparation : mélanger au mortier, acide gallique 2 parties + trioxyméthylène 1 partie. Au moment de l'emploi, dissoudre 0<sup>g</sup>,25 du produit dans 5<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'eau distillée bouillante. Au réactif bouillant, ajouter 0<sup>cm<sup>3</sup></sup>,5 d'ammoniaque à 18<sup>o</sup> B. (attention aux projections). Agiter jusqu'à ce que le réactif soit jaune paille. A ce moment, il est utilisable; lorsqu'il est brun ou rosé, il ne vaut plus rien. Ne se conserve que très peu de temps.

Le réactif encore tiède est versé sur la coupe déparaffinée au xylol et lavée au chloroforme. Au bout de 10 à 15 secondes, jeter l'excès du réactif et laisser la préparation à l'air. On voit se développer une teinte bleue caractérisant la chaux. Rincer à l'eau saturée de SO<sup>4</sup>Ca et filtrée. Coloration de fond dans une solution d'éosine additionnée de 5 pour 100 d'ammoniaque; laver rapidement dans l'eau formolée à 10 pour 100; déshydrater; xylol; montage dans l'huile de cèdre. Calcium en bleu, le reste rouge.

La réaction de CRÉTIN est sensible au millionième pour le calcium. Elle permet de déceler celui-ci jusque dans les noyaux cellulaires. La coloration bleue est spécifique de la présence du calcium. D'autres métaux donnent également des laques colorées avec le réactif gallo-formique; mais la couleur obtenue est différente et la réaction est beaucoup moins sensible (au millième). Ainsi, le baryum et le strontium donnent des laques vertes, le silicium une laque jaune, le fer une laque violet brunâtre, le magnésium une laque rosée. Ces diverses réactions pourraient, à l'occasion, servir à identifier histochimiquement ces éléments.

La réaction de CRÉTIN, extrêmement sensible et spécifique, présente cependant quelques inconvénients. Tout d'abord, c'est une réaction assez délicate, qui demande un peu d'habitude et de tour de main pour qu'on la réussisse à coup sûr. Ensuite, à cause de sa forte alcalinité, le réactif peut détériorer des coupes délicates ou les décoller. Malgré cela, c'est une des meilleures que l'on connaisse pour la détection histochimique du calcium.

C. *Méthode au pyrogallol.* — Il y a longtemps, MERKEL avait observé que des solutions de pyrogallol colorent fortement en jaune brunâtre les éléments calcifiés. Cette réaction a été reprise par KOSSA et par GRANDIS

et MAININI. D'après les auteurs, le mécanisme de la réaction serait le suivant : le pyrogallol, capable de se comporter comme un acide faible, donne, en présence d'un sel de calcium, du pyrogallate de calcium peu soluble. Ce pyrogallate, tout comme le pyrogallol lui-même, absorbe énergiquement l'oxygène de l'air en donnant naissance à un produit jaune brunâtre.

KOSSA dissout 1<sup>g</sup> de pyrogallol dans 40<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'eau, et ajoute 0<sup>g</sup>,5 de soude caustique; les coupes sont traitées par cette solution pendant 5 minutes, puis très soigneusement lavées à l'eau distillée, de façon à éliminer toute trace de réactif; enfin, les coupes sont abandonnées quelques heures ou quelques jours dans l'eau, où la coloration se développe de plus en plus.

La question de la spécificité de la réaction au pyrogallol ne nous semble pas encore suffisamment éclaircie. Il a été vérifié *in vitro* que le pyrogallol donne bien avec les sels de calcium un précipité jaunâtre, brunissant fortement par exposition à l'air. GRANDIS et MAININI, MACALLUM, SCHUSCIK ont observé que les sels de sodium, de potassium et de magnésium donnent aussi des pyrogallates brunissant dans les mêmes conditions; ces pyrogallates sont beaucoup plus solubles que le pyrogallate de calcium, mais pourraient être difficilement extractibles des coupes et être retenus par adsorption. Cependant, nous ne pensons pas que ces sels puissent fournir des réactions interférant avec celle du calcium, car ils n'existent pas ou n'existent plus à l'état libre dans les tissus dans lesquels on recherche le calcium. Nous craindrions plutôt une adsorption du pyrogallol ou de son produit d'oxydation (qui, en solution alcaline, se produit spontanément et assez rapidement) par des éléments organiques des tissus. Et de fait, on constate généralement une coloration jaune clair du fond de la préparation qui, à vrai dire, n'est guère difficile à distinguer de la réaction du calcium. Ces restrictions faites, la méthode au pyrogallol semble constituer une bonne méthode, d'une assez grande sensibilité (SCHMORL), donnant des préparations honorables, mais d'une teinte générale assez peu agréable.

D. *Méthode de MACALLUM au sulfate de plomb.* — La méthode proposée par MACALLUM est une méthode indirecte. Le sel de calcium est d'abord transformé en sulfate de calcium, par l'action de l'alcool sulfurique à 2 pour 100 prolongée 20 minutes. Un rinçage très soigné à l'alcool

absolu renouvelé cinq ou six fois, élimine toute trace d'acide sulfurique. On fait agir alors une solution  $n/10$  d'acétate de plomb pendant une demi-heure, de manière à transformer le sulfate de calcium en sulfate de plomb. Un nouveau rinçage très soigné à l'eau distillée élimine toute trace du sel soluble de plomb. Enfin, un traitement par un mélange à parties égales de glycérine et d'une solution concentrée de sulfure d'ammonium, met en évidence le sulfate de plomb en le transformant en sulfure de plomb, intensément coloré en noir.

Cette méthode nous paraît sujette à de grosses causes d'erreur, et ne nous semble pas devoir être retenue. MACALLUM lui-même estimait que, lors des transformations chimiques compliquées nécessitées par sa méthode, des transports de substances pouvaient s'effectuer et que la localisation du composé calcique initial pouvait être faussée : il recommandait en conséquence de la prudence dans l'interprétation des résultats. Cependant, là ne nous paraît pas encore résider la plus grosse cause d'erreur. Celle-ci nous paraît être l'emploi de la méthode indirecte. Dans le premier temps de la réaction, on transforme le composé calcique en sulfate de calcium, c'est exact ; mais en même temps, on transforme aussi tous les autres métaux alcalino-terreux et lourds en sulfates ; tous ces sulfates, comme le sulfate de calcium, sont insolubles dans l'alcool ; ainsi, les sels de fer se transformeront en sulfate de fer. Dans le deuxième temps, on transforme le sulfate de calcium, et *tous les autres sulfates avec lui*, en sel de plomb par l'action de l'acétate de plomb. Ce n'est pas tout : l'acétate de plomb peut être adsorbé par des éléments organiques de la coupe ; il l'est par exemple au niveau de la substance fondamentale de l'os, comme cela ressort des expériences de ROEHL (effectuées d'ailleurs dans un tout autre but). Et nous ne parlerons pas du plomb qui pourra être retenu à l'état de phosphate ou d'autre sel insoluble, à cause de la présence de phosphates quelconques, non solubles ou retenus par adsorption. Enfin, dans le troisième temps, on met le plomb en évidence, celui qui provient du sulfate de plomb (c'est-à-dire de *tous les sulfates initiaux*), celui qui a été adsorbé par des éléments organiques à l'état d'acétate, sans compter celui qui a pu être retenu à l'état de phosphate de plomb. Et ce plomb est supposé représenter la localisation exacte du calcium ! On voit combien la spécificité du procédé de MACALLUM est aléatoire. Nous pensons qu'il doit être considéré comme sans valeur, dans la recherche histo-chimique de l'ion calcium.

E. *Méthodes destinées plus spécialement à la mise en évidence du phosphate de calcium.* — A côté des méthodes précédemment exposées, dont le but est de mettre en évidence l'ion calcium en général, on en a proposé d'autres, spécialement destinées à mettre en évidence de façon spécifique le phosphate de calcium.

1<sup>o</sup> *Méthode argentique de VON KOSSA et méthodes dérivées.* Les applications du nitrate d'argent à la recherche du calcium sont anciennes. La première semble avoir été réalisée par FLESCHE en 1885; mais c'est surtout celle de VON KOSSA qui est la plus connue.

*Technique.* — Les coupes sont traitées pendant une demi-heure par une solution de nitrate d'argent de 1 à 5 pour 100 et exposées au soleil ou à une lumière vive; rinçage à l'eau distillée; élimination du sel d'argent en excès par un traitement par une solution à 5 pour 100 d'hyposulfite de sodium; rinçage; coloration de fond à la safranine; montage au baume. Les portions calcifiées montrent au début de la réaction une coloration jaune, qui ne tarde pas à se changer en noir. Il existe quelques variantes de cette technique: quelquefois, après traitement au sel d'argent, et rinçage soigné, on réduit par une solution diluée d'acide pyrogallique. D'autres fois, le temps de passage dans la solution d'argent est réduit, et l'exposition au soleil se fait sous eau distillée. GOHS pratique une réaction semblable sur des os fixés au formol, en prolongeant le traitement argentique 2 à 7 jours à l'obscurité; puis décalcification à l'acide nitrique et inclusion à la celloidine. GOMORI fixe à l'alcool, argente les pièces 6 à 10 jours, et réduit 4 à 6 jours par l'hypophosphite de Na à 5 pour 100.

Ces modifications peuvent présenter des avantages de réalisation, mais ne sont pas fondamentalement différentes de la réaction de KOSSA. Elles se ramènent toutes en somme à une imprégnation argentique.

La réaction de KOSSA est, pour l'auteur, absolument spécifique du phosphate de calcium. Son mécanisme serait le suivant: l'argent serait précipité par le phosphate de calcium à l'état de phosphate d'argent, que la lumière réduirait en argent métallique. Cette réduction n'est possible qu'en présence d'une substance organique; le phosphate de calcium, traité *in vitro* par du nitrate d'argent donne lieu à un précipité jaunâtre, mais qui ne noircit pas à la lumière; ce même précipité, en présence de substances « albuminoïdes », se réduit rapidement à la lumière. KOSSA admet donc que le calcium présent dans les tissus l'est, tout au moins en partie, sous forme d'albuminate; c'est cet albuminate qui serait l'agent du noircissement à la lumière.

Les études expérimentales poursuivies par SCHMORL, KLOTZ, SCHUSCHIK, CAMERON et d'autres ont apporté bien des restrictions aux idées de KOSSA.



En premier lieu, malgré les affirmations de KOSSA, la réaction peut fort bien être donnée par d'autres sels de calcium que le phosphate.

SCHUSCIK a remarqué que le carbonate de calcium amorphe donne la réaction de KOSSA, tandis que le carbonate cristallin ne la donne pas. Cette intéressante constatation est à mettre en rapport avec l'existence de diverses formes minéralogiques du calcaire, telle qu'on l'exposera plus loin. D'autres sels de calcium que les phosphates et les carbonates sont d'ailleurs capables de fournir la réaction à l'argent, par exemple les chlorure, sulfate, oxalate et oléate de calcium.

La réaction n'est même pas spécifique pour le calcium. KLOTZ a reconnu que le cuivre, le mercure, le plomb donnent également des réactions positives. CAMERON a de même observé qu'en milieu gélatiné, la réaction est donnée également par les phosphates et carbonates de strontium, de baryum, de fer et de cuivre.

La méthode de KOSSA, il est facile de le voir, n'est pas un test spécifique, ni pour les sels de calcium, ni pour les phosphates. Cependant, malgré ses causes d'erreur nombreuses, elle est susceptible de rendre de grands services pour une étude morphologique de l'imprégnation calcaire des tissus. Les images qu'elle fournit sont en effet fort belles et s'obtiennent sans difficulté.

2<sup>o</sup> Méthodes aux métaux lourds. Un certain nombre de réactions qui sont données par leurs auteurs comme révélant le phosphate de calcium utilisent des métaux lourds. Ce sont toutes, en réalité, des méthodes d'imprégnation métalliques et elles peuvent se ramener à un seul schéma : on traite le tissu à examiner par une solution d'un sel d'un métal lourd, puis, après lavage soigné destiné à enlever tout excès du sel, on traite par un réactif capable de « révéler » le métal lourd utilisé. Voici les sels métalliques utilisés par ROEHL et leur « révélateur » : 1<sup>o</sup> sulfate de cuivre ammoniacal-hématoxyline de Weigert; donne une laque bleu noir; 2<sup>o</sup> acétate de plomb-sulfure d'ammonium; donne du sulfure de plomb noir; 3<sup>o</sup> chlorure de fer-ferrocyanure de potassium; donne du bleu de Prusse; 4<sup>o</sup> molybdate d'ammonium-chlorure d'étain; donne de l'oxyde de molybdène bleu foncé. STOELZNER a de même proposé huit méthodes pour la recherche du calcium, basées sur des principes analogues. Les méthodes I, II et VIII de STOELZNER sont analogues aux méthodes de KOSSA et de ROEHL; voici les autres : III, nitrate de cobalt-sulfure d'ammonium;

donne du sulfure de cobalt noir; IV, sulfate de cuivre-sulfure d'ammonium; donne du sulfure de cuivre noir; V, chlorure de fer-sulfure de potassium; donne du sulfure de fer noir; VI, chlorure de fer-sulfocyanure de potassium; donne une coloration rouge sang; VII, chlorure de fer-tanin; donne de l'encre noire. On pourrait encore imaginer beaucoup de techniques du même genre.

Toutes ces méthodes n'ont absolument aucune valeur histochimique. Comme SCHUSCIK l'a montré, elles restent positives après décalcification. Ce ne sont donc pas des réactions histochimiques du calcium, ni de l'ion phosphorique. Elles sont dues, en réalité, aux affinités de la substance fondamentale des tissus calcifiés et n'ont pas plus de signification histochimique que les affinités colorantes de celle-ci.

### 3. *Les réactions du calcium masqué.*

A l'heure actuelle, il n'existe guère qu'un moyen de mettre en évidence le calcium masqué : c'est la micro-incinération, employée pour la première fois dans ce but par POLICARD.

Sur les préparations micro-incinérées (*voir* détails sur les méthodes de micro-incinération, pages 57 et suivantes), le calcium est passé quantitativement à l'état d'oxyde (CaO). Un observateur exercé peut reconnaître les cendres riches en calcium à leur aspect blanc crayeux; mais comme toutes les cendres des autres métaux, sauf le fer, sont également blanches, cet aspect ne peut guère entrer en ligne de compte pour une étude quelque peu précise.

Le meilleur moyen d'identifier le calcium sur les coupes micro-incinérées est d'y pratiquer la réaction des cristaux de gypse (POLICARD, *voir* p. 63) ou la réaction de DENIGÈS (TURCHINI, *voir* p. 70). Ces réactions sont hautement spécifiques et permettent d'identifier de façon certaine l'élément calcium; malheureusement, ces procédés ne permettent qu'une localisation assez approximative; une localisation topographique est possible, mais non pas une localisation cytologique fine. Leur sensibilité est considérable et dépasse de beaucoup toutes les autres méthodes proposées.

SCHULTZ-BRAUNS, afin d'identifier le calcium sur un spodogramme, plonge celui-ci avec précaution dans de l'eau distillée, l'y fait séjourner 2 ou 3 minutes, puis le sèche. Ce traitement doit dissoudre les sels les plus solubles, sodium, potassium, etc., et laisser intacts les oxydes de

calcium, de magnésium, de manganèse, peu solubles. SCOTT attire l'attention sur les causes d'erreurs de cette méthode. D'après les données de RAMAGE et SHELDON, il existe dans les organismes des éléments encore moins solubles dans l'eau que l'oxyde de calcium. D'autre part, dans la masse complexe de fusion des éléments d'une préparation, il y a de larges possibilités de combinaisons chimiques des sels, et l'on ne peut rien prévoir de la solubilité de tels complexes.

Résumons, en quelques lignes, les méthodes dont on peut disposer actuellement en Histochimie pour la recherche du calcium :

a. *Calcium soluble*. Méthode de RABL, utilisable seulement avec beaucoup de restrictions.

b. *Calcium insoluble*, mais ionisable : 1<sup>o</sup> méthodes aux laques de la purpurine, de l'alizarine, de l'antrapurpurine; assez sûres, mais guère sensibles; 2<sup>o</sup> méthode de CRETIN au réactif galloformique; réaction sûre, sensible, mais délicate et parfois brutale.

c. *Calcium masqué*. Micro-incinération suivie de la réaction du gypse; très sûre, mais ne permet pas de façon certaine une localisation cytologique précise.

Toutes les autres méthodes qui ont été proposées ne présentent pas assez de sécurité pour pouvoir servir en Histochimie. Quelques-unes, comme les réactions de cristallisation et la réaction au pyrogallol, peuvent cependant être utilisées à titre complémentaire pour confirmer les données obtenues par les premières méthodes. Quant aux autres, à savoir les réactions à l'hématoxyline, au sulfate de plomb, la méthode argentique de KOSSA et les réactions qui en dérivent, les méthodes aux métaux lourds de ROEHL et de STOELTZNER, et les méthodes analogues, elles ne peuvent en aucun cas être utilisées comme réactions histochimiques du calcium. On a vu, en effet, qu'elles n'ont en réalité rien à voir avec la présence de calcium et qu'elles sont dues aux propriétés des substrats calcifiés ou en voie de calcification. Il est parfaitement légitime de s'en servir en Histologie, dans l'étude des processus de calcification, et d'en tirer des conclusions d'ordre morphologique; en revanche, ce serait une grosse erreur de vouloir en faire des réactions histochimiques, et d'en déduire des conclusions d'ordre chimique sur la répartition et le métabolisme du calcium dans les tissus.

#### 4. Les variétés du calcaire $\text{CO}^3\text{Ca}$ .

Le carbonate de calcium, nommé aussi calcaire, existe sous un grand nombre de formes minéralogiques. Les principales sont la calcite, l'aragonite, la vaterite et le calcaire amorphe; toutes correspondent à la formule  $\text{CO}^3\text{Ca}$ . Ce sont à peu près les seules que l'on trouve chez les êtres vivants. Outre ces formes, il en existe d'autres, composées soit de calcaire anhydre, soit d'hydrates, qui n'ont qu'un intérêt minéralogique.

L'existence chez les animaux de différentes formes minéralogiques du calcaire soulève de nombreux problèmes qui, au point de vue histologique, ont surtout été étudiés par M. PRENANT et par SCHMIDT. En effet, la forme stable, dans les conditions biologiques normales de température et de pression, est la calcite. Toutes les autres formes tendent à se transformer en calcite, alors que la transformation inverse est impossible. Cette transformation s'effectue toutefois avec des vitesses différentes : elle est grande pour le calcaire amorphe et la vaterite, faible pour l'aragonite. Dès lors, du moment que chez les animaux, il y a production d'une autre forme que celle qui est stable, c'est-à-dire d'une autre que la calcite, se pose le problème du déterminisme de la formation de cette variété en quelque sorte anormale. C'est là un problème extrêmement complexe que nous ne pouvons songer à aborder ici, même de façon élémentaire, et pour l'étude duquel nous renvoyons aux recherches de M. PRENANT.

Nous nous contenterons d'esquisser ici les méthodes utilisables en microscopie pour distinguer les diverses formes les unes des autres et de donner un bref aperçu de la répartition de ces formes chez les êtres vivants.

Les propriétés qui peuvent servir pratiquement pour reconnaître les différentes formes de calcaire sont les caractères optiques (examen en lumière polarisée), les caractères morphologiques et, notamment, ceux qui sont tirés des figures de corrosion, les essais de densité, de dureté, de stabilité, les spectres de rayons X et enfin, des réactions chimiques spécifiques. Ces caractères ne sont pas tous utilisables pour des recherches microscopiques, car certains d'entre eux exigent des échantillons assez volumineux. Nous indiquons ci-dessous comment on peut, de façon très élémentaire, effectuer la distinction entre les différentes formes. Une telle analyse n'a qu'une valeur assez relative et ne peut servir pour des recherches très précises. Pour réaliser celles-ci, il est nécessaire d'avoir recours à une analyse minéralogique approfondie, dont on ne peut parler ici.

Le calcaire amorphe se reconnaît au fait qu'il n'est pas biréfringent, et ne s'illumine donc pas entre nicols croisés. Il se présente sans formes définies.

Toutes les autres formes du calcaire qui existent chez les êtres vivants sont cristallines et biréfringentes.

La calcite appartient au système rhomboédrique; elle est donc biréfringente. Elle présente les caractères d'un cristal uniaxe; ces caractères, qui s'observent en lumière polarisée convergente (conoscopie) peuvent servir à une identification sous le microscope (voir détails théoriques et techniques dans le livre de SCHMIDT), mais ne sont pas toujours d'application aisée. Pour distinguer la calcite de l'aragonite et de la vaterite, les moyens les plus pratiques sont les réactions de MEIGEN. Dans une solution assez étendue de nitrate de cobalt, la calcite ne se colore pas à froid et très peu à chaud, tandis que l'aragonite et la vaterite, à froid et surtout à chaud, se colorent en lilas ou violet. Le sulfate ferreux,

agité avec le minéral broyé, donne lieu avec la calcite à un léger précipité jaune, tandis que les deux autres donnent un précipité abondant et vert foncé. La réaction de THUGUTT peut être également utile : traitée par une solution centinormale de nitrate d'argent pendant une demi-minute, lavée à l'eau distillée, puis traitée par un excès de bichromate de potassium à saturation, la calcite se teint à peine, tandis que l'aragonite se colore en rouge vif par formation de chromate d'argent. Signalons une modification de la réaction de MEIGEN, due à QUERCIGH, et qui, d'après DEBENEDETTI-PISCHLER, doit être applicable aux recherches microscopiques. Après traitement par le nitrate de cobalt et rinçage, on traite par une solution de sulfure d'ammonium : aragonite noir intense, calcite tout au plus grisâtre.

La calcite peut se présenter, soit sous l'aspect de cristaux de formes diverses, possédant toujours un axe morphologique ternaire, soit sous forme de sphérolithes, généralement à caractère positif (*voir* p. 54), soit enfin sous des formes spiculaires à surfaces plus ou moins courbes.

L'*aragonite* appartient au système monoclinique; c'est donc un minéral biaxe, qui, examiné en lumière polarisée convergente, donne naissance aux figures d'axes caractéristiques des cristaux biaxes. Ce caractère, joint aux réactions de MEIGEN et de THUGUTT, sert à la distinguer de la calcite. Les formes sous lesquelles se présente l'aragonite sont très voisines de celles de la calcite : cristaux, sphérolithes à caractère positif, spicules.

La *vatérite* est probablement biaxe; elle donne, comme l'aragonite, les réactions de MEIGEN. Elle se présente presque toujours sous forme de sphérolithes, dont le caractère est *négatif*; rarement ce sont des sphérolithes positifs. Sa densité (2,5) est beaucoup moins grande que celle de l'aragonite (2,9). Elle est instable et se transforme aisément en calcite, au contact de l'eau, surtout à chaud; cette transformation s'effectue en quelques heures; au contraire, la transformation de l'aragonite en calcite demande des mois. Enfin, la *vatérite* est assez soluble dans l'eau. Signalons enfin que la *vatérite* peut être confondue quelquefois avec le calcaire amorphe, car sa biréfringence est faible et ne peut souvent être mise en évidence que par l'emploi d'un gypse ou d'un quartz teinte sensible.

D'après M. PRENANT, on trouve du calcaire amorphe dans les glandes de MORREN postérieures des Lombrics; la coque des œufs de Couleuvre, et surtout dans les téguments de nombreux Arthropodes; on en trouve également dans les os des Vertébrés, où cependant on ne trouve que peu de carbonate de calcium. On trouve de la *vatérite* dans certaines concrétions du conjonctif chez les Mollusques, les Cestodes, quelques Trématodes, et dans le tissu adipeux de quelques Insectes. L'aragonite, plus fréquente, se rencontre dans la plupart des otolithes des Vertébrés, la coque des œufs de Tortue, la coquille de la plupart des Mollusques, le dard des Escargots, le squelette des Coralliaires et chez certaines Algues calcaires. Presque toutes les autres formations calcaires des êtres vivants sont formées de calcite.

\* \* \*

## MAGNÉSIUM.

La recherche du magnésium en Histo-chimie animale n'a été effectuée à notre connaissance que par CRÉTIN et POUYANNE dans leurs études sur l'action des métaux sur la consolidation osseuse. Se référer à leur mémoire.

## III. — MÉTAUX LOURDS.

## FER.

De tous les métaux lourds, le fer seul présente un intérêt considérable en Histo chimie animale.

Toutes les réactions du fer utilisées actuellement — sauf la micro-incinération — ne mettent en évidence que le fer à l'état ionisé ou facilement ionisable. On sait cependant, depuis longtemps, que le fer des organismes se trouve pour la plus grande partie à l'état non ionisable et donc inerte vis-à-vis des réactifs histo chimiques. Si l'on veut mettre en évidence le fer dans des composés où il est ainsi « masqué » (MOLISCH), « bloqué » (BACKER), « occulte » (KOCKEL), il faut au préalable le libérer à l'état ionisable par l'opération appelée *démasquage*.

Si les réactifs histo chimiques du fer ionisable sont connus depuis bien longtemps (PERLS, 1866; QUINCKE, 1868) et n'ont guère subi que de très petites modifications, il n'en est pas de même des méthodes de démasquage, qui ont soulevé et soulèvent encore beaucoup de discussions.

Nous exposerons donc séparément les réactifs histo chimiques du fer ionisable et les méthodes de démasquage du fer occulte, après quelques considérations sur la fixation des pièces utilisées pour la recherche du fer.

1. *La fixation histo chimique du fer.*

Le fer existant dans les tissus n'est que très rarement à l'état soluble. Aussi, le problème de la fixation histologique du fer est-il bien plus une question de conservation parfaite *in situ* que de précipitation à proprement parler.

Il existe pas mal de désaccord entre les auteurs sur les procédés à employer pour assurer cette conservation. Les premiers auteurs ont été évidemment préoccupés par l'idée d'empêcher toute dissolution du fer, bien plus que par le souci d'assurer une fixation histologique impeccable; en cela, ils se laissaient guider bien plus par des considérations d'ordre chimique que par des considérations d'ordre morphologique. Ainsi, HALL avait proposé des fixateurs à base d'alcool et de sulfure d'ammonium; tous les composés ferrugineux ionisables sont ainsi fixés sous forme de sulfure de fer insoluble. Cette technique est actuellement abandonnée parce que fournissant des fixations histologiquement très mauvaises. L'alcool (absolu)

a été également fortement préconisé, surtout par MACALLUM. Ce réactif ne dissout pas les composés ferrugineux d'une façon appréciable; cependant, il n'est pas certain qu'il respecte de façon intégrale leur localisation fine. En effet, si le composé étudié est en liaison (adsorptive ou autre) avec des structures à base protidique, la localisation ne pourra être assurée que si la structure elle-même est convenablement fixée. C'est là, au fond, une application des règles que nous avons développées dans le Chapitre II de cet ouvrage. Or, l'alcool est, comme on le sait, un très médiocre fixateur des structures. Aussi, à plusieurs reprises, s'est-on élevé énergiquement contre son emploi. Ainsi, ABDERHALDEN estime que la fixation des tissus par l'alcool influence la distribution du fer à tel point qu'il devient impossible de se faire une idée exacte de sa répartition. ASVADOUROVA observe fréquemment sur des pièces fixées à l'alcool des plages diffuses résultant évidemment d'une fixation défectueuse; on ne les retrouve plus si l'on a fixé au moyen de réactifs meilleurs.

Le formol, en solution à 10 pour 100, a été également conseillé, par exemple par SWIRSKI, TARTAKOWSKY, NISHIMURA. Ce dernier trouve que ce fixateur n'extrait pas sensiblement le fer des tissus: dans des liquides formolés ayant servi à fixer des organes riches en fer, on ne parvient pas après 24 heures à déceler qualitativement ce métal. Cependant, FALKENBERG estime qu'à cause de son acidité le formol est capable de dissoudre le fer; si cela est exact, il ne sert de rien de se servir de formol neutre, car celui-ci se réacidifie toujours quand on y plonge des tissus animaux (SPATZ).

Le sublimé en solution saturée, conseillé par MACALLUM, doit être rejeté (HERXHEIMER) car il ne permet pas d'utiliser toutes les réactions du fer, par exemple la réaction de QUINCKE.

Avec PRENANT et ASVADOUROVA, nous pensons qu'il est préférable d'utiliser, non pas des agents qui sont censés insolubiliser ou garder insoluble le fer, mais les fixateurs les plus fidèles de la technique histologique, comme par exemple le liquide de BOUIN ou celui de BOUIN-HOLLANDE. Non seulement la fixation histologique est meilleure, mais également la fixation histochimique: c'est en effet essentiellement par la fixation du substrat qu'est assurée la fixation des substances chimiques. Celle-ci vaudra ce que vaut la première.

Les fixateurs chromés peuvent également être utilisés avec avantage. A plusieurs reprises, il a été constaté que la recherche du fer sur les pièces

fixées par les fixateurs chromés ne pouvait s'effectuer par les méthodes au bleu de Prusse et au bleu de Turnbull. GRYNFELTT et CRISTOL pallient cet inconvénient en se débarrassant du chrome qui trouble la réaction par un traitement des coupes avec une solution de nitrate de plomb. Ce procédé permet une localisation très précise du fer, car il rend possible l'emploi de fixateurs cytologiques très fins, comme les liquides de REGAUD ou de HELLY.

Dans ces dernières années, un certain nombre d'auteurs ont préconisé d'effectuer les réactions du fer sur des tissus non fixés (WEILL) ou sur des coupes par congélation de tissus non fixés, effectuées par la méthode de SCHULTZ-BRAUNS (ROMEIS). Non seulement de tels procédés ne vont pas sans difficultés techniques, mais nous estimons la localisation du fer beaucoup moins sûre que par n'importe quel autre procédé : si le fer existe en liaison avec des éléments cellulaires de nature protidique — et c'est souvent le cas — la non-fixation de ces éléments et leur lyse entraînera fatalement des changements dans la localisation des composés ferrugineux. C'est un point sur lequel nous avons également déjà insisté dans le Chapitre II.

## 2. Les réactifs du fer ionisé ou ionisable.

Le fer ionisé ou ionisable est facile à mettre en évidence avec beaucoup de sécurité. Il existe dans ce but cinq groupes de méthodes : méthodes au bleu de Prusse; méthodes au bleu de Turnbull; méthodes au sulfure de fer; méthodes au sulfocyanure de fer; méthodes aux laques d'hématoxyline ou de brésiline.

Il est à noter que le fer ionisé peut exister sous deux formes : soit sous forme d'ion ferrique  $Fe^{+++}$  trivalent, soit sous forme d'ion ferreux  $Fe^{++}$  bivalent. C'est généralement le fer ferrique trivalent que l'on rencontre dans les tissus; le fer ferreux, bivalent, est beaucoup plus rare. On peut cependant le rencontrer; par exemple, VILLARET, JUSTIN-BESANÇON, DOUBROW et EVEN ont noté sa présence dans des pigments ferrugineux d'origine hématique.

A. *Méthodes au bleu de Prusse.* — Dans ces méthodes, dont la première fut indiquée par PERLS (1866), le fer est mis en évidence sous forme de ferrocyanure ferrique ou bleu de Prusse  $[Fe(CN)_6]^{3-}Fe^{4+}$ .



*Technique.* — La réaction au bleu de Prusse peut s'effectuer, soit en traitant les coupes successivement par une solution de ferrocyanure de K, et par une solution ou des vapeurs de H Cl, ou bien faisant agir le ferrocyanure et l'acide simultanément. Nous ne détaillerons pas ici toutes les variantes proposées, qu'on trouvera dans tous les Traités de technique microscopique, et nous nous contenterons d'indiquer la technique que nous employons habituellement. Les coupes sont traitées pendant 15 minutes à une demi-heure par un mélange à parties égales de stock-solutions de ferrocyanure de potassium à 2 pour 100 et d'acide chlorhydrique à 2 pour 100; ce mélange doit toujours être préparé extemporanément et être de couleur jaune clair; les solutions ayant une couleur verdâtre doivent être rejetées. Après rinçage, les noyaux sont colorés au carmin aluné et les coupes montées à l'huile de cèdre.

La réaction au bleu de Prusse est extrêmement sensible (limite de sensibilité en Microchimie : 0,002 %). Elle est spécifique des sels ferriques; elle n'est pas donnée par les sels ferreux. Aucune substance minérale ou organique ne donne de réaction pouvant être confondue avec celle des sels ferriques. Sa spécificité est donc parfaite. Cependant, elle n'est rigoureusement sûre qu'effectuée avec beaucoup de soin. Le ferrocyanure de K, sous l'action d'un acide trop concentré ou sous l'action prolongée d'un acide dilué, se décompose partiellement en acide ferrocyanhydrique, puis en sel ferrique; celui-ci, réagissant avec le ferrocyanure restant, donne lui-même du bleu de Prusse. Ce bleu de Prusse, à l'état naissant, est capable de se précipiter électivement sur certaines formations et en impose ainsi pour un composé ferrugineux tissulaire. La méthode d'« imprégnation ferrique » de la microglie, indiquée par DEL RIO HORTEGA, n'est pas autre chose qu'une telle imprégnation par le bleu de Prusse naissant; celui-ci se produit par un simple chauffage à 60° du mélange de ferrocyanure et d'acide chlorhydrique. Il ne faut pas considérer cette méthode comme histo-chimique; elle ne décèle pas le fer des tissus, mais bien des affinités cellulaires pour un colorant à l'état colloïdal.

Enfin, il faut prendre garde aux réactifs employés et tout spécialement à l'acide chlorhydrique. Celui-ci contient presque toujours du fer; c'est là un fait qu'il ne faut pas négliger, lorsqu'on doit effectuer des recherches très précises.

B. *Méthodes au bleu de Turnbull.* — Le bleu de Turnbull est le ferri-cyanure ferreux  $[\text{Fe}(\text{CN})^6]\text{Fe}^3$ ; il ne faut pas le confondre avec le bleu de Prusse. Il s'obtient par l'action de ferricyanures sur les sels de fer divalents. Les sels ferriques ne donnent pas cette réaction.

Les sels ferreux étant peu répandus dans les tissus, la réaction au bleu de Turnbull est rarement employée seule, à moins qu'on ne veuille mettre les composés ferreux exclusivement en évidence. Le plus souvent, on commence par ramener tous les composés ferrugineux du tissu à l'état de sel ferreux; dans ce but, on se sert de sulfure jaune d'ammonium qui les transforme en sulfure de fer  $\text{FeS}$ . Ensuite, on fait agir une solution acide de ferricyanure, qui transforme ce dernier en bleu de Turnbull. La réaction ainsi effectuée est la réaction de TIRMANN et SCHMELTZER.

*Technique.* — Les coupes, venant de l'eau distillée, sont traitées de 1 à 24 heures par une solution concentrée de sulfure d'ammonium; cette solution doit être jaune clair et ne pas dater de plus de trois semaines. Après rinçage soigné à l'eau distillée, traitement pendant 10 à 20 minutes par un mélange à parties égales et fraîchement préparé de solutions à 20 pour 100 de ferricyanure de K et à 1 pour 100 de HCl. Rinçage, coloration nucléaire au carmin aluné, ou mieux coloration triple safranine, vert de méthyle, acide picrique, d'après OKKELS.

Les préparations colorées au bleu de Turnbull ont l'inconvénient de pâlir au bout d'un temps plus ou moins long (à ce sujet, voir GANS).

La réaction de TIRMANN et SCHMELTZER, assez peu utilisée en France, est considérée par un certain nombre d'auteurs allemands (ROMEIS, SCHMIDTMANN, etc.) comme la meilleure technique de détection histo-chimique du fer; ce serait la méthode la plus sensible et la plus fidèle. Elle est absolument spécifique et donne moins facilement lieu à des causes d'erreur que la méthode au bleu de Prusse.

C. *Méthodes au sulfure de fer* (QUINCKE, 1868). — Dans ces méthodes, le fer est mis en évidence sous forme de sulfure de fer  $\text{FeS}$  noir. Fort employées au début de ce siècle, elles tombent peu à peu en désuétude. Moins sensibles que les autres méthodes, elles nécessitent des manipulations désagréables, fournissent des préparations peu agréables à voir et enfin ne sont pas spécifiques: d'autres métaux lourds ont également des sulfures noirs. Nous n'en indiquerons donc pas la technique.

D. *Méthodes à l'acide sulfocyanhydrique* (MOLISCH, 1893; KOCKEL, 1925). — La couleur rouge sang des sels de fer traités par l'acide sulfocyanhydrique (acide rhodanique) permet de déceler 0,0025 de fer; cette réaction est donc encore beaucoup plus sensible que celle du bleu de Prusse. Malheureusement, la coloration est fugace et disparaît en une dizaine de minutes.

En outre, la couleur produite est soluble et peut diffuser. Elle n'est donc indiquée que lorsque la quantité de fer à rechercher est très faible.

Voici la technique que KOCKEL emploie après le démasquage effectué d'après sa méthode au chlore-thétrachlorure de carbone (cf. plus loin).

Les préparations venant du tétrachlorure de carbone sont séchées; on couvre le fond d'une boîte de Petri d'une mince couche de solution de sulfocyanure de K, et on l'acidifie par H Cl. La préparation est exposée, face en dessous, aux vapeurs d'acide rhodanique qui se dégagent. En quelques instants, la coloration rouge se produit. On dépose sur la coupe une goutte de glycérine, on la couvre d'une lamelle et examine immédiatement. Lorsque la préparation a pâli, on peut renouveler l'opération avec succès une et parfois deux fois.

SCHMELTZER opère comme suit pour obtenir des préparations stables : on pratique des coupes à la celloïdine; celles-ci, montées sur lame, sont traitées successivement par l'alcool absolu, par un mélange de créosote et de xylol 2 : 1, par le xylol, par un mélange ana de xylol et de paraffine liquide, et enfin par de la paraffine liquide pure. Dans un petit tube, on mélange extemporanément 0<sup>g</sup>,5 de sulfocyanure avec 0<sup>mg</sup>,5 d'acide sulfurique concentré. La coupe, imprégnée de paraffine est exposée aux vapeurs qui se dégagent de ce mélange, pendant 10 minutes. On pose une lamelle sur la préparation et on la lute. Les préparations ainsi obtenues se conserveraient plusieurs semaines.

E. *Méthodes des laques.* — Ces méthodes sont basées sur le fait que les ions fer donnent naissance, par action sur des colorants convenables, à des *laques* fortement colorées et insolubles (1).

L'hématoxyline et la brésiline, jaune très pâle à l'état libre, donnent des laques de fer intensément colorées en noir; l'alizarine monosulfonate de sodium, rouge, donne une laque de fer (ou plutôt une laque ferrocaldique) brun noir.

Réaction à l'hématoxyline (MACALLUM, DIETERLE) : traiter les coupes 24 heures par une solution à 5 pour 100 d'hématoxyline pure. Laver longuement à l'eau distillée. Coloration de fond à la safranine ou à l'éosine. Fer noir ou brun.

Réaction à la brésiline (MAWAS) : la brésiline est très voisine de l'hématoxyline; s'emploie comme elle. Après coloration, différencier dans de l'alcool chlorhydrique à 1 pour 100. Fer brun ou violacé.

Réaction à l'alizarinemonosulfonate de soude : 1<sup>o</sup> colorer 5 à 15 minutes dans une solution à 5 pour 100 de rouge d'alizarine S; 2<sup>o</sup> laver dans un cristalliseur renfermant des traces de chlorure de calcium. La coloration s'accroît fortement. Éventuellement, différencier par l'alcool sulfurique à 0,5 pour 100; 3<sup>o</sup> laver à l'eau; déshydrater au xylol baume. Fer en brun noir noyau rouge violet, fond rose.

(1) Sur les colorants à laques, voir p. 70.

Ces réactions sont très sensibles, mais leur spécificité est *toujours* très douteuse. On n'est jamais sûr de l'absence des sels de calcium qui peuvent souvent fournir des réactions interférant avec celles du fer. Il est certain d'ailleurs que les méthodes basées sur la formation des laques ont donné des résultats positifs dans des cas où aucune méthode, ni histochimique, ni macrochimique, n'a jamais permis de détecter le fer, par exemple au niveau de certains noyaux cellulaires (*voir*, à ce sujet, les intéressantes constatations de MARZA et CHIOSA sur l'ovaire de la poule). On peut assez aisément comprendre la cause de ces erreurs. Vraisemblablement, dans nombre de cas, une petite quantité de fer se trouve apportée par les réactifs ou le verre des ustensiles; de ce fer, il est à peu près impossible de se débarrasser (WIENER). Passant dans la solution d'hématoxyline, il y cause la production d'une petite quantité de laque; cette laque, identique à la laque ferrique de WEIGERT ou de HANSEN, a une énorme affinité pour certains éléments cellulaires (comme les noyaux) et va donc les colorer électivement. On doit en outre tenir compte de la présence possible dans la coupe de calcium ou d'autres métaux bivalents ou trivalents; tous ces métaux peuvent en effet donner naissance à des laques au même titre que le fer. S'ils se trouvent comme impuretés dans la solution du colorant, ils y forment également des laques ayant une très forte affinité pour des éléments cellulaires, et c'est une cause d'erreur de plus.

Les méthodes de détection du fer par l'emploi de colorants à laques sont donc très aléatoires; elles sont tout au plus bonnes pour confirmer les données obtenues par les autres méthodes.

### 3. Démasquage du fer masqué.

Dans un certain nombre de composés organiques, le fer ne peut être mis en évidence par ses réactifs habituels, qui sont des réactifs de fer ionique. Le fer y est *masqué* <sup>(1)</sup>. Tels sont par exemple les ferro et ferricyanures, le saccharate de fer, l'hématogène de BUNGE, la ferratine

---

(1) Les anciens auteurs parlaient volontiers de fer « organique », comme synonyme de fer « masqué ». C'est là une terminologie qui nous semble à abandonner. En effet, il existe des composés organiques du fer, où celui-ci est ionisable et décelable par les réactifs habituels; par exemple, le citrate de fer. D'autre part, certaines formes de fer masqué ne sont pas des substances organiques, comme le fer colloïdal étudié par MARFORI et par LAPICQUE.

(MACALLUM, MARFORI), la vitelline, l'hémoglobine, etc., et même certaines formes d'oxyde de fer colloïdal (MARFORI, LAPICQUE). De tels composés sont importants en Biologie, et l'on même dire que leur intérêt dépasse de beaucoup celui que présentent les formes ioniques.

La question du démasquage du fer « occulte » a donné lieu à d'interminables discussions. Quand les uns prétendent qu'il est possible au moyen de réactifs appropriés de libérer à l'état ionique tout le fer organiquement combiné (MACALLUM, KOCKEL, etc.), les autres croient que cette opération est irréalisable et que le fer soi-disant libéré du tissu est apporté par les réactifs ou les instruments employés (WIENER, MOLISCH, HUECK, etc.).

Il nous semble que ces opinions extrêmes sont exagérées, mais renferment chacune une part de vérité. Il est certain en effet que des réactifs appropriés peuvent faire passer des composés dont le fer est masqué à l'état de fer ionique, mais que, d'autre part, un certain nombre de résultats ont pu être faussés par des impuretés provenant des réactifs.

A. *Méthodes de MACALLUM.* — 1<sup>o</sup> Démasquage par le sulfure d'ammonium. En prolongeant l'effet du réactif de QUINCKE pendant deux jours à deux semaines à la température de 50°, MACALLUM pense démasquer le fer de ses combinaisons organiques.

2<sup>o</sup> Démasquage par l'alcool acide. Traiter d'une demi-heure à plusieurs heures par l'alcool sulfurique (alcool 90° : 96 + SO<sup>4</sup>H<sup>2</sup> concentré : 4); rincer à l'alcool; puis mettre le fer ionisé en évidence par la méthode au sulfure d'ammonium, au ferrocyanure, ou à l'hématoxyline.

*Valeur des méthodes de démasquage de MACALLUM.* — Les points suivants nous paraissent acquis : 1<sup>o</sup> ces méthodes peuvent démasquer le fer de certaines combinaisons; par exemple, les pigments ferrugineux dans les organes hématopoiétiques, le saccharate de fer (<sup>1</sup>). Dans ces composés, ainsi qu'il est facile de s'en assurer, le fer ne peut pas être mis en évidence sans démasquage, mais l'est fort bien après démasquage à l'alcool sulfurique; 2<sup>o</sup> elles sont incapables de le mettre en évidence dans beaucoup d'autres.

---

(<sup>1</sup>) Dans ce composé, le fer est lié à un hydroxyle alcoolique et non pas à un radical acide; le saccharate de fer est donc en somme un alcoolate. C'est pour cette raison que le fer n'y est pas ionisable.

Citons, par exemple : les ferro et ferricyanures, l'hémoglobine (TREADWELL, WIENER, MACALLUM). Disons-le tout de suite, la plus grande partie du fer masqué des organismes paraît rentrer dans cette catégorie; 3<sup>o</sup> la méthode peut être sujette à des erreurs du fait d'impuretés existant dans les réactifs ou apportés par les instruments. Ces impuretés sont fixées électivement sur certains éléments tissulaires. De tels cas de contamination sont indubitables : la démonstration de la présence de fer dans les noyaux cellulaires est presque certainement due à cette cause d'erreur. La notion de la présence du fer dans les noyaux cellulaires avait été admise pendant longtemps et était devenue classique, sous l'influence surtout de SCHNEIDER et de MACALLUM. Les méthodes les plus précises de recherche du fer masqué et tout spécialement la micro-incinération (*voir*, à ce sujet, les récentes conclusions de POLICARD) ont bien montré depuis que, en réalité, l'immense majorité des noyaux cellulaires ne renferment pas de fer. Des analyses chimiques de sperme d'oursin (MASING), de sperme de hareng ou de thymus de veau (SAUERLAND), ensembles de cellules très riches en matière nucléaire, n'ont d'ailleurs permis de déceler que d'infinitésimales quantités de fer. Déjà, en 1892, GILSON avait insisté sur la formidable affinité que possède le noyau pour le fer : le fer que les anciens auteurs décelaient dans les noyaux provenait en réalité de leurs réactifs. Dans des études extrêmement précises, A. WIENER a prouvé la réalité du point de vue de GILSON. Il faut lire le travail de WIENER pour se rendre compte de la difficulté que l'on a à éviter toute contamination par les réactifs. Tous les réactifs donnés comme purs contiennent, en réalité, du fer; une quantité extrêmement minime, à la limite des possibilités analytiques, est déjà suffisante pour produire des contaminations notables. Il faut s'astreindre à toutes sortes de précautions spéciales. Tous les réactifs, tous les liquides devant servir à la fixation ou à l'inclusion doivent être purifiés et analysés à plusieurs reprises, jusqu'à ce que l'on soit certain de l'absence de la plus minime trace de fer; on ne peut employer que du verre Pyrex; on doit prohiber de façon absolue l'emploi de tout instrument et de tout ustensile en fer ou renfermant du fer.

Cette propriété d'adsorber le fer, de l'accumuler, même à partir de solutions extrêmement étendues, n'est d'ailleurs pas propre aux noyaux cellulaires. Pas mal d'éléments très divers peuvent se comporter de même. On peut faire la remarque qu'il s'agit en général de formations à caractère basophile prononcé. Ainsi les blocs de NISSL, la substance fondamentale

de l'os (CAMERON), des membranes végétales (DEVAUX). En ce qui concerne l'os, CAMERON observe qu'un séjour de 24 heures dans des solutions aqueuses ne renfermant qu'une partie de sulfate de fer pour un million suffit à rendre positive la réaction du fer dans des pièces qu'une analyse préliminaire avait montré rigoureusement privées de fer.

Tout cela démontre que, dans la recherche du fer masqué d'après la méthode de MACALLUM, la plus grande prudence s'impose. La méthode est capable de démasquer quelques composés ferrugineux, au nombre desquels on peut ranger certainement certains pigments de désintégration de l'hémoglobine; elle est incapable de démasquer la plupart des autres combinaisons ferrugineuses de l'organisme; enfin, des résultats absolument erronés ont été causés par des phénomènes d'adsorption élective de fer présent en quantité infinitésimale dans les réactifs employés.

B. *Démasquage par le chlore-tétrachlorure de carbone* (KOCKEL). — KLEIN avait signalé que le traitement de frottis sanguins par les vapeurs de brome permettait d'obtenir la réaction du bleu de Prusse sur les globules rouges. Mais les éléments cellulaires sont alors devenus méconnaissables.

KOCKEL est arrivé à démasquer le fer de l'hémoglobine par l'action du chlore dissous dans le tétrachlorure de carbone.

*Technique.* — Fixer au formol ou à l'alcool. Couper à la paraffine ou par congélation. Les coupes, imprégnées d'alcool, sont passées dans du tétrachlorure de carbone pur, puis pendant 20 minutes dans du tétrachlorure de carbone saturé de chlore sec. Après ce traitement, les coupes sont retirées et on laisse s'évaporer le tétrachlorure de carbone et le chlore. Puis on effectue une des réactions histochimiques du fer décrites plus haut; de préférence la réaction du bleu de Prusse ou la réaction de l'acide sulfocyanhydrique.

Nous donnons cette méthode à titre indicatif; nous l'avons essayée, dans le but de mettre en évidence le fer de l'hémoglobine, et n'avons obtenu que des résultats négatifs.

C. *Démasquage par micro-incinération* (POLICARD). — La micro-incinération est la seule méthode capable de libérer de façon certaine le fer occulte des tissus. Après la combustion, les cendres ferrugineuses se reconnaissent à leur couleur rouge ou jaune, suivant qu'elles sont mélangées ou non à des cendres blanches. La méthode est rigoureusement spécifique, car l'oxyde de fer est la seule substance colorée parmi les cendres des tissus. Elle est sûre, car le fer est libéré intégralement de ses combinaisons.

Enfin, sa sensibilité est très grande. POLICARD vient récemment de montrer qu'un observateur exercé peut déceler, par la coloration jaune des cendres, une quantité de fer égale à  $3,75 \times 10^{-7} \gamma$ .

La méthode de détection du fer total par micro-incinération est donc de loin la meilleure de toutes les méthodes de recherche du fer masqué, comme l'ont indiqué MARZA, MARZA et CHIOSA, au terme d'une soigneuse étude comparative. Bien entendu, on ne pourra espérer avoir des résultats très exacts que si l'on évite très soigneusement les diverses causes de contamination dont on a parlé plus haut. Les précautions nécessaires sont d'ailleurs bien plus faciles à prendre que celles qui sont de rigueur dans les méthodes de MACALLUM, car le nombre de réactifs à employer est réduit à un minimum. Signalons seulement, après SCOTT, que des précautions spéciales doivent être prises en ce qui concerne le rasoir. Un rasoir fraîchement aiguisé donne de nombreuses particules ferrugineuses qui viennent se déposer sur la coupe.

Les indications pratiques suivantes résument l'ensemble de l'étude qui précède :

*a. Fer ionique.* — Fer ferrique : réaction du bleu de Prusse et accessoirement à l'acide sulfocyanhydrique. Fer ferreux : réaction du bleu de Turnbull. Fer ionique total : réaction de TIRMANN et SCHMELTZER.

*b. Fer masqué, mais facilement démasquable.* — Démasquage à l'alcool acide d'après MACALLUM, puis réaction du bleu de Prusse, ou de TIRMANN-SCHMELTZER.

*c. Fer total.* — Micro-incinération.

Les autres méthodes de recherche ou de démasquage du fer ne nous paraissent pas à conseiller.

\*  
\* \*

## CUIVRE.

La détection histochimique du cuivre présente un intérêt biologique assez grand. D'une part, en effet, ce métal intervient dans la constitution de pigments respiratoires chez certains Invertébrés (hémocyanine chez de nombreux Mollusques et quelques Arthropodes). On doit donc s'attendre là à un métabolisme particulièrement intense de ce métal. Des recherches histochimiques dans ce domaine ont été effectuées par BOYCE et HERDMANN et par MENDEL et BRADLEY.



D'autre part, le foie renferme normalement du cuivre, en petite quantité (dans le foie du fœtus humain, 1,75  $\gamma$  par milligramme de foie, d'après RAMAGE et SHELDON). Dans ces dernières années, on a soutenu qu'il existe un rapport entre l'augmentation de la teneur du foie en cuivre et le développement des cirrhoses hépatiques atrophiques type LAENNEC (ASKANAZY, MALLORY). Enfin, MALLORY, PARKER et NYE ont suggéré que l'hémochromatose pourrait être due à un empoisonnement chronique par le cuivre. Dans le but de vérifier ces idées, des études histochimiques ont été entreprises afin de déceler et de localiser le cuivre dans le foie; ont été employées des méthodes histochimiques pures (MALLORY et PARKER) et des méthodes histospectrographiques (POLICARD, GERLACH).

Les techniques utilisées par les auteurs cités ont été les suivantes :

BOYCE et HERDMANN, sur des tissus de Mollusques, utilisent le recouplement de trois méthodes : 1<sup>o</sup> action du sulfure d'ammonium à 1,5 pour 100 acidulé par 0,5 pour 100 de HCl : formation de sulfure de cuivre noir (réaction non spécifique); 2<sup>o</sup> action d'une solution à 0,025 pour 100 d'hématoxyline pure, qui donne naissance en 5 à 15 minutes à la laque de cuivre bleu foncé (réaction non spécifique); 3<sup>o</sup> action du ferrocyanure de potassium; formation de ferrocyanure de cuivre rouge (réaction spécifique).

Outre ces méthodes, MENDEL et BRADLEY emploient une solution concentrée d'acide bromhydrique renfermant une trace de brome libre. Entre lame et lamelle, ce réactif développe une couleur violet intense, mais disparaissant après quelque temps. Cette réaction est hautement spécifique.

MALLORY et PARKER, dans leurs études sur les cirrhoses et l'hémochromatose ont utilisé également l'action de l'hématoxyline. Ils fixent les tissus, soit dans l'alcool à 95<sup>o</sup>, soit dans du formol à 10 pour 100 tamponné à pH 7,0. Sur les coupes, ils font agir une solution à 0,5 pour 100 d'hématoxyline pure, tamponnée à pH 7,0. Les composés cuivriques sont colorés en bleu à bleu noir, tandis que l'hémosidérine est brun à brun noirâtre. Comme contrôle de cette réaction, ils utilisent une réaction microchimique de cristallisation : sur une coupe, on dépose un cristal d'acétate de sodium, puis une ou deux gouttes d'une solution saturée de nitrite de potassium, puis une ou deux gouttes d'acide acétique. Enfin, on dissout une petite quantité d'acétate de plomb dans le mélange, recouvre la préparation d'une lamelle et attend sous le microscope le développement à la surface de la coupe, de cristaux jaune foncé quadrangulaires apparaissant noirs lorsque leur taille devient suffisante. Cette dernière réaction ne permet évidemment pas de localisation du composé cuivrique et ne peut servir que de test chimique de la présence de cet élément.

Des résultats obtenus dans la recherche histochimique du cuivre, nous ne retiendrons que ceux qui ont été obtenus chez les Vertébrés. MALLORY et PARKER ont tout d'abord étudié l'empoisonnement expérimental du cobaye par le cuivre. Cet empoisonnement produit de l'anémie, de l'hémoglobinurie, de la nécrose des cellules hépatiques et des cellules rénales,

et enfin de la pigmentation hépatique. Le pigment qui se forme donne les réactions du cuivre; les auteurs suggèrent qu'il serait formé par une combinaison du cuivre avec un dérivé de l'hémoglobine; outre les réactions du cuivre, ce pigment donnerait en effet les réactions caractéristiques de l'hémofuscine. Au bout de quelques semaines, la réaction du cuivre commence à s'affaiblir et le pigment est alors de l'hémofuscine pure; plus tard, il se transforme en hémosidérine (donnant donc les réactions du fer). Dans l'hémochromatose, MALLORY et PARKER retrouvent le même pigment dans les îlots de régénération du foie et dans les masses de bile concentrée. Ce pigment suit une évolution analogue à celle qui a été décrite : cuivre-hémofuscine, hémofuscine, hémosidérine; mais cette évolution s'effectue ici lentement et demande des années.

On pourrait reprocher aux résultats de MALLORY et PARKER de n'avoir pas été obtenus par une méthode irréprochable. La coloration bleu foncé de la laque de cuivre de l'hématoxyline ne nous paraît pas très différente de la coloration bleu noir de sa laque ferrugineuse. La confusion entre pigments cuivreux et pigments ferrugineux peut donc être facilement commise. Et comme le test de contrôle de MALLORY et PARKER ne permet pas une localisation histologique, la constitution des pigments de MALLORY et PARKER peut rester douteuse. Les études de ces auteurs gagneraient beaucoup à être reprises en contrôlant la réaction à l'hématoxyline par des méthodes vraiment spécifiques, comme la technique au ferrocyanure de BOYCE et HERDMANN ou la méthode à l'acide bromhydrique de MENDEL et BRADLEY.

Par la voie histospectrographique, beaucoup plus sûre chimiquement, POLICARD a recherché le cuivre dans des foies normaux, des foies d'animaux intoxiqués et des foies cirrhotiques, dont certains avaient déjà été étudiés par MALLORY et PARKER eux-mêmes. Dans l'ensemble, les résultats de cette méthode semblent confirmer ceux des auteurs américains. La répartition du métal dans le foie n'est pas régulière. Spécialement, dans le cas de cirrhoses, il y a des territoires où le cuivre est accumulé, tandis que d'autres en demeurent dépourvus. Malheureusement, la méthode histospectrographique ne permet pas une localisation histologique assez précise, car il n'a pas été possible à POLICARD de déterminer de façon précise le caractère histologique des points d'accumulation cuprique. Les résultats de l'étude histospectrographique sont donc assez fragmentaires au point de vue morphologique; cependant, leur rigoureuse exactitude au point de vue chimique en fait des documents d'une haute valeur.

\*  
\* \*

## ZINC.

MENDEL et BRADLEY ont essayé de mettre en évidence le zinc dans l'hépatopancréas des Mollusques (où l'analyse chimique en démontre l'existence en grande quantité, 2 pour 100 du tissu sec, 9-15 pour 100 des cendres). Ils transforment le zinc en nitroprussiate de zinc insoluble et caractérisent ce nitroprussiate par l'action d'un sulfure alcalin (couleur rouge).

Les coupes à la paraffine sont traitées pendant 15 minutes à 50° par une solution à 10 pour 100 de nitroprussiate de soude; laver à l'eau courante *très* soigneusement (15 minutes). La coupe est couverte d'une lamelle; on introduit entre lame et lamelle une goutte d'une solution de sulfure de potassium. Il se produit une couleur pourpre intense.

La réaction serait assez spécifique, car les tissus où l'analyse ne décèle que des traces de zinc ne donnent jamais la réaction.

\*  
\* \*

## BISMUTH.

Le bismuth introduit dans l'organisme peut être mis en évidence par la méthode de CHRISTELLER-KOMAJA, basée sur la formation d'un iodo-bismuthate de quinine très peu soluble et de couleur jaune brun foncé.

Fixer au formol. Couper par congélation. Traiter les coupes 1 minute par le réactif préparé comme suit : solution *a* : sulfate de quinine, 1<sup>g</sup> + H<sup>2</sup>O, 50<sup>cm<sup>3</sup></sup> + acide nitrique, X gouttes; solution *b* : iodure de potassium, 2<sup>g</sup> + H<sup>2</sup>O distillée, 50<sup>cm<sup>3</sup></sup>. Conserver *a* et *b* séparément. Au moment de l'emploi, mélanger parties égales de *a* et *b* et ajouter 2 gouttes d'acide nitrique officinal. Filtrer. Rincer très rapidement dans : H<sup>2</sup>O, 10<sup>cm<sup>3</sup></sup> + NO<sup>2</sup>H, 2 gouttes. Coller la coupe sur porte-objet, essorer, monter. Coloration de contraste facultative au violet de gentiane. Le bismuth apparaît en grains brun foncé.

Cette méthode a été utilisée par CALIFANO, CHRISTELLER, KOMAJA, VONKENNEL dans leurs études sur la Chimiothérapie par les composés bismuthiques.

\*  
\* \*

## MANGANÈSE.

Étant donnée l'importance biologique du manganèse, dont le rôle dans les processus oxydasiques a bien été mis en évidence par les célèbres travaux de G. BERTRAND sur la laccase, la recherche histochimique de ce

métal se présente comme un problème intéressant, qui n'a toutefois pas été beaucoup étudié jusqu'ici.

BEHRENS et GÖSSL, sur une coupe de tissu frais, déposent une goutte d'une solution de phosphate ammoniaco-sodique  $\text{NaNH}_4\text{PO}_4\text{H}$  et placent le tout dans une atmosphère de vapeurs d'ammoniaque; il se forme un précipité brun clair, d'abord amorphe, puis cristallin de phosphate ammoniaco-manganeux  $\text{MnNH}_4\text{PO}_4$ . Le fer et le magnésium interfèrent en donnant des complexes analogues  $\text{FeNH}_4\text{PO}_4$  et  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ . Mais le sel manganeux est le seul qui résiste à un lavage prolongé et le seul qui brunisse par l'action de permanganate de potassium.

BUREAU, ayant repris l'étude de cette méthode, aboutit à en nier la valeur. Au point de vue chimique pur, le principe de la méthode de BEHRENS et GÖSSL est exact; en revanche, essayée sur les feuilles d'*Aucuba* et sur les branchies d'*Anodonta* qui sont très riches en manganèse (DUBUISSON et VAN HEUVERSWYN), elle s'est montrée inutilisable. La précipitation du manganèse ne se produit que sur des tissus frais et seulement au bout d'un à deux jours d'action du réactif. Au bout de ce temps nécessaire au démasquage du métal, les altérations du tissu sont tellement grandes que la préparation est illisible.

\*  
\* \*

OR.

Les composés auriques introduits dans les organismes peuvent être mis en évidence histochimiquement par les méthodes suivantes :

A. *Méthode de CHRISTELLER*, modifiée par MICHAELIS. — Principe : réduction des sels d'or en pourpre de Cassius au moyen du chlorure stanneux.

Fixer au formol ou à l'alcool absolu. Traiter les coupes 10 minutes au bain-marie ou 36 heures à 56° par : solution  $\text{SnCl}_2$  à 5 pour 100, 10; H Cl concentré, 1.

Coloration de fond au carmin aluné. L'or apparaît sous forme de granulations noires ou brun foncé.

La méthode de CHRISTELLER a été utilisée par GALLINAL, OKKELS, MICHAELIS, GAUTHIER-VILLARS et a été considérée par ces auteurs comme fournissant de bons résultats.

Cependant, elle offre un inconvénient assez sérieux (GÉRARD et CORDIER). Le précipité de pourpre de Cassius ne se produit qu'après dissolution

préalable du composé aurique dans le réactif. Il s'ensuit qu'il ne se dépose pas rigoureusement à l'endroit où se trouvait le composé aurique primitif. Dans les cas favorables, cette précipitation se fait immédiatement autour du composé aurique, lui formant une auréole. D'autres fois, elle se fait à distance, au niveau surtout du conjonctif et des basales.

Tous les composés auriques ne peuvent être mis en évidence par la méthode de CHRISTELLER. Les formes inorganiques, comme la Sano-crycine ou la Chrysalbine (aurothiosulfate de Na) réagissent bien. Au contraire, des composés organiques, comme le 2949 I. G. Farbenindustrie, ne donnent que des résultats négatifs (MICHAELIS).

*Méthode de BORCHARDT*, modification de MICHAELIS. — Principe : les sels d'argent mettent en liberté l'or de ses sels, parce que l'argent précède l'or dans la série électrolytique des tensions (1).

Fixer au formol ou à l'alcool. Traiter les coupes 15 minutes au bain-marie bouillant ou 12 à 24 heures à 40° par une solution de nitrate d'argent à 5 pour 100; pour enlever l'argent précipité dans la coupe, traiter la coupe par l'acide nitrique à 20 pour 100. Résultat : granulations noires.

Cette méthode est beaucoup plus sûre que la précédente, de l'avis de MICHAELIS et de GÉRARD-CORDIER.

*Méthode de OKKELS*. — Principe : la lumière, par action photochimique, met en liberté l'or de ses sels. Les coupes sont simplement exposées à l'action de la lumière solaire pendant au moins 12 heures, ou d'une lampe à rayons ultraviolets pendant le même temps (GAUTHIER-VILLARS). Les résultats sont comparables à ceux de la méthode de CHRISTELLER, mais la réduction est généralement moins complète.

Quelle que soit la méthode employée, vérifier que les granulations noires sont bien constituées par de l'or métallique : insolubles dans les acides concentrés, solubles dans l'eau régale ( $= \text{NO}^3\text{H} + \text{HCl aa.}$ ), solubles dans les solutions de cyanure de K ou de Na.

Signalons enfin que l'or peut être détecté par voie histospectrographique (GERLACH, POLICARD). Cette méthode, beaucoup plus sensible que toutes les autres, permet de déceler avec sécurité l'or dans des organes qui n'en

---

(1) C'est du moins l'explication que BORCHARDT donne de sa réaction. Elle ne nous paraît pas convaincante.

montrent aucune trace par les méthodes usuelles. Malheureusement, elle ne permet pas une localisation suffisamment précise.

\*  
\* \* \*

#### PLOMB.

Les sels de plomb injectés dans l'organisme peuvent être décelés par les méthodes suivantes :

A. *Méthode au chromate* (FRANKENBERGER, CRÉTIN). — Les pièces sont simplement fixées avec un liquide bichromaté neutre, tel que le *Regaud*. Le plomb est précipité sous forme de chromate de plomb jaune insoluble, très facilement identifiable. Coloration au bleu de toluidine. Cette méthode, employée également par TRUC, joint une bonne spécificité à une fixation histologique impeccable.

B. *Méthode par micro-incinération* (TADA). — Les coupes sont incinérées, puis, après collodionnage, traitées par  $H^2S$ , un chromate ou un iodure alcalin. Il y a formation respectivement de sulfure de Pb noir, de chromate jaune ou d'iodure jaune. Cette méthode, purement topographique, convient mal à une recherche cytologique précise.

C. *Méthodes au sulfure*. — 1<sup>o</sup> Méthode d'IWAHASHI : fixer au formol; traiter les coupes par une solution de sulfure d'ammonium. Le plomb apparaît en noir. IWAHASHI contrôle la spécificité de la réaction par l'action de  $H^2O^2$  qui doit décolorer le  $PbS$ ; 2<sup>o</sup> Méthode de OKKELS : fixer deux jours au liquide de ALMKVIST (voir ci-après : mercure). Après fixation, laver 24 heures à l'eau courante. Inclure à la paraffine. Dans les coupes, les dépôts de plomb se présentent en noir sur fond jaune.

Ces dernières méthodes nous paraissent moins bonnes : la qualité histologique du fixateur est moindre; la formation de sulfure de fer interfère avec celle de sulfure de plomb et nécessite donc un contrôle sur des pièces témoins (se rappeler que dans les intoxications par le plomb, il existe de graves perturbations dans les organes hématopoiétiques avec formation de dépôts ferrugineux).

D. Détection par voie autoradiographique, voir BEHRENS et BAUMANN.

\*  
\* \*

## MERCURE.

Les sels de mercure introduits dans l'organisme peuvent être retrouvés par les méthodes suivantes :

A. *Méthode d'ALMKVIST-CHRISTELLER.* — Fixer deux jours dans : solution saturée d'acide picrique 100 + acide nitrique à 25 pour 100 : 1 ; saturer de H<sup>2</sup>S gazeux ; laisser reposer un jour et filtrer. Après fixation, laver 24 heures à l'eau courante, inclure à la paraffine. Mercure sous forme d'un précipité noir de sulfure de mercure.

Des pièces de contrôle, fixées avec des fixateurs normaux, traitées de façon à mettre le fer en évidence, sont nécessaires car le fixateur d'ALMKVIST transforme le fer en sulfure (noir) qu'on peut confondre avec le sulfure de mercure.

SIMONNET fixe 10 heures dans : alcool-chloroforme à parties égales 100<sup>cm<sup>3</sup></sup> + acide nitrique 2<sup>cm<sup>3</sup></sup>, le tout saturé de H<sup>2</sup>S par barbotage.

B. *Méthode de LOMBARDO-DEBENEDETTI.* — Fixer au formol. Les coupes sont traitées par une solution acide de chlorure stanneux (on peut utiliser le réactif de CHRISTELLER-MICHAELIS pour la recherche de l'or). Les sels de mercure sont réduits à l'état de mercure métallique qui apparaît en noir.

C. *Méthode de BRANDINO.* — Fixer au formol ou à l'alcool. Les coupes sont traitées par une solution à 1 pour 100 de diphénylcarbazine. Le mercure fournit un précipité violet. Ce procédé, qui est très sensible, a permis à l'auteur de retrouver le sublimé dans des organes de malades décédés d'intoxication mercurielle et conservés dans le formol depuis 17 ans.

\*  
\* \*

## NICKEL.

A notre connaissance, le nickel n'a été recherché histochimiquement dans les tissus animaux que par CRÉTIN et POUYANNE, dans leurs études sur l'action des métaux sur la consolidation osseuse. Fixer dans : formol, 30 ; sérum physiologique, 100 ; sulfhydrate d'ammonium, 5 gouttes ; puis immerger la pièce dans une solution de phosphate ammonique pour obtenir le sel double NH<sup>4</sup>NiPO<sup>4</sup> + 6 H<sup>2</sup>O insoluble. Décalcifier. Sur les

coupes, colorer le nickel par une solution alcoolique d'hématoxyline pure. Il y a formation d'une laque de nickel lilas, apparaissant en bleu lorsqu'elle est abondante.

\*  
\* \* \*

#### URANIUM.

Les sels d'urane injectés dans les tissus peuvent être décelés histologiquement en se basant sur la formation d'urani-ferrocyanure de potassium, de couleur brun foncé. SCHNEIDER, dans le but de fixer et de déceler en même temps les sels d'urane, fixe par : ferrocyanure de potassium à 5 pour 100, 50<sup>cm<sup>3</sup></sup>; solution saturée d'acide picrique, 50<sup>cm<sup>3</sup></sup>; acide chlorhydrique, 10<sup>cm<sup>3</sup></sup>; après fixation, lavage dans H Cl à 4 pour 100; puis alcool 80° acidifié par H Cl; inclusion et coupe.

GÉRARD et CORDIER décelent les sels d'urane retenus dans les cellules rénales en traitant les coupes exactement par les mêmes réactifs que ceux qui servent à déceler le fer par la méthode au bleu de Prusse. Les sels d'urane se colorent en brun foncé. La méthode est d'une haute spécificité.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

*Potassium.* — LLOYD (F. E.), *Flora*, 18, 1925, p. 369. — LIESEGANG, *Z. wiss. M.*, 31, 1914. — MACALLUM (A. B.), *Abderh. Hdb. Bio.*, V, 2, p. 1099; *J. Physiol.*, 32, 1905, p. 95. — JACOBI et KEUSCHER (W.), *A. Psych.*, 79, 1927, p. 323. — ROHDENBURG et GEIGER (J.), *A. Path.*, 6, 1928, p. 215. — SCHULZE (W.), *A. Entw. Mech.*, 106, 1925. — VAN GULICK (P. J.), *A. néerl. Physiol.*, 6, 1922, p. 328. — WATERMANN, *Bio. Z.*, 132, 1922, p. 535. — WOERDEMANN, *Koninkl. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam*, 1920.

*Thallium.* — BARBAGLIA (V.), *Studi Sassari*, 8, 1930, p. 253.

*Calcium.* — ASCHOFF (L.), *Verkalkung in Erg. d. allg. Path.*, 8, 1902. — BENEDETTI-PISCHLER (A.) in *Klein-Strebinger. Fortschritte der Mikrochemie*, 1928 (Deuticke Leipzig-Wien). — CAMERON (G. R.), *J. Path.*, 33, 1930, p. 329. — COWPER-EAVES (E.), *Brain*, 49, 1926. — CRÉTIN (A.), *Ass. Anat.*, 17, 1922, p. 100; 18, 1923, p. 163; 19, 1924; *Bull. Hist.*, 1, 1924, p. 334; *Recherches sur l'ossification et la réparation des os fracturés*, 1925 (imprimerie de l'Institut commercial, Le Mans). — DENIGÈS, *Acad.*, 170, p. 996. — FLESCHE, *Z. wiss. M.*, 2, 1885, p. 464. — FREUDENBERG (E.), *Kl. W.*, 5, 1926, p. 64. — GOHS (W.), *Zbl. Path.*, 28, 1933, p. 273. — GÖMÖRI (C.), *Virch.*, 286, 1932, p. 682. — GRANDIS et MAININI, A., *Ital. Biol.*, 34, 1900, p. 73; 38, 1902, p. 143. — HALLIBURTON, *J. Physiol.*, 13, 1892, p. 807. — HUGOUNENC et MOREL, *Acad.*, 140, 1905, p. 1065. — JACOBI et KEUSCHER (W.), *A. Psych.*, 79, 1925, p. 323. — KISSER (J.), *Mikroch.*, 1, 1923, p. 25; *Pharmaz*



*Presse*, 4, 1923. — KLOTZ (O.), *J. exp. Med.*, 7, 1905, p. 633. — VON KOSSA, *Ziegl.*, 19, 1901, p. 163. — LEMBERG, *Z. Geol. Gesellsch.*, 44, 1892. — LONNBERG, *Skand. A. Physiol.*, 3, 1901, p. 1. — MACALLUM (A. B.), *Abderh. Hdb. Bio.*, V, 2, 1912; *Sc.*, 62, 1925, p. 511. — MERKEL, *Die Speichelröhren*, 1883 (Rektoratsprogramm, Leipzig). — PRENANT (M.), *Bull. biol. Fr. Belg.*, 58, 1924; *Ann. Physiol.*, 1927; *A. Zool.*, 65, 1926; *Bull. biol. Fr. Belg.*, 62, 1928, p. 21; *Biol. Rev.*, 2, 1927, p. 365. — POLICARD (A.), *Bull. Hist.*, *passim*. — POMMER (G.), *Z. wiss. M.*, 2, 1885. — QUERCIGH, *Lincei*, 5, 1915, p. 24 et 1231. — RABL (C. H. R.), *Kl. W.*, 2, 1923, p. 1644; 5, 1926, p. 365. — ROEHL, *Ziegl. Festschrift Arnold*, 1905. — ROHDENBURG (G. L.) et GEIGER (J.), *A. Path.*, 6, 1928, p. 215. — SACERDOTE (G.), *A. per le Sc. Medicine*, 51, 1926, p. 329. — SCHMIDT (W. J.), *Die Bausteine des Tierkörpers in polarisiertem Lichte*, 1923 (Cohen, Bonn). — SCHMORL, *Pathologisch-Anatomische Untersuchungenmethode* (Leipzig). — SCHULTZE, *Verkalkung in Erg. d. allg. Path.*, 14, 1910. — SCHULTZ-BRAUNS, *Virch.*, 273, 1929, p. 1. — SCHULZE (W.), *A. Entw. Mech.*, 106, 1925. — SCHUSCİK (O.), *Z. wiss. M.*, 37, 1920. — SCHUJENINOFF, *Z. wiss. M.*, 18, 1897. — SCOTT, *Prof.*, 20, 1933, p. 133. — SPALTEHOLTZ (W.), *Ueber das Durchsichtigmachen von menschlicher und tierischer Präparate, nebst Anhang über Knochenfärbung* (Leipzig, 1911). — STOELZNER, *Virch.*, §180, 1905. — STRELZOFF, *Unt. path. Inst. Zürich*, 1873. — SUMITA MASAO, *Virch.* 200, 1910. — TURCHINI (J.), *Ass. Anat.*, 19, 1924.

*Magnésium*. — CRÉTIN (M.) et POUYANNE, *Bordeaux Chirurg.*, n° 3, 1933.

*Fer*. — ABDERHALDEN (E.), *Z. Biol.*, 39, 1900, p. 113. — ASVADOUROVA, *Ass. Anat.*, 1909. — BEST, *Verh. dtsh. path. Ges.*, 8, H. 2, 1904. — DEVAUX (M.), *Proc. verb. Soc. Linnéenne Bordeaux*, 1901. — DEL RIO HORTEGA (P.), *Bol. R. Soc. Españ. Hist. Nat.*, 27, 1927, p. 199. — DIÉTERLE (A.), *Path.*, 10, 1931, p. 740. — FALKENBERG, *Zbl. Path.*, 15, 1910, p. 662. — GANS (A.), *Z. wiss. M.*, 40, 1924, p. 310. — GILSON, *Rep. Brit. Ass. for Advanc. Sc.*, 1892, p. 778. — GRYNFELT et CRISTOL, *Soc. Chim. Biol.*, 5, 1923, p. 797. — HALL (W. S.), *A. Anat. and Physiol. Abt. Physiol.*, 49, 1896. — KOCKEL (H.), *Virch.*, 277, 1930, p. 856. — LIESEGANG (R.), *Z. wiss. M.*, 40, 1923. — MACALLUM (A. B.), *J. micr. Sc.*, 38, 1895, p. 175; *J. Physiol.*, 22, 1907, p. 92. — MARZA et CHIOSA (L.), *Bull. Hist.*, 9, 1932, p. 213. — MOLISCH, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 11, 1893. — MARFORI, *A. ital. Biol.*, 30, 1898. — MOLISCH, *Die Pflanzen in ihren Beziehungen zum Eisen*, 1892 (Iéna). — NISHIMURA, *Zbl. Path.*, 21, 1910, p. 10. — OKKELS (H.), *Z. wiss. M.*, 47, 1930, p. 69. — PERLS, *Virch.*, 39, 1866. — POLICARD (A.), *Acad.*, 176, 1923; *Bull. Hist.*, *passim*. — RATHERY et DOUBROW (S.), *Ass. Anat.*, 27, 1932, p. 455. — RICHTER (O.), *Z. wiss. M.*, 39, 1922, p. 1. — SCHMELTZER (W.), *Z. wiss. M.*, 50, 1933, p. 99. — SPATZ (H.), *Verh. dtsh. path. Ges.*, 19, 1923, p. 222. — SWIRSKI (G.), *A. ges. Physiol.*, 74, 1899, p. 466. — TARTAKOWSKY, *A. ges. Physiol.*, 100, 1903, p. 586. — WIENER (A.), *Bio. Z.*, 77, 1916, p. 27. — VILLARET, JUSTIN-BESANÇON, DOUBROW et EVEN, *Biol.*, 108, 1931, p. 954. — WEIL (A.), *Abderh. Hdb.*, V, 2, I, 1928, p. 437.

*Zinc*. — MENDEL (L. B.) et BRADLEY (H. C.), *Amer. Jl physiol.*, 14, 1905, p. 311.

*Cuivre*. — BOYCE et HERDMANN, *Rep. Thompson Yates Labor.* (Liverpool, 1899). — MALLORY (F. B.) et PARKER (F. J.), *Amer. Jl Path.*, 7, 1931, p. 352 et 365. — MENDEL et BRADLEY (H. C.), *Amer. Jl Physiol.*, 14, 1905, p. 311. — POLICARD (A.), *Biol.*, 112, 1933, p. 1418; *Bull. Hist.*, 10, 1933, p. 94.

*Bismuth.* — CALIFANO (L.), *Z. Krebsf.*, 26, 1928, p. 183. — CHRISTELLER (E.), *Med. Kl.*, n° 16, 1926. — KOMAYA (G.), *A. Derm. Syph.*, 149, 1925, p. 277. — VON KENNEL, *Verh. dtsh. Derm. Ges.* (Bonn, 1927).

*Manganèse.* — BEHRENS (H.), *Mikrochemische Analyse organischer Verbindungen*, 1897. — BUREAU (V.), *A. Biol.*, 45, 1934, p. 391. — DUBUISSON et HEUVERSWIJN (J.), *A. Biol.*, 42, 1930. — GOSSL, *Beih. Bot. Zbl.*, 18.

*Or.* — BORCHARDT, *Virch.*, 267, 1928, p. 272. — CHRISTELLER (E.), *Verh. dtsh. path. Ges.*, 22, 1927, p. 173. — GALLINAL, *Z. Tuberk.*, 48, 1928, n° 6. — GAUTHIER-VILLARS (P.), *Biol.*, 109, 1932, p. 197. — GERLACH (W.), *Virch.*, 282, 1931, p. 209. — GÉRARD P. et CORDIER (R.), *Bull. Acad. Roy. Méd. Belgique*, 1934, p. 160. — OKKELS (H.), *Biol.*, 102, 1929, p. 1089. — KUROSU, *Z. exp. Med.*, 57, 1927. — MICHAELIS, *Bio. Z.*, 225, 1930, p. 478. — TIMM (F.), *Z. gerichtl. Med.*, 20, 1933, p. 211.

*Plomb.* — BEHRENS (B.) et BAUMANN (A.), *Z. exp. Med.*, 92, 1933, p. 251. — CRÉTIN (A.), *Ass. Anat.*, 24, 1929, p. 171. — FRANKENBERGER (Zd.), *Ass. Anat.*, 16, 1921, p. 241. — IWASHI, *Verh. jap. path. Ges.*, 1927. — OKKELS (H.), *Biol.*, 102, 1929, p. 1089. — TADA, *Verh. jap. path. Ges.*, 1927. — TRUC (E.), *Bull. Hist.*, 6, 1929, p. 393.

*Mercure.* — BRANDINO (G.), *Studi Sassari*, 5, 1927, p. 85. — SIMONNET (M.), *Ass. Anat.*, 25, 1930.

*Nickel.* — CRÉTIN et POUYANNE, *Bordeaux chirurgical*, 3, 1933.

*Uranium.* — GÉRARD (P.) et CORDIER (R.), *A. Biol.*, 43, 1932, p. 367. — SCHNEIDER (G.), *Skand. A. Physiol.*, 14, 1903, p. 383.



## CHAPITRE VIII.

### ÉTUDE DES ANIONS.

---

#### CHLORE.

A. *Chlorures*. — De nombreux auteurs se sont préoccupés de déceler et de localiser histochimiquement les chlorures dans les tissus animaux, surtout dans le but d'étudier leur élimination rénale.

Toutes les méthodes qu'ils ont proposées sont des méthodes argentiques. Le chlore est précipité sous forme de chlorure d'argent par l'action d'un sel d'argent, le plus généralement en solution nitrique, et l'on met secondairement l'argent en évidence soit par l'action d'un réducteur chimique, soit par l'action de la lumière. Ce sont donc des méthodes indirectes.

Des nombreuses variantes proposées par différents auteurs (MACALLUM, MONTI, LESCHKE, MACDONNARD, GROEBBELS, DEFRISE), nous ne citerons que quelques-unes, à titre documentaire.

MACALLUM plonge les cellules isolées ou les tissus dissociés dans une solution n/10 de nitrate d'argent, acidifiée à raison de 25<sup>mm</sup> d'acide nitrique à 60 pour 100 par litre de solution. Après avoir laissé agir une demi-heure, on expose la préparation au soleil ou à une forte lumière pendant une demi-heure; rinçage et examen dans la glycérine.

LESCHKE fixe des pièces de 0<sup>mm</sup>,5 à 1<sup>mm</sup> d'épaisseur au plus dans une solution renfermant 1 à 3 pour 100 de nitrate d'argent et 1 pour 100 d'acide nitrique, pendant 12 à 24 heures et à l'obscurité. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée, à l'obscurité; réduire 10 à 20 heures dans un révélateur photographique à l'hydroquinone. Inclure, couper, colorer les noyaux au carmin aluné.

GROEBBELS fixe de petites pièces 24 heures dans du nitrate d'argent nitrique à l'obscurité; après 24 heures, ajouter à cette solution 5 à 10 pour 100 de formol; rincer à plusieurs reprises à l'eau distillée, toujours dans l'obscurité. Ensuite, exposer à la lumière solaire ou aux rayons d'une lampe à arc pendant un ou plusieurs jours. Inclusion, etc.

DEFRISE fixe à 37° et à l'obscurité dans du nitrate d'argent nitrique, rince dans NO<sup>3</sup>H à 1 pour 100, inclut, et coupe, le tout à l'obscurité, rince de nouveau à l'acide nitrique, réduit dans un mélange de formol (1 partie) et d'alcool saturé de soude caustique (2 parties), passe à l'hyposulfite et colore les noyaux par un colorant quelconque.

Toutes ces méthodes doivent être considérées sans aucune valeur

histochimique; on n'est sûr, en effet, ni de l'exactitude de la localisation de l'ion chlore, ni de la spécificité de la réaction : ni les conditions chimiques, ni les conditions morphologiques requises pour une analyse histochimique exacte ne sont remplies.

Tout d'abord, les conditions morphologiques : l'ion chlore est extrêmement diffusible, les sels d'argent sont lourds et peu diffusibles. De plus, ils exercent une action coagulante énergique sur les matériaux cellulaires et ils se créent ainsi une barrière à leur propre pénétration. Il est donc impossible de précipiter les ions chlores rigoureusement *in loco*.

Enfin, comme on se trouve en milieu colloïdal, les conditions de la précipitation se trouvent fortement troublées. Les composés argentiques sont de ceux qui donnent le plus aisément les phénomènes de précipitation périodique du type des anneaux de LIESEGANG (les lignes de FROMMANN ne sont pas autre chose).

Cette critique est d'autant plus grave que tous les auteurs, sans exception, ont fait agir le sel d'argent sur des fragments de tissus ayant quelques millimètres d'épaisseur. Aucun n'a cherché à assurer une meilleure pénétration du réactif en le faisant parvenir aux cellules par la voie des vaisseaux.

On peut dire qu'en travaillant dans de telles conditions, non seulement les résultats *peuvent* être entachés d'erreur, mais encore qu'ils *sont* certainement erronés et que la localisation de l'ion chlore telle qu'elle a été décrite par les auteurs n'est certainement pas celle qui existait sur le vivant.

Non seulement la localisation de l'ion chlore est fautive, mais la réaction n'a même pas de valeur signalétique certaine.

Les auteurs se sont évidemment fait de grosses illusions sur la valeur spécifique de leurs réactions, en appliquant de façon trop brute les données de la Chimie inorganique. Celle-ci enseigne, comme on le sait, que tous les sels d'argent sont solubles dans l'acide nitrique, sauf les chlorure, bromure et iodure. En faisant donc agir sur les tissus une solution de nitrate d'argent acidulée par de l'acide nitrique, ils ont pensé précipiter exclusivement les sels haloïdes d'argent, tous les autres dérivés argentiques devant passer en solution; ils ont admis implicitement que le lavage suffit à enlever intégralement tous les dérivés argentiques solubles.

La réalité est tout autre. Comme tous les métaux lourds, l'argent est fortement adsorbable par certains éléments des tissus. De l'argent ainsi adsorbé, il est pratiquement impossible de se débarrasser, même par les lavages les plus soignés. Outre la précipitation des chlorures, les auteurs

obtiennent en réalité une imprégnation argentique de certaines formations cellulaires.

Ce que nous venons de dire n'est pas seulement basé sur des vues théoriques. Avec les méthodes qui sont supposées mettre en évidence de façon spécifique les chlorures, on peut obtenir de fort belles imprégnations d'éléments cellulaires très divers. Ainsi, DECKHUYZEN met en évidence les limites cellulaires en traitant par des solutions de nitrate d'argent nitrique, rinçant à l'eau acidulée par l'acide nitrique, et opérant une réduction ultérieure. Il est à noter que DECKHUYZEN, pour se débarrasser le plus possible des chlorures de l'organisme, les enlève au préalable par un lavage au nitrate de potassium! BERGH décrit une méthode très analogue dans le but de mettre en évidence les limites cellulaires des vaisseaux des Annélides. Ces méthodes de DECKHUYZEN et de BERGH sont absolument superposables aux méthodes de LESCHKE, de DEFRISE et de MACALLUM, par exemple.

Certains auteurs, comme ACHARD et AYNAUD, frappés par ces faits, ont admis que les imprégnations argentiques étaient dues en toute première ligne à la présence des chlorures dans les tissus. C'est une opinion qui, aujourd'hui, nous paraît encore défendable dans certains cas, mais qui est certainement trop absolue. ACHARD et AYNAUD eux-mêmes ont d'ailleurs bien dû reconnaître que certaines imprégnations argentiques sont sans relation aucune avec la présence des chlorures. Un des exemples qu'ils citent à ce point de vue est précisément constitué par les substances intercellulaires des membranes séreuses (qui, nous venons de le voir, sont parfaitement mises en évidence par les méthodes au nitrate d'argent nitrique). Ces « Kittsubstanzen » sont d'autre part imprégnées par beaucoup de méthodes non argentiques. On peut, par exemple, traiter les tissus par du ferrocyanure de potassium, puis par un sel ferrique : les « Kittsubstanzen » sont mises en évidence par formation de bleu de Prusse. Il s'agit alors, de toute évidence, de phénomènes adsorptifs et l'imprégnation à l'argent n'en est qu'une modalité. Tout cela démontre donc que la réaction au nitrate d'argent nitrique n'est en rien spécifique des chlorures.

Dans les écrits des auteurs qui ont employé ces réactions, on peut d'ailleurs assez facilement trouver des cas où ils ont admis la présence de chlorures, alors qu'il ne s'agit probablement que d'imprégnations argentiques très banales. Ainsi, GROEBBELS, étudiant le système nerveux par la méthode de LESCHKE, observe un dépôt d'argent réduit au niveau de nom-

breux éléments nerveux (dendrites, trophosponge dendritique, reticulum glial, etc.). De fil en aiguille, il en arrive à admettre que la méthode de GOLGI est une réaction histochemique des chlorures. On pourrait fort bien renverser le sens de son raisonnement, et cela paraîtrait plus vraisemblable : si la méthode de LESCHKE et la méthode de GOLGI donnent des résultats superposables dans certains cas, ce n'est pas parce que la réaction de GOLGI est due à la présence de chlorures, c'est parce que la méthode de LESCHKE est, comme la méthode de GOLGI, une méthode d'imprégnation argentine. De même, il est bien possible que le dépôt d'argent réduit obtenu par la méthode de LESCHKE au niveau des cellules « spéciales » découvertes par OKKELS dans les segments intermédiaires et les tubes de BELLINI du rein chez les Vertébrés, ne soit pas dû, comme le croit FEYEL, à la présence de chlorure de sodium électivement résorbé par ces cellules, mais à une imprégnation des granulations de ces cellules. Celles-ci possèdent en effet une affinité spécialement marquée pour les sels d'argent et s'imprègnent par la méthode de DA FANO par exemple. FEYEL en déduit que « ces cellules présentent une richesse particulière en chlorures, ce qui est probablement la raison de leur forte argentophilie ». Encore une fois, on peut renverser l'argument : au lieu de « prendre » le DA FANO, parce qu'elles seraient riches en chlorures, ne peut-on admettre qu'elles donnent des résultats positifs à la méthode de LESCHKE, comme à la méthode de DA FANO, parce que leurs granulations ont une affinité considérable pour les sels d'argent, affinité due à des potentialités adsorptives? Cette affinité ne pourrait-elle pas s'exercer aussi bien en milieu acide (méthode de LESCHKE) qu'en milieu neutre et après fixation (méthode de DA FANO)?

A ces objections, on pourrait encore en ajouter d'autres. Ainsi, les travaux récents de GIROUD et ses collaborateurs démontrent que la vitamine C, présente dans à peu près tous les tissus en quantité plus ou moins grande, réduit le nitrate d'argent, instantanément et à l'obscurité, même en solution acide. Le précipité d'argent ainsi formé va interférer avec la réaction argentique des chlorures. La présence de substances argento-réductrices dans les tissus constitue donc encore une nouvelle cause d'erreur.

Les réactions jusqu'ici proposées pour la recherche de l'ion chlore ne sont donc pas spécifiques, et le moins que l'on puisse en dire est qu'il serait absolument nécessaire de les contrôler par d'autres méthodes.

Si nous résumons, nous devons avouer que les méthodes histochemiques

actuelles de détection des chlorures sont sans valeur. Elles ne sont pas spécifiques, mais on pourrait faire des progrès à ce point de vue en imaginant des méthodes de contrôle. D'autre part, elles sont nettement insuffisantes au point de vue topographique, et, de ce côté, nous sommes pessimistes quant à l'avenir.

B. *Acide chlorhydrique*. — La recherche histochimique de l'acide chlorhydrique lors de la sécrétion gastrique a été effectuée pour la première fois par Claude BERNARD (1859). Un mélange d'un sel ferrique et de ferrocyanure de potassium reste parfaitement intact en solution neutre ou en présence d'acides organiques. Il se produit instantanément un précipité de bleu de Prusse, en présence d'un acide minéral libre. Cl. BERNARD avait injecté dans la veine jugulaire d'un chien une solution de lactate de fer, puis une solution de ferrocyanure de potassium. Dans l'animal, tué au bout de trois quarts d'heure, l'auteur ne trouva de bleu de Prusse nulle part dans l'organisme, sauf à la surface de la muqueuse gastrique. L'expérience fondamentale de Cl. BERNARD a été reprise par un certain nombre d'auteurs, avec des modalités quelque peu différentes, mais sans que le principe en fût changé (LÉPINE, SEHRWALD, FITZ-GERALD, HAMMETT, HARVEY et BENSLEY, BRECKMANN et DELOYERS). Pour pouvoir obtenir des préparations durables et des coupes histologiques, il suffit, l'expérience faite, de fixer à l'alcool absolu ou tout autre fixateur *neutre* et de pratiquer une inclusion suivant les méthodes habituelles.

Comme LÉPINE l'avait déjà montré en 1872, l'acide chlorhydrique ne se trouve à l'état libre qu'à la surface de la muqueuse gastrique. Ni les cellules de l'épithélium, ni celles des glandes n'en contiennent. Cependant, à plusieurs reprises, des auteurs (SEHRWALD, FITZ-GERALD, HAMMETT) ont décrit des localisations d'acide chlorhydrique dans les cellules bordantes, et même dans d'autres éléments cellulaires de la muqueuse gastrique. Ces observations, d'après HARVEY, BENSLEY, PLENK, doivent être rapportées à des erreurs techniques. Les tissus morts ou mourants peuvent, en effet, se teindre secondairement par le bleu de Prusse formé à d'autres endroits; il faut donc prendre garde à ces phénomènes de diffusion et de coloration secondaire.

\*  
\* \*

BROME.

Jusqu'ici, à notre connaissance, le brome n'a pas été recherché histo-

chimiquement dans les tissus animaux. Pour sa détection chez les végétaux, consulter la revue générale de MANGENOT.

\*  
\* \* \*

## IODE.

L'iode peut exister dans les êtres vivants sous plusieurs formes. Il peut être à l'état d'iode ionique, c'est-à-dire d'iodures; dans les organismes animaux, l'iode n'existe pas normalement sous cette forme, et l'on n'aura à le rechercher que si l'on a introduit des iodures dans l'organisme dans des buts thérapeutiques ou en vue d'études histophysiologiques. L'iode peut également exister sous forme organique combinée; il est alors *masqué* à ses réactifs. Dans les organismes animaux, la forme masquée la plus importante est celle qui existe dans la thyroïde.

A. *Iode ionique (iodures)*. — Pour la recherche des iodures introduits dans l'organisme, plusieurs méthodes ont été proposées.

STIEGLITZ injecte dans les veines de l'animal à sacrifier 20<sup>mg</sup> de nitrate de plomb à 5 pour 100. Fixation des pièces au formol. Dans les coupes, on retrouve l'iode sous forme de cristaux d'iodure de plomb jaune. On est souvent gêné par la formation de cristaux insolubles de chlorure et de carbonate de plomb (HINTZELMANN).

HINTZELMANN fixe les pièces dans du formol à 10 pour 100 additionné de 1 pour 100 d'acétate de thallium. On coupe par congélation. Examinées en lumière incidente, les coupes montrent des cristaux jaunes d'iodure de thallium, se détachant sur le fond noir. La méthode est spécifique. Ne pas laisser les coupes trop longtemps dans l'eau, car l'iodure de thallium finit par s'y dissoudre.

LESCHKE utilise la même méthode argentique qu'il a proposée pour la détection des chlorures, en éliminant ceux-ci par une perfusion prolongée à l'eau, avant d'injecter l'iodure par voie intraveineuse.

Dans une revue critique récemment parue, GERSH et STIEGLITZ ont repris l'étude des méthodes de détection des iodures. Ils ont essayé trois groupes de méthodes. Dans les premières, ils se sont efforcés de précipiter les iodures en tant que tels dans les tissus; ou bien, ils congèlent les tissus par le CO<sup>2</sup> solide ou par l'air liquide et coupent par congélation; ou bien ils pratiquent une inclusion par la méthode de congélation-dessiccation d'ALTMANN-GERSH; dans les deux cas, ils reçoivent les coupes dans du chlorure de palladium. Enfin, ils essaient de fixer par des liquides dans lesquels les iodures sont insolubles, comme par exemple l'acétate d'éthyle.



Les secondes méthodes consistent à essayer de précipiter les iodures sous forme de précipités insolubles et colorés, par perfusion des animaux avec des réactifs convenables (nitrate d'argent, chlorure de palladium, chlorure de thallium, acétate mercurique, nitrate mercurieux, nitrate de plomb). Un troisième groupe de méthodes comprend celles où l'iodure est précipité sous forme de précipité incolore, mais que l'on peut ultérieurement convertir en précipité coloré (sulfate acide de diphényliodonium, sels cuivreux). Toutes ces méthodes ont donné des résultats non satisfaisants. Comme conclusion à leur étude, effectuée avec des moyens techniques remarquables et avec un excellent esprit de critique, les auteurs doivent avouer qu'aucune technique de détection histochimique des iodures n'a de valeur. Ils attribuent leur échec à la grande diffusibilité de l'ion iodure et à l'impuissance du réactif précipitant de pénétrer assez rapidement dans les tissus. « Pour des buts histochimiques, la réaction doit non seulement conduire à un précipité extrêmement insoluble, mais l'introduction du réactif précipitant doit être tout à fait instantanée. Comme des métaux lourds sont requis pour la précipitation des ions iodures, leur tendance à précipiter les protéines et ainsi à bloquer leur pénétration est une difficulté apparemment insurmontable. »

Cette étude, effectuée par les auteurs américains, est riche en enseignements généraux. Elle montre bien, en effet, toute l'importance des facteurs de diffusion dans la localisation histochimique des composés cristalloïdes existant à l'état dissous dans les tissus. Leur critique a une portée qui dépasse le domaine qu'ils ont approfondi. En effet, les mêmes constatations valent pour un grand nombre de cas où l'on a prétendu localiser histochimiquement des substances dissoutes; c'est le cas, par exemple, pour les chlorures, les sulfates, les phosphates solubles, l'urée, etc. C'est pourquoi, il nous a paru bon d'insister quelque peu.

B. *Iode en combinaison organique.* — Méthode de JUSTUS : dans les coupes, l'iode est libéré par un traitement de 1 à 2 minutes par l'eau de chlore. Ensuite, on précipite l'iode à l'état d'iodure et le chlore à l'état de chlorure d'argent par l'action d'une solution à 2 pour 100 de nitrate d'argent pendant 2 à 3 heures. Le chlorure d'argent formé est dissous par une solution concentrée et chaude de chlorure de sodium. A ce moment, l'iodure d'argent est reconnaissable à sa teinte faiblement jaune. On traite alors, après lavage soigné, par une solution saturée aqueuse de sublimé. Il se forme de l'iodure mercurique, reconnaissable à sa couleur rouge.

Cette méthode a été vivement critiquée par HERXHEIMER et MACALLUM,

qui lui ont dénié toute valeur. En tout cas, il semble bien qu'elle ne puisse mettre en évidence que de l'iode très lâchement lié; ce n'est guère que dans les organismes végétaux qu'on peut le trouver dans cet état. Aussi, en Histochemie animale, cette méthode paraît d'utilité très restreinte.

Méthode de TURCHINI : TURCHINI a pu mettre l'iode en évidence dans les tissus d'Huître par la méthode suivante. Traiter par une solution fraîchement préparée de nitrite de soude à 10 pour 100, acidulée par 1 pour 100 d'acide sulfurique. L'iode est libéré à l'état moléculaire et communique aux tissus une coloration jaune. Un traitement à l'empois d'amidon à 3 pour 100 filtré développe une belle coloration bleue. Les préparations ne se conservent pas.

Cette méthode ne peut convenir que pour l'iode très lâchement combiné et ne permet guère de localisation cytologique fine.

C. *Iode thyroïdien*. — La thyroxine renferme 4 atomes d'iode, fixés sur des noyaux benzéniques. On sait que l'iode directement lié à des radicaux aromatiques n'est pas mobilisable et ne peut être guère libéré que par destruction totale de la molécule. Aussi, on peut considérer comme fantaisiste la réaction de FALOZZI, qualifiée d'histochemique par son auteur : on fixe 36 heures par le mélange suivant : chlorure de palladium,  $1^g + HCl$ , 3 gouttes 1-formol,  $30^{cm^3} + H^2O$ ,  $300^{cm^2}$ . Inclusion à la paraffine; sur les coupes, on voit des granulations noires entourées d'une zone claire, que l'auteur prétend représenter l'iode contenu dans la thyroïde (1).

\*  
\* \*

## PHOSPHORE.

Le phosphore compte parmi les éléments constitutifs les plus importants de la matière vivante; nul organisme n'en est dépourvu. L'étude de son métabolisme présente donc un gros intérêt, et en Histochemie, des recherches assez nombreuses ont vu le jour dans le but de le mettre en évidence et de le localiser au sein des tissus et des cellules.

Comme le fer, le phosphore peut exister dans les organismes, soit sous une forme immédiatement décelable, à l'état ionique, soit sous forme masquée, en combinaison organique.

À l'état ionique, on ne le trouve guère qu'à l'état de phosphates. Généralement, dans les organismes animaux, il s'agit de phosphates de calcium.

---

(1) En ce qui concerne l'iode chez les végétaux, voir la revue de MANGENOT.

Nous avons déjà exposé, au chapitre traitant du calcium, des méthodes proposées pour détecter histochimiquement le phosphate de calcium, et nous n'aurons plus à y revenir ici. Les formes solubles du phosphore sont assez rares, et, en Histo chimie animale, on n'aura guère à effectuer leur recherche que si on les a introduites expérimentalement dans l'organisme.

Les formes masquées, organiques, du phosphore sont de beaucoup les plus nombreuses et les plus importantes. Parmi les groupes les plus représentatifs de substances renfermant du phosphore masqué, on doit citer les nucléoprotides, les phosphoprotéides, les phospholipines. Le phosphore y est présent, soit sous forme d'éther, soit sous forme d'ester. En Histo chimie, les réactions où l'on recherche le phosphore masqué sont souvent désignées sous le nom de « réactions du phosphore ». Il nous paraît opportun, en raison de l'existence des formes ioniques solubles et insolubles de phosphore, de les désigner sous une dénomination ne prêtant pas à équivoque, comme par exemple celle de « phosphore occulte ».

A. *Phosphates solubles en général.* — LESCHKE, dans ses études sur l'Histophysiologie rénale, s'est efforcé de rechercher les phosphates solubles par le procédé suivant :

Il précipite les phosphates à l'état de phosphate d'urane insoluble, par fixation des pièces dans une solution de nitrate d'urane à 0,1-0,5 pour 100. Après lavage à l'eau distillée, plusieurs fois renouvelée, inclure à la paraffine. Les coupes, après un lavage soigné à l'eau distillée, sont traitées par une solution fraîchement préparée de ferrocyanure de potassium à 1 pour 100 dans l'acide chlorhydrique à 1 pour 100. Il y a formation d'urani-ferrocyanure de potassium brun rouge. Coloration de fond à l'hémalum et montage au baume.

Cette méthode mérite tous les reproches que nous avons déjà adressés à plusieurs reprises à toutes celles qui visent à précipiter *in situ* des substances cristalloïdes dissoutes. Le fixateur, étant beaucoup moins diffusible que l'élément à rechercher et bloquant sa propre pénétration en coagulant énergiquement les protéines, ne peut pénétrer assez vite pour que toute diffusion ait pu être évitée. De plus, comme on se trouve en milieu colloïdal, la précipitation du composé insoluble se trouve fortement troublée et de nouveaux transports de substance peuvent se produire. Ajoutons enfin que la méthode de LESCHKE est une méthode indirecte et que cela rend passablement suspecte sa valeur spécifique. On ne peut donc la considérer que comme une mauvaise méthode, qu'il vaudrait mieux rayer une fois

pour toute de la technique histochemique, comme d'ailleurs toutes les methodes proposees par LESCHKE pour la recherche des elements solubles dans les tissus renaux.

WINTHER et SMITH ont essaye de localiser le phosphore inorganique mis en liberte lors du fonctionnement du muscle, en precipitant le phosphore a l'etat de phosphomolybdate d'ammonium par l'action d'une solution nitrique de molybdate d'ammonium. Le phosphomolybdate forme est ensuite mis en evidence par l'action d'une solution a 3 pour 100 de ferrocyanure de potassium; ce traitement developpe une coloration bleu fonce au niveau du phosphomolybdate, tandis que le molybdate d'ammonium qui pourrait rester en excès ne se colore pas si l'on est en solution neutre, ou bien se colore en rouge fonce si l'on est en solution acide.

Cette methode, dans les conditions ou elle a ete appliquee, n'a pas plus de valeur que celle de LESCHKE. En effet, la localisation du precipite forme est encore beaucoup plus aleatoire que dans le cas de celle-ci. On sait, en effet, que la precipitation de l'ion phosphorique par le molybdate d'ammonium n'est jamais instantanee. Pretendre localiser du phosphore dans des elements cytologiques aussi fins que des disques sombres de fibrilles musculaires est depasser de beaucoup les possibilites de l'experience. En revanche, la reaction est beaucoup plus specifique que celle de LESCHKE. En effet, si du molybdate se trouve adsorbe par des elements de la preparation, il se colorera en rouge et non en bleu et n'interferera pas avec la reaction fournie par le phosphomolybdate.

B. *Phosphore occulte.* — Les premiers, LILIENFELD et MONTI, travaillant sous la direction de KOSSEL, s'efforcèrent de deceler histochemiquement le phosphore masque dans les nucleines. Le principe de leur methode est le suivant. Le phosphore est libere de ses combinaisons organiques et transforme en acide orthophosphorique par l'action prolongee d'un acide fort (acide nitrique). Au moment de sa liberation, l'acide phosphorique est precipite par l'action du molybdate d'ammonium, qui le transforme en phosphomolybdate d'ammonium insoluble. Liberation et precipitation s'effectuent donc simultanement par l'action d'un reactif nitromolybdique. Le phosphomolybdate d'ammonium est jaune, mais sa couleur est trop pale pour pouvoir etre distinguee sur des coupes microscopiques. Aussi le met-on en evidence en le reduisant en oxyde de molybdene fortement colore en bleu, par l'action d'un reducteur, le pyrogallol.

*Technique.* — 1<sup>o</sup> Les coupes sont plongées de 1 à 5 jours à 35° en flacon clos dans le réactif nitromolybdique [préparé comme suit : 1 partie d'acide molybdique ( $\text{MoO}^3\text{H}^2$ ) est dissoute dans 4 parties d'ammoniaque ( $d = 0,88$ ); puis on y ajoute lentement 15 parties d'acide nitrique ( $d = 1,2$ ). Après quelques jours de repos, filtrer]; 2<sup>o</sup> après l'action du réactif molybdique, laver longuement pour enlever l'excès de molybdate ammonique; 3<sup>o</sup> réduire pendant 15 minutes dans une solution fraîche de pyrogallol à 1 pour 100; 4<sup>o</sup> coloration de fond au carmin; 5<sup>o</sup> déshydrater; xylol-baume. Phosphore en noir verdâtre.

La méthode de LILIEFELD-MONTI a été utilisée dans sa formule originale par GRANDIS et MAININI pour apprécier la répartition du phosphore dans la ligne d'ossification du cartilage, par RUSSO, par COMES pour déceler le phosphore dans la zone pellucide de l'œuf des Mammifères, par BERTELO dans l'étude de l'œuf d'Oursin. Sa valeur a été très fortement critiquée et on lui a fait subir pas mal de modifications pour essayer de la rendre plus précise; nous parlerons plus loin de ces modifications et de leur valeur.

Pour la clarté de l'exposé, dédaignant l'ordre chronologique, nous scinderons les objections faites à cette méthode et à celles qui en dérivent en deux groupes : 1<sup>o</sup> la méthode de LILIEFELD-MONTI est-elle capable de démasquer réellement les formes occultes du phosphore et de les mettre en évidence? 2<sup>o</sup> est-elle spécifique?

Le problème du *démasquage du phosphore combiné* a préoccupé BENSLEY, SCOTT et surtout POLICARD et LEULIER. Est-il possible, par les méthodes préconisées de libérer le phosphore lié aux molécules organiques et de le libérer à l'état d'ion phosphorique, seul capable de réagir avec le molybdate d'ammonium? A cette question, les auteurs précédents répondent négativement. « Pour libérer même une partie du phosphore nucléinique, affirment POLICARD et LEULIER, il faut une attaque chimique incompatible avec le maintien de la structure histologique. »

Cette affirmation nous paraît beaucoup trop absolue, à ne considérer que les documents expérimentaux. Des essais ont été effectués, dans les conditions mêmes où s'effectue la réaction de LILIEFELD-MONTI.

Considérons d'abord les nucléines et les acides nucléiques. On savait, d'après OSBORNE et HARRIS, SCHMIEDEBERG, que des acides même assez dilués mettent en liberté en quelques heures à l'ébullition une fraction importante du phosphore contenue dans la molécule de ces substances et l'on pouvait s'attendre qu'à froid l'action fût la même, mais considérablement ralentie. MACALLUM démontra ainsi qu'à 35°, l'acide nitrique

à 30 pour 100 peut déjà libérer du phosphore de l'acide zymonucléinique et du nucléoprotide pancréatique d'HAMMARSTEN. NASMITH et FIDLAR ont suivi la réaction quantitativement sur une nucléoprotéine extraite du testicule : en 10 minutes, l'acide nitrique à 30 pour 100 libère déjà 36 pour 100 du phosphore; en 72 heures, la libération est totale. D'autres acides, comme l'acide chlorhydrique, ont d'ailleurs les mêmes propriétés (SCOTT; BENSLEY). Tout cela est en parfait accord avec les expériences de LEVENE et de FEULGEN, montrant la facilité d'hydrolyse des acides nucléiques avec libération des purines, du groupement hydrocarboné et de l'acide phosphorique. On peut donc conclure, contrairement aux affirmations de POLICARD et LEULIER, qu'il est possible, par l'action du réactif nitromolybdique, de libérer le phosphore des nucléines. SCOTT a constaté que la libération du phosphore est aisée, mais elle s'effectuerait sous une forme soluble organique, ne réagissant pas avec le molybdate; toutefois, NASMITH et FIDLAR ont vérifié que le phosphore est bien libéré à l'état d'ion phosphorique.

Ce qui est vrai pour les nucléines et les acides nucléiques n'est pas applicable à toutes les formes masquées du phosphore. Ainsi le phosphore des phosphoprotéides, tels que la caséine, n'est pas libéré, même à l'état de traces, par un traitement de deux mois par l'acide nitrique à 30 pour 100 (MACALLUM). De même, POSTERNAK a montré que le réactif nitromolybdique ne libère pas d'acide phosphorique d'un éther phosphorique de l'inosite après un traitement de 24 heures à la température ordinaire. Nous manquons de renseignements sur la facilité de libération du phosphore du phosphagène ou des phospholipines, dans les conditions où s'effectue la réaction de LILIENTFELD-MONTI. Il semble que la libération du phosphore de ces substances soit cependant beaucoup moins aisée que celui des nucléines (1).

Nous ne pouvons donc nous rallier aux conclusions pessimistes de POLICARD et LEULIER; tout au moins certaines formes de phosphore occulte sont démasquables par la méthode de LILIENTFELD-MONTI.

Signalons que, sur du matériel végétal, KLEIN démasque le phosphore organique par l'action du perhydrol (solution concentrée de  $H_2O_2$  à 30 pour 100), en présence d'un sel

---

(1) Par l'emploi d'acide nitrique fumant, chauffé à 40°-50°, POLACCI et ORSENIGO arrivent à démasquer le phosphore de composés tels que la phytine, la caséine, les nucléines, l'albumine, la fibrine, la lécithine. Un tel traitement paraît trop brutal pour pouvoir être appliqué à des coupes de tissus animaux.

ferreux (nitrate ferreux à 3 pour 100). Ce traitement, qui n'est pas nocif pour les coupes, met en liberté quantitativement le phosphore à l'état d'ion phosphorique. Cette méthode de démasquage, à notre connaissance, n'a pas été appliquée en Histochimie animale et mériterait d'être essayée.

C'est sur la question de la spécificité de la réaction que la méthode de LILIEFELD et MONTI est passible des plus graves critiques. On a vu que, dans cette méthode, le phosphomolybdate d'ammonium, insoluble et peu visible, est transformé en oxyde de molybdène bleu (apparaissant sur les coupes en vert, à cause de la réaction xanthoprotéique surajoutée) par l'action du pyrogallol. Or, on n'a pas tardé à reconnaître que le pyrogallol réagit également avec le molybdate d'ammonium seul, pour donner une coloration brune ou noirâtre très facile à confondre avec la couleur produite par la réduction du phosphomolybdate (RACIBORSKI, HEINE, MACALLUM, ARCANGELI). Or, le molybdate est fortement adsorbé par certains organites cellulaires, et les lavages les plus soignés, des lavages qui durent des mois (MACALLUM), ne peuvent l'enlever. La réaction brune ou noirâtre observée par LILIEFELD et MONTI au niveau des noyaux cellulaires est donc due, non au phosphore, mais au molybdate d'ammonium pour lequel les noyaux cellulaires ont une très forte affinité, comme GILSON l'avait d'ailleurs démontré antérieurement.

Passons maintenant aux modifications proposées à la méthode de LILIEFELD et MONTI.

Pour que la réaction prenne une signification précise, il faudrait trouver un corps capable de réduire le phosphomolybdate en composé coloré, tout en laissant le molybdate incolore.

POLACCI, au lieu du pyrogallol, utilise comme réducteur le chlorure stanneux. Cette méthode a paru satisfaisante à plusieurs auteurs, comme ZOIA, COMES, CHECCHI, CESARIS DEMEL. Mais le chlorure stanneux réduit en bleu les molybdates tout comme les phosphomolybdates, et ARCANGELI, HEINE, MACALLUM et d'autres ont pu lui opposer les mêmes objections qu'à LILIEFELD et MONTI. POLACCI, avec ORSENIGO, a encore affirmé récemment la valeur de sa méthode, mais, d'après nous, il n'a fait qu'effleurer l'objection principale : les lavages après l'action du réactif nitromolybdique suffisent-ils à éliminer toute trace de molybdate adsorbé par les éléments de la coupe ?

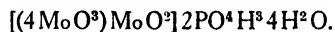
MACALLUM crut pouvoir tourner la difficulté en proposant le chlorhydrate de phénylhydrazine qu'il affirmait n'avoir d'action réductrice que sur le

phosphomolybdate. Ce procédé, d'abord considéré comme un gros progrès, fut ensuite reconnu défectueux (BENSLEY, NASMITH et FIDLAR). Les réactions positives obtenues sont dues au molybdate adsorbé par la coupe et non au phosphore libéré des tissus. Pas plus que le pyrogallol ou le chlorure stanneux, le chlorhydrate de phénylhydrazine n'est capable de « distinguer » le molybdate du phosphomolybdate.

Ces critiques sont extrêmement graves et enlèvent absolument toute valeur aux travaux qui ont été effectués par les méthodes précitées. Pratiquement, la méthode de LILIENFELD et MONTI, ainsi que les méthodes qui en dérivent, n'ont abouti qu'à des échecs ou à des constatations fausses.

La méthode de LILIENFELD-MONTI ne doit au fond être abandonnée que pour une raison assez secondaire : les auteurs cités ne sont pas arrivés à trouver un réactif mettant en évidence le phosphomolybdate formé sans toucher au molybdate adsorbé par les coupes. Depuis quelques années, en Histo chimie animale, on semble s'être désintéressé de la question, qui avait fait l'objet de nombreuses tentatives il y a vingt-cinq ans. Il nous semble cependant que tout espoir d'arriver à modifier la réaction de LILIENFELD et MONTI de façon à la rendre spécifique n'est pas entièrement perdu.

Le botaniste ANGELI a cherché une modification permettant d'obtenir des résultats sûrs, même si du molybdate se trouve adsorbé par les tissus. En réduisant les phosphomolybdates, on obtient du phosphomolybdate de molybdényle, ou phosphoconjugué céruléomolybdique de DENIGÈS :



La réduction du molybdate seul, par le chlorure stanneux, donne le bleu de molybdène ordinaire :  $4\text{MoO}^3\text{MoO}^2$ . Le phosphoconjugué est de nuance plus verdâtre que le bleu de molybdène. Ce contraste s'accroît si l'on traite par l'eau oxygénée : le phosphoconjugué devient vert-pré, le bleu de molybdène bleu-ciel. De plus, l'ammoniaque reste absolument sans action sur le phosphoconjugué, tandis qu'il dissout le bleu de molybdène en le décolorant.

ANGELI procède comme suit (il s'agit de matériel végétal) : traiter les coupes 20 minutes par le réactif chloromolybdique (molybdate d'ammonium 3g; + eau 20<sup>ml</sup> + solution à 30 pour 100 d'acide chlorhydrique 20<sup>cm<sup>3</sup></sup>); rincer sommairement à l'eau distillée; réduire par une solution N/50 de chlorure stanneux; rincer sommairement; laver longuement dans une solution d'ammoniaque à 2,5 pour 100; par ce traitement, le bleu de molybdène



formé par réduction du réactif adsorbé par la coupe se décolore et seul reste coloré le phosphoconjugué provenant de la réduction du phosphomolybdate. Résultat final : éléments renfermant du phosphore colorés électivement en bleu verdâtre.

D'autre part, WINTHER et SMITH ont observé que le phosphomolybdate d'ammonium, traité par une solution de ferrocyanure de potassium, donne naissance à une coloration bleue, tandis que le molybdate, en solution neutre ne se colore pas, et en solution acide ne donne naissance qu'à une coloration brune. Comme nous l'avons dit plus haut, WINTHER et SMITH ont utilisé leur réaction dans le but de rechercher le phosphore inorganique dans le muscle, mais il semble bien que leur méthode d'identification du phosphomolybdate puisse être très avantageusement utilisée pour la recherche du phosphore occulte. Après le démasquage par le réactif nitromolybdique de LILIENFELD et MONTI, il suffirait de laver pour enlever tout excès d'acide et de traiter par le ferrocyanure de K à 3 pour 100. La méthode de WINTHER et SMITH pour l'identification du phosphomolybdate semble bien, d'après les quelques vérifications *in vitro* que nous en avons faites, ne pas prêter le flanc aux critiques qui enlèvent toute valeur aux méthodes dont on a parlé plus haut. Il y aurait un grand intérêt à reprendre l'étude du phosphore masqué en se basant sur cette méthode, qui, nous ne savons pourquoi, semble avoir passé à peu près inaperçue.

Si nous résumons tout ce que nous venons de dire sur la détection histochimique des formes occultes du phosphore, nous concluons ainsi : aucune des méthodes jusqu'ici utilisées en Histo chimie animale pour la recherche du phosphore masqué n'a de valeur et toutes les conclusions qui en ont été tirées doivent être considérées comme manquant totalement de base. Cependant, tout espoir n'est pas perdu ; le démasquage du phosphore organique, ou tout au moins de certaines formes de celui-ci, est possible, en employant des méthodes convenables. D'autre part, la possibilité d'arriver à une technique de détection rigoureusement spécifique de l'ion phosphorique semble donnée par l'emploi de la méthode de WINTHER et SMITH ou de celle d'ANGELI.

\*  
\* \*

#### SOUFRE.

A l'état inorganique, le soufre se rencontre dans les êtres vivants, soit comme élément libre (soufre des Thiobactéries), soit comme sulfate, rarement comme sulfure. En Histo chimie animale, de toutes ces formes

on n'a guère à considérer que les sulfates, soit qu'ils existent à l'état normal dans l'organisme, soit qu'on les ait injectés dans des buts thérapeutiques ou histophysiologiques. Les formes organiques du soufre sont nombreuses :  $-\text{SO}^3\text{H}$ ;  $-\text{OSO}^3\text{H}$ ;  $-\text{S}-\text{S}-$ ;  $-\text{SH}$ , etc. Les formes sulfhydriques seront étudiées au chapitre des aminoacides soufrés (*voir* p. 132), les esters sulfuriques au chapitre des glucides (*voir* p. 236).

A. *Sulfates*. — Pour rechercher les sulfates solubles, MACALLUM a proposé la méthode suivante. Son principe est de précipiter les sulfates sous forme de sulfate de plomb insoluble dans l'acide nitrique; secondairement, on met ce corps en évidence en le transformant en sulfure de plomb noir.

1<sup>o</sup> Les coupes de tissu frais sont portées au moins 10 minutes dans une solution n/10 d'acétate de plomb; 2<sup>o</sup> laver à  $\text{H}_2\text{O}$  distillée; 3<sup>o</sup> 2 à 5 minutes dans  $\text{NO}^3\text{H}$  n/10; 4<sup>o</sup> rincer soigneusement; 5<sup>o</sup> examiner dans le mélange glycérine-solution saturée de sulfure d'ammonium (*ana*).

La méthode de MACALLUM ne peut fournir que des localisations très approximatives, comme toutes les méthodes où l'on essaie de précipiter *in situ* un sel soluble et diffusible (*voir* Chap. II). De plus, sa spécificité est passablement aléatoire, comme celle de toutes les méthodes indirectes (*voir* Chap. III).

B. *Soufre organique, masqué*. — A part les dérivés à fonction SH, dont on parlera plus loin, la recherche des composés organiques soufrés a fait l'objet de peu d'études. Les premiers essais de MANN avaient été infructueux.

FAURÉ-FREMIET et DRAGOIU ont décelé un composé soufré dans la cellule granuleuse du poumon, en traitant pendant 30 jours par une solution de chlorure de cadmium à 3 pour 100 additionnée de 10 pour 100 de formol. Le composé soufré se révèle par la formation de sulfure de cadmium jaune. Par une fixation de 20 jours dans : formol 10 pour 100,  $100^{\text{mm}}$  + acétate de plomb, 5<sup>g</sup> + acide acétique, quantité suffisante pour atteindre un pH de 3,3 à 3,5, le composé soufré se révèle par un précipité noir de sulfure de plomb.

La réaction du soufre labile, au plombite de soude, bien connue des biochimistes, a pu être quelquefois appliquée en Histochemie (GIROUD

et BULLIARD, BROUSSY). C'est cependant une réaction assez brutale et le milieu alcalin qu'elle exige est défavorable à la bonne conservation des tissus. Les applications des auteurs cités avaient trait d'ailleurs à la kératine qui est riche en soufre et résiste bien aux agents chimiques; nous pensons que, sur d'autre matériel, elle ne peut guère donner de résultats satisfaisants.

\*  
\* \*

#### ARSENIC.

A cause de leurs propriétés chimiothérapeutiques importantes, les dérivés arsenicaux ont fait l'objet d'assez nombreuses recherches histochimiques.

On peut distinguer deux groupes de méthodes de recherche histochimique des dérivés arsenicaux. Les premières sont destinées à montrer l'arsenic en tant que tel et ont été surtout appliquées à la recherche des sels inorganiques de l'arsenic, tels que l'anhydride arsénieux ou l'arsénite de sodium (liqueur de Fowler). Ce sont des méthodes utilisant l'hydrogène sulfuré. Les autres, spécialement destinées à la mise en évidence des arsénobenzols, sont des méthodes argentiques.

*A. Méthodes à l'hydrogène sulfuré.* — Ces méthodes, utilisées par JUSTUS, BRÜNAUER, OSBORNE, MEMMESHEIMER, sont à peu près identiques.

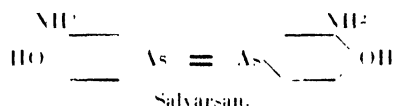
Fixer les tissus au formol 1 ou 2 jours, laver la pièce soigneusement à l'eau courante et traiter plusieurs jours par une solution saturée fraîche de  $H^2S$  à la température de  $70^{\circ}$ . Ensuite, rinçage et inclusion à la paraffine ou de préférence à la celloïdine. Dans les coupes apparaissent des granulations jaune brunâtre, cristallines, qui, d'après les auteurs, représentent du trisulfure d'arsenic. Pour se débarrasser des autres sulfures, et notamment du sulfure de fer, qui pourraient donner des réactions interférentes, on traite les coupes par de l'alcool à  $70^{\circ}$ , renfermant 10 pour 100 de  $HCl$ , pendant 20 minutes. Tous les sulfures, sauf le trisulfure d'arsenic, sont solubles dans ce milieu.

TANNENHOLZ et MUIR, tout récemment, ont vivement critiqué les méthodes à l'hydrogène sulfuré. Les tissus normaux, en l'absence de tout composé arsenical, montrent toujours, après traitement par  $H^2S$ , les granulations jaune brunâtre qui sont censées représenter du trisulfure d'arsenic. Après avoir envisagé nombre d'hypothèses sur leur nature, les auteurs concluent qu'il doit s'agir de combinaisons sulfurées de protéines; en tout cas, leurs caractères sont loin d'être ceux du trisulfure d'arsenic. Les réactions à l'hydrogène sulfuré doivent donc être considérées comme sans valeur pour la recherche histochimique de l'arsenic.

**B. Méthodes argentiques.** — Ces méthodes furent indiquées par SCHUMACHER, puis par JANCZO pour la recherche du salvarsan et des autres arsénobenzols.

On fixe 10 jours les pièces dans le formol à 10 pour 100 et l'on coupe par congélation. Les coupes sont traitées 30 minutes par une solution à 1,5 pour 100 de nitrate d'argent ammoniacal, additionnée de son volume de glycérine. Rinçage, fixation à l'hyposulfite, coloration de fond à volonté et montage. Les arsénobenzols sont colorés en brun noir foncé. MORELLI trouve avantageux de remplacer la glycérine dans la solution indiquée par une solution de sel de Seignette (dont la concentration n'est pas donnée).

Cette réaction, d'après nous, rentre en réalité dans un cadre plus général. A part de très petites modifications de détail, elle est identique à la réaction argentaffine, dont on parlera plus en détail au chapitre des phénols. La réaction argentaffine est donnée par tous les diphénols ou aminophénols ou diamines aromatiques en position ortho ou para. Le salvarsan est un dérivé arsenical d'un orthoaminophénol. C'est à ce radical orthoaminophénol



que le salvarsan doit de réduire le nitrate d'argent ammoniacal. Les réactions argentiques destinées à la démonstration du salvarsan et des arsénobenzols analogues sont dues au radical aromatique de ces corps et non pas à leur teneur en arsenic.

\*  
\* \*

### SILICIUM.

En Histochemie animale, l'étude de quelques dérivés siliceux présente un intérêt assez grand, par leurs rapports avec une maladie professionnelle, la silicose. Ce sont, d'une part, la silice  $\text{SiO}_2$  et, d'autre part, des silicates hydratés, tels que la séricite, la sillimanite et la muscovite.

Pour détruire les matières organiques des coupes et rendre plus visibles les particules minérales incluses dans les tissus (spécialement dans le poumon), POLICARD opère ainsi : 1° les coupes à la paraffine sont déparaffinées au toluène puis séchées; 2° sur la coupe, on dépose une petite goutte d'acide perchlorique concentré, à 50 ou 60 pour 100 (attention : explosif dangereux); 3° mettre une lamelle, chauffer avec précaution, sur une platine chauffante, vers 50 à 60°; 4° examiner dans le liquide, si nécessaire après lutage de la préparation : les matières organiques sont dissoutes et les particules minérales sont bien mises en évidence; ne pas les confondre avec des cristaux de perchlorate de K qui se produisent en même temps,

ni avec des gouttelettes grasses en liberté. Ce traitement paraît cependant décomposer la plupart des silicates, y compris la séricite (MC CRAE, in JONES).

Les composés siliceux présents dans les poumons silicotiques sont, pour la plupart, biréfringents et peuvent donc être décelés par l'examen au microscope polarisant.

Pour les distinguer des autres substances biréfringentes qui peuvent se trouver dans les coupes, POLICARD propose la micro-incinération. Les formes biréfringentes de la silice (quartz) sont seules à conserver leur biréfringence après ce traitement, toutes les substances organiques étant détruites. Ce procédé ne peut toutefois convenir pour la détection de la séricite, ou des autres silicates hydratés, car la micro-incinération détruit la morphologie de leurs particules (CORDIER, communication personnelle). Ce point est important, car on sait que les recherches les plus récentes sur la silicose tendent à admettre l'importance primordiale, pour ne pas dire exclusive, de ces composés siliceux fibreux dans la pathogénie de cette maladie (JONES W. R.).

Ajoutons que le silicium peut être détecté par voie histospectrographique (GERLACH, POLICARD).

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

*Chlore.* — BERGH, *Anat. H.*, 1899. — BERNARD (Cl.), *Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides et de l'organisme* (Baill ère, 1859). — BRENNCKMANN et DELOYERS (L.), *Biol.*, 102, 1929, p. 29 et 684. — DECKHUYSEN, *Anat. A.*, 1889. — DEFRISE (A.), *Monit. zool. ital.*, 37, 1926, p. 14; *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 2, 1927, p. 521; *A. ital. Anat. e Embr.*, 24, 1927, p. 697. — GROEBBELS, *Pflüg.*, 193, 1922, p. 128. — FEYEL (P.), *Biol.*, 115, 1934, p. 1148. — GROEBBELS (F.), *Münch. K. W.*, 67, 1920, p. 923. — HAMMETT (F. S.), *Anat. Rec.*, 9, 1915, p. 21. — HARVEY (B. C. H.) et BENSLEY (R. R.), *Biol. Bull.*, 23, 1912, p. 225. — LÉPINE (M.), *Biol.*, 24, 1872, p. 221. — LESCHKE (E.), *Verh. dtsh. Kongr. inn. Med.*, 31, 1914, p. 635; *Münch. K. W.*, 61, 1914, p. 1498; *Z. klin. M.*, 81, 1915, p. 14. — MACALLUM (A. B.), *Proc. Roy. S.*, 76, 1905, p. 217; *Abderh. Hdb. Bioch.*, V, 2, 1912, p. 1132. — MACALLUM (A. B.) et MENTEN (T. L.), *Proc. Roy. S.*, 77, 1906, p. 181. — MONTI (A.), *Arch. di Fisiol.*, 11, 1913. — OKKELS (H.), *Bull. Hist.*, 6, 1929, p. 12. — PLENK, article *Magen* in *V. Möllend. Hdb.*, 1932. — SCHIMPER, *Flora*, 1890. — SEHRWALD, *Münch. K. W.*, 36, 1889, p. 177.

*Brome.* — MANGENOT, *Bull. Hist.*, 4, 1927, p. 82.

*Iode.* — GERSH (I.) et STIEGLITZ (E. J.), *Anat. Rec.*, 56, 1933, p. 185. — FABOZZI (S.), *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 4, 1929, p. 754. — HERXHEIMER, *Technik der pathologisch-histolo-*

*gischen Untersuchungen* (Wiesbaden, 1912). — HINTZELMANN (U.), *Z. wiss. M.*, 46, 1930, p. 486. — JUSTUS, *Virch.*, 170, 1902, p. 501. — STIEGLITZ (E.), *Journ. Pharm. and exp. Ther.*, 22, 1923, p. 89. — TURCHINI (J.), *Bull. Acad. Sc. Lettres, Montpellier*, 60, 1930, p. 29.

*Phosphore*. — ANGELI, *Riv. di Biol.*, 10, 1933, p. 702. — ARCANGELI (A.), *Atti Soc. tosc. Sc. nat.*, 18, 1902; *Mon. zool. ital.*, 17, 1906; *Gazz. chim. ital.*, 37, 1907; *Riv. di biol.*, 9, 1927, p. 572. — BENSLEY (R. R.), *Biol. Bull.*, 10, 1908, p. 49. — BERTOLO, *Att. Acc. Sc. nat. Catania*, 1903 et 1904. — CESARIS DEMEL (V.), *Att. Soc. tosc. Sc. nat.*, 36, 1926. — CHECCHI (F.), *Riv. di Biol.*, 7, 1925. — COMES, *Ibid.*, 1906; *Monit., Zool., ital.*, 17, 1906. — CRÉTIN (A.), *Ass. Anat.*, 18, 1923, p. 163; *Bull. Hist.*, 2, 1925, p. 159. — DENIGÈS (G.), *Biol.*, 84, 1921, p. 875; *Acad.*, 186, 1928, p. 318. — GRANDIS et MAININI, *Arch. per le Sc. Med.*, 24, 1901. — HEINE, *Hoppe-S.*, 22, 1896, p. 410. — KLEIN (G.), *Planta*, 2, 1926, p. 447. — LESCHKE (E.), *Z. klin. M.*, 81, 1914. — LILIEFELD et MONTI, *Lincei*, 1<sup>re</sup> série, 1892; *Hoppe-S.*, 17, 1893; *Z. wiss. M.*, 9, 1893, p. 332. — MACALLUM (A. B.), *Proc. Roy. Soc.*, 63, 1893, p. 467. — NASMITH (G.) et FIDLER (G.), *Jl Physiol.*, 37, 1908, p. 278. — POLACCI, *Malpighia*, 8, 1894; *Att. Ist. Bot. Pavia*, 2<sup>e</sup> série, 6, 1898; 10, 1904; *Riv. di Biol.*, 9, 1927, p. 10. — POLACCI (G.) et ORSENIGO (A.), *Atti. Ist. Bot. Pavia*, 4<sup>e</sup> série, 4, 1933, p. 167. — POLICARD (A.) et LEULIER (A.), *Bull. Hist.*, 2, 1925, p. 22. — RACIBORSKI, *Akad. Wiss. Krakau*, 553, 1906; *Bot. Z.*, 51, 1893, p. 245. — ROEHL (W.), *Ziegl.*, 7, 1905, p. 456. — RUSSO, *Mon. zool. ital.*, 17, 1906. — SCOTT (F. H.), *Jl Physiol.*, 35, 1906, p. 119; 35, 1907. — TISDALL, *Jl biol. Chem.*, 50, 1922, p. 329. — WINTHER et SMITH, *Jl Physiol.*, 56, 1922, p. 227. — ZOIA (R.), *Boll. Scient.*, 16, n<sup>o</sup> 4, p. 8.

*Soufre*. — MACALLUM (A. B.), *Abd. Hdb. bioch. Arbmeth.*, V, 2, 1912.

*Arsenic*. — BRUNAUER (S. R.), *A. Derm.*, 129, 1921, p. 186. — JANCZO (N.), *Z. exp. M.*, 61, 1928, p. 63; *A. exp. Zellf.*, 6, 1928, p. 444. — JUSTUS (J.), *Dermat. Z.*, 12, 1905, p. 277. — MEMMESHEIMER, *Dermat. Z.*, 54, 1928, p. 4. — MORELLI (E.), *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 6, 1931, p. 853. — OSBORNE (E. D.), *Dermat. Syph.*, 12, 1925, p. 773; 18, 1928, p. 37; 25, 1932, p. 419. — SCHUMACHER (J.), *Dermat. W.*, 60, 1925, p. 257; *Bio. Z.*, 157, 1925, p. 438; *A. Derm.*, 149, 1925; *Z. exp. Med.*, 63, 1928, p. 804. — TANNENHOLZ et MUIR (A.), *Path.*, 15, 1933, p. 789.

*Silicium*. — JONES (W. R.), *Jl of Hygiene*, 33, 1933, p. 308. — POLICARD (A.) et MARTIN (E.), *Bull. Hist.*, 10, 1933, p. 22; POLICARD et MOREL, *Médecine du Travail*, n<sup>o</sup> 4, 1932, p. 56.

## SECTION II.

### Protides et leurs dérivés.

---

## CHAPITRE IX.

### PROTIDES EN GÉNÉRAL.

---

#### I. — RÉACTIONS COLORÉES GÉNÉRALES DES PROTIDES.

En Chimie biologique, les protides peuvent être caractérisés par un certain nombre de méthodes : précipitation, coagulation, réactions de coloration.

Les méthodes de précipitation (précipitation réversible par addition de sels divers) ou de coagulation (précipitation irréversible avec modification profonde, obtenue par la chaleur, les acides minéraux ou organiques, les alcools, les sels des métaux lourds, des réactifs divers, formol, acide picrique, phénols, iodures complexes, etc.) ne constituent pas, à proprement parler, des méthodes histochimiques. Le fait qu'une substance histologiquement décelable précipite ou coagule par un de ces réactifs est d'une portée générale très réduite; il ne semble pas, dans l'état actuel de nos connaissances, qu'il puisse être interprété comme démontrant ou même faisant prévoir la nature protidique de cette substance. Les réactifs précipitant ou coagulant les protides sont, en effet, des fixateurs histologiques et le problème de leur action n'est pas autre chose que le problème de la fixation histologique en général. On sait combien d'obscurités et d'incertitudes l'entourent. La question est donc encore loin d'être élucidée et ces caractères ne peuvent servir de base à des conclusions histochimiques, pas plus que les caractères de colorabilité.

Les seules réactions des protides applicables en Histochemie sont donc

leurs réactions colorées; et encore, parmi toutes celles-ci, bien peu sont utilisables. La plupart exigent en effet des conditions de réalisation incompatibles avec la conservation des structures histologiques. Nous n'indiquerons que les moins mauvaises.

Prises isolément, les réactions colorées des protides n'ont qu'une signification assez ambiguë. En effet, elles sont rarement spécifiques et peuvent être données par des substances qui ne sont pas des protides. D'autre part, elles sont généralement dues à la présence dans la molécule protidique de groupements particuliers, tels que celui de la tyrosine ou du tryptophane. Si ce groupement manque dans un protide donné, la réaction sera négative. Les réactions colorées des protides doivent donc être envisagées comme un ensemble. Ce n'est que par leur réunion que l'on peut se faire une idée de la nature protidique d'une substance.

Il est bien entendu que, sous le nom de réactions colorées des protides, nous n'avons en vue que les réactions dans lesquelles l'apparition de la coloration est due à un phénomène chimique se produisant entre le réactif et la molécule du protide. Il ne s'agit pas des phénomènes de coloration dus à l'adsorption d'une substance colorée par le substrat protidique. De telles réactions, comme par exemple la coloration jaune produite par l'action de l'iode, la colorabilité par l'acide picrique ou l'éosine, qui ont été considérées quelquefois comme réactions permettant d'affirmer la nature protidique d'une structure, n'ont absolument aucune valeur histo-chimique et n'ont même pas de signification approximative.

*A. Réaction xanthoprotéique.* — Cette réaction consiste en la nitration des radicaux aromatiques contenus dans les protides, et principalement des noyaux phénoliques. Elle n'est pas spécifique des protides, car elle est donnée par un très grand nombre de substances renfermant des radicaux aromatiques, par exemple les phénols, les dérivés indoliques, les alcaloïdes, etc. Quoique nécessitant un réactif assez brutal, elle n'est pas trop nocive pour les coupes. La coloration jaune canari ou orangée caractéristique de la réaction est souvent peu intense, mais assez nette.

Traiter la coupe par de l'acide nitrique fumant froid; laisser agir quelques minutes; les protides se colorent en jaune. Rincer et exposer aux vapeurs d'ammoniaque; la coloration passe à l'orangé.

*B. Réaction de MILLON.* — Cette réaction est relativement facile à



obtenir. Elle est due aux radicaux aromatiques des protides, et particulièrement aux noyaux tyrosine. Elle est également donnée par un certain nombre de composés phénoliques non protidiques.

Il existe un assez grand nombre de formules du réactif de MILLON. La meilleure pour l'usage histochimique nous paraît être celle de BENSLEY, qui a l'avantage marqué de pouvoir s'employer à froid, et qui donne une réaction colorée durable; par l'emploi d'autres réactifs, il arrive assez souvent que la coloration se détruisse.

Préparation du réactif : diluer 400<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'acide nitrique concentré (densité 1,42) à 1 litre au moyen d'eau distillée. Laisser reposer 48 heures. Diluer alors de nouveau au dixième. La solution d'acide nitrique à 4 pour 100 ainsi obtenue est alors additionnée de cristaux de nitrate mercurique en grand excès et abandonnée plusieurs jours jusqu'à complète saturation. Filtrer ensuite. A 400<sup>cm<sup>3</sup></sup> de la solution ainsi obtenue, ajouter 3<sup>cm<sup>3</sup></sup> de la solution initiale à 40 pour 100 d'acide nitrique et 1<sup>g</sup>,4 de nitrite de sodium. Les coupes sont plongées dans la solution ainsi obtenue pendant plusieurs heures; généralement, au bout de 3 heures la réaction présente une intensité suffisante. Les protides sont colorés en rouge ou en rose.

C. *Réaction à la ninhydrine.* — RUHEMANN et ABDERHALDEN ont montré que la ninhydrine (hydrate de tricéthohydrindène) donne, avec les acides aminés, les polypeptides et les protides une coloration bleue ou violette intense. Cette réaction a été utilisée en Histochimie par BERG, ROMIEU, GIROUD, et paraît assez avantageuse. Elle est en effet assez peu nocive pour les préparations lorsqu'elle est exécutée avec précautions et la coloration qu'elle communique aux substances protidiques est bien visible. C'est essentiellement une réaction des  $\alpha$  aminoacides et est commune à toutes les substances possédant un radical  $\text{CO OH}-\text{CH}-\text{NH}^2$ . D'après BERG, cette réaction ne serait positive qu'au niveau des produits de désintégration des albumines et des protides « inférieurs » (?).

*Technique de BERG.* — Fixer au formol à 10 pour 100; laver; couper par congélation. Faire bouillir la coupe 1 minute dans 2<sup>cm<sup>3</sup></sup>,5 d'une solution de ninhydrine à 0,2 pour 100; laver, monter à la glycérine ou à la glycérine gélatinée. ROMIEU emploie une solution plus concentrée et ne chauffe que légèrement.

D. *Réaction à l'alloxane.* — KRASSER a indiqué que l'alloxane, en solution alcoolique à 1 pour 100, colore les protides en rouge ou en rose. HURTLEY et WOTTON ont élucidé le mécanisme de cette réaction. Elle est due à la présence d' $\alpha$  aminoacides. L'acide est décomposé en fournissant

de l'ammoniaque, pendant que l'alloxane est partiellement réduite en acide dialurique. Une molécule d'acide dialurique se combine à une molécule d'alloxane non modifiée pour donner de l'alloxanthine; et celle-ci réagit avec l'ammoniaque formée pour donner du purpurate d'ammonium ou murexide. ROMIEU loue beaucoup cette réaction et la considère comme une des meilleures réactions des protides; elle s'effectue en solution neutre et à froid; bien entendu, comme elle n'est pas rigoureusement spécifique, elle demande à être vérifiée par les autres réactions des protides. GIROUD l'effectue à chaud et observe qu'elle doit être interprétée avec prudence car la coloration montre une certaine tendance à la diffusion.

E. *Réaction à la quinone.* — Les protides chauffés avec de la quinone donnent naissance à une coloration rouge brunâtre (WURSTER et RACIBORSKY). D'après ROMIEU, la réaction ne se produit qu'à chaud et au contact de la poudre de quinone. Cette réaction n'est donc pas beaucoup à conseiller en Histo chimie, mais peut cependant donner d'utiles indications.

F. *Réaction d'AXENFELD.* — Cette réaction s'obtient en déposant sur la préparation quelques gouttes d'acide formique, puis 3 ou 4 gouttes de chlorure d'or à 0,1 pour 100 et en chauffant lentement (GIROUD). Il se développe une réaction rose, puis violette. Cette réaction est très peu caractéristique des protides, car bien d'autres substances, créatine, urée, acide urique, guanine, glycogène par exemple, donnent des réactions très analogues. Son emploi peut donc mener à des erreurs d'interprétation.

G. *Réaction de ROMIEU.* — ROMIEU a observé que l'acide orthophosphorique concentré développe par un léger chauffage une coloration rouge ou violette au niveau des protides. D'après les recherches de BLANCHETIÈRE et ROMIEU, cette réaction serait due au groupement tryptophane des protides. Sous l'action de l'acide phosphorique, il y aurait déshydratation de radicaux hydrocarbonés et formation d'une aldéhyde; celle-ci réagirait avec le tryptophane et de façon plus générale avec les groupements indoliques des protides pour donner naissance à la réaction caractéristique. Somme toute, cette réaction serait assez analogue comme principe aux réactions à l'acide glyoxylique (ADAMKIEWICZ) ou au formol (LEWIN) ou à la benzaldéhyde (REICHL), toutes trop brutales pour pouvoir constituer des réactions histo chimiques.

*Technique.* — Fixer au formol, à l'alcool ou au Bouin. Faire des coupes un peu épaisses, soit à la paraffine, soit, de préférence, à la celloïdine. Recouvrir la coupe d'une goutte d'acide phosphorique sirupeux et d'une lamelle; passer quelques minutes à l'étuve à 56° et examiner immédiatement après dans le réactif lui-même.

Les autres réactions colorées des protides, telles qu'on les décrit en Biochimie, peuvent occasionnellement être appliquées à l'Histochimie, mais de façon générale, elles sont beaucoup trop brutales et détruisent toute structure histologique.

## II. — RÉACTIONS PAR MORDANÇAGE.

Comme les réactions colorées des protides sont assez peu caractéristiques, on a essayé de tourner la difficulté en utilisant l'affinité des protides pour certaines substances pouvant elles-mêmes fournir des réactions colorées. Par exemple, les méthodes de ZACHARIAS (ferrocyanure, puis perchlorure de fer), de POULSEN (tanin, puis sulfate ferreux), de DERRIEN et TURCHINI (tanin acétique, puis chlorure ferrique). Ces méthodes sont basées sur des affinités encore mal définies; aussi n'en parlerons-nous que pour les signaler. Il y aurait intérêt à en entreprendre une étude systématique et approfondie.

## III. — MÉTHODES DE DIGESTION ARTIFICIELLE.

On peut essayer de distinguer entre elles les différentes classes de protides d'après leur plus ou moins grande résistance vis-à-vis des agents de digestion artificielle (pepsine, trypsine).

Ainsi, la digestion pepsique dissout les fibrilles collagènes, la réticuline, les substances cornées de l'ongle et des plumes; très peu les fibres élastiques; pas du tout la nucléine, la substance cornée des poils, la chitine. La digestion tryptique dissout les fibrilles élastiques, et la plupart des protides habituels. Elle respecte le collagène, la réticuline, les substances cornées et la chitine.

Les méthodes de digestion, utilisées de très bonne heure (SCHWANN, 1839), ont été surtout en faveur au commencement de ce siècle; à l'heure actuelle, elles ne constituent plus une méthode de recherche couramment employée, si ce n'est peut-être pour l'étude des substances squelettiques et des processus de kératinisation.

On trouvera tous les renseignements techniques nécessaires sur ces méthodes dans la revue générale de SPALTEHOLTZ.

Nous avons déjà effectué la critique des méthodes de digestion artificielle dans la partie générale de cet ouvrage, en parlant des réactions de solubilité en Histochemie. Nous avons montré que leur valeur histochemique est très mince, l'état physique des structures étudiées jouant un rôle au moins aussi grand que leur constitution chimique. Nous prions le lecteur de se reporter à ce chapitre et nous n'ajouterons qu'un mot à ce sujet : les méthodes de digestion artificielle dans l'étude des protides ont d'autant moins de valeur qu'il est extrêmement rare de pouvoir disposer de ferments rigoureusement purs. Les ferments que l'on a à sa disposition sont presque toujours des mélanges plus ou moins complexes de ferments, dont l'action est très difficile à débrouiller. Tirer des conclusions du fait qu'une structure est ou n'est pas dissoute par un ferment donné, c'est donc s'aventurer sur un terrain singulièrement mouvant.

Du peu de valeur des réactions de digestion artificielle, les histochemistes semblent bien s'être rendu compte, car leur emploi devient de plus en plus restreint; c'est là une évolution qu'on ne peut qu'approuver.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

ABDERHALDEN (E.), *Hoppe-S.*, 72, 1911, p. 37. — BERG (W.), *Pflüger*, 194, 1922, p. 102; 199, 1923, p. 629; *Kl. W.*, n° 37, 1923; *Pflüger*, 214, 1926, p. 243. — BENSLEY (R. R.) et GERSH (I.), *Anat. Rec.*, 57, 1933, p. 217. — BLANCHETIÈRE (A.), *Acad.*, 180, 1925, p. 2072. — BLANCHETIÈRE (A.) et ROMIEU (M.), *Biol.*, 107, 1931, p. 1127. — DERRIEN et TURCHINI (J.), *Bull. Soc. Sc. méd. Biol. Montpellier*, 1924. — GIROUD (A.), *Prot.*, 7, 1929, p. 72. — HURTLEY et WOTTON, *Jl. Chem. Soc.*, 99, 1911, p. 281. — ROMIEU (M.), *Bull. Hist.*, 2, 1925, p. 185; *Acad.*, 180, 1925, p. 875; *Biol.*, 96, 1927, p. 1230. — SPALTEHOLTZ, *Enz. mikr. Techn.*, II, Aufl. 1910, article *Künstliche Verdauung*.

---

---

## CHAPITRE X.

### PRODUITS D'ANABOLISME ET DE CATABOLISME DES PROTIDES.

Sous ce titre, nous étudierons : A. Les acides aminés et leurs dérivés actuellement décelables par des méthodes histo-chimiques, à savoir : 1<sup>o</sup> les aminoacides soufrés et leurs dérivés; 2<sup>o</sup> les composés phénoliques, considérés comme dérivant des aminoacides aromatiques (tyrosine, phénylalanine); 3<sup>o</sup> les composés indoliques, considérés comme dérivant du tryptophane; B. L'urée.

#### I. — AMINOACIDES SULFURÉS ET LEURS DÉRIVÉS.

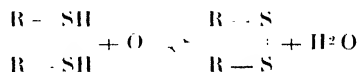
Les substances à fonction sulfhydrile jouent un rôle vraisemblablement important dans les phénomènes physiologiques. C'est ce qui résulte des travaux bien connus de REY-PAILHADE sur le philothion, de HOPKINS, QUASTEL, STEWART, TUNICLIFFE, MEYERHOF et de nombreux autres auteurs sur le glutathion. Nous n'insisterons pas ici sur le détail de ces études que l'on trouvera exposé dans les manuels de Chimie physiologique.

Les premières recherches montrant la présence dans les tissus de substances à fonction SH remontent à GOLA (tissus végétaux) et à BUFFA (tissus animaux). BUFFA observa qu'une solution alcaline de nitroprussiate de soude développe une coloration rouge au niveau de nombreux tissus. D'après l'auteur, la réaction ne pouvait être due ni à l'acétone ni à la créatine (qui donnent aussi, comme on le sait, des réactions colorées avec le nitroprussiate), mais à la cystéine. L'accumulation de cette cystéine correspondrait aux régions à métabolisme particulièrement intense. HEFFTER étudia de même le pouvoir réducteur de certains tissus envers différents réactifs et attribua ce pouvoir réducteur à la présence de cystéine. Lorsque HOPKINS eut démontré que la substance à fonction sulfhydrique libre que l'on peut extraire des tissus n'est pas la cystéine, mais le gluta-

thion, tripeptide de l'acide glutamique, du glycolle et de la cystéine (<sup>1</sup>), plusieurs biochimistes eurent l'occasion de le rechercher au sein même des tissus par la réaction au nitroprussiate; par exemple, HOPKINS lui-même, FINK, CAMP, KAYE, WALKER, etc. Mais ces recherches n'étaient pas envisagées spécialement du point de vue histologique et leurs très intéressantes études ne peuvent guère compter comme histochimiques. C'est à JOYET-LAVERGNE, MATTEI et DULZETTO, GIROUD et BULLIARD que l'on doit les premières études histochimiques systématiques sur ce sujet et la mise au point des méthodes utilisables dans ce but.

1. *Méthodes de recherche.* — La meilleure méthode de recherche des substances à fonction sulfhydrile dans les protoplasmes, et d'ailleurs la plus employée, consiste en la réduction du nitroprussiate de soude en milieu alcalin. Comme BUFFA l'a montré, l'acétone et la créatinine ne peuvent guère entrer en ligne de compte dans l'étude des tissus animaux et la réaction est en fait à peu près spécifique pour les substances à fonction sulfhydrile; signalons cependant, d'après SULLIVAN, que des aldéhydes pourraient réagir de même.

La réaction au nitroprussiate est donnée par toutes les substances possédant un groupement SH — libre, par exemple par la cystéine et le glutathion réduit. Comme on le sait, ces substances sont capables de s'oxyder en donnant des substances à fonction disulfure —S—S—, cystine et glutathion oxydé. Ces dernières ne donnent pas la réaction; mais on peut les ramener à l'état réduit en faisant agir un réducteur convenable, par exemple le cyanure de potassium ou le sulfite de sodium. En mettant à profit cette propriété, on peut donc mettre en évidence également les formes oxydées, qui d'ailleurs existent dans les tissus en bien moins grande quantité que les formes réduites. Les formules schématiques suivantes expriment la relation entre les formes sulfhydrile et les formes disulfure :



Les techniques préconisées par les différents auteurs, dans le but de

---

(<sup>1</sup>) Dans ses premières recherches HOPKINS avait considéré le glutathion comme un dipeptide de l'acide glutamique et de la cystéine; ce n'est que plus tard qu'il y reconnut la présence de glycolle.

rechercher, soit le glutathion en particulier, soit les substances à fonction SH en général, sont toutes des modalités de la réaction au nitroprussiate. En voici quelques-unes, à titre documentaire.

MATTEI et DULZETTO, pour rechercher le glutathion, fixent des fragments de tissu pendant une demi-heure dans l'acide trichloracétique à 20 pour 100. Les coupes par congélation sont traitées 3 à 4 minutes par une solution fraîche de nitroprussiate de sodium; après essorage rapide, on expose la coupe aux vapeurs de  $\text{NH}_3$ , refroidit énergiquement par la glace ou le  $\text{CO}_2$  solide et examine immédiatement au microscope dont la platine a été refroidie à 5°. La coloration rouge violette communiquée aux corps à fonction sulphydrique est fugace.

JOYET-LAVERGNE, également pour rechercher le glutathion, utilise trois modes opératoires. Pour les tissus frais, il indique une méthode directe et une méthode indirecte. La première consiste simplement à traiter le tissu par une goutte d'une solution fraîche de nitroprussiate de soude à 5 pour 100, puis à l'additionner d'une goutte d'ammoniaque et à examiner immédiatement. La deuxième consiste à faire précéder ce traitement par l'action d'un « stimulant »; on peut utiliser quatre stimulants; les deux premiers sont des réducteurs destinés à faire passer les formes oxydées à l'état de forme réduite: soit le cyanure de potassium à 10 pour 100 pendant 5 minutes, soit le sulfite de sodium à 2 pour 100 pendant 10 minutes; les deux autres sont des traitements, soit par une solution saturée de sulfate d'ammonium pendant 15 minutes, soit par de l'acide trichloracétique pendant 2 à 5 minutes. La dernière méthode est destinée à l'étude des tissus fixés. On fixe de quelques heures à un jour dans l'alcool absolu, ou bien dans le formol salé (formol, 15; eau physiologique, 75), ou bien dans l'acide trichloracétique à 2 pour 100. Dilacérer ou couper par congélation. Pratiquer ensuite la méthode indirecte en appliquant les stimulants 1 ou 3.

GIROUD ET BULLIARD, dans beaucoup de recherches, ont utilisé l'étude directe des tissus frais, dilacérés ou coupés par congélation, en traitant les tissus par une solution de nitroprussiate de sodium à 10 pour 100 alcalinisée par environ 2 pour 100 d'ammoniaque. Ils ont également utilisé cette réaction après fixation par l'alcool.

Toutes ces réactions présentent l'inconvénient de ne fournir que des colorations fugaces. GIROUD ET BULLIARD ont trouvé un moyen de les stabiliser, par un traitement préalable de quelques secondes au moyen d'une solution à 5 pour 100 d'acétate de zinc. La coloration obtenue par ce procédé est rouge groseille au lieu d'être violette comme la réaction normale au nitroprussiate. Après l'action des réactifs, on monte au baume d'après les techniques histologiques habituelles. Les préparations restent colorées longtemps, mais il est préférable de les conserver à la glacière.

Toutes les réactions indiquées jusqu'ici présentent l'inconvénient de ne pas empêcher la diffusion possible du glutathion. Ce tripeptide est en effet soluble dans l'eau et un entraînement est possible. Cette objection a moins de valeur qu'elle ne paraît au premier abord, car la plupart des substances à fonction sulphydrique du protoplasme sont, comme GIROUD l'a montré, des substances fixes.

On doit bien le dire, il reste quelque équivoque dans ces techniques, et les auteurs ne se sont pas toujours rendu compte exactement de la signification exacte de la réaction qu'ils ont employée. Le nitroprussiate de sodium indique bien la présence d'une substance à fonction sulfhydrile, mais suivant les traitements préalables que l'on a fait subir à la préparation, on ne met pas en évidence la même substance.

Avec HOPKINS, on peut classer les substances à fonction sulfhydrile des cellules en deux groupes. Dans le premier, nous rangerons les substances *solubles*. Les seules qui aient quelque importance dans ce groupe sont le glutathion réduit et le glutathion oxydé. Le premier est décelable immédiatement par le nitroprussiate; le second ne l'est qu'après avoir été ramené à l'état réduit par l'action d'un réducteur convenable, par exemple le cyanure de potassium. Dans le second groupe, se classent les substances à fonction sulfhydriques *fixes*. Celles-ci, qui sont liées aux protides protoplasmiques, ne sont en général pas décelables immédiatement par le nitroprussiate; il est nécessaire de les « démasquer » par l'action de réactifs convenables. Ceux-ci sont des coagulants ou des dénaturants des protides. Une expérience de SHEARER illustre ces faits. La réaction au nitroprussiate donne des résultats positifs sur l'œuf d'Oursin frais. SHEARER extrait de l'œuf toutes les substances SH solubles par l'action d'une solution très diluée d'acide acétique; la réaction au nitroprussiate devient alors très faible. Or, si l'on fait agir des fixateurs histologiques sur du matériel ainsi traité, on peut constater que la réaction redevient très forte, par libération des SH fixes des tissus.

L'acide trichloracétique, qui, comme on l'a vu, a été souvent utilisé par les morphologistes, a une double action. C'est un extracteur des formes solubles et un démasquant des formes fixes. Les substances réagissant au nitroprussiate après « fixation » à l'acide trichloracétique ne sont donc pas seulement le glutathion, SH soluble, comme certains auteurs l'ont cru (MATTEI et DULZETTO, PARUTA, JOYET-LAVERGNE), mais bien, outre le glutathion restant après traitement à l'acide trichloracétique, des substances à fonction sulfhydrique fixes. GIROUD et BULLIARD les considèrent comme de la cystéine faisant corps avec les protides protoplasmiques.

LANGERON, dans la dernière édition de son *Précis de Microscopie*, a fort bien résumé, dans un article documenté par RAPKINE, les données fournies par les modalités de la réaction au nitroprussiate. Les voici :



1° *Tissus frais* (fragments, coupes par congélation, frottis) :

a. Glutathion réduit : traiter sur lame par une goutte de solution (à 5 pour 100 pour les tissus végétaux, à 2 pour 100 pour les tissus animaux) de nitroprussiate de sodium. Ajouter un renforçateur, tel que le sulfate d'ammonium en solution aqueuse saturée ou en cristaux, puis une goutte d'ammoniaque. Le glutathion réduit prend une coloration rouge ou violacée.

b. Glutathion total : traiter le tissu par une solution de cyanure de potassium à 10 pour 100 pendant 5 à 10 minutes. Effectuer ensuite la réaction ci-dessus.

c. Radicaux SH fixés aux protides : les fragments de tissu sont traités à plusieurs reprises, chaque fois pendant 15 minutes, par une solution d'acide trichloracétique à 10 pour 100. Laver à grande eau après chaque traitement. Employer ensuite la même réaction que pour le glutathion réduit.

2° *Tissus fixés*. — Éviter les fixateurs comme l'alcool absolu ou l'acide trichloracétique qui peuvent démasquer les groupes sulfhydriles. Fixer de préférence par le formol salé. Opérer ensuite comme pour les tissus frais.

Toutes ces réactions sont fugaces. On peut les stabiliser en employant le procédé de GIROUD et BULLIARD déjà cité plus haut.

## 2. Résultats de la recherche histochimique des substances à fonction SH.

A. *Morphologie des substances à fonction sulfhydrile*. — Nous parlerons tout d'abord de la répartition cytologique des substances à fonction sulfhydrile dans la cellule.

Les recherches de JOYET-LAVERGNE ont amené cet auteur à considérer le chondriome comme le support de glutathion. En vérité, les examens des réactions au nitroprussiate sont assez malaisés quand il s'agit de détails cytologiques fins, qui ne peuvent être examinés qu'aux plus forts grossissements. PARAT s'est déclaré incapable de localiser la réaction à un élément cellulaire défini. GIROUD, cependant, sur un matériel favorable, la cellule intestinale de l'*Ascaris canis* et la cellule ovarienne du même animal, a pu constater de la façon la plus nette que le chondriome renferme bien une substance à fonction sulfhydrile. Pour JOYET-LAVERGNE, nous l'avons vu, la substance ainsi liée au chondriome serait le glutathion. GIROUD admet, au contraire, qu'il s'agirait des formes fixes des substances à fonction sulfhydrile.

D'autre part, d'après GIROUD, ces relations entre le chondriome et les substances à fonction sulfhydrile ne sont pas nécessaires, comme le pense JOYET-LAVERGNE.

Il y a des organes riches en ces substances et pourtant pauvres en chondriome, par exemple le cristallin ou les globules rouges. Et réciproquement : les éléments des glandes salivaires, riches en chondriome, ne présentent

pas de réaction bien nette, pas plus que les tubes à bâtonnets du rein. Dans le muscle, les myofibrilles donnent des réactions bien plus marquées que la partie sarcoplasmique.

Continuant ses investigations sur la répartition cellulaire des substances à fonction sulfhydrile, GIROUD montre que la forme soluble, c'est-à-dire le glutathion, existe tout particulièrement dans le protoplasma non figuré ou hyaloplasma, tandis que la forme fixe est surtout localisée au niveau du protoplasma figuré (chondriome, myofibrilles, etc.). C'est surtout cette dernière forme qui est mise en évidence par les réactions histo-chimiques. Dans les deux cas, c'est presque en totalité à l'état réduit que ces substances préexistent. Rares sont les formes oxydées.

B. *Rôle des substances à fonction SH.* — Nous ne parlerons pas ici du rôle général des substances à fonction SH dans le métabolisme cellulaire général. On sait que de nombreuses recherches d'ordre biochimique ont montré que le glutathion, par sa fonction SH, est capable de fonctionner comme un transporteur d'hydrogène suivant la conception de WIELAND, et peut donc jouer un rôle important dans les phénomènes d'oxydo-réduction du protoplasme. Partant de ces idées, certains morphologistes, parmi lesquels on doit signaler tout spécialement JOYET-LAVERGNE, se sont efforcés de préciser le rôle des substances à fonction SH dans la physiologie cellulaire, en mettant par exemple en rapport teneur en glutathion et rH intracellulaire — ou bien richesse du chondriome en glutathion et pouvoir oxydant de celui-ci. Mais, outre que ces conclusions ont été vivement attaquées (REY, WURMSER), on doit bien dire que la solution de tels problèmes généraux de physiologie cellulaire n'apparaît pas pouvoir être apportée par le secours de la Morphologie. Ces questions ne relèvent pas à proprement parler de l'Histo chimie, mais ressortissent à la Physicochimie et à la Chimie biologique.

Nous limiterons donc notre exposé aux domaines où l'étude morphologique a permis d'accomplir d'importants progrès. Dans cet ordre d'idées, une mention toute spéciale doit être accordée aux belles études de GIROUD et BULLIARD sur le rôle des substances à fonction sulfhydrile dans les processus de kératinisation. Ces recherches traitent dans l'ordre morphologique de données qui, à un point de vue plus spécialement chimique, avaient été l'objet d'investigations de BUFFA, KAYE, WALKER.

Dans l'épiderme et les phanères, existent au niveau du corps muqueux,

des corps réducteurs à fonction sulfhydrile, se présentant sous deux formes : une forme soluble qui peut être considérée comme étant du glutathion et une forme fixe qu'on peut regarder comme un groupement cystéinique appartenant aux substances albuminoïdes du protoplasma. Dans les processus de kératinisation, c'est surtout cette dernière substance qui présente l'intérêt majeur. On voit, en effet, qu'elle précède toujours immédiatement, dans le temps comme dans l'espace, l'apparition de la kératine; elle existe toujours là où il y a activité kératogène.

Au niveau des kératinisations du type épidermique (*type mou*, kératinisation imparfaite), on observe une réaction au nitroprussiate d'intensité moyenne répartie de façon homogène dans tout le corps muqueux. Elle ne se produit plus dans la kératine définitivement formée. Au contraire, au niveau des phanères (*type dur*, kératinisation parfaite), se voit une réaction intense, ne s'étendant pas à toute l'étendue du corps muqueux, mais strictement localisée à une zone située au voisinage immédiat de la couche cornée; la corne néoformée se colore encore légèrement; la corne définitive ne présente jamais la réaction.

L'usage du nitroprussiate permet donc ainsi de faire très aisément la distinction entre les deux types de kératinisation et permet en outre d'aborder aisément la question de la croissance des phanères; la réaction des substances à fonction sulfhydrile met en effet en évidence de façon saisissante les points où se forment les phanères. Ce fait a permis aux auteurs de préciser de nombreux problèmes morphologiques de la croissance des phanères et, notamment, de révéler l'activité de certaines zones dont la participation à la formation des phanères a pu être mise en doute. C'est le cas, par exemple, pour le lit de l'ongle où la réaction au nitroprussiate démontre l'existence d'une légère activité kératogène.

Au point de vue chimique, les substances à fonction sulfhydrile fixes que l'on voit apparaître lors de la kératinisation représentent les matériaux à partir desquels s'édifient les corps soufrés de la kératine, qui est, comme on le sait, une des substances organiques les plus riches en soufre de l'organisme. GIROUD et BULLIARD ont de bonnes raisons de penser que ces groupements SH fixes du corps muqueux sont la forme réduite des corps disulfurés ou oxydés présents dans la kératine. On peut, par suite, considérer les premiers, dont l'état réduit est peut-être sous la dépendance des propriétés du protoplasme vivant, comme la forme primitive des seconds.

En étudiant un processus de kératinisation extrêmement curieux qui a

lieu dans le gésier des oiseaux, se déroulant avec des phénomènes morphologiques très différents de ceux de la kératinisation habituelle, BROUSSY a retrouvé des corps à fonction sulfhydrile précédant l'apparition de la kératine. Alors qu'en général la kératinisation résulte de la transformation chimique de produits à l'intérieur de la cellule et affecte le corps cellulaire lui-même, au niveau du gésier des oiseaux, le processus kératogène s'effectue dans des produits de sécrétion formés dans des glandes et excrétés. Or, dans le matériel étudié par BROUSSY, la réaction au nitroprussiate est positive dans les éléments sécrétants et dans le contenu glandulaire; cette même réaction devient négative, dès que le produit de sécrétion se conglobe en filaments solides présentant tous les caractères de scléroprotides sulfurés. Cette très intéressante observation confirme et complète les études de GIROUD et BULLIARD.

## II. — COMPOSÉS A FONCTION PHÉNOLIQUE.

Les composés à fonction phénolique se rencontrent fréquemment chez les êtres vivants. Chez les végétaux, on en a décrit un grand nombre; chez les animaux, on les rencontre moins fréquemment, mais leur métabolisme, d'aspect très varié, n'en est pas moins intéressant. On peut les rencontrer, soit comme terme du métabolisme constructif des protides, soit comme éléments cataboliques. Dans la première catégorie, on doit surtout envisager la tyrosine, aminoacide phénolique. Dans la seconde, on rencontre des produits assez divers : produits de déchets (phénols urinaires); produits d'élimination adaptés à une fin physiologique et représentant la partie active de certains venins (tyramine de la glande salivaire postérieure des Céphalopodes, composés phénoliques de la glande à venin de BUFO, quinone chez *Iulus terrestris*); produits intermédiaires dans la genèse des pigments (prémélanines); substances hormonales (adrénaline).

L'étude histochimique systématique des composés à fonction phénolique est récente, mais elle a donné déjà des résultats très intéressants dans des domaines divers. Les premières recherches effectuées dans cet ordre d'idées sont dues à CORDIER et LISON et portent sur la nature de la substance chromoargentaffine de la cellule de KULTSCHITZKY. Les méthodes utilisées dans cette étude furent ensuite développées par LISON et appliquées à d'autres matériels. Depuis cette époque, plusieurs travaux ont paru,

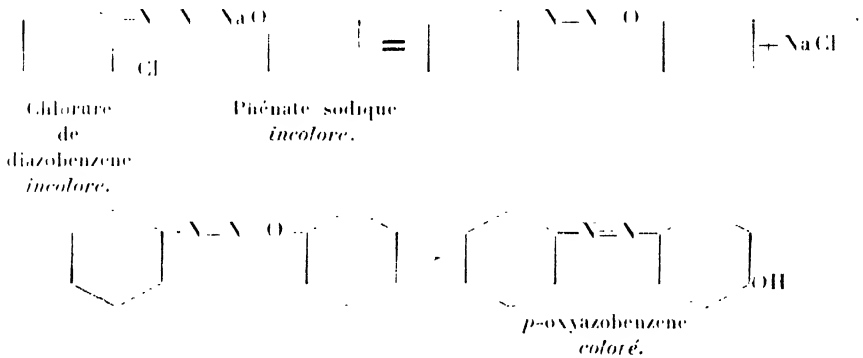
confirmant les données de ces auteurs et exposant de nouveaux résultats obtenus par l'étude d'animaux et d'organes variés. Nous dirons un mot de ces recherches plus loin.

### 1. Méthodes d'étude des composés phénoliques.

Les réactions utilisables en Histochimie pour la recherche des composés phénoliques sont au nombre de quatre. Les deux premières sont des réactions générales à tous les composés phénoliques; on les nomme l'*azoréaction* et l'*indoréaction*; les deux autres sont spéciales et caractéristiques des diphénoles ou polyphénols en position ortho ou para; ce sont la *réaction chromaffine* et la *réaction argentaffine*.

A. L'*azoréaction* consiste essentiellement en la formation d'une matière colorante azoïque par réaction du phénol tissulaire en milieu alcalin avec un sel de diazonium.

Par exemple, en supposant que le phénol tissulaire soit le benzophénol

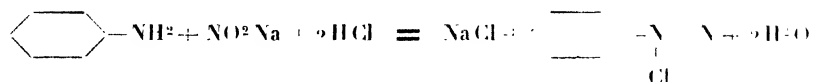


Les deux substances réagissantes, prises isolément, à savoir le phénol du tissu et le sel de diazonium du réactif sont *incolorés*; leur produit de réaction est *vivement coloré*.

Cette réaction est donc une véritable synthèse de matière colorante.

*Technique.* — Le premier temps de l'azoréaction est la préparation de la solution du sel de diazonium. Comme ces sels, à part de rares exceptions, sont instables, on est obligé de les préparer extemporanément, par *diazotation* d'une amine aromatique. En principe, toute amine aromatique peut être employée dans ce but; il suffit de la traiter, en solution bien refroidie et diluée, par une solution acide de nitrite de sodium. La réaction s'effectue

suivant le schéma suivant, où l'amine diazotée est supposée être l'aniline :



Voici, d'après LISON, les quantités de réactifs à employer pour la préparation de 50 cm<sup>3</sup> de solution de diazoïque, à partir de quelques amines aromatiques :

- a. Acide sulfanilique, 20 cg; H Cl 36° B., 4 cm<sup>3</sup>; solution de nitrite de sodium à 5 pour 100 3 cm<sup>3</sup>.
- b. Naphtylamine, 15 cg; H Cl, 8 cm<sup>3</sup>; NO<sup>2</sup>Na, 6 cm<sup>3</sup>.
- c. Acide naphthionique, 15 cg; H Cl, 4 cm<sup>3</sup>; NO<sup>2</sup>Na, 2 cm<sup>3</sup>.
- d. Benzidine, 20 cg; H Cl, 8 cm<sup>3</sup>; NO<sup>2</sup>Na, 5 cm<sup>3</sup>.
- e. Dianisidine, 15 cg; H Cl, 8 cm<sup>3</sup>; NO<sup>2</sup>Na, 5 cm<sup>3</sup>.
- f. Acide dianisidine sulfonique, 12 cg; H Cl, 8 cm<sup>3</sup>; NO<sup>2</sup>Na, 5 cm<sup>3</sup>.

Quelle que soit l'amine choisie, le mode opératoire est le même : on prépare une solution ou une suspension de l'amine à diazoter, on y ajoute l'acide chlorhydrique, puis on refroidit énergiquement par de la glace. Pour que la diazotation s'effectue bien, la température ne doit pas dépasser 5°. On ajoute alors progressivement et en agitant la quantité voulue de la solution de nitrite de sodium et l'on maintient le mélange à la glacière pendant 20 minutes. Au bout de ce temps, l'amine est diazotée; la solution se conserve ainsi quelques heures.

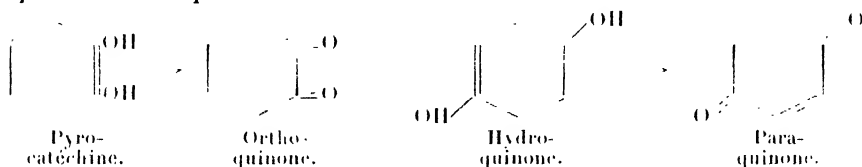
CLARA utilise des solutions de diazonium préparées à partir de l'acide sulfanilique, de la paranitroaniline et de la benzidine; son mode opératoire est légèrement différent de celui de LISON, mais le principe et le résultat sont identiques.

Au lieu de préparer extemporanément le sel de diazonium, on peut utiliser, comme CLARA l'a fait, des sels de diazonium, qui, plus stables que les autres, ont pu être obtenus à l'état solide et sont introduits dans le commerce. Ce sont le rouge de nitrosamine et le nitrazol CF. L'emploi de ces substances est très simple : il suffit d'en préparer une solution aqueuse à 4 pour 100. Les solutions du premier sont neutres et peuvent être employées telles quelles; les solutions du second sont acides et devront être alcalinisées au moment de la copulation. D'après VIALLI, ces substances ne donnent toutefois pas d'aussi beaux résultats que les sels de diazonium préparés extemporanément.

Le deuxième temps de la azoréaction s'appelle la *copulation* et consiste à faire réagir le sel de diazonium avec le phénol. Cette copulation doit s'effectuer en milieu nettement alcalin. La solution du sel de diazonium choisi, toujours maintenue froide, est alcalinisée par addition d'une solution concentrée de carbonate de soude, également froide. La cessation du dégagement d'acide carbonique et, au besoin, la vérification au papier de tournesol indiquent que la réaction est devenue franchement alcaline. Dès que le réactif est alcalinisé, il doit être utilisé; dans cet état, il ne se conserve guère plus d'un quart d'heure sans altération. Les coupes histologiques sont traitées par le sel de diazonium ainsi alcalinisé pendant un temps très court, qui n'excède pas 30 secondes. La réaction est pour ainsi dire instantanée; un séjour trop prolongé dans le réactif a pour effet de colorer plus intensément le fond sans ajouter à l'intensité de la réaction des phénols.

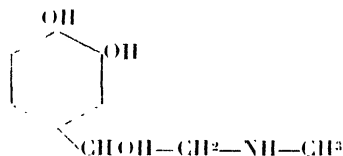


en présentent d'autres. Ce sont les di et polyphénols en position ortho et para. Ces substances se distinguent, en effet, des autres composés phénoliques par leur pouvoir réducteur considérable, dû à leur oxydation aisée en *quinones*. Ainsi, les deux diphénoles les plus simples, l'hydroquinone (para) et la pyrocatechine (ortho) s'oxydent aisément en leurs quinones correspondantes



Les ortho et paradiphénols sont assez fréquents dans les êtres vivants, plus même que les monophénols, et leur rôle dans le métabolisme tissulaire paraît important, à cause précisément de leur aptitude réactionnelle considérable. Histochimiquement, deux réactions leur sont spéciales, la réaction chromaffine et la réaction argentaffine. Ces deux réactions, les histologistes les connaissent depuis longtemps; et pourtant, leur signification chimique précise n'a guère été établie que dans ces dernières années.

C. *Réaction chromaffine.* — HENLE, en 1865, découvrit le brunissement de la médullaire surrénale traitée par des fixateurs renfermant du bichromate. C'est cette coloration brunâtre apparaissant par l'action des bichromates que l'on appelle *réaction chromaffine*. Comme on le sait, dans la surrénale, la réaction chromaffine est due à l'*adrénaline*.



Ce fait fut démontré par MULON, peu après la synthèse de l'adrénaline par TAKAMINE.

Pendant longtemps on s'est assez peu préoccupé du mécanisme et de la signification de cette réaction. Cependant, on pensait, de façon assez générale, que la réaction était due à la réduction du bichromate par l'adrénaline en un oxyde de chrome jaune (BORBERG); OGATA avait attribué à ce produit de réduction la formule  $(CrO^2)_n$ ; d'autre part, on la croyait spécifique de l'adrénaline.



En 1922, VERNE s'aperçut que l'adrénaline n'était pas seule à donner une coloration brune sous l'influence de bichromate ; toute une série d'autres composés aromatiques réducteurs agissent exactement comme l'adrénaline ; il donna une règle, exacte à un point près, pour déterminer *a priori* si une substance aromatique est chromaffine ou non. Toutes ces substances qui réagissent comme l'adrénaline sont, soit des polyphénols, soit des aminophénols, soit des polyamines en position ortho ou para. Les composés méta ne réagissent pas.

VERNE, cependant, n'avait pas élucidé le mécanisme de la réaction. Lorsqu'on fait agir du bichromate sur une des substances citées plus haut, on voit apparaître une coloration brune. De deux choses l'une : ou bien la couleur est due à la formation d'un produit de réduction jaune du bichromate, ou bien elle est due à la formation d'un dérivé d'oxydation coloré de la substance elle-même.

Les observations d'OGATA, indiquant dans le précipité formé lors de la réaction la présence d'un dérivé  $(CrO^2)$ , semblent montrer que la première hypothèse répond à la réalité et que l'expression « réaction chromaffine » qui a de l'affinité pour le chrome se trouve parfaitement justifiée.

GÉRARD, CORDIER et LISON ont montré qu'il n'en était rien et que le mécanisme de la réaction est tout différent. La couleur jaune brunâtre obtenue est due à un produit d'oxydation de la substance réagissante. En effet, les auteurs sont parvenus à obtenir une réaction chromaffine typique *sans employer de sels de chrome*. En fixant des surrénales dans un liquide formolé contenant de l'iodate de potassium — oxydant pas très énergique — la médullaire surrénale se colore en brun jaune, *exactement comme si l'on avait fixé dans un liquide bichromaté*. En faisant agir *in vitro* une solution d'iodate sur une solution d'adrénaline, on voit apparaître une coloration rose. Bien d'autres oxydants agissent comme les iodates ; seulement, si ces oxydants fournissent des produits de réduction colorés, cette coloration se superpose à celle qui est caractéristique de la réaction chromaffine. Ainsi, par exemple, si l'on traite *in vitro* de l'adrénaline par du bichromate, il se produit, *outre la coloration rose caractéristique* de la réaction, un précipité de  $CrO^2$  ; avec l'acide osmique, il se produit un précipité noir d'osmium (réaction de GRYNFELTT, étudiée également par MULON) ; avec l'hydroxyde d'argent ammoniacal, un précipité noir d'argent (réactions de OGATA, de BAGINSKI) ; avec l'iode (réaction de VIRCHOW), la coloration propre du réactif interfère avec celle de la réaction. Seul l'iodate ne

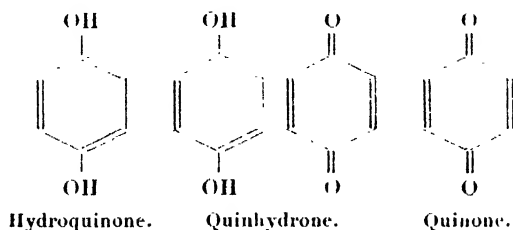
fournit pas d'interférence, parce qu'il est incolore et parce que ses produits de réduction, les iodures, sont également incolores.

La constatation de GÉRARD, CORDIER et LISON a une grande importance au point de vue de la signification et de la spécificité de la réaction chromaffine.

Si la coloration brune observée était due à un produit de réduction du bichromate employé comme réactif, tout corps réducteur *quelconque* pourrait avoir le même effet et la réaction chromaffine serait simplement signalétique d'une substance réductrice *quelconque*. Mais puisque la coloration est due à l'oxydation de la substance réagissante elle-même, la spécificité de la réaction apparaît beaucoup plus étroite.

Pour achever de la délimiter, il faut connaître la nature de cette matière colorée qui se forme lors de l'oxydation d'une substance « chromaffine ». Nous avons déjà dit plus haut que toutes les substances que VERNE, puis LISON ont reconnues comme fournissant une réaction chromaffine positive sont, soit des polyphénols, soit des aminophénols, soit des polyamines en position ortho ou para. Or, l'oxydation de ces corps donne des *quinones*. On pouvait donc penser que les corps colorés, termes finaux de la réaction chromaffine, étaient des *quinones*.

Cependant, la coloration des quinones est très faible et l'on comprendrait mal qu'on puisse la détecter aisément sur les quantités aussi minimes que celles que l'on trouve dans une coupe microscopique. Toute une série de considérations d'ordre chimique, sur lesquelles il serait trop long d'insister ici, ont mené à la conclusion qu'on avait affaire, non pas à des quinones, mais des *quinhydrone*, corps résultant de l'union d'une molécule du polyphénol initial resté inaltéré, avec une molécule de la quinone correspondante. Par exemple, le diphénol le plus simple, l'hydroquinone, dans les conditions où se fait la réaction chromaffine, fournit, non pas la paraquinone, mais la quinhydrone ordinaire.



Les quinhydrone doivent à la coexistence dans leur molécule d'un cycle quinonique et d'un cycle benzénique (ce qu'on exprime en disant qu'elles sont à constitution *mériquinoïdique*), une coloration très intense, visible même à de grandes dilutions.

Ces quinhydrone ont une propriété assez caractéristique; leur oxydation, au moyen d'oxydants *énergiques*, donne la quinone correspondante; et le fait, que l'on peut aisément reproduire sur des coupes microscopiques se traduit par une décoloration marquée; les quinones sont en effet beaucoup moins colorées que les quinhydrone qui leur correspondent.

Les considérations développées dans les paragraphes précédents permettent de délimiter de façon très étroite la signification et le domaine de spécificité de la réaction chromaffine. Elles ont été coordonnées par LISON de façon à énoncer ce que l'on peut appeler les *lois de la chromaffinité*.

1° Sont *chromaffines*, tous les corps appartenant à la série des révélateurs aromatiques photographiques, telle qu'elle a été définie par LUMIÈRE et SEYEWETZ. Répondent à cette description les polyphénols, les aminophénols et les polyamines en position ortho ou para;

2° Les *réactifs* capables de déclencher la réaction chromaffine sont des oxydants n'agissant pas de façon trop énergique; par exemple, les bichromates et les iodates alcalins en solution neutre;

3° Les produits colorés représentant le terme final de la réaction sont des *quinhydrone*, résultant de la condensation d'une molécule du produit initial avec une molécule du produit quinonique formé par l'oxydation de celui-ci;

4° Les oxydants énergiques transforment les quinhydrone en la quinone correspondante; ce fait se traduit par une décoloration de la substance colorée produite lors de la réaction chromaffine.

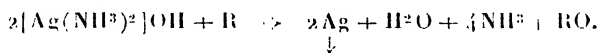
On peut donc conclure de cela que la réaction chromaffine, contrairement à ce qui est souvent affirmé (« elle est élective, mais non spécifique », LAIGNEL-LAVASTINE; « ist in keiner Weise für irgendeine Substanz charakteristisch », CLARA), se révèle comme étant d'une haute spécificité pour des *fonctions chimiques* parfaitement définies : elle est exclusivement l'apanage des di ou polyphénols ou aminophénols ou polyamines en position ortho ou para. Le fait qu'elle est positive permet d'affirmer sans aucun doute la présence d'un de ces composés.

Il faut cependant prendre garde à l'existence de réactions « pseudo-chromaffines »

(LISON). Certaines cellules sont capables d'adsorber énergiquement les sels de chrome et un traitement par ces derniers leur communique une coloration jaune. Il ne s'agit pas, dans ce cas, de la réaction chromaffine vraie qui est, comme nous l'avons vu, une réaction d'oxydation. La distinction entre la réaction vraie et la pseudoréaction est facile : il suffit d'essayer l'action d'un iodate au lieu d'un bichromate. S'il s'agit d'une cellule présentant la réaction vraie, elle se colorera également par un traitement à l'iodate. S'il s'agit de la pseudoréaction, l'iodate sera sans effet. C'est à une telle pseudoréaction chromaffine qu'est due l'intense coloration jaune que prennent les cellules de la région médiale de la glande à pourpre des Murex, par un traitement au bichromate (cellules de GRYNFELT).

La technique de la réaction chromaffine est simple. On l'effectue généralement sur pièces, en fixant les tissus dans un liquide renfermant du bichromate de potassium, tel que le MULLER-formol. Les fixateurs renfermant du sublimé, comme le ZENKER, donnent des résultats inconstants; ceux qui renferment de l'acide chromique donnent généralement des résultats négatifs. On peut également utiliser un fixateur à base d'iodate de potassium (5 pour 100) et de formol (10 pour 100). Ce fixateur, comme nous l'avons vu, ne donne pas lieu à des pseudoréactions, mais l'intensité de la réaction est généralement un peu moindre que celle obtenue avec les fixateurs bichromatés. Quand la substance à étudier peut être conservée après fixation banale, la réaction chromaffine peut très bien être effectuée sur coupes; il suffit de traiter celle-ci quelques heures par une solution à 3 pour 100 de bichromate ou d'iodate de potassium. La réaction positive se reconnaît à la teinte jaune ou brunâtre que prennent les substances chromaffines.

D. *Réaction argentaffine.* — Comme la réaction chromaffine, la réaction argentaffine est connue depuis longtemps. Elle consiste essentiellement en la réduction de l'hydroxyde d'argent ammoniacal en argent métallique par la substance étudiée



Les polyphénols, aminophénols et polyamines en position ortho ou para donnent *tous* cette réaction; elle est due à leur pouvoir réducteur énergétique.

Afin d'éviter des confusions, on doit insister avec CORDIER sur un point important : c'est que *la réaction argentaffine n'a rien de commun avec les imprégnations argentiques*. Dans celles-ci, on traite d'abord le tissu à étudier par un sel d'argent, soit le nitrate d'argent (méthode de CAJAL et ses nombreuses variantes), soit le carbonate d'argent ammoniacal (DEL RIO HORTEGA), soit l'hydroxyde d'argent ammoniacal (BIELSCHOWSKY); ensuite, on fait agir un réducteur, révélateur photographique (CAJAL) ou formol (DEL RIO HORTEGA). Quelquefois, l'ordre est inversé, comme dans la

méthode de FONTANA : on imprègne par le corps réducteur (tanin), puis on fait agir le sel d'argent.

La réaction argentaffine est essentiellement différente : ici, on traite *seulement* par l'hydroxyde d'argent ammoniacal, et c'est la substance réductrice présente dans le tissu qui opère *elle-même* la réduction.

Il importe de réagir contre des appellations erronées et imprécises. Couramment, on voit employer la désignation « argentophile » ou « argentaffine » indifféremment pour désigner les formations mises en évidence par des techniques argentiques en général. « Argentophile » n'implique pas de signification bien spéciale; « argentaffine », créé par analogie avec « chromaffine », a, au contraire, une signification *chimique* précise et doit être strictement réservé au cas de substances réduisant *par elles-mêmes* le nitrate d'argent dans les conditions qui vont être précisées.

*Technique.* — La réaction argentaffine peut être effectuée, soit sur coupes, soit sur pièces après fixation banale, soit immédiatement sur pièces sans fixation préalable. La valeur de tous ces procédés n'est pas égale. Les procédés sur pièces, quoique capables de mettre en évidence des substances argentaffines qui pourraient disparaître dans les manipulations de l'inclusion et de la coupe, sont beaucoup moins rigoureuses que les méthodes sur coupes, et nous paraissent d'emploi beaucoup plus restreint.

La méthode de choix pour les coupes est la méthode de MASSON; elle est considérée par tous les auteurs qui ont eu à s'occuper de la question (CORDIER, HAMPERL, CLARA), comme donnant des résultats sûrs et constants. La méthode originale comporte la fixation au Bouin, mais elle peut aussi bien s'employer après l'action d'autres fixateurs. Les coupes déparaffinées sont lavées à fond (2 h.) à l'eau distillée. Les coupes sont alors traitées 36 à 40 h. à l'obscurité et à l'abri de l'air par le liquide de FONTANA (il y a souvent intérêt à réduire le temps de traitement par la solution argentique à 24 h.). Le liquide de FONTANA se prépare en ajoutant goutte à goutte de l'ammoniaque à une solution de nitrate d'argent à 5 pour 100 jusqu'à ce que le précipité qui s'est formé se soit exactement redissous; on ajoute alors très prudemment et goutte à goutte une solution de nitrate d'argent à 5 pour 100 jusqu'à apparition d'un trouble persistant; le liquide ne doit plus sentir l'ammoniaque; on le décante avant l'emploi. Après action de la solution d'argent, rincer abondamment à l'eau distillée, virer par l'action d'une solution de chlorure d'or à 0,1 pour 100 (quelques minutes), fixer quelques minutes dans une solution d'hyposulfite de sodium à 5 pour 100; rincer, effectuer une coloration de fond au carmin aluné par exemple et monter au baume suivant la méthode habituelle.

Les autres procédés effectuant la réaction argentaffine sur coupes, comme celui de HAMPERL, ne diffèrent de la méthode de MASSON que par quelques détails (suppression du virage à l'or, etc.) et ne doivent pas être rapportés en entier ici.

Nous n'indiquerons pas ici les techniques effectuant la réaction argentaffine sur pièces fixées, comme les méthodes de MASSON, TÖRÖ, HASEGAWA. Aucune des méthodes utilisant une argentation sur bloc n'est impeccable, comme HAMPERL et CLARA l'ont déclaré. Elles

sont en effet très irrégulières dans leurs résultats et imprègnent souvent des formations qui ne sont pas le moins du monde argentaffines. On observe fréquemment des précipitations plus ou moins électives sur des éléments de signification diverse. En bref, ces méthodes, outre la réaction argentaffine, produisent à un degré plus ou moins prononcé de véritables imprégnations argentiques, sans aucune signification.

En vue de la détection histochemique de l'adrénaline, ont été proposées des méthodes qui sont équivalentes en fait à des réactions argentaffines exécutées d'emblée, sans fixation préalable. KUTSCHERA-AICHBERGEN traite les tissus non fixés par le nitrate d'argent ammoniacal, OGATA d'abord par l'ammoniaque et ensuite par le nitrate d'argent ammoniacal. Ces méthodes sont extrêmement mauvaises au point de vue histologique, car les solutions ammoniacales ne fixent pas les tissus mais les dissocient. BAGINSKI utilise un fixateur renfermant du nitrate d'argent ammoniacal et du chromate d'ammonium. La fixation obtenue par ce procédé est, d'après notre expérience, un peu moins mauvaise, seulement la valeur histochemique de la réaction nous paraît très médiocre. On obtient, en effet, des précipitations d'argent là où il n'existe pas de composé réellement argentaffine. Dans la surrenale, nous avons obtenu ainsi de nombreux précipités dans la corticale de l'organe; il nous semble vraisemblable que ces précipitations sont dues à la présence dans cette portion de l'organe de la vitamine C que GIROUD et LEBLOND y ont pu récemment détecter histochemiquement. On sait, en effet, que la vitamine C est capable de réduire instantanément et à froid les solutions des sels d'argent, que le milieu soit alcalin ou acide.

Il nous reste à délimiter le domaine de spécificité de la réaction argentaffine. L'examen des conditions où s'effectue cette réaction permet d'affirmer qu'elle est signalétique de substances à *fonction réductrice* marquée.

Une remarque toutefois : pour que la réaction argentaffine puisse être considérée comme ayant une valeur chimique, il importe de veiller sur un point de technique. La durée de traitement par le sel d'argent ammoniacal ne peut pas dépasser celle qui a été indiquée. Si l'on fait agir le réactif trop longtemps, toutes les structures cellulaires, noyaux, cytoplasmes, grains de sécrétion finissent par le réduire. On sait, en effet, combien ces solutions argentiques sont instables. Dans une préparation correctement traitée, seules les substances argentaffines sont intensément colorées en noir ou en brun noir par l'argent réduit; tout le reste de la préparation est absolument incolore.

Les polyphénols, aminophénols et polyamines en position ortho et para donnent toujours la réaction argentaffine, et c'est pourquoi la réaction argentaffine a été étudiée à cette place. Cependant, il s'en faut qu'elle soit donnée *uniquement* par ces substances. Beaucoup d'autres corps chimiquement définis sont capables de réduire l'hydroxyde d'argent ammoniacal dans les mêmes conditions (par exemple les aldéhydes). La réaction argentaffine est donc loin d'avoir la spécificité étroitement



En tant qu'orthodiphénol, elle doit donc donner toutes les réactions histo-chimiques caractéristiques de ces corps. En fait cependant, une seule est applicable de façon certaine, la réaction chromaffine, et cela parce que l'adrénaline, dans les surrénales, n'est pas fixée par les fixateurs histologiques. Si l'on effectue sur coupes les réactions décrites plus haut comme caractéristiques des composés phénoliques, elles sont négatives parce que l'adrénaline s'est dissoute pendant les manipulations. Ce n'est que si on les effectue sur pièces fraîches que l'on peut arriver à un résultat. Or, l'azoréaction et l'indoréaction ne peuvent être effectuées sur des tissus frais sans que la localisation soit profondément modifiée. Les réactions argentaffines sur pièces (méthodes de BAGINSKI et de KUTSCHERA-AICHBERGEN pour la mise en évidence de l'adrénaline) sont à déconseiller, comme nous l'avons vu plus haut. Quant à la réaction chromaffine, elle est trop connue pour que nous devions y insister; signalons cependant qu'elle peut tout aussi bien être effectuée en fixant au moyen d'un liquide bichromaté, comme dans la technique classique, ou bien en utilisant un liquide renfermant de l'iodate de potassium (GÉRARD, CORDIER et LISON. Macroscopiquement, SZENT-GYÖRGYI avait déjà observé le brunissement de la médullaire surrénale traitée par une solution d'un iodate).

On a souvent discuté sur le point de savoir si, dans la médullaire surrénale et les paraganglions, l'adrénaline existe en tant que telle, ou bien à l'état de substance préadrénalinique ou adrénalinogène. L'état actuel de l'Histochimie ne permet pas de répondre à cette question de façon certaine. Ce que l'on peut affirmer cependant, c'est que la substance qui, dans ces organes, est mise en évidence par la réaction chromaffine, possède déjà les deux fonctions hydroxyles de l'adrénaline; cela apparaît clairement si l'on se réfère au mécanisme de cette réaction. Si la substance diffère de l'adrénaline, ce ne peut être que par la composition de la chaîne latérale située en para. Les réactions histo-chimiques actuelles ne permettent pas d'émettre la moindre opinion sur la constitution de celle-ci.

B. *Les cellules de KULTSCHITZKY des Chordés.* — On sait que les cellules de KULTSCHITZKY (cellules de KULTSCHITZKY, de NICOLAS-CIACCIO-MASSON, cellules jaunes (SCHMIDT), cellules entéro-chromo-argentaffines (CIACCIO), cellules argentaffines (MASSON), cellules chromo-argentaffines (CORDIER), cellules entéro-chromo-argentaffines (PESSIN), basalgekörnte Zellen (KAUFFMANN-WOLFF), cellules basigranuleuses (CLARA), Chemo-



regulatorzellen (TORO), sont des éléments que l'on trouve, en nombre assez réduit, dans les glandes de LIEBERKÜHN de l'intestin, surtout au fond des culs-de-sac glandulaires, quelquefois aussi dans l'estomac et dans le canal de WIRSUNG.

Elles sont essentiellement caractérisées par la présence, dans leur cytoplasme, de granulations très fines, « poussiéreuses », situées principalement dans la région *basale*, infranucléaire de la cellule. Leur répartition zoologique est très étendue. On les a trouvées dans tous les groupes de Vertébrés et même, récemment, LISON les a signalées chez les Ascidiées. Nous n'insisterons pas ici sur leurs caractères morphologiques ou zoologiques, que l'on trouvera exposés en détail dans une revue très documentée de M. CLARA (1932).

On a beaucoup discuté sur la signification des granulations de ces cellules et l'on peut dire qu'il y a peu d'espèces cellulaires sur lesquelles on a émis un aussi grand nombre d'hypothèses contradictoires, voire même fantaisistes.

Leur origine, d'abord.

Représentent-elles des cellules intestinales entodermiques vraies (MASSON), des cellules mésenchymateuses immigrées dans la muqueuse (KULL), ou encore des cellules nerveuses provenant du ganglion cœliaque (DANISCH), ou encore des leucocytes introduits dans l'épithélium (NICOLAS) ?

Sur l'activité sécrétoire, dans ces cellules, même désaccord; on en a fait des cellules à polarité exocrine, à polarité endocrine, à polarité neurocrine.

Sur la signification chimique de leurs granulations et sur leur rôle physiologique, de même. On a pensé que leurs granulations représentaient des ferments; CIACCIO croyait que les cellules déversaient dans la lumière intestinale de l'adrénaline dans le but d'y activer les oxydations (!?). PARAT voyait en elles des cellules porteuses de sécrétine. TÖRÖ croit qu'elles jouent un rôle dans la régulation de l'alcalinité du contenu intestinal. Enfin, HAMPERL, puis CORDIER ont défendu avec beaucoup de force l'hypothèse que les granulations des cellules de KULTSCHITZKY étaient formées d'une substance identique ou tout au moins apparentée aux polyphénols. Les arguments de ces auteurs sont basés sur un ensemble d'analogies assez impressionnant. Malgré cela, ils ne furent pas admis par tout le monde, surtout en l'absence de preuves directes et de démon-

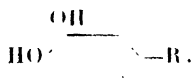
tration formelle. Cependant, l'hypothèse de HAMPERL et de CORDIER répond bien à la réalité; les granulations des cellules de KULTSCHITZKY sont bien le véhicule d'un polyphénol.

Ce fait a été démontré par voie histochimique par CORDIER et LISON; il a été depuis confirmé plusieurs fois par CLARA, CLARA et CANAL, VIALLI et ERSPAMER; ainsi, ont été établies de façon péremptoire ce que les auteurs avaient déduit d'un ensemble de considérations exactes sans doute, mais théoriques.

Deux des propriétés histochimiques fondamentales de la cellule de KULTSCHITZKY ont été décrites, il y a longtemps déjà. Leurs granulations sont *chromaffines* (SCHMIDT) et *argentaffines* (MASSON). Ces deux réactions, à elles seules, suffisent à faire admettre que, dans leur molécule, se trouve un radical polyphénolique, aminophénolique ou polyaminé en position ortho ou para. Les considérations développées plus haut sur les réactions chromaffine et argentaffine dispensent d'insister beaucoup là-dessus. Si les auteurs précédents, qui connaissaient bien l'existence de ces deux réactions dans la cellule de KULTSCHITZKY, n'ont pas abouti à la conclusion que nous formulons, c'est parce qu'ils n'en avaient pas saisi leur signification chimique précise. Une fois celle-ci déterminée, la conclusion s'impose d'elle-même.

Les granulations des cellules de KULTSCHITZKY possèdent donc dans leur substratum un groupement polyphénolique. S'il en est bien ainsi, les deux réactions générales des phénols que nous avons décrites plus haut — l'azoréaction et l'indoréaction — doivent être positives. Et c'est bien ce que l'expérience démontre.

D'autre part, certaines particularités du comportement des azoïques formés, jointes au résultat positif de la réaction au perchlorure de fer (CORDIER et LISON, CLARA), et de la réaction de QUASTEL (CLARA) amènent à penser qu'il s'agit d'un orthodiphénol, portant en para une chaîne latérale. La substance active de la cellule de KULTSCHITZKY doit donc être du type



Il n'est pas facile de préciser la nature de la chaîne latérale portée par l'atome de carbone en para par rapport aux hydroxyles. Les caractères de l'azoréaction ont amené CORDIER et LISON à penser que cette chaîne

latérale doit être relativement simple et ne renferme probablement que des radicaux aliphatiques. Les arguments apportés par ces auteurs ont cependant semblé faibles à CLARA et la question reste ouverte. CORDIER et LISON, puis CLARA ont considéré que les caractères de solubilité des grains argentaffines, solubilité dans l'alcool fort, dans les acides forts, conservation et fixation par l'action du formol sont conditionnés par la nature chimique de cette chaîne latérale. Cela ne nous paraît plus certain; en effet, ces caractères pourraient tout aussi bien être conditionnés par un substratum (protidique?) auquel se trouverait lié le composé phénolique.

VIALLI et ERSPAMER, d'après les caractères de colorabilité des granulations, inclinent à croire que la chaîne latérale ne pourrait avoir un caractère alcalin, mais plutôt neutre et peut-être acide. La même objection se présente : les caractères de colorabilité sont peut-être dus au substrat du composé phénolique. On doit d'ailleurs noter que les caractères de solubilité et de colorabilité des granulations de cellules de KULTSCHITZKY peuvent présenter d'assez grandes variations, soit au cours du développement dans une même espèce, soit en considérant des espèces différentes. Cela peut être tout aussi bien interprété en faveur d'une variation des propriétés du substrat auquel le composé phénolique est lié que d'une variation des chaînes latérales du phénol lui-même.

TURCHINI, BROUSSY et JOURDAN, tout récemment, tendent à admettre que le composé formant les grains argentaffines serait l'adrénaline; ils se basent sur le fait qu'après des injections d'adrénaline, on observe une augmentation appréciable du stock granuleux chromoargentaffine et du nombre des cellules de KULTSCHITZKY. Le rôle de ces cellules serait donc adrénalinopexique, tout comme les cellules médullo-surrénales, d'après les conceptions récentes de DA COSTA. *A priori*, il n'y a pas de raison pour rejeter catégoriquement l'hypothèse de TURCHINI, BROUSSY et JOURDAN, mais nous pensons cependant que la prudence s'impose et qu'il est sage d'avouer que l'on n'a pas encore de renseignements précis sur la constitution de la chaîne portée en para dans le composé phénolique caractéristique de la cellule de KULTSCHITZKY.

En résumé, le cas de la cellule de KULTSCHITZKY est donc relativement simple au point de vue histochimique : on a la preuve de l'existence dans sa molécule d'au moins une fonction phénolique : azoréaction et indo-réaction positives; on a aussi la preuve de l'existence de deux hydroxyles en ortho ou para : réactions chromaffine ou argentaffine positives. On a

enfin de grosses probabilités pour que les deux hydroxyles soient en position ortho l'un par rapport à l'autre et que la position para soit occupée par une chaîne latérale, dont on ne peut encore rien dire.

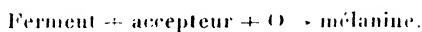
Chez les Amphibiens et les Poissons ont été décrites des cellules qui, tout en présentant tous les caractères morphologiques des cellules de KULTSCHITZKY, donneraient des réactions chromaffines positives avec réaction argentaffine et azoréaction négatives (CLARA, DE FILIPPI). De telles propriétés semblent, *a priori*, très bizarres. En effet, comme LISON l'a noté, toute substance donnant une réaction chromaffine doit aussi être argentaffine : puisqu'elle est capable de s'oxyder très aisément en un composé quinhydronique, elle doit forcément aussi réduire le nitrate d'argent ammoniacal. L'inverse n'est pas vrai, car le domaine de spécificité de la réaction argentaffine est plus étendu que celui de la réaction chromaffine : la réaction argentaffine recouvre la réaction chromaffine et, en outre, elle la déborde. Le cas des cellules de KULTSCHITZKY chez les Vertébrés inférieurs apparaîtrait donc comme anormal, si VIALLI et ERSPAMER n'avaient montré que les observations précédentes devaient être révisées, qu'en réalité, chez tous les Vertébrés, les cellules de KULTSCHITZKY se présentent avec des caractères histochimiques constants et qu'elles présentent toujours simultanément une réaction chromaffine, une réaction argentaffine et une azoréaction positive.

Signalons enfin, pour être complet, qu'il existe des cellules basigranuleuses à granulations acidophiles, morphologiquement très semblables aux cellules de KULTSCHITZKY, mais qui ne présentent aucune des réactions des composés phénoliques et dont la signification est très obscure. On les trouve dans l'intestin postérieur des Carnivores domestiques.

La détermination de la constitution histochimique de la cellule de KULTSCHITZKY est évidemment un fait très important pour la détermination de son comportement physiologique. En effet, les idées fausses que l'on s'était forgées autrefois sur la nature des inclusions de cette cellule ont fait souvent préjuger faussement de son rôle physiologique. A ce point de vue, la connaissance plus exacte de son chimisme pourra servir de base à une expérimentation physiologique rigoureuse et à éclaircir le rôle encore si obscur de ce curieux élément cellulaire, que l'on retrouve avec une si remarquable constance dans tout le phylum des Chordés.

C. *Composés phénoliques et propigments mélaniques.* — Les recherches

modernes sur la mélanogénèse ont abouti à une théorie fermentative (G. BERTRAND), et de façon générale on s'est rallié au schéma suivant :



Des recherches biochimiques, extrêmement nombreuses, se sont attachées à déterminer, soit le ferment mélanisant, soit le chromogène prémélanique. Les ferments : tyrosinase, laccase (BERTRAND), catécholase (WEEWERS), dopaoxydase (BLOCH, HASEBROEK), bien d'autres encore. Les chromogènes : tyrosine, dioxyphénylalanine, d'autres encore.

Une remarque à propos de ces chromogènes : ce sont tous des composés à fonction phénolique, soit des monophénols, soit des polyphénols.

Si les recherches biochimiques sur la mélanogénèse sont assez poussées, il n'en est pas de même en Histologie. On connaît assez mal la localisation morphologique des ferments mélanisants; cependant des études très intéressantes ont été poussées dans cette direction. On connaît plus mal encore la localisation des chromogènes prémélaniques; le seul qui ait été étudié de façon précise est celui que VERNE a décrit chez les Crustacés décapodes sous le nom de *pigment aminoacide*. L'analyse chimique a montré à VERNE que cette substance était particulièrement riche en radicaux tyrosine.

Les études histochimiques entreprises avec les techniques de détection des composés phénoliques décrites plus haut ont permis d'apporter de nouvelles contributions au problème de la mélanogénèse.

Deux études récentes à ce sujet montrent la présence, comme prépigment mélanique, d'un orthodiphénol. Dans le tégument du Criquet d'Égypte (*Anacridium ægyptium*), BROUSSY a vu le pigment mélanique précédé d'un prépigment de couleur jaunâtre, d'origine probablement mitochondriale. Ce prépigment donne des réactions chromaffine (au bichromate et à l'iodate) et argentaffine positives; il donne également une azoréaction positive et copule par exemple avec le tétrazo de la dianisidine. De plus, traité par du perchlorure de fer dilué, il donne naissance à une belle coloration verte. L'ensemble de ces réactions, ainsi qu'il résulte de leur discussion telle qu'elle a été exposée plus haut, montre la présence dans ces granulations d'un orthodiphénol, semblable à la diphénylalanine ou à tout autre diphénol analogue. D'autre part, on peut mettre en évidence dans le corps de l'animal une dopaoxydase. Dans un matériel tout différent, la cellule de LEYDIG des larves d'Amphibiens urodèles, SEEGER a également

constaté la présence d'un orthodiphénol précédant l'apparition d'un pigment mélanique. Chose extrêmement curieuse, le ferment coexiste dans la cellule avec l'accepteur et peut y être décelé par des méthodes appropriées (voir p. 290 et suiv.). Avant la métamorphose, la mélanogénèse ne se produit cependant pas, probablement parce que la réaction ionique du cytoplasme, trop acide, lui est défavorable. A la métamorphose, la réaction devient plus alcaline et le pigment se forme.

Ces intéressantes observations montrent donc ici la mélanogénèse à partir d'un diphénol ou tout au moins avec passage par un stade orthodiphénolique.

Dans un autre cas, étudié précédemment par LISON, les faits se présentaient de façon plus complexe. Dans le poil de l'embryon de chat, un prépigment de couleur jaunâtre précède la mélanine noire. Ce prépigment donne une azoréaction et une indoréaction positives; cela prouve l'existence dans sa molécule d'au moins un hydroxyle phénolique.

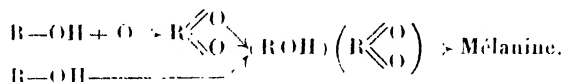
La réaction chromaffine est négative; cela exclut donc l'idée d'un polyphénol. La réaction argentaffine, elle, est positive, montrant donc que cette substance possède un pouvoir réducteur encore énergétique.

Résumons ces propriétés : couleur jaune, présence d'un hydroxyle phénolique, absence d'un deuxième hydroxyle en ortho ou para, pouvoir réducteur marqué. Si nous nous référons aux chromogènes prémélaniques que les études *in vitro* nous ont fait connaître, nous constatons que leurs propriétés chimiques ne correspondent pas à celles du chromogène que nous venons de décrire. Il ne peut être question de tyrosine, ni d'un autre monophénol analogue : ces composés, incolores, ne réduisent pas l'hydroxyle d'argent ammoniacal à froid. Il ne peut être question non plus de dioxyphénylalanine ou d'un autre diphénol analogue; ces corps, en effet, sont également incolores et donnent une réaction chromaffine typique.

Il a semblé à l'auteur qu'on ait ici affaire à un produit de condensation entre un monophénol et une quinone, corps possédant encore un hydroxyle phénolique libre. De tels corps, résultant de l'union d'une molécule d'un monophénol ou d'une monoamine avec une molécule de quinone sont connus chimiquement; leurs propriétés sont exactement celles décrites pour le chromogène prémélanique.

D'autre part, des biochimistes ayant cherché à se rendre compte du mécanisme chimique de la transformation du chromogène en mélanine ont admis qu'il y a, à un moment donné, introduction dans le noyau benzé-

nique de l'accepteur phénolique, d'un ou même plusieurs hydroxyles supplémentaires. Si l'on part de la tyrosine, monophénol, on aboutira à un di ou polyphénol. Or, on a déjà dit l'extrême oxydabilité de ces di ou polyphénols ortho ou para, et leur transformation très aisée en quinones. Rien d'impossible donc que ces quinones, au moment de leur formation, ne s'additionnent au monophénol inaltéré. Ainsi se trouverait constituée la substance des bâtonnets jaunes, première étape de la mélanogénèse. Ultérieurement, cette substance jaune se transformera en mélanine.



Bien entendu, ce schéma n'a qu'une valeur toute relative : l'hypothèse formulée rend compte des faits observés, sans plus.

Le fait est pourtant intéressant, car il constitue un document à verser au dossier du problème si complexe de la mélanogénèse.

D. *Autres composés phénoliques histochimiquement décelables.* — Outre les composés phénoliques déjà étudiés plus haut, un certain nombre d'autres ont été décelés par des méthodes histochimiques; sans présenter un intérêt général aussi grand que ceux qui viennent d'être passés en revue, ils méritent une mention, car ils soulèvent dans chaque cas des problèmes particuliers dont l'étude est intéressante.

Quand on passe en revue ces composés, on est tout d'abord frappé par la rareté des composés monophénoliques. A l'heure actuelle, tous les composés phénoliques histochimiquement identifiés sont des polyphénols ou apparentés aux polyphénols, sauf un seul : c'est le monophénol trouvé par LISON dans des cellules migratrices du tissu conjonctif chez l'Huître (*Ostrea edulis*). On n'a aucun renseignement sur la signification de ce composé, qui, d'après certains indices, semble bien avoir un poids moléculaire considérable et être de composition chimique complexe.

Dans la glande salivaire postérieure des Céphalopodes, LISON a pu mettre en évidence des composés phénoliques qui représentent des produits de sécrétion venimeux. Deux substances différentes ont pu être distinguées. L'une, soluble et difficile à mettre en évidence sur coupes, doit être la *tyramine* [(C<sup>6</sup>H<sup>4</sup>)(OH)<sup>1</sup>(CH<sup>2</sup>—CH<sup>2</sup>—NH<sup>2</sup>)<sup>4</sup>], que BOTAZZI a isolé du produit de sécrétion de la glande. L'autre, insoluble, se présentant sous forme de

grains jaunes, chromaffines (VERNE) et argentaffines, doit être un produit d'oxydation d'un polyphénol, c'est-à-dire une quinhydrone. Cette dernière substance n'est probablement qu'une des étapes de sécrétion de la première.

Dans le rein de *Patella vulgata*, le même auteur a pu déceler des substances assez diverses à fonction phénolique, qui représentent des stades de dégradation et d'élimination résultant du métabolisme protidique : monophénols, diphénols, quinhydrones.

Dans les glandes à venin de diverses espèces de *Bufo*, LISON a également décelé des composés phénoliques qui font partie de la sécrétion venimeuse de ces glandes. Il existe une assez grande diversité dans le comportement de ces substances chez les différentes espèces. Chez *Bufo aqua*, on met en évidence de façon très frappante un orthodiphénol; cet orthodiphénol n'est pas autre chose que l'adrénaline, qui se trouve dans le venin à une concentration exceptionnellement élevée (7 pour 100, ABEL et MACHT). Chez *Bufo vulgaris* et *Bufo calamita*, il existe, outre un diphénol soluble, un monophénol libre en assez petite quantité, mais libérable par hydrolyse acide. Chez *Bufo viridis*, il existe certainement un diphénol et peut-être également un monophénol. Chez de nombreuses autres espèces d'Amphibiens, VIALLI a également signalé des composés di ou polyphénoliques.

Les granulations vitellines des Polyclades, d'après des recherches toutes récentes de VIALLI, renferment également des composés di ou polyphénoliques. D'autres études, également toute récentes du même auteur, en signalent dans la portion médiane, purpuripare, de la glande à pourpre chez *Murex trunculus*. On reviendra plus loin sur la signification paradoxale de ce fait, en étudiant les composés indoliques dans cette glande à pourpre.

Enfin, MILLOT et JONNART ont établi la présence de corps à fonction phénolique libre dans le sang des Araignées. Dans certains cas, il s'agit de monophénols, dans d'autres de diphénols, mais le plus souvent des corps appartenant aux deux séries ont pu être décelés. Ces substances existent aussi bien dissoutes dans le plasma que fixées sur des granulocytes; elles semblent en relation avec les phénomènes de la mue.

Ainsi que cette énumération le montre, les composés di ou polyphénoliques ne sont pas extrêmement rares chez les animaux et quoique les techniques histochimiques en vue de leur détection n'aient été mises au point que tout récemment (CORDIER et LISON, GÉRARD, CORDIER et LISON, 1930; LISON, 1931; CLARA, 1932), les exemples en sont déjà assez nombreux. Il est trop tôt cependant pour essayer de tirer une conclusion



au sujet de la signification biologique générale de ces composés à fonction phénolique; actuellement, chaque cas doit être envisagé en particulier et étudié pour lui-même. Nous ne doutons pas cependant que des recherches ultérieures n'apportent des contributions nouvelles à l'étude de la localisation de ces substances, dont l'aptitude chimique réactionnelle et l'activité pharmacologique considérables doivent faire penser *a priori* qu'ils jouent un rôle important dans le métabolisme. Les résultats, encore fragmentaires maintenant, pourront alors être groupés et l'on arrivera à se faire une idée synthétique au sujet du métabolisme général de ces substances dans l'individu.

### III. — COMPOSÉS INDOLIQUES.

Les composés renfermant un groupement indolique ne sont pas rares dans les êtres vivants; ils jouent un rôle assez important dans le métabolisme des protides, métabolisme constructif (tryptophane) ou catabolisme destructif (indol, scatol, indican). Aussi, le problème de leur localisation histochimique n'est-il pas sans intérêt.

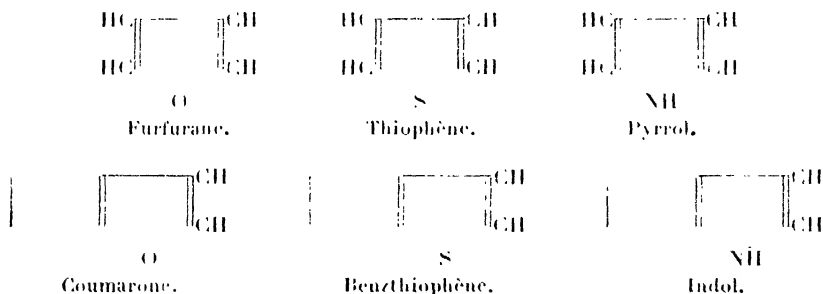
A. *Les méthodes d'étude* mises au point par LISON pour la détection des substances à radical indolique montrent un bon exemple d'identification d'une substance par le recouplement de réactions qui, prises isolément, ne sont pas spécifiques, mais dont le domaine de spécificité est différent. Il n'existe en effet, pas plus en Histochimie qu'en Chimie analytique, de réaction qualitative spécifique du noyau indolique.

1<sup>o</sup> La première réaction utilisable est une adaptation d'une réaction d'EHRLICH. Quoique assez brutale, c'est la moins mauvaise, surtout pour préciser la morphologie des substances recherchées. On traite les coupes pendant une ou deux heures à 55° ou quelques minutes à 75° dans le mélange suivant : diméthylaminobenzaldéhyde, 2<sup>g</sup>; acide chlorhydrique concentré, 20<sup>cm<sup>3</sup></sup>; alcool absolu, 80<sup>cm<sup>3</sup></sup>. On examine dans le réactif ou bien on rince à l'alcool absolu et monte au baume sans coloration de fond; les coupes ne se conservent que quelques mois. Les composés à fonction indolique prennent une coloration bleu violet, le fond de la préparation ne se colorant que très légèrement en bleu pâle. Cette réaction n'est pas spécifique; elle est donnée par les phénols, les amines aromatiques et

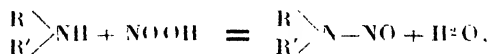
beaucoup de noyaux hétérocycliques parmi lesquels ceux de l'indol et du pyrrol.

2° Pour éliminer la présence des phénols, il suffit de pratiquer l'azoréaction suivant la méthode décrite plus haut, à propos de la détection histo-chimique des phénols; pour éliminer les amines aromatiques, on pratique la même réaction, mais cette fois en milieu acide; on sait, en effet, que les amines aromatiques copulent avec les sels de diazonium en milieu acide.

3° Cependant, on ne peut se contenter de cette preuve négative, et l'on doit pratiquer une troisième réaction — *réaction de l'indophénine* — qui prouve de façon positive l'existence d'un hétérocycle. On pratique cette réaction en déparaffinant une coupe, en la séchant au sortir du xylol, la traitant par une goutte d'une solution d'isatine dans l'acide sulfurique concentré et examinant dans le réactif. Il se produit une coloration rouge violacé ou bleuâtre. Bien entendu, cette technique brutale et de sensibilité moyenne ne se prête pas à l'examen de fins détails; ce n'est qu'un contrôle chimique de réactions morphologiquement plus précises. La réaction de l'indophénine (V. MEYER) est rigoureusement spécifique des composés pentagonaux monohétérocycliques; elle est donc donnée par les dérivés du furfurane, du thiophène, du sélénophène, du pyrrol et leurs dérivés à noyau benzénique condensé, coumarone, benzthiophène et indol.



4° La distinction entre les hétérocycles est possible par la réaction appelée par LISON *nitrosaminoréaction*. Elle consiste à transformer tout d'abord le groupe imino —NH— présent dans les noyaux du pyrrol et de l'indol, en nitrosamine par l'action de l'acide nitreux



puis à mettre secondairement la nitrosamine en évidence par une réaction de LIEBERMANN pour la détection des corps nitrosés : la formation de *dichroïnes* fortement colorées en vert par l'action d'une solution de phénol dans l'acide sulfurique concentré. Pour pratiquer cette réaction, on traite d'abord la coupe pendant une ou deux heures par une solution de nitrite de soude à 5 pour 100 additionnée avant l'emploi de 5 pour 100 d'acide acétique; ensuite, la coupe est desséchée, recouverte d'une goutte d'une solution de phénol à 5 pour 100 dans  $\text{SO}^4\text{H}^2$  concentré et examinée dans le réactif. Cette réaction est donnée par les phénols, les amines aromatiques primaires et tous les corps renfermant le groupement imino  $-\text{NH}-$ . Les premiers étant éliminés par les réactions précédentes, la nitrosamino-réaction montre donc la présence d'un radical NH dans la molécule, et prouve alors l'existence d'un radical pyrrol ou indol.

5° Enfin, pour distinguer entre les corps pyrroliques et les corps indoliques, on se sert de la *nitroréaction*. Celle-ci consiste à faire agir un mélange sulfonitrique ( $\text{SO}^4\text{H}^2 + \text{NO}^3\text{H}$ , ana) sur la préparation. Les substances renfermant un noyau benzénique (et parmi elles les composés indoliques) sont nitrées et se reconnaissent à leur couleur jaune canari; les noyaux pyrroliques seuls ne se nitrent pas.

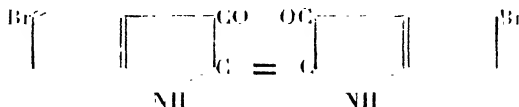
Le tableau suivant résume la discussion chimique du problème.

Réaction.	Domaine de spécificité.	Résultat.
1. EHRlich ( <i>diméthylaminobenzaldéhyde</i> ).....	phénols, arylamines, hétérocycles	violet
2. Azoréaction.....	phénols, arylamines, quelques composés hétérocycliques	0
3. Indophénine.....	furfurane, thiophène, pyrrol, coumarone, benzthiop., indol et dérivés	rouge violet
4. Nitrosaminoréaction....	NH, phénols, arylamines primaires	vert
5. Nitroréaction.....	cycle benzénique	jaune

Par le recoupement de ces réactions, on peut donc arriver à identifier avec une sécurité suffisante les composés renfermant un noyau indolique dans les tissus.

B. *Applications et résultats de ces méthodes.* — C'est dans la glande à pourpre des Murex que LISON a recherché pour la première fois histochimiquement les composés à noyau indolique. La pourpre est en effet

constituée par le 6.6'-dibromindigo (FRIEDLÄNDER).



Un coup d'œil sur sa formule montre immédiatement sa parenté avec les composés indoliques. Cependant, dans la glande du Mollusque, la pourpre n'apparaît qu'après la mort et est donc précédée par un chromogène. Comme DUBOIS l'a montré, les glandes à pourpre ne renferment pas en réalité le chromogène, mais un préchromogène qu'un ferment, la purpurase, transforme en chromogène. Celui-ci, par oxydation, donne la pourpre. Étant donnée la parenté entre la pourpre et les indols, il a semblé logique à l'auteur de chercher à déceler ceux-ci dans la glande à pourpre. Les résultats de cette étude sont assez inattendus.

La glande à pourpre est constituée par trois régions (GRYNFELTT), disposées à peu près parallèlement et allongées d'avant en arrière : la zone médiale et les deux zones marginales, l'une branchiale et l'autre rectale. Seule la zone médiale mérite le nom de glande à pourpre : c'est là seulement en effet que se trouvent les cellules renfermant les préchromogènes, qu'après la mort de l'animal, on peut voir se transformer en pourpre. Les zones marginales ne participent pas à la sécrétion de la pourpre et leurs cellules (*cellules de GRYNFELTT*) renferment un secretum granuleux sur la nature duquel on n'avait aucun renseignement. LISON s'attendait à trouver un composé indolique dans les cellules de la zone médiale, sécrétant la pourpre; il ne put décider ni de son absence, ni de sa présence, parce que toutes les cellules lui apparurent régulièrement vidées de leur contenu. En revanche, les grosses granulations des cellules de GRYNFELTT donnèrent toutes les réactions décrites plus haut. Étant donnée la communauté d'origine des cellules de GRYNFELTT et des cellules purpuripares, l'auteur pense que chacune de ces espèces cellulaires, évoluée vers un type différent, travaille pour son propre compte et élabore, à partir de matériaux identiques ou analogues, des substances différentes quoique chimiquement apparentées; l'une est indologène, l'autre est indigogène. Il n'y a en effet aucune relation entre la formation de la pourpre et le composé indolique des cellules de GRYNFELTT. Il est vraisemblable que ce dernier représente la partie toxique de la sécrétion de la glande à pourpre.

Ces faits doivent être rapprochés de ceux qui viennent d'être tout récemment établis par VIALLI. Cet auteur a pu étudier histochimiquement la sécrétion de la partie *médiale* de la glande à pourpre, que LISON avait régulièrement trouvée vide de son contenu; cette différence constatée par les deux auteurs doit probablement tenir à des conditions diverses de fixation des pièces. Le résultat de l'étude de VIALLI est également inattendu : les granulations des cellules purpuripares renferment une substance di ou polyphénolique, parfaitement caractérisée par les réactions histo-chimiques des composés phénoliques décrites plus haut. Cette substance, de par sa constitution chimique, ne peut se rattacher que très difficilement à la pourpre. VIALLI a observé cependant qu'elle ne paraît constituer qu'un des stades d'un cycle sécrétoire. En effet, dans les quelques cellules où il a pu voir se former la pourpre, les granulations ne donnent plus de façon certaine les réactions des composés phénoliques; donc, au cours de la formation de la pourpre, qui doit certainement passer par un stade leuco, la substance perd les caractéristiques attachées à la présence des oxydrides phénoliques.

Les données histochimiques que l'on possède actuellement sur la glande à pourpre des *Murex* posent donc des problèmes biochimiques intéressants, rattachés d'ailleurs au problème pharmacologique de l'activité toxique de la glande : les problèmes de la genèse de composés chimiques complexes à partir de composés à fonction phénolique ou indolique.

Après la glande à pourpre, le seul cas de substance à fonction indolique histochimiquement décelée a été décrit par P. DUSTIN Jr. Dans le tissu granulopoiétique de *Protopterus Dolloi*, une espèce cellulaire distincte est bourrée de grosses granulations incolores par les colorants acides ou basiques d'aniline, colorables en noir par l'hématoxyline ferrique, présentant toutes les réactions ci-dessus décrites pour les composés à noyau indolique. Ces cellules semblent avoir une évolution catabolique et être destinées à disparaître ultérieurement; elles font partie d'un système de cellules qui constitue une véritable glande à sécrétion interne, lançant dans la circulation des substances qu'elle a synthétisées et dont l'action est encore inconnue.

#### IV. — URÉE.

Pour déceler et localiser histochimiquement l'urée, deux méthodes ont été proposées. L'une est basée sur la précipitation de l'urée sous forme



La dixanthylurée cristallise sous forme d'aiguilles fines, qui se groupent presque toujours en rosettes, de tailles diverses. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau, l'alcool, l'éther, le toluène, le xylène, l'acide acétique glacial; ils sont détruits par le toluène phéniqué.

Sur les coupes histologiques, la dixanthylurée est facilement reconnaissable à sa forme cristalline et peut mieux encore être mise en évidence grâce à sa biréfringence très marquée : entre nicols croisés, les cristaux de dixanthylurée apparaissent fortement illuminés. A l'examen microscopique ordinaire en lumière transmise, ils apparaissent colorés en jaune verdâtre, et, sous certaines conditions, brunâtres.

La réaction au xanthidrol a été appliquée par de nombreux auteurs, et presque uniquement à la recherche de l'urée dans le rein et les organes excréteurs, par exemple par POLICARD, CHEVALLIER, STÜBEL, CALABRESI et SEPPILI, WALTER, PIRAS, OESTREICHER, HOLLMANN, BONNET et HAUSHALTER, FEYEL, LAVES.

Les techniques utilisées par ces différents auteurs présentent quelques différences, mais se ramènent toujours au même type : précipitation de l'urée par une solution de xanthidrol dans l'acide acétique glacial. La technique de STÜBEL est une de celles qui ont été le plus employées. Cet auteur plonge de petites pièces de tissu dans une solution à 6 pour 100 de xanthidrol dans l'acide acétique glacial pendant 6 à 12 heures; ensuite, inclusion à la paraffine suivant les techniques histologiques habituelles. Les coupes sont colorées par une coloration histologique quelconque et examinées au microscope polarisant. OLIVER emploie un liquide renfermant 2% de xanthidrol, 10<sup>mm</sup> d'alcool méthylique et 20<sup>mm</sup> d'acide acétique glacial. Certains auteurs pratiquent la fixation sur des fragments de tissus; d'autres injectent le fixateur par voie artérielle en ouvrant largement le foie ou les veines pour assurer l'écoulement du sang contenu dans les organes.

Au point de vue spécificité, la méthode au xanthidrol est irréprochable. La solution de xanthidrol dans l'acide acétique ne précipite, à part l'urée, aucun constituant normal de l'urine ou de l'organisme. Au contact des tissus imbibés d'eau, la solution de xanthidrol donne naissance à un précipité de xanthidrol, mais celui-ci est dissous intégralement par les passages à l'alcool nécessaires pour l'inclusion et le traitement des coupes. *In vitro*, la réaction au xanthidrol est extrêmement sensible puisqu'elle permet de déceler par précipitation un milligramme d'urée dans un litre d'eau (FOSSE). En Histochimie, sa sensibilité paraît moindre. Certains (OLIVER, BONNET et HAUSHALTER) estiment que l'urée, à une concentration correspondant à la concentration normale du sang n'est pas décelable par la méthode au xanthidrol. D'autres (OESTREICHER) pensent que le contenu

physiologique des organes en urée peut être décelé histochimiquement et qu'on peut en apprécier les variations quantitatives par le plus ou moins grand nombre de cristaux de dixanthylurée décelables dans les coupes.

En revanche, si la réaction est hautement spécifique et si sa sensibilité paraît largement suffisante pour une étude histochimique, il s'en faut de beaucoup qu'elle soit sûre au point de vue morphologique. La localisation du précipité de dixanthylurée ne correspond en effet *en rien* à la localisation réelle de l'urée, telle qu'elle existait sur le vivant. On doit opposer à la méthode au xanthidrol toutes les objections que nous avons déjà développées dans la partie générale de cet ouvrage au sujet de la précipitation *in situ* des substances solubles des tissus, lorsqu'elles ne sont pas liées à un substrat morphologiquement défini. L'urée est une molécule très légère (poids moléculaire 60) et l'une des plus diffusibles que l'on connaisse dans l'organisme; au contraire, le xanthidrol est une molécule lourde et peu diffusible (poids moléculaire 198). La première aura largement le temps de diffuser avant que la seconde ne soit arrivée à son contact. Ce défaut sera d'autant plus marqué que le fixateur pénètre mal (500<sup>h</sup> en six heures, OESTREICHER), parce que l'acide acétique qui sert de véhicule au xanthidrol est un puissant précipitant des protides et empêche ainsi sa propre pénétration. Cette objection s'adresse surtout aux auteurs qui se sont contentés de plonger des fragments de tissus dans le liquide fixateur; *a priori*, les travaux effectués avec une méthode aussi défectueuse sont évidemment sans aucune valeur. Les fixations effectuées par injection intravasculaire du fixateur sont moins mauvaises, mais ne peuvent être considérées comme impeccables, à cause de l'énorme diffusibilité de la substance à rechercher.

Mais il y a plus. La précipitation de l'urée par le xanthidrol *n'est pas instantanée*. La réaction n'est pas une simple précipitation, comme celle des chlorures par un sel d'argent; c'est une réaction de condensation entre molécules organiques, s'effectuant avec élimination d'eau. *Cette réaction est relativement lente*, comme l'a montré FOSSE lui-même. *En fait, elle peut demander de une à plusieurs heures* suivant les quantités et les concentrations relatives des substances réagissantes. La précipitation de la dixanthylurée est donc *toujours retardée*, même en solution aqueuse pure; en solution colloïdale, elle peut l'être bien plus encore à cause de l'effet protecteur des colloïdes sur la précipitation.

Un examen attentif des préparations obtenues au moyen de la méthode



au xanthidrol permet d'ailleurs de se rendre compte très aisément de l'existence de tels phénomènes de retardement dans la précipitation. Étant donné que l'urée se trouve à l'état dissous dans les humeurs de l'organisme, sa répartition doit y être égale et très diffuse; le précipité obtenu devrait donc être très fin et assez régulièrement réparti. Au contraire, par la méthode au xanthidrol, le précipité de dixanthylurée est toujours formé de rosettes et d'agrégats de cristaux, dont la taille est souvent supérieure aux cellules et peut devenir assez considérable. C'est là le signe à peu près infaillible d'une précipitation lente. On sait, en effet, que les cristaux sont toujours d'autant mieux formés que la cristallisation est plus lente. D'autre part, pendant cette cristallisation, des déplacements de substance peuvent s'observer. OESTREICHER a ainsi noté fréquemment que des cellules ou des noyaux cellulaires fonctionnent comme centres d'attraction et de cristallisation. L'aspect, la dimension et la répartition des cristaux varient suivant la profondeur de l'endroit envisagé. OESTREICHER en conclut très justement que la localisation de l'urée par la méthode au xanthidrol n'est pas rigoureuse. « On ne peut, dit-il, de la localisation des agrégats cristallins dans certaines cellules, conclure à une teneur spécialement forte en urée et, par suite, à une fonction spéciale de ces cellules, comme on l'a dit par exemple de la localisation exclusive de l'excrétion uréique au niveau des épithéliums des tubes contournés rénaux (OLIVER). La localisation des cristaux de dixanthylurée dépend en première ligne : *a*, des propriétés du tissu et de la pénétration plus ou moins rapide du réactif qui en est la conséquence; *b*, de la position plus ou moins profonde des éléments des tissus dans la coupe; *c*, du pouvoir de diffusion de l'urée, corps facilement soluble. »

La pertinence de ces graves critiques se trouve encore fortement renforcée quand on confronte les résultats obtenus par différents auteurs sur un même matériel, le rein, par exemple. Ces résultats montrent des discordances considérables. En voici quelques-uns. POLICARD ne trouve jamais de cristaux de dixanthylurée, ni intracellulaires, ni extracellulaires dans les glomérules, les tubes contournés de premier ordre et les anses de HENLE; il en trouve en grande abondance dans la lumière des canaux de BELLINI. CHEVALLIER et CHABANIER trouvent de l'urée dans le rein entier, aussi bien dans la corticale que dans la médullaire; dans la première, les cristaux sont surtout intracellulaires et rarement intratubulaires; dans la seconde, ils sont surtout intratubulaires et se trouvent aussi bien dans les

tubes de HENLE que dans les tubes de BELLINI. BONNET et HAUSHALTER n'ont jamais trouvé de localisation intracellulaire certaine. La répartition du précipité est inégale suivant les différentes parties du rein. Ces auteurs estiment que le précipité observé dans le rein provient d'une contamination par l'urine provenant des voies urinaires excrétoires et que la méthode au xanthidrol ne peut, pour cette raison, avoir de valeur histochimique. OLIVER trouve principalement les cristaux dans trois endroits, les vaisseaux sanguins, les cellules des tubes contournés et la lumière des tubes urinaires; il n'en trouve pas dans la capsule de BOWMANN. STUBEL en observe dans les glomérules, dans la capsule de BOWMANN, dans les cellules des tubes contournés, la lumière des tubes droits et dans les interstices conjonctifs entre les vaisseaux et les tubes urinaires. HOLLMANN trouve la répartition des cristaux inégale suivant les zones du rein; il interprète ce fait en admettant que le rein ne fonctionne pas d'une manière égale dans tous ses points. Il observe des précipitations de dixanthylurée dans le glomérule et dans la capsule de BOWMANN, dans les cellules et la lumière des tubes contournés, dans la lumière des anses de HENLE et des canaux collecteurs, dans les interstices conjonctifs et dans les vaisseaux. FEYEL trouve de l'urée dans les glomérules, mais jamais dans la membrane de BOWMANN; dans les tubes contournés et les tubes droits corticaux (portion corticale des tubes de HENLE), la localisation est surtout intracellulaire; dans les tubes de HENLE médullaires et les tubes de BELLINI, elle est au contraire surtout intratubulaire.

Ces discordances sont flagrantes et montrent bien l'inconstance et le peu de valeur de toutes les méthodes au xanthidrol. Une très légère variante dans le traitement des pièces produit d'importants changements; tout comme de légères modifications dans une méthode d'imprégnation argentique produisent l'imprégnation de structures très différentes.

Résumons. La méthode de recherche histochimique de l'urée par précipitation au moyen de xanthidrol doit être catégoriquement rejetée : la localisation obtenue par ce procédé ne correspond pas à celle qui existait pendant la vie. La trop grande diffusibilité de l'urée, le trop faible pouvoir pénétrant du réactif, la trop lente formation du précipité de dixanthylurée font que la précipitation ne peut s'effectuer rigoureusement *in loco*; des facteurs incontrôlables produisent des déplacements de substance ou des cristallisations autour de centres d'attraction. L'ensemble de ces consi-

dérations théoriques est confirmé par l'étude attentive des résultats mêmes des auteurs qui ont accordé une valeur histochimique à la méthode.

Quant aux interprétations physiologiques qu'on en a déduites, nous sommes au regret de devoir les considérer sinon comme fausses, du moins comme manquant de base expérimentale solide.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

*Aminoacides sulfurés et leurs dérivés.* — BUFFA, *Jl. Physiol. et Path. gén.*, 1904. — BROUSSY (J.), *Contribution à l'étude histologique et histophysiologique du gésier des oiseaux et d'un processus spécial de kératinisation qui se produit à leur niveau*, 1932 (*Th. Méd. Montpellier*). — GIROUD (A.), *A. Anat. Micr.*, 21, 1925, p. 145; *Biol.*, 98, 1928, p. 376. — GIROUD (A.) et BULLIARD (H.), *Ass. Anat.*, 23, 1928, p. 167; 24, 1929, p. 248; *A. Morph. exp. gén.*, 29, 1930. — GIROUD (A.), *Ass. Anat.*, 25, 1930, p. 144; *Prot.*, 12, 1931, p. 23. — GIROUD (A.) et BULLIARD (H.), *Prot.*, 19, 1933, p. 391. — JOYET-LAVERGNE (Ph.), *Biol.*, 97, 1927, p. 140 et 327; 98, 1928, p. 567 et 658; *Bull. Hist.*, 5, p. 331. — KAYE (M.), *Bio. Jl*, 18, 1924, p. 1289. — MATTEI et DULZETTO, *Lincei*, 8, 1928, p. 317. — PARUTA (M.), *A. Biol.*, 43, 1932, p. 305.

*Composés à fonction phénolique.* — BAGINSKY (S.), *Bull. Hist.*, 5, 1928, p. 129. — BORBERG, *Sk. A. Physiol.*, 28, 1913. — BROUSSY (J.), *Ass. Anat.*, 28, 1933, p. 110. — CAJAL (R.), *Trav. lab. rech. Biol.*, Madrid, 19, 1929, p. 71. — CIACCI (C.), *Anat. Anz.*, 24, 1904; *A. ital. Biol.*, 43, 1905; *Biol.*, 60, 1906, p. 76; *A. ital. Anat.*, 482, 1907. — CLARA (M.), *Z. mikr. anat. Forsch.*, 6, 1926; *A. ital. Anat.*, 25, 1928, p. 1; *Z. mikr. anat., Forsch.*, 30, 1932; *Z. Anat.*, 98, 1932; *Z. Zellf.*, 15, 1932; *Mon. Zool. Ital.*, 44, 1933, p. 199; *Erg. Anat. Entw.*, 30, 1933, p. 240. — CLARA (M.) et CANAL (F.), *Z. Zellf.*, 15, 1932. — CORDIER (R.), *Biol.*, 93, 1925; *A. Biol.*, 36, 1926; *Bull. Hist.*, 4, 1927. — CORDIER (R.) et LISON (L.), *Bull. Hist.*, 7, 1930, p. 140. — ERÖS (G.), *Zbl. Path.*, 54, 1932. — GÉRARD (P.), CORDIER (R.) et LISON (L.), *Bull. Hist.*, 7, 1930; *Biol.*, 105, 1930, p. 876. — HAMPERL (H.), *Z. mikr. Anat. Forsch.*, 2, 1925; *Virch.*, 286, 1932. — HASEGAWA, *Virch.*, 244, 1923. — HENLE (J.), *Z. rat. Med.*, 1863. — KULTSCHITZKY, *A. mikr. Anat.*, 49, 1897. — KUTSCHERA-AICHBERGEN, *Zbl. Path.*, 27, 1922. — LIESEGANG (R. E.), *Koll. Beih.*, 3, 1911, p. 1; *Z. wiss. M.*, 28, 1911; *Z. exp. M.*, 39, 1924, p. 558; *Z. wiss. Mikr.*, 45, 1928, p. 273. — LISON (L.), *Biol.*, 106, 1930, p. 41; *A. Biol.*, 41, 1931, p. 344; *Ann. Soc. Sc. nat. et méd. Montpellier*, 8, 1932, p. 425; 9, 1932, p. 542; *Biol.*, 111, 1932, p. 657; 112, 1933, p. 1237. — MASSON (P.), *Acad.*, 103, 1914; *Trans. Roy. Soc. Canada*, V, 3<sup>e</sup> série, 26, 1932, p. 45. — MILLOT (J.) et JONNART (R.), *Acad.*, 197, 1933, p. 1002. — MULON, *Biol.*, 57, 1905. — OGATA (T. et A.), *Ziegler*, 71, 1923, p. 376. — OHNO (S.), *Ziegler*, 71, 1923. — PARAT (M.), *Ass. Anat.*, 19, 1924. — QUASTEL (I. H.), *Analyst.*, 56, 1931, p. 311. — SCHMIDT, *A. mikr. A.*, 46, 1905. — SEEGER (P. G.), *Z. Zellf.*, 19, 1933, p. 441. — STOELTZNER (W.), *Münch. M. W.*, 66, 1919, p. 584. — SZENT-GYÖRGYI, *Bio. Jl*, 22, 1928, p. 1387. — TÖRÖ (E.), *Verh. Anat. Ges. Anat.*, 67, 1929. — TURCHINI (J.), BROUSSY (J.) et JOURDAN (A. E.), *Arch. Soc. Sc. Médic. Biol.*

Montpellier, 15, 1934, p. 174. -- VERNE (J.), *Soc. Chim. Biol.*, 5, 1923, p. 227. — VIALLI (M.), *Boll. Soc. med. chir. Pavia*, 48, 1934, p. 1; *Boll. Soc. ital. Biol. Sper.*, 8 et 9, 1933 et 1934; *Boll. di Zool.*, 5, 1934, p. 31; *A. Biol.*, 39, 1929. — VIALLI (M.) et ERSPAMMER (V.), *Soc. ital. biol. Sper.*, 8, 1933, p. 885; *Z. Zellf.*, 19, 1933, p. 743. — VOSS, *Z. Anat.*, 89, 1929.

*Composés indoliques.* — DUSTIN (P. Jr.), *A. Biol.*, 45, 1934, p. 1. — LISON (L.), *Jl de Physiol. Path. gén.*, 31, 1933, p. 82.

*Urée.* — BONNET et HAUSHALTER, *Biol.*, 86, 1932. — CALABRESI et SEPPILI, *Mon. Zool. ital.*, 36, 1925, p. 69. — CHEVALIER et CHABANIER, *Biol.*, 78, 1915. — FEYEL (P.), *Biol.*, 114, 1933, p. 1155. — HOLLMANN (J. L. A.), *Bull. Hist.*, 1, 1924, p. 257; *Nederl. Tydschr. voor Geneesk.*, n° 22, 1923. — LAVES (W.), *Wien. K. W.*, 11, 1928, p. 1403. — LESCHKE (E.), *Z. klin. M.*, 81, 1914. — OLIVER (J.), *Jl exp. Med.*, 33, 1921. — OESTREICHER (A.), *Virch.*, 257, 1925, p. 614. — PIRAS, *A. di Fisiol.*, 21, 1923, p. 167. — POLICARD (A.), *Biol.*, 78, 1915. — STUBEL, *Anat. Anz.*, 54, 1921; WALTER (K.), *Pflüger*, 198, 1923, p. 267.

-----

## CHAPITRE XI.

### NUCLÉOPROTIDES ET LEURS DÉRIVÉS.

#### I. -- NUCLÉOPROTIDES ET ACIDES NUCLÉIQUES.

##### 1. *Introduction.*

En 1869, MIESCHER isola, des noyaux des cellules du pus, une substance qu'il appela nucléine et que nous appellerions aujourd'hui nucléoprotide; il montra qu'elle renfermait du phosphore. Quelques années plus tard, il démontrait que cette substance était en réalité le sel d'un protide basique (protamine) et d'une substance à caractère acide qu'il appela acide nucléique; presque en même temps, HOPPE-SEYLER, KOSSEL et MIESCHER découvraient que les nucléines pouvaient être isolées de nombreux noyaux cellulaires. Depuis cette époque, de nombreuses recherches chimiques se sont succédées pour élucider la constitution si complexe de ces substances. Elles ont donné des résultats de la plus haute importance.

Parallèlement au problème chimique des nucléines, s'est posé le problème histochimique de la localisation de ces substances au sein de la cellule. Les premières découvertes de MIESCHER sont à proprement parler histo-chimiques, puisque dès le début elles avaient permis de localiser dans le noyau les nucléines qu'il avait découvertes; et le titre des œuvres complètes de MIESCHER l'exprime bien « Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von F. MIESCHER ». Étant donnée l'importance du noyau dans la physiologie cellulaire, les histologistes se sont toujours efforcés de préciser davantage la notion fondamentale introduite par MIESCHER et de localiser avec la plus grande précision dans la cellule les nucléines et des acides nucléiques. Dans ce but, bien des méthodes ont été imaginées, et rien n'est plus instructif que l'évolution de l'Histochimie à ce sujet. Les premiers auteurs s'étaient efforcés de localiser les nucléines en se servant des caractères tinctoriaux de cette substance; l'Histochimie (on

disait alors Microchimie) du noyau telle qu'ils la pratiquaient alors n'était pas autre chose que de l'Analyse chromatique. Plus tard, on essaya d'identifier les nucléines soit par la mise en évidence d'un de leurs constituants fondamentaux, le phosphore ou le fer, soit par l'emploi de certains ferments. Enfin, beaucoup plus récemment, un chimiste spécialisé dans l'étude des acides nucléiques, FEULGEN, a réussi à trouver une réaction extrêmement précise des nucléines, parfaitement applicable à l'Histochimie, la *réaction nucléale*.

Avant de passer en revue et de critiquer ces différentes méthodes, il nous paraît bon de rappeler brièvement quelques notions au sujet de la constitution chimique des nucléines. Le lecteur qui désirerait plus de détails à ce sujet se reportera aux traités récents de Biochimie et spécialement au livre que LEVENE a consacré aux acides nucléiques.

La Chimie actuelle des nucléoprotides tourne principalement autour de la constitution du composant acide qui en forme en quelque sorte la partie spécifique, c'est-à-dire les acides nucléiques, et laisse assez dans l'ombre celle du protide qui leur est accolé. Les vues modernes sur les acides nucléiques tendent à ne reconnaître l'existence dans la nature que de deux acides nucléiques. Le premier, l'acide zymonucléique (Hefenukleinsäure, Yeastnucleic acid), existe chez les plantes; l'autre, l'acide thymonucléique, se rencontre dans les tissus animaux. Les deux acides nucléiques ont ceci de commun que, par hydrolyse, ils donnent naissance aux matières suivantes : 1<sup>o</sup> de l'acide phosphorique; 2<sup>o</sup> un hydrate de carbone; 3<sup>o</sup> des bases puriques, et 4<sup>o</sup> des bases pyrimidiques. Ils diffèrent par la nature de leur groupement hydrocarboné et de leurs bases puriques. Le tableau suivant indique la nature de ces composants pour les deux acides nucléiques, d'après les données les plus récentes :

	Acide zymonucléique.	Acide thymonucléique.
<i>Bases puriques</i> .....	Adénine Guanine	Adénine Guanine
<i>Bases pyrimidiques</i> .....	Cytosine Uracile	Cytosine Thymine
<i>Hydrate de carbone</i> .....	<i>d</i> -ribose	<i>d</i> -ribodésose

Les acides nucléiques sont formés par l'union de quatre *nucléotides*; il n'y a pas lieu de discuter ici le mode d'union de ces nucléotides entre eux. Les nucléotides sont des esters phosphoriques des *nucléosides*; ceux-ci

sont eux-mêmes des glucosides formés par l'union d'un hydrate de carbone avec une base purique ou pyrimidique.

## 2. *L'analyse chromatique et chromolytique des nucléines.*

Les tentatives de détection histologique des nucléines par l'analyse des caractères de solubilité et de colorabilité sont anciennes et nombreuses. Les considérations développées dans la partie générale de cet ouvrage au sujet de la valeur histochimique de telles méthodes nous dispensent d'insister ici. Nous avons montré que ces méthodes peuvent avoir un intérêt morphologique car elles permettent de différencier des éléments qu'autrement on confondrait, mais qu'au point de vue de l'Histochimie, elles n'ont absolument aucune valeur. En fait, elles ont conduit à des erreurs flagrantes, qui, souvent, n'ont été redressées que récemment.

On a été jusqu'à prétendre que certains colorants constituent des réactifs absolument spécifiques des nucléines. Tel serait par exemple le vert de méthyle. Cette idée a été mise en avant avec beaucoup d'insistance par PAPPENHEIM, et les affirmations de UNNA et de son école n'ont pas peu fait pour la répandre. Certains auteurs vont même jusqu'à dire que suivant la teinte plus ou moins bleuâtre de la réaction, on pourrait distinguer entre les nucléoprotides et les acides nucléiques libres. Nous avouons n'avoir jamais pu comprendre comment des assertions aussi gratuites ont pu trouver du crédit. Des expériences élémentaires montrent, en effet, que le vert de méthyle est capable, suivant les conditions d'emploi, de colorer à peu près tous les éléments des coupes histologiques, tout comme n'importe quel colorant basique.

## 3. *La recherche de constituants minéraux des nucléines.*

LILIENTHAL et MONTI, puis MACALLUM ont cherché à identifier les nucléines en mettant en évidence un de leurs éléments fondamentaux, le phosphore. L'idée n'est pas mauvaise, mais malheureusement, ainsi qu'on l'a dit plus haut, les méthodes de recherche histochimique du phosphore sont absolument sans aucune valeur. De ce côté, on ne peut donc qu'aboutir à un échec.

On a également essayé d'identifier les nucléines en y mettant le fer masqué en évidence. L'idée de la richesse en fer des nucléines est ancienne. MIESCHER avait admis que dans les têtes de spermatozoïdes existait constamment une substance ferrugineuse non phosphorée, le *caryogène*. Ce caryogène constituerait un des stades d'élaboration des acides nucléiques,

au cours du développement du noyau. MACALLUM, poursuivant l'idée de MIESCHER, a affirmé que le fer représente un élément constant des nucléines. D'après lui, la presque totalité du fer cellulaire (abstraction faite bien entendu des dérivés ferrugineux cataboliques, comme les pigments ferrugineux d'origine hématique) se trouverait localisée dans la chromatine. La recherche du fer constituerait donc une méthode indirecte de détection histochimique des nucléines.

Cette théorie ne peut plus être admise à l'heure actuelle. Le fer que MACALLUM trouvait de façon constante dans les noyaux provenait en réalité d'impuretés véhiculées par les réactifs et adsorbées par les structures nucléaires. La Chimie actuelle des nucléoprotides montre que les acides nucléiques ne possèdent pas de fer dans leur molécule. D'autre part, les recherches les plus récentes, effectuées au moyen de techniques plus rigoureuses que celles qu'employait MACALLUM, ont montré que la présence de fer dans les noyaux cellulaires est un phénomène assez exceptionnel. C'est là un point sur lequel POLICARD a encore tout récemment insisté (Congrès des Anatomistes, Bruxelles, 1934; *Bull. Hist.*, mai 1934).

#### 4. Recherche des nucléines par la nucléase.

On a cherché, d'autre part, à identifier les nucléines en se servant de l'action spécifique d'un ferment, la nucléase, étudiée *in vitro* par SACHS. Des recherches basées sur cette idée ont été effectuées par OES chez les végétaux, VAN HERWERDEN, JORGENSEN, sur des tissus animaux. En faisant agir sur des coupes une solution de nucléase à 37° pendant un ou deux jours, les nucléines doivent être dissoutes à l'exclusion de tout autre élément cellulaire. Cette méthode est passible des critiques générales qu'on peut adresser aux méthodes utilisant des ferments. L'action de ceux-ci dépend non seulement de la nature chimique des substances étudiées, mais également de leur état physique. Aussi, certaines nucléines peuvent-elles très bien résister à l'action du ferment selon l'état de combinaison de l'acide nucléique et suivant la texture plus ou moins serrée de la structure qui les contient. Aussi, interprète-t-on souvent les résultats et dit-on qu'un résultat positif (c'est-à-dire la dissolution de l'élément) a seul de la valeur, un résultat négatif étant sans signification.

Cette conclusion est déjà trop optimiste. En effet, la nucléase, telle que l'ont employée les auteurs ci-dessus, est bien loin d'être pure. Elle renferme



en réalité, comme WERMEL le note, tout un arsenal de ferments. Même les nucléases préparées par les biochimistes modernes sont bien loin d'être pures; ainsi, la préparation connue sous le nom de takadiastase, utilisée par NOGUCHI, a dû être reconnue par l'auteur lui-même comme renfermant un grand nombre de ferments différents qu'il n'a pu séparer.

Les résultats donnés par l'application de la nucléase sont donc extrêmement sujets à caution.

Voici, par exemple, quelques résultats suspects : la chromatine des spermatozoïdes de Mammifères n'est pas digérée par la nucléase; pourtant, on ne peut douter de la présence de nucléines à leur niveau. Les corps de NISSL, au contraire, sont dissous. Or, par la réaction de FEULGEN-ROSSENBECK, on a pu prouver l'absence de nucléine animale à leur niveau. Les granulations de métachromatine (volutine) des Protistes sont également dissoutes; les études récentes sur la nature de la métachromatine ne permettent plus guère d'admettre qu'elle renferme une nucléine vraie (WERMEL).

##### 5. Réaction nucléale de FEULGEN-ROSSENBECK.

R. FEULGEN, à qui l'on doit d'importantes études sur la constitution des nucléines, a découvert un test spécifique de l'acide thymonucléique. Après une hydrolyse légère en milieu acide, l'acide thymonucléique donne naissance à une matière colorante rouge violette sous l'action du réactif de SCHIFF (fuchsine décolorée par l'acide sulfureux). Cette réaction, appliquée à l'étude histologique par FEULGEN et ROSSENBECK, constitue le meilleur test histochimique d'étude des nucléines.

Pour bien comprendre la portée de cette réaction, il importe d'en établir le mécanisme, qui n'a été entièrement élucidé que récemment.

L'acide thymonucléique est assez labile et il suffit d'une hydrolyse modérée, pour en séparer les bases puriques; le corps qui se forme ainsi est appelé, depuis KOSSEL et NEUMANN, *acide thymique*. Entre autres réactions d'aldéhydes, cet acide jouit de la propriété de recolorer la fuchsine décolorée par l'acide sulfureux. Comme FEULGEN l'a montré, ces propriétés de l'acide thymique sont dues aux groupements glucidiques de cette substance, qui « masqués » en quelque sorte dans l'acide thymonucléique, ont été libérés par l'hydrolyse. Le schéma suivant, construit d'après les formules les plus récentes de LEVENE, exprime cette relation



un simple lavage suffit pour en débarrasser les préparations. Le fixateur de FEULGEN a le gros désavantage de permettre un fort gonflement de la chromatine sous l'action des manipulations subséquentes. BAUER a fait une étude systématique des meilleurs fixateurs à employer. Les résultats optimum sont obtenus par la fixation au moyen des mélanges considérés par tous les histologistes comme les meilleurs fixateurs nucléaires, par exemple le CHAMPY, le FLEMMING sans acide acétique, le ZENKER, le HELLY, le BOUIN-ALLEN. Le CARNOY, le PETRUNKEWITSCH et le BOUIN ne sont pas à recommander, car les structures supportent alors mal l'hydrolyse. La réaction nucléale peut s'effectuer aussi bien sur frottis, sur coupes par congélation, sur coupes à la paraffine et même sur pièces (VOSS).

2<sup>o</sup> *Hydrolyse.* — Les coupes déparaffinées sont portées dans une solution d'acide chlorhydrique normal (82<sup>mm</sup>,5 de HCl de densité 1,19 pour 1 litre d'eau distillée) maintenue à la température constante de 60°, pendant un temps convenable. La durée de l'hydrolyse dans la méthode originale de FEULGEN est de 4 minutes; elle varie suivant le fixateur et le matériel employé et est donc à déterminer dans chaque cas; le temps optimum est généralement compris entre 5 minutes et 15 minutes. Une hydrolyse trop longue provoque un affaiblissement de la réaction. L'hydrolyse terminée, l'arrêter brusquement par rinçage à l'eau distillée.

3<sup>o</sup> *Action du réactif de SCHIFF.*— Les préparations sont alors traitées par le réactif de SCHIFF pendant 1 heure et demie; après quoi, on passe successivement pendant 2 minutes chaque fois dans trois récipients renfermant de l'eau saturée d'acide sulfureux. Ce rinçage à l'eau sulfureuse est un temps très important. Il est destiné à éliminer toute trace du réactif de SCHIFF qui pourrait adhérer à la coupe. Si ce rinçage est effectué dans de l'eau distillée, le réactif de SCHIFF peut s'hydrolyser avec mise en liberté de fuchsine basique; celle-ci peut alors teindre secondairement des éléments de la préparation. Cette hydrolyse ne peut avoir lieu dans l'eau chargée de SO<sup>2</sup>. Après les trois rinçages à l'eau sulfureuse, on lave à l'eau distillée, puis monte au baume suivant les méthodes habituelles. Les éléments renfermant de l'acide thymonucléique sont colorés en rouge violet ou violet.

Préparation du réactif de SCHIFF, d'après FEULGEN : 1<sup>g</sup> de fuchsine basique pulvérisée est dissous à l'ébullition dans 200<sup>mm</sup> d'eau. Refroidir à 50°, ajouter 20<sup>mm</sup> HCl normal; refroidir à 25°, ajouter 1<sup>g</sup> de bisulfite de soude anhydre et mettre dans un flacon bouchant bien. Après quelques heures, la solution se décolore; elle est utilisable au bout de 24 heures et se conserve très bien en flacon bouché. Elle doit être jaune pâle ou incolore; si elle présente une coloration rouge ou rose, indiquant la régénération de la fuchsine initiale, elle doit être rejetée.

Réactif d'après WERMEL : au lieu d'être constitué, comme le réactif de SCHIFF, par « l'acide fuchsine sulfureux », le réactif de WERMEL est en réalité constitué par le dérivé monoaldéhydique de celui-ci. Il présente l'avantage d'être plus sensible et de s'hydrolyser moins aisément. On prépare d'abord le réactif d'après FEULGEN. Deux heures après on ajoute 0<sup>mm</sup>,2 d'acétaldéhyde et l'on voit apparaître une belle couleur violette. Après une demi-heure ou 1 heure, on rajoute 20<sup>mm</sup> de HCl normal et 1<sup>g</sup> de sulfite de sodium. La solution se redécoule en 1 à 2 jours. Une fois décolorée entièrement, la solution est prête et se conserve longtemps en flacon bien bouché.

Les solutions de rinçage s'obtiennent en ajoutant à 200<sup>mm</sup> d'eau distillée 10<sup>mm</sup> d'une solution à 10 pour 100 de bisulfite de soude anhydre et 10<sup>mm</sup> de HCl normal. Elles doivent être préparées chaque jour.

*Remarque.* — Lorsque l'on effectue la réaction nucléale, il faut toujours faire une préparation témoin. Cette préparation est plongée, sans hydrolyse, dans le réactif de SCHIFF. La réaction doit être négative. Quand on effectue ce test, l'action du réactif de SCHIFF ne doit pas être prolongée plus d'une demi-heure à 1 heure, car au bout de ce temps, l'acidité propre du réactif peut produire une hydrolyse de l'acide thymonucléique et alors donner une réaction positive.

La réaction nucléale n'est pas donnée par tous les acides nucléiques, comme l'enseigne un examen attentif de son mécanisme.

Elle n'est positive que pour ceux d'entre eux dont le groupement glucidique est le *d*-ribodésosé, c'est-à-dire pour l'acide thymonucléique; l'acide zymonucléique, dont l'hydrolyse libère un pentose, le *d*-ribose, ne la donne pas.

Pour apprécier la spécificité de la réaction, il importe de toujours bien avoir présent à l'esprit que la réaction nucléale est constituée en réalité par l'ensemble de deux réactions : l'hydrolyse et l'action de la fuchine décolorée par l'acide sulfureux. Ces deux temps sont absolument nécessaires pour que l'on puisse parler de réaction nucléale. Aussi, pour pouvoir dire que la réaction nucléale est positive, il faut : 1<sup>o</sup> que l'on obtienne une coloration par le réactif de SCHIFF après hydrolyse acide et 2<sup>o</sup> que l'on n'obtienne pas de coloration par le même réactif sur une préparation non soumise à l'hydrolyse.

Cette condition nous permet d'affirmer le haut degré de spécificité de la réaction nucléale. En effet, si les substances capables de recolorer en violet le réactif de SCHIFF sont assez nombreuses (les aldéhydes seules dans l'opinion classiques; en réalité, comme LISON l'a montré, non seulement les aldéhydes, mais encore certaines cétones, des composés non saturés, des aminoxydes, le brome libre, des systèmes catalytiques oxydants), on ne connaît, à l'heure actuelle chez les êtres vivants, aucune autre substance que les acides thymonucléiques et leurs dérivés, qui, ne le recolorant pas à l'état natif, soient capables de le recolorer après une très légère hydrolyse. L'objection, quelquefois présentée, que la réaction nucléale est seulement une réaction générale d'aldéhydes, témoigne d'une profonde ignorance du mécanisme de la réaction. C'est le réactif de SCHIFF qui est un réactif d'aldéhydes; la réaction de FEULGEN implique une

hydrolyse, préalable à l'action du réactif de SCHIFF; sous l'action de l'hydrolyse, une substance SCHIFF-négative doit devenir SCHIFF-positive. On peut rencontrer dans les tissus des substances recolorant la fuch sine décolorée par l'acide sulfureux, soit immédiatement (cas des fibres élastiques par exemple, FEULGEN et ROSSENBECK), soit après traitement par certains réactifs (corps gras après traitement par le sublimé, FEULGEN et VOIT, VERNE; glycogène après traitement par l'acide chromique, BAUER). Ces réactions sont fondamentalement différentes de la réaction nucléale et c'est une grossière erreur que de les confondre avec celle-ci. Ce n'est pas l'emploi du réactif de SCHIFF qui caractérise la réaction nucléale, c'est la succession d'une hydrolyse et de l'emploi du réactif de SCHIFF. Le réactif de SCHIFF n'est pas spécifique, mais la réaction de FEULGEN l'est.

Il faut prendre garde, en effectuant la réaction nucléale, à une importante cause d'erreur que nous avons déjà signalée. C'est la possibilité d'une hydrolyse du réactif de SCHIFF avec régénération de la fuch sine et coloration secondaire d'éléments basophiles de la préparation. Pour l'éviter, il faut prendre les précautions que nous avons dites, à savoir un rinçage très scrupuleux à l'eau chargée d'acide sulfureux. C'est probablement pour n'avoir pas pris garde à ce point que certains auteurs ont obtenu des résultats reconnus faux. REDENZ a ainsi décrit une réaction nucléale positive au niveau des blocs de NISSL des cellules nerveuses, alors que beaucoup d'autres auteurs l'ont trouvée constamment négative (BERG, WERMEL, HERTWIG, VOSS, VERNE). C'est également pour cette raison que l'on trouve tant d'indications contradictoires au sujet de la présence ou de l'absence d'acide thymonucléinique chez certains Protistes.

Au point de vue morphologique, la réaction nucléale paraît actuellement réaliser tous les desiderata. Le procédé original de FEULGEN était assez défectueux, car l'hydrolyse produisait un fort gonflement et une vacuolisation des structures nucléaires. L'emploi de meilleurs fixateurs a permis de supprimer ces défauts. VON MÖLLENDORFF avait suggéré une erreur possible dans la réaction nucléale. Les aldéhydes produites par l'hydrolyse ou bien la matière colorante se produisant par l'action du réactif de SCHIFF sur l'hydrolysate ne pourraient-elles diffuser et provoquer une teinture secondaire d'éléments cellulaires voisins? FEULGEN a répondu à cette objection en montrant que ni le produit d'hydrolyse, ni la coloration ne peuvent diffuser de façon appréciable, car des lavages même prolongés ne peuvent les déplacer des structures auxquelles elles sont liées. WERMEL

a également effectué sur ce sujet des expériences décisives, trop longues à rapporter ici.

### 6. Résultats histochimiques de la réaction nucléale.

La réaction nucléale nous apparaît donc comme une réaction histo-chimique de grande valeur. En effet, elle permet de suivre au sein des cellules la destinée des *substances* nucléaires et non plus, comme le faisaient les méthodes d'analyse chromatiques, celle des *structures* nucléaires.

En premier lieu, grâce à elle, on a pu préciser la localisation des nucléines dans le noyau. Celles-ci se trouvent uniquement au niveau de la « chromatine », c'est-à-dire de l'élément basophile du noyau. Les nucléoles n'en présentent pas trace (WERMEL). Dans les noyaux en cinèse, les chromosomes présentent toujours une réaction nucléale intense.

En dehors du noyau, chez les Métazoaires, on n'a pas trouvé jusqu'ici de substances présentant la réaction nucléale. Les constatations contraires (REDENZ, HOPE-HIBBARD) ont été controuvées (<sup>1</sup>).

On sait qu'à différentes reprises on a considéré des éléments cytoplasmiques comme renfermant des nucléines ou des substances apparentées; par exemple les corps de NISSL des cellules nerveuses, les granulations des mastocytes, les grains de kératohyaline, les granulations basophiles apparaissant dans les œufs après la fécondation. Toutes ces hypothèses étaient basées presque uniquement sur des analogies de colorabilité avec la chromatine ou sur des études chromolytiques. Les constatations effectuées au moyen de la réaction nucléale contredisent toutes ces idées, en montrant l'absence, au niveau des éléments considérés, d'acides nucléiques du type de l'acide thymonucléique; la possibilité d'existence d'autres acides nucléiques (pentosenucléoprotides) ne peut bien entendu pas être exclue, puisque ces substances ne donnent pas la réaction nucléale.

D'autre part, la réaction nucléale a suscité d'importantes recherches sur le métabolisme des acides nucléiques chez les Métazoaires. De façon générale, la réaction nucléale donne des résultats parallèles, à la fois comme

---

(<sup>1</sup>) Cependant, au cours de l'intoxication à la tripaflavine, DUSTIN et MAYER ont vu apparaître des sphérules cytoplasmiques donnant la réaction nucléale. Cette excréation sphérolaire de nucléines, consécutive à l'inhibition mitotique est fonction de l'arrêt des cinèses et semble être l'expression d'un balancement entre l'activité caryocinétique et une forme d'activité sécrétoire.

localisation et comme intensité, aux colorations de la chromatine telle qu'on l'obtient par les colorants basiques. Lorsque la colorabilité des caryosomes augmente, l'intensité de la réaction nucléale augmente également et *vice versa*. Cependant, il existe une exception importante; dans les noyaux des ovocytes de premier ordre, au stade de grand accroissement, la réaction nucléale devient négative, alors même que les chromomères des chromosomes plumeux conservent une basophilie assez marquée. Ce fait, observé pour la première fois par KOCH en suivant l'ovogenèse des Chilopodes au moyen de la réaction nucléale, a été confirmé sur des matériaux très divers par un grand nombre d'auteurs : VOSS, LUDFORD, BRACHET, MUKERJI, GRESSON, BAUER, MARZA. Ce n'est qu'à la maturation que la réaction nucléale reparait, d'ailleurs strictement localisée aux chromosomes. Cette disparition de l'acide thymonucléique à un moment donné de l'ovogenèse n'est pas due à une simple dilution de l'acide thymonucléique dans la vésicule germinative, comme l'a supposé FEULGEN, mais à une transformation chimique entraînant la perte de la réaction (KOCH, LUDFORD, BRACHET). La signification profonde de ce fait curieux a fait l'objet de très belles études de J. BRACHET. Dans l'ovocyte de premier ordre parvenu à la fin de son accroissement, il n'existe pas de réserve appréciable d'acide thymonucléique, ni nucléaire, ni cytoplasmique, contrairement à l'hypothèse de GODLEWSKI. Au cours du développement ultérieur de l'œuf, se produit une synthèse d'acide thymonucléique. Chez certaines espèces (Oiseaux) la synthèse est totale, conformément à la théorie de LOEB : le phosphore est emprunté à d'autres composés phosphorés, les bases puriques et les radicaux hydrocarbonés de l'acide thymonucléique sont synthétisés de toutes pièces. Chez d'autres espèces, au contraire, comme l'Oursin, sur lequel a spécialement travaillé J. BRACHET, il doit se produire une synthèse d'acide thymonucléique à partir d'autres nucléoprotides, vraisemblablement de pentosenucléoprotides cytoplasmiques (non démontrables histochimiquement puisque ne donnant pas la réaction nucléale, mais dosables par voie chimique).

Nous avons dit plus haut que, typiquement, l'acide thymonucléique se rencontrait chez les organismes animaux, tandis que l'acide zymonucléique était l'apanage des organismes végétaux et des protistes. Ces vues, obtenues par l'étude biochimique, ont dû être corrigées par les recherches histo-chimiques. Chez les végétaux supérieurs, FEULGEN et ROSSENBECK ont reconnu que les noyaux donnent parfaitement la réaction nucléale. Dans

ces organismes, il y a donc coexistence des deux acides nucléiques. L'acide thymonucléique est localisé au noyau, tandis que l'acide zymonucléique semble toujours être à l'état diffus, dans le cytoplasme. Dans les levures et les bactéries, d'après FEULGEN et ROSSENBECK, il n'existerait pas d'acide thymonucléique. VERNE, à ce propos, fait remarquer que ces organismes ne possèdent pas de noyau et que, dès qu'apparaît le noyau comme organe figuré, l'acide thymonucléique apparaît aussi. On pourrait tout aussi bien, nous semble-t-il, soutenir la proposition réciproque : dès qu'apparaît l'acide thymonucléique, il est dans un noyau. On doit donc conclure qu'entre le noyau, organe figuré, et l'acide thymonucléique, substance chimique définie, il existe un rapport constant et étroit. Ce fait doit avoir une haute signification biologique, quoiqu'on ne puisse encore préciser davantage l'importance de ces relations entre la Morphologie et la Chimie.

Chez les Protistes, cependant, il existe pas mal de divergences entre les auteurs au sujet de la réaction nucléale. Dans certains organismes, les uns ont décrit des corpuscules donnant une réaction nucléale positive, tandis que les autres n'ont pu la retrouver. La levure de bière, d'après FEULGEN et ROSSENBECK, WERMEL et SASSUCHINE, ne donne pas de réaction ; d'après REICHENOW et ROCHLINA, la volutine de cet organisme donnerait une réaction positive. Le noyau des Rhizopodes ne présenterait pas d'acide thymonucléique d'après les uns (WERMEL, PIETSCHMANN) et en présenterait d'après d'autres (BOGDANOWICZ, v. SCHUCKMANN, ZUELZER, JIROVEC, REICHENOW). Nous pensons que ces résultats discordants doivent provenir d'erreurs techniques, d'autant plus trompeuses que les dimensions du matériel à examiner sont plus réduites.

## II. — PURINES.

Les bases puriques constituent des éléments importants du métabolisme. Comme on le sait, chez la plupart des animaux, ils résultent du catabolisme des nucléoprotides. Cela justifie leur présentation dans ce livre à la suite des nucléoprotides, quoique, comme on le sait, chez certains animaux (Sauropsides), ils dérivent également du métabolisme protidique général.

L'Histochimie des bases puriques n'est pas encore très développée et présente encore de grosses lacunes. Cet état de choses est dû à plusieurs



raisons. Tout d'abord, ainsi qu'on le verra plus loin, les méthodes de mise en évidence des purines sont encore assez déficientes; elles manquent surtout de spécificité. D'autre part — et ceci est plus grave — les possibilités d'étude histochimique des purines se trouvent limitées chez un grand nombre d'organismes et spécialement chez les Vertébrés supérieurs par le fait qu'on éprouve les plus grandes difficultés à les précipiter lorsqu'elles existent à l'état dissous. Ainsi, il est pour ainsi dire impossible de surprendre les stades de l'élimination rénale physiologique de l'acide urique, même chez les Oiseaux où elle est considérable. Il faut en injecter des quantités considérables pour qu'on puisse la retrouver sur les coupes. Ne sont guère abordables que les purines qui se trouvent d'avance à l'état figuré dans l'organisme, soit à l'état cristallin (iridocytes, guanophores des Vertébrés inférieurs ou des Invertébrés), soit en liaison avec un substratum organique (concrétions puriques chez de nombreux Invertébrés).

Dans ces cas, la fixation des purines ne présente aucune difficulté; il suffit de fixer par un liquide qui ne les dissolve pas. C'est généralement l'alcool absolu qui est préconisé. Nous lui préférons l'alcool-formol, qui donne des fixations histologiques meilleures. Les fixateurs aqueux et surtout les fixateurs fortement acides doivent être évités.

Parmi les réactions proposées pour détecter histochimiquement les purines, il en est qui sont communes à toutes les purines; les autres ne sont données que par certaines d'entre elles.

### 1. Réactions communes à tous les corps puriques.

A. *Méthodes argentiques.* — Les méthodes argentiques de détection des purines sont basées sur l'insolubilité de leurs sels argentiques. La base est transformée en son sel d'argent, puis l'argent est mis secondairement en évidence par réduction, soit à la lumière, soit par l'action d'un révélateur photographique. Tel est le principe des méthodes d'ANTEN, de COURMONT et ANDRÉ, de CIACCIO, de LESCHKE, de HOLLANDE. La valeur de ces réactions est fort inégale. En effet, il s'agit de réactions indirectes, et l'on sait combien ces méthodes sont sujettes à des causes d'erreur tenant à l'adsorption du sel argentique par les tissus. D'autre part, beaucoup d'autres substances que les purines sont capables de donner, par l'action d'un sel d'argent, un précipité insoluble; la réaction n'est donc pas spécifique. Ce qui est plus caractéristique et à peu de chose près spécifique pour les purines, c'est l'*insolubilité* de ce sel d'argent dans un excès d'ammo-

niaque. Les méthodes jusqu'ici proposées ne tiennent pas compte de ce fait. Les unes emploient le nitrate d'argent en solution neutre, comme celles de COURMONT et ANDRÉ, de HOLLANDE; ce sont les moins spécifiques de toutes; elles donnent des résultats positifs en l'absence de purines. Ainsi, COURMONT et ANDRÉ ont obtenu des résultats positifs sur le rein de la Grenouille, dont l'urine ne renferme pourtant que des traces absolument infinitésimales de purines (NEBELTHAUS, EBSTEIN). Quant à la réaction de HOLLANDE, il suffit de l'appeler réaction de KOSSA et alors elle est censée mettre en évidence le phosphate de calcium! D'autres méthodes utilisent des solutions ammoniacales de nitrate d'argent (CIACCIO, LESCHKE), ou de chlorure d'argent (ANTEN). Elles sont un peu moins mauvaises, mais la possibilité d'une adsorption du sel d'argent par des protides cellulaires n'est pas le moins du monde exclue et la spécificité de la réaction demeure toujours très aléatoire. On doit d'ailleurs remarquer que les méthodes de ANTEN, LESCHKE et CIACCIO s'effectuent sur pièces entières et non pas sur coupes. Ce sont là des conditions de travail extrêmement défavorables, car les tissus ont un pouvoir réducteur assez considérable pour réduire à eux seuls le nitrate d'argent ammoniacal, réactif des plus instables. Cela est tellement vrai que CIACCIO, après avoir traité les pièces de 1 à 5 jours par le nitrate d'argent ammoniacal, à l'obscurité, monte les préparations sans avoir fait intervenir un réducteur quelconque : les granulations d'argent réduit qu'il voit, il les interprète comme purines. Disons plutôt qu'il s'agit de sel d'argent réduit par un trop long séjour au contact des tissus.

Nous sommes convaincus que les méthodes argentiques jusqu'ici proposées pour la détection des purines n'ont absolument aucune valeur et nous estimons inutile d'en détailler la technique.

Une méthode argentique rationnelle de détection des purines devrait ne s'effectuer que sur coupes; on devrait traiter des coupes, après un lavage soigneux à l'eau distillée, par une solution de nitrate d'argent ammoniacal, renfermant un excès assez notable (au moins 5 pour 100) d'ammoniaque; ce traitement devrait être assez court, quelques heures au plus; après traitement argentique, devrait suivre un rinçage très soigné dans de l'eau ammoniacale plusieurs fois renouvelée; ensuite, réduction par un révélateur photographique, comme par exemple dans la méthode de CAJAL; puis virage à l'or et fixation à l'hyposulfite. Malgré tout, les résultats d'une telle méthode devraient être critiqués. Un résultat positif

obtenu au niveau d'une inclusion cytoplasmique amorphe devrait être considéré avec beaucoup de prudence, en raison de la possibilité d'une adsorption par des protides tissulaires. Seul, un résultat positif au niveau d'une inclusion cristalline pourrait être considéré comme ayant quelque valeur. En effet, c'est seulement quand on a affaire à des corps cristallisés que l'on est à peu près sûr de la pureté de la substance étudiée.

B. *Méthode de SAINT-HILAIRE.* — Cette méthode est également une méthode indirecte. Elle est basée sur le fait que les sels cuivreux des purines sont insolubles; le cuivre est mis secondairement en évidence par l'action du ferrocyanure de potassium, qui donne du ferrocyanure cuivreux rouge.

*Méthode.* — 1<sup>o</sup> Fixer les pièces dans de l'alcool absolu; inclure à la celloïdine; 2<sup>o</sup> placer les coupes dans  $\text{SO}^4 \text{Cu}$  à 5-10 pour 100 pendant plusieurs heures; 3<sup>o</sup> transporter dans une solution très chaude et saturée de bisulfite de soude 1 à 2 minutes; 4<sup>o</sup> laver très soigneusement à l'eau distillée; 5<sup>o</sup> traiter 10 minutes par une solution de ferrocyanure de K à 1 pour 100; 6<sup>o</sup> laver. Déshydrater, xylol, baume. Éventuellement, coloration de fond par un bleu basique.

*Méthode II :* 1<sup>o</sup> fixer les tissus frais dans une solution chaude concentrée de bisulfite de Na, additionnée d'une solution de  $\text{SO}^4 \text{Cu}$  jusqu'à apparition d'un précipité; 2<sup>o</sup> laver à fond; 3<sup>o</sup> dissocier ou couper; 4<sup>o</sup> traiter par le ferrocyanure.

Cette réaction est une fois de plus sujette à toutes les critiques adressées aux méthodes indirectes; elle n'est pas spécifique. Des albuminoïdes, comme la protamine et l'histone, peuvent donner des réactions positives (PRENANT). POLICARD n'a eu que de mauvais résultats avec cette méthode. STEMPER, d'autre part, a observé que la coloration rouge caractéristique de la réaction pouvait se produire toute seule, en l'absence de toute purine.

## 2. Réactions spéciales des différents corps puriques.

A. *Réaction de la murexide.* — La réaction de la murexide, bien connue en Macrochimie, peut être appliquée en Histochimie. Cependant, une réserve s'impose : une réaction positive prouve la présence d'une purine, mais négative, elle ne prouve rien. En effet, lors du premier temps de la réaction (traitement par l'acide nitrique), il y a formation soit d'alloxanthine, soit de nitroxanthine (suivant qu'il ne s'agit de la réaction vraie de la murexide ou de la réaction dite xanthique). Ces corps sont extrêmement solubles dans tous les réactifs et doivent donc disparaître de la coupe.

En fait, ils le font toujours, *sauf* lorsqu'ils sont retenus en quelque sorte par des albuminoïdes du substrat (cas des inclusions puriques du rein des Mollusques étudiées par TURCHINI). La réaction de la murexide peut donc fort bien donner un résultat négatif, lors même qu'une purine se trouve dans la coupe.

En revanche, un résultat positif a une signification très précise, car aucune autre substance organique présente dans les organismes animaux ne peut la donner. Il importe cependant de ne pas confondre la teinte pourpre violacée de la réaction de la murexide avec la teinte jaune orangé de la réaction xanthoprotéique donnée par les protides. La distinction est facile à effectuer, pourvu que l'on soit prévenu. Au point de vue purement morphologique, il faut noter que la réaction de la murexide est assez brutale et ne se prête donc guère à l'étude cytologique fine. Sa sensibilité est assez médiocre.

*Technique.* — 1<sup>o</sup> Déposer sur la coupe une goutte d'acide nitrique concentré; 2<sup>o</sup> chauffer doucement jusqu'à évaporation; 3<sup>o</sup> exposer aux vapeurs d'ammoniaque : les coupes sont jaune orangé (réaction xanthoprotéique), tandis que les composés puriques sont pourpre violet.

La réaction de la murexide est donnée, comme on sait, par l'acide urique, la xanthine et ses dérivés méthylés, la guanine, mais non par l'adénine et l'hypoxanthine.

B. *Distinction des bases puriques entre elles.* — Histologiquement, on n'a guère à distinguer que la guanine de l'acide urique. Pour cette distinction, on ne dispose pas, à l'heure actuelle, de réactions chimiques sûres; on est obligé d'avoir recours aux caractères de solubilité. On notera que ces caractères de solubilité peuvent être infidèles si la substance ne se trouve pas à l'état cristallin pur, mais unie de façon plus ou moins solide à un substrat protidique ou autre. Des résultats absolument certains ne peuvent donc être obtenus que pour les corps puriques dont on aura, au préalable, vérifié l'état cristallin au moyen du microscope polarisant.

Voici les caractères différentiels de solubilité de la guanine et de l'acide urique :

*Guanine.* — 1<sup>o</sup> Extrêmement peu soluble dans l'eau, insoluble dans les solvants organiques; 2<sup>o</sup> très soluble dans les acides minéraux, insoluble dans les acides organiques; 3<sup>o</sup> très soluble dans toutes les bases minérales,

sauf dans l'ammoniaque, même concentrée; 4<sup>o</sup> insoluble dans l'hydrate de pipérazine; 5<sup>o</sup> soluble dans l'alun de fer (MILLOT).

*Acide urique.* — 1<sup>o</sup> Extrêmement peu soluble dans l'eau, insoluble dans les solvants organiques; 2<sup>o</sup> insoluble dans les acides; 3<sup>o</sup> solubilité irrégulière dans les bases organiques, suivant le sel formé; insolubilité dans NH<sup>3</sup>; 4<sup>o</sup> soluble dans l'hydrate de pipérazine.

A titre documentaire, nous devons signaler des méthodes d'analyse chromatique des corps puriques, qui n'ont bien entendu pas de valeur histochimique (par exemple les méthodes de SCHMORI., de A. SCHULTZ, de TOMITA), ou l'emploi de l'acide osmique (critiqué par MELCZER).

### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

*Nucléines.* — BAUER (H.), *Z. Zellf.*, 15, 1932, p. 225. — BERG (W.), *Z. mikr.-anat. Forsch.* 7, 1926, p. 421. — BOGDANOWICZ (A.), *Z. Zellf.*, 10, 1930, p. 471. — BRACHET (J.), *A. Biol.*, 39, 1929, p. 677; 44, 1933, p. 519. — DUSTIN (A. P.), *C. R. Assoc. Anat.*, 27, 1932, p. 249; *Arch. zool. exp.*, 75, 1933, p. 353. — FEULGEN (R.) et ROSSENBECK (H.), *Hoppe-S.*, 135, 1924, p. 203. — FEULGEN (R.), *Abderh. Hdb.*, V, 2, 1926, p. 2; *Hoppe-S.*, 165, 1927, p. 215. — GRESSON, *Quart. Jl Mic. S.*, 73, 1930, p. 617. — VAN HERWERDEN (A.), *Z. Zellf.*, 10, 1913, p. 431; *Berl. K. W.*, 50, 1913; *Anat. Anz.*, 47, 1914. — HIBBARD (H.), *A. Biol.*, 38, 1928, p. 371. — JIROVEC (O.), *A. Prot.*, 59, 1927, p. 550. — JORGENSEN, *Z. Zellf.*, 10, 1920, p. 56. — KOCH (A.), *Z. Zellf.*, 2, 1925, p. 293. — LEVENE (P. A.), *Nucleic Acids*, 1931 (Chemical Catalog C<sup>o</sup>, New-York). — LEVENE (P. A.), MIKESKA (L. A.) et MORI (T.), *Jl Biol. Chem.*, 85, 1930, p. 785. — LISON (L.), *Bull. Hist.*, 9, 1932, p. 177. — LUDFORD (R. J.), *Proc. Roy. S.*, B, 102, 1928, p. 397. — MACALLUM (A. B.), *Proc. Roy. S.*, 50, 1891, p. 277. — MAYER (Ch.), *Arch. int. Med. exp.*, 9, 1934, p. 427. — MUKERJI (R. N.), *Proc. Roy. S.*, B, 131, p. 1930. — PIETSCHMANN (K.), *A. Prot.*, 65, 1929. — ROCHLINA (E.), *Bull. Ac. Sc. U. R. S. S.*, 7<sup>e</sup> série, 855, 1933. — VON SCHUKMANN (W.), *Arb. Reichsgesundheitsamt*, 57, 1926, p. 802. — VERNE (J.), *Bull. Hist.*, 4, 1927, p. 110; *Ass. Anat.*, 23, 1908, p. 465. — VOSS (H.), *Z. mikr.-anat. Forsch.*, 34, 1933, p. 282. — WERMEL (E.), *A. Russ. Prot.*, 4, 1925, p. 1; *Z. Zellf.*, 5, 1927, p. 400; 6, 1927, p. 424. — WOODCOCK, *Jl Roy. Army Med. Corp.*, 46, 1926, p. 354. — ZUELZER (M.), *A. Prot.*, 57, 1927, p. 247.

*Purines.* — ANTEN, *A. int. Pharmacodyn.*, 1902. — CIACCIO (C.), *Anat. Anz.*, 33, 1908, p. 298. — COURMONT (J.) et ANDRÉ (Ch.), *Jl Physiol. et Path. gén.*, 25, 1905, p. 225. — HOLLANDE (A. Ch.), *Bull. Hist.*, 8, 1931, p. 176. — MELCZER (N.), *Z. wiss. M.*, 43, 1926, p. 161. — MILLOT, *Th. Méd.*, Paris, 1923; *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 57, 1923. — SAINT-HILAIRE, *Hoppe-S.*, 26, 1898. — SCHULTZ (A.), *Verh. d. path. Ges.*, 175, 1931. — TOMITA (W.), *Trans. jap. path. Soc.*, 18, 1929, p. 263.

## SECTION III.

### Lipides.

---

## CHAPITRE XII.

### ÉTUDE GÉNÉRALE DES MÉTHODES D'ANALYSE HISTOCHIMIQUE DES LIPIDES.

---

L'étude des substances grasses représente certainement un des chapitres les plus importants de l'Histochimie. Il s'en faut de beaucoup cependant qu'il constitue un ensemble achevé. Au contraire, il est encore en pleine évolution et les acquisitions de ces dernières années ont bouleversé beaucoup de notions trop hâtivement devenues classiques. Les réactions proposées pour la détection histochimique des lipides et la distinction des divers lipides entre eux sont nombreuses; peu cependant ont une valeur spécifique réelle. Beaucoup d'entre elles, journallement utilisées, sont sans valeur aucune, et n'ont même pas la valeur d'un indice ou d'une probabilité. Trop souvent, on leur accorde une confiance aveugle, on les applique sans discrimination et l'on bâtit des hypothèses dans le vide. Ici, peut-être plus que dans tous les autres domaines de l'Histochimie, la prudence et le sens critique s'imposent.

La plupart des données si péniblement acquises au sujet de la valeur signalétique des réactions histochimiques des lipides doivent être revisées de fond en comble. La cause profonde des erreurs commises dans l'appréciation de leur spécificité doit être cherchée dans une erreur de systématique. Les auteurs qui découvrirent une méthode applicable à l'Histochimie des corps gras en essayèrent la spécificité *in vitro* sur des corps gras chimiquement définis. Leur tort fut de faire ces essais uniquement sur des corps purs. Les propriétés des mélanges de corps gras — et dans les tissus, les

corps gras ne se présentent jamais qu'à l'état de mélanges — ne sont pas la somme pure et simple des propriétés de leurs constituants. Dans nombre de cas, des mélanges présentent des réactions très différentes de celles de leurs constituants pris isolément. On n'avait pas pris garde à ce fait et l'on avait ainsi créé une Histochimie des corps gras qui n'a de valeur que pour des corps purs, et est inapplicable en pratique.

Dans les lignes qui vont suivre, nous étudierons successivement : la fixation histochimique des lipides, les méthodes générales de leur mise en évidence, les réactions spéciales permettant de distinguer les différentes classes de lipides. Nous ferons suivre cet exposé d'une table dichotomique d'analyse histochimique des lipides qui résume toutes les possibilités actuelles de l'Histochimie dans ce domaine. Enfin, nous étudierons les méthodes relatives à la mise en évidence des lipides « masqués » et aux procédés de lipophanérose artificielle.

Dans les écrits des morphologistes, on trouve trop souvent encore des termes absolument périmés, qui ne répondent plus aux dénominations modernes des biochimistes.

Citons, par exemple, le terme « lipoïde », le plus mauvais parce que le plus ambigu : « lipoïde » « which is at once a cloak for ignorance and an indefinable limbo into which any one can thrust anything of which he knows little or nothing » (LEATHES et RAPER). « Lipoïde », d'après les uns, désigne tous les constituants cellulaires solubles dans les solvants des corps gras (OVERTON); d'après d'autres, toute la fraction insaponifiable de celle-ci (KLETZINSKI et beaucoup d'autres); d'après d'autres encore (CIACCIO), seulement les phospholipines et les galactolipines. C'est un terme à rejeter.

D'autres termes, aussi mauvais, tendent heureusement à disparaître : ainsi « protagon », qu'on sait actuellement ne désigner qu'un mélange; et « lécithines » (au pluriel) ou « corps lécithoïdes », sous lesquels d'anciens auteurs désignaient tous les corps gras précipitables par l'acétone, c'est-à-dire ce que nous nommons aujourd'hui les lipines. La terminologie suivante, conforme aux décisions des Congrès internationaux de Biochimie, a donc été suivie. Entre parenthèses ont été mis les termes anciens.

*Lipides* (corps gras).

- I. *Glycérides* (graisses neutres) : *glycérol* (glycérine), *acides gras*.
- II. *Cholestérides* (esters du cholestérol) : *cholestérol* (cholestérine), *acides gras*.
- III. *Lipines* (lipoides) : *phospholipines* (phosphatides).  
*galactolipines* (cérébrosides).

## I. — LA FIXATION HISTOCHEMIQUE DES LIPIDES.

La technique la plus couramment utilisée pour l'étude histologique des corps gras consiste à effectuer une fixation plus ou moins prolongée dans le formol à 10 ou 20 pour 100, puis à pratiquer des coupes par congélation.

Cette technique est loin d'être indifférente envers les corps gras et la fixation formolée peut produire d'importants changements dans leurs aptitudes réactionnelles. La fixation produit ainsi une diminution générale de la solubilité des lipides (HAMMAR, KUTSCHERA-AICHBERGEN), elle cause d'importants changements dans leurs caractères de colorabilité : augmentation de corps gras FISCHLER-positifs (MILLOT et GIBERTON, DOLFINI), de corps gras CIACCIO-positifs (DA ROCHA-LIMA, DOLFINI), de corps gras colorables en bleu par la méthode de L. SMITH au bleu de Nil (DOLFINI, BÆMINGHAUS); elle trouble les caractères optiques des corps gras en lumière polarisée : cristallisation de lipides (SCHMIDT).

La nature et le mécanisme de ces transformations sont mal connus. ROCHA-LIMA, observant une augmentation des lipides CIACCIO-positifs, supposée spécifique des lipines (« lipoides »), admet une transformation des glycérides en lipines. BÆMINGHAUS, MILLOT et GIBERTON, observant une augmentation des lipides FISCHLER et SMITH-DIETRICH-positifs, et se faisant des illusions sur la valeur de ces méthodes, pensent à une hydrolyse des glycérides en glycérol et acides gras, l'un croyant à l'action hydrolytique de l'acidité du fixateur, les autres admettant la présence d'une lipase formolo-résistante. Les données obtenues par des biochimistes ne sont pas du tout d'accord avec les constatations des histologistes précédents. WEIL, KIMMELSTIEI, MLADENOVIC et LIEB n'observent aucune diminution de cholestérol, de ses esters, des galactolipines, des glycérides après fixation formolée; ils trouvent régulièrement un passage assez important des phospholipines dans le liquide fixateur. Et nous venons de dire qu'avec leurs méthodes soi-disant spécifiques, les histologistes constatent une augmentation des lipines!



De façon générale, on peut cependant admettre qu'un séjour assez bref dans le fixateur ne peut guère influencer notablement les réactions des lipides. Ce n'est qu'au bout de 24-48 heures que des modifications quelque peu notables peuvent se produire.

Pour les recherches fines, on aura toujours soin de pratiquer des examens de contrôle sur pièces fraîches (par exemple coupées par congélation sans fixation), et dans tous les cas on évitera de laisser séjourner le matériel plus de quelques jours dans des liquides formolés.

## II. — LES RÉACTIONS HISTOCHIMIQUES GÉNÉRALES DES LIPIDES.

### 1. *Caractères de solubilité.*

En Chimie biologique, le groupe entier des corps gras est défini en première approximation par des caractères de solubilité. Les lipides sont les substances insolubles dans l'eau et solubles dans les « solvants des corps gras » : alcool, éther, chloroforme, tétrachlorure de carbone, sulfure de carbone, hydrocarbures, etc.

Cette notion ne peut être transposée en Histochimie. En effet, l'histologiste se trouve fréquemment, tantôt devant des corps gras qui se dissolvent mal ou pas du tout dans les solvants de graisses, tantôt devant des corps solubles dans ces solvants et qui ne sont pas des corps gras. Ainsi, il n'est nullement exceptionnel de rencontrer des corps gras parfaitement conservés sur des coupes à la paraffine, des acides gras par exemple (ROUSLACROIX) ou des carotinoïdes, ayant donc résisté à l'action dissolvante de l'alcool et des hydrocarbures. On peut même en rencontrer sur des coupes à la celloïdine (VERSÉ), alors que les pièces ont séjourné plusieurs semaines dans des mélanges d'alcool et d'éther. Cela tient à plusieurs raisons. Tout d'abord, les conditions d'extraction que réalise l'inclusion à la paraffine ne correspondent pas exactement aux conditions de l'extraction des corps gras pratiquée en Chimie analytique. Comment comparer en effet une inclusion histologique à une extraction prolongée au *Soxhlet* ou au *Komagawa*? Et même si l'on tenait à se rapprocher le plus possible de ces conditions, l'état physique des corps gras tels qu'ils existent dans du matériel fixé histologiquement sera toujours loin de l'état du matériel préparé pour une étude chimique (dessiccation, pulpage, etc.). La fixation formolée à elle seule produit déjà de notables changements dans la solubilité des corps gras (KAUFFMANN, LEHMANN et BANIECKI). Rien d'étonnant

donc à trouver insolubles ou peu solubles sur des préparations histologiques des corps gras qu'une extraction chimique prouverait solubles.

De plus, les histologistes connaissent des substances qu'ils rattachent très justement aux corps gras et qui sont très peu ou pas du tout solubles dans les solvants des lipides. L'exemple le plus typique est le groupe des « chromolipoides » (CIACCIO); les chromolipoides, dérivés de dégradation directe des corps gras, et qui présentent encore tous les caractères histo-chimiques de ceux-ci, sont pour la plupart insolubles ou peu solubles dans leurs solvants, même à chaud.

Pour l'histologiste, les caractères de solubilité n'ont donc pas la même importance que pour le biochimiste, et il n'y attachera donc pas un intérêt exagéré.

## 2. Colorants généraux des lipides.

Le procédé le plus courant pour la détection des corps gras est l'emploi de colorants spécifiques. Ces colorants présentent la propriété d'être insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants des corps gras et dans les corps gras eux-mêmes.

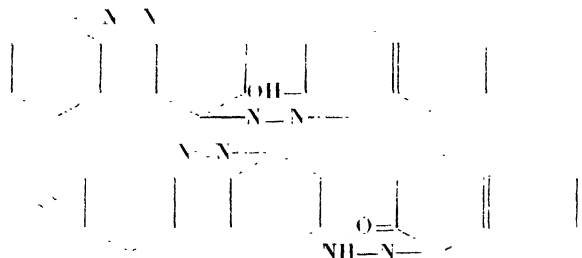
Pour se rendre compte de la valeur spécifique de ces méthodes, il est nécessaire de donner quelques explications complémentaires. Les colorants spécifiques des lipides ne sont pas à proprement parler des matières colorantes *stricto sensu*. En effet, ils n'ont *aucune* affinité tinctoriale, ni pour les fibres textiles, ni pour les éléments tissulaires (autres que les corps gras). Ce sont des corps *colorés*, mais non pas des corps *colorants* proprement dits. La coloration qu'ils communiquent aux corps gras est un pur phénomène physique de dissolution régi par la loi de HENRY; elle n'a rien de commun avec les phénomènes compliqués de la teinture, dont le mécanisme est encore à l'heure actuelle très discuté.

On connaît la distinction fondamentale entre un corps coloré et un corps colorant. Un corps coloré est un corps absorbant sélectivement une ou des radiations du spectre; la propriété *couleur* tient à l'existence dans la molécule de la substance (WITT) d'un groupe atomique particulier, le groupe *chromophore*; on connaît actuellement une bonne vingtaine de groupes chromophores (par exemple  $—N=N—$ ;  $NO^2—$ ;  $NO—$ ;  $—N=C=$ , etc.).

Mais les corps colorés ne renfermant qu'un chromophore n'ont *aucune* affinité pour les fibres textiles et ne sont donc pas des matières colorantes. Pour que le pouvoir colorant apparaisse, il faut en outre un groupement dit *auxochrome*; les groupements auxochromes sont tous des radicaux salifiables, c'est-à-dire ionisables, par exemple :  $NH^2$ ,  $OH$ ,  $SO^3H$ , etc.

Si la faculté d'ionisation disparaît pour une raison ou une autre, l'effet auxochromique et donc le pouvoir colorant disparaissent.

Les « colorants » spécifiques des graisses sont : 1<sup>o</sup> soit des corps possédant un ou des chromophores, mais pas d'auxochrome : par exemple l'azobenzène, le carotène, probablement aussi la chlorophylle; 2<sup>o</sup> soit des corps renfermant un ou des chromophores et un auxochrome, mais où celui-ci a été rendu non ionisable et par conséquent inefficace : c'est le cas du Soudan III et du Scharlach. Tous deux sont des orthooxyazoïques; chez ces corps, à cause d'un phénomène de tautomérie, l'ionisabilité de l'auxochrome OH est annihilée (MICHAELIS). Ainsi, dans le cas du Soudan III,



Tout cela revient à dire que *les colorations spécifiques des graisses constituent un phénomène parfaitement connu et entièrement défini* : il a donc une signification histochimique précise. L'examen d'un tissu par ces méthodes n'est pas une technique d'analyse chromatique, c'est une technique histochimique.

La spécificité de ces méthodes est parfaite : seuls les lipides donnent des réactions positives.

Il doit être bien entendu que, sous le nom de colorant spécifique des corps gras, on comprend seulement des matières colorées n'ayant aucun pouvoir tinctorial vrai, telles que le Soudan ou le Scharlach. De nombreux colorants, surtout basiques, outre leur pouvoir tinctorial envers les fibres textiles ou les éléments tissulaires, peuvent colorer les corps gras (colorants liposolubles : rouge neutre, violet de gentiane, bleu de méthylène, etc.). Ces colorants ne peuvent pas être rangés dans la catégorie des colorants dits spécifiques des lipides.

Les colorants spécifiques des lipides les plus connus sont le Soudan III (DADDI) et le Scharlach (MICHAELIS), mais les meilleurs sont incontestablement le Noir soudane B, le Rouge soudane B (*I. G. Farbenindustrie*) et le Bleu B.Z.L. (CIBA), récemment introduits dans la technique histologique par LISON. Ces colorants, et surtout le premier d'entre eux, présentent sur les colorants classiques l'avantage d'une coloration bien

plus prononcée et d'une affinité bien plus considérable pour les corps gras. Cette affinité est tellement grande que le Noir soudane B permet de colorer intensément la myéline en noir bleuté, fournissant des préparations équivalentes à celles que l'on pourrait obtenir par la méthode de WEIGERT, alors que les colorants classiques, qui ne présentent pour elle qu'une affinité réduite, ne peuvent guère lui communiquer qu'une coloration pâle et peu visible (LISON et DAGNELIE).

Les indications techniques concernant le Scharlach et le Soudan III sont trop connues pour qu'on doive les rappeler ici. Voici celles qui ont été proposées par LISON pour les nouveaux colorants.

A. Bleu B.Z.L. : 1<sup>o</sup> préparer une solution saturée à chaud de bleu B.Z.L. dans l'alcool à 50°; filtrer avant l'emploi; 2<sup>o</sup> colorer les coupes, venant de l'eau, 15 minutes à 24 heures, suivant l'affinité des graisses pour le colorant (en flacon fermé); 3<sup>o</sup> rincer à l'eau distillée; 4<sup>o</sup> colorer les noyaux par le carmin aluné, le carmalun ou la safranine; 5<sup>o</sup> monter au sirop d'Apathy.

B. Rouge Soudane B (3) : 1<sup>o</sup> préparer à chaud une solution saturée de colorant dans l'alcool à 70°; filtrer avant l'emploi; 2<sup>o</sup> avant coloration passer les coupes 30 secondes dans l'alcool à 70°; 3<sup>o</sup> colorer 10 minutes à 2 heures (en flacon fermé); 4<sup>o</sup> rincer 30 secondes à l'alcool à 70°; 5<sup>o</sup> rincer à l'eau; 6<sup>o</sup> coloration nucléaire par l'hémalum; 7<sup>o</sup> monter au sirop d'Apathy.

C. Noir Soudane B : même technique, mais coloration nucléaire au carmin aluné ou la safranine.

On trouve, dans certains auteurs, l'assertion que les glycérides se colorent en rouge par le Soudan, les cholestérides en rose orangé et que les « lipoides phosphorés » se colorent à peine. Cette affirmation, purement gratuite, est contredite par toutes les recherches effectuées *in vitro* (MICHAELIS, KAUFFMANN et LEHMANN, et d'autres). Les différences d'affinité des lipides cellulaires doivent être rapportées, non à des différences dans leur composition chimique, mais à des facteurs purement physiques (différences de point de fusion, liaison avec des éléments cellulaires, température où s'effectue la coloration). En effet, toutes conditions physiques étant égales, on ne constate guère *in vitro* de différences entre le comportement des lipides quels qu'ils soient (1).

---

(1) Le noir Soudane B permet cependant de distinguer entre les corps gras normaux des tissus et des hydrocarbures qui y sont présents à l'état pathologique (« vasinomes »). Les premiers se colorent en noir bleuté, la vaseline, la paraffine liquide en violet (P. GÉRARD, *Bull. Hist.*, 12, 1935, p. 92).

Outre les colorants déjà cités plus haut, un grand nombre peuvent être utilisés qui présentent des propriétés très analogues. Leur emploi n'offre aucun avantage. Tels sont, par exemple, la chlorophylle, l'alcanna, la cyanine, le bleu d'indophénol, les carotines (extraites de la carotte, du « poivre espagnol » ou du Capsicum), etc., proposés par différents auteurs.

L'emploi des colorants spécifiques constitue la méthode fondamentale de recherche des corps gras en Histo chimie, celle que l'on emploiera toujours lorsque l'on désire prouver la nature lipidique d'une substance. En Histo chimie, la colorabilité par ces colorants spécifiques est un fait plus significatif que les caractères de solubilité, qui, en Biochimie, définissent le groupe. L'histo chimiste peut donc poser la définition suivante : est un lipide tout élément tissulaire figuré colorable par les colorants spécifiques des corps gras.

### 3. Réduction du tétroxyde d'osmium.

Dans la pratique histologique, l'acide osmique est souvent utilisé pour la mise en évidence des corps gras. Au point de vue morphologique, c'est une réaction précieuse, mais en Histo chimie elle n'a rigoureusement aucune valeur, quoi qu'on en ait dit.

Qu'elle ne soit pas spécifique des corps gras, c'est là un fait connu depuis très longtemps (SCHULTZE et RUDNEFF 1865) et sur lequel il est inutile d'insister; beaucoup d'autres substances sont osmioréductrices.

On notera d'ailleurs que les conditions d'action de l'acide osmique influent beaucoup sur le résultat. Lorsqu'on fait agir une solution pure d'acide osmique sur un tissu, il se réduit plus ou moins sur tous les éléments tissulaires; ce n'est que si l'acide osmique est additionné d'un oxydant (acide chromique, bichromate) que la réduction se produit de façon plus ou moins spécifique. Encore cette addition de bichromate produit-elle des résultats bizarres; la myéline noircit par l'acide osmique pur (RANVIER), mais pas par un mélange acide osmique-bichromate (WLASSAK, MARCHI). Le cholestérol fait exactement le contraire (ESCHER).

On doit accorder d'autant moins de valeur histo chimique au noircissement des lipides par l'acide osmique que son mécanisme est mal connu, parce que plus complexe qu'on ne le croit souvent.

Au moment où la pièce est traitée par l'acide osmique, il se produit un noircissement de certains corps gras; ce « noircissement primaire » est attribué de façon presque unanime aux groupements non saturés — C = C —

présents dans les radicaux gras de la série des oléfines (ALTMANN), et tout particulièrement au radical oléique. Mais lorsqu'on passe une pièce ainsi osmiée dans l'alcool, on observe un noircissement « secondaire » d'autres corps gras (STARKE).

On ne sait pas de façon certaine ce qui se passe lors de ce noircissement secondaire, ni au niveau de quel corps gras il se produit. Pour détails sur cette discussion voir STARKE, MICHAELIS, HANDWERK. Tout au plus sait-on que la lécithine, qui ne donne pas de noircissement primaire, donne régulièrement une teinte noire franche après passage à l'alcool (WLASSAK, MULON, LOISEL, BOUIN, BONNAMOUR et POLICARD, et d'autres), mais cependant ne donne plus ce noircissement secondaire après traitement au bichromate (WLASSAK); c'est au fond le principe de la méthode de MARCHI. BERG attribue le noircissement secondaire à une dissolution ou une absorption de  $OsO_4$  par le corps gras et réduction ultérieure par l'action de l'alcool (l'alcool réduit facilement  $OsO_4$ ).

Le noircissement par l'acide osmique n'est pas caractéristique des corps gras; il n'est même pas donné par tous les corps gras. Ceux qui ont un caractère saturé ne le donnent pas, et même aussi quelques-uns à caractère non saturé : l'oléate de soude (FAVRE et ANDRÉ); l'acide oléique, dans certaines conditions (ROSSI).

On sait que les différents corps gras se colorent de façon différente par l'acide osmique : les uns sont d'un noir franc, les autres bistres ou jaunâtres. Les classiques considèrent les graisses noires comme des glycérides et les graisses bistres comme des cholestérides ou des lipines. Rien à l'heure actuelle ne permet de vérifier cette assertion. Pour MULON, ce serait la richesse en oléine qui serait en cause; cette opinion est rendue incertaine par l'existence du noircissement secondaire. En réalité, on ne peut *rien* déduire de l'intensité plus ou moins grande du noircissement par l'acide osmique. Le moins qu'on puisse dire, c'est que la question est à reprendre.

En résumé, le noircissement des corps gras par l'acide osmique est une réaction tout au plus bonne pour une étude morphologique. En Histochemie, elle est sans valeur; elle ne peut permettre ni d'affirmer la présence ou l'absence d'un corps gras en général, ni encore moins de distinguer histochimiquement les différents corps gras l'un de l'autre.

### III. — RÉACTIONS SPÉCIALES DES DIVERS LIPIDES.

#### 1. Caractères optiques en lumière polarisée.

A. *Glycérides et acides gras*. — L'opinion classique veut que les glycérides soient isotropes et qu'ils ne s'illuminent donc pas entre nicols croisés.

Quant aux acides gras, ils se présenteraient sous forme de cristaux aciculés, biréfringents.

Cela est exact, mais en partie seulement.

Les glycérides examinés à l'état *frais*, sur l'animal vivant, apparaissent sous la forme de gouttelettes; à ce moment, elles sont à l'état liquide et sont donc monoréfringentes. Mais lorsque leur point de congélation est atteint, les glycérides peuvent fort bien cristalliser et devenir donc biréfringents. Nous disons *peuvent*, parce que le phénomène est fréquent, mais non constant : il peut ne pas se produire, peut-être à cause de phénomènes de surfusion. L'aspect le plus commun de la cristallisation des glycérides a été souvent décrit (HOLTHUSEN, KRAUSE, ARDNT, VERSÉ, etc.) : une gouttelette monoréfringente renferme des cristaux biréfringents ou est entourée de houppes cristallines biréfringentes. Ces formations cristallines ont été le plus souvent prises pour des cristaux d'acides gras provenant de l'hydrolyse des glycérides. Rien n'est moins certain. VERSÉ, dans des expériences *in vitro* comme *in situ*, a pu montrer que des mélanges de glycérides refroidis ou abandonnés à eux-mêmes à basse température produisaient exactement les mêmes apparences : la tripalmitine et la tristéarine cristallisent au sein de gouttelettes de trioléine incristallisable.

Quant aux acides gras, ils ne doivent pas être nécessairement cristallisés. Ils peuvent tout aussi bien exister à l'état amorphe, liquide ou surfondu et dans ces cas — qui sont fréquents — ils seront évidemment monoréfringents (= obscurs entre nicols croisés).

Il faut donc conclure ainsi : les glycérides et les acides gras, examinés à l'état frais, chez l'animal vivant, ne sont *jamais* biréfringents, parce qu'ils sont à l'état fondu. Lorsque les pièces sont refroidies (coupes par congélation) ou conservées (dans des fixateurs-formol) des glycérides et des acides gras peuvent se congeler, passer à l'état cristallin et apparaître alors biréfringents. C'est une grosse erreur que d'admettre, comme on le fait souvent, que les cristaux qui se produisent dans ces conditions ne sont que des acides gras.

B. *Cholestérol et cholestérides*. — Le cholestérol chez les êtres vivants se présente sous la forme de plaques rhombiques biréfringentes; il n'est pas fréquent à l'état libre, sauf dans la bile et au cours de certains états pathologiques.

Les cholestérides présentent des caractères optiques extrêmement particuliers.

L'opinion classique veut qu'ils apparaissent sous forme de gouttelettes illuminées entre nicols croisés et présentant une croix noire de polarisation. Encore une fois, cette idée n'est exacte qu'en partie.

A l'état liquide, entre certaines limites de température, ils présentent des propriétés cristallines et constituent des cristaux liquides au sens de LEHMANN. Sous cet état, ils ont toutes les propriétés optiques d'un sphérocrystal : ils apparaissent donc bien, sous nicols croisés, comme des gouttelettes éclairées, avec une croix noire correspondant aux plans de polarisation des nicols, comme le veut la description classique.

Mais il n'en est pas nécessairement ainsi. Ce n'est que dans des conditions bien déterminées, entre le point de fusion et une température nommée *point d'éclaircissement*, que ces sphérocristaux liquides peuvent se constituer. A une température plus basse que le point de fusion, les cholestérides cristallisent en cristaux aciculés exactement semblables à ceux des acides gras ou des glycérides (en lumière polarisée ils présentent pour une rotation complète de la platine du microscope quatre positions d'illumination et quatre positions d'extinction; pas de croix de polarisation). A une température plus élevée que le point d'éclaircissement, le caractère cristallin des gouttelettes liquides se perd et la gouttelette devient isotrope, apparaissant obscure entre nicols croisés, et en tout semblable à des gouttelettes grasses quelconques. D'autres influences d'ailleurs favorisent la production de l'une ou de l'autre de ces trois formes possibles des cholestérides. Le tableau de la page suivante résume l'ensemble de ces transformations.

Ces transformations peuvent très bien se réaliser sur des coupes; elles sont réversibles et peuvent donc être répétées. A la température du laboratoire, on se trouve presque toujours entre le point de fusion et le point d'éclaircissement. Pour obtenir la cristallisation, un refroidissement énergique est quelquefois nécessaire. Quelques remarques encore. La fixation au formol produit très souvent la cristallisation des cholestérides même à la température ordinaire. Dans les préparations montées au lévulose, la cristallisation se produit souvent instantanément; dans les préparations



montées à la glycérine, c'est beaucoup plus rare. Les cholestérides osmiés ne sont plus biréfringents; la coloration au Soudan III, au Scharbach, au bleu de Nil diminue l'anisotropie des cristaux liquides jusqu'à la supprimer, mais non pas l'anisotropie des cristaux solides.

*Gouttelettes isotropes.*

Par refroidissement au-dessous du point d'éclaircissement (surfusion possible).	Par montage au sirop de lévulose.	Par chauffage au-dessus du point d'éclaircissement.
		Par traitement à OsO <sup>4</sup> ou coloration au Soudan, Scharlach, au bleu de Nil.

*Sphérocristaux*  
(liquides).

Par refroidissement au-dessous du point de fusion (surfusion possible et assez fréquente).	Par montage au sirop de lévulose.	Par action prolongée du formol.	Par chauffage au-dessus du point de fusion.
--	-----------------------------------	---------------------------------	---

*Cristaux vrais*  
(solides).

Chez l'animal vivant, les cholestérides se présentent assez souvent à l'état de gouttelettes isotropes. Le passage à l'état de sphérocristaux liquides peut s'effectuer spontanément lors de la fixation, mais peut nécessiter aussi d'autres interventions. L'absence de biréfringence ne prouve donc pas l'absence de cholestérides.

C. *Lipines*. — Depuis longtemps, on sait que les lipines peuvent se présenter sous forme de gouttelettes biréfringentes, présentant en lumière polarisée la croix de polarisation (DASTRE et MORAT). Ce phénomène a été rattaché par LEHMANN à leur propriété de former des cristaux liquides; les lipines se comportent donc en cela comme les esters du cholestérol, et l'on pourrait répéter tout ce qui a été dit à propos de ceux-ci; comme eux, elles peuvent exister à l'état de gouttelettes liquides isotropes et plus rarement, il est vrai, à l'état de cristaux solides aciculés.

Il a été prétendu cependant que les lipines ne donnent des sphérocristaux liquides que lorsqu'elles sont mélangées de cholestérides (ABRAMI, ASCHOFF, SCHMIDT). Ce point de vue ne paraît pas devoir être retenu,

car les échantillons les plus purs de lipines qui ont été préparés ont pu être vus à l'état de sphérocristaux (lécithine : LEHMANN; phrénosine et kérasine : ROSENHEIM).

Résumons : l'examen en lumière polarisée, à lui seul, ne peut donner que des renseignements très ambigus concernant la nature chimique d'un lipide. Trois cas peuvent se présenter :

1<sup>o</sup> Les corps gras ne s'illuminent pas entre nicols croisés.

Aucune conclusion possible : il peut s'agir de n'importe quel corps gras : les glycérides et les acides gras à l'état fondu ne sont en effet jamais biréfringents; les cholestérides et les lipines peuvent l'être, mais ne le sont pas toujours, soit que l'on se trouve au-dessus du point d'éclaircissement, soit qu'une condition physique quelconque inhibe la formation de cristaux liquides.

2<sup>o</sup> Les corps gras s'illuminent mais sans donner lieu au phénomène de la croix de polarisation; dans ce cas, il s'agit de cristaux vrais, solides; par rotation de 360° de la platine du microscope, ces cristaux présentent quatre positions d'extinction.

Aucune conclusion possible : *tous* les corps gras, quels qu'ils soient, glycérides, acides gras, cholestérides, lipines, peuvent exister sous cet état.

3<sup>o</sup> Les corps gras s'illuminent, en présentant une croix de polarisation.

La seule conclusion est bien qu'il ne s'agit, ni d'un glycéride, ni d'un acide gras; ceux-ci n'existent en effet jamais sous forme de sphérocristaux. On a donc affaire à un cholestéride ou à une lipine, la distinction entre ces deux classes de corps étant impossible.

Dans les cas 1 et 2, on peut essayer de provoquer le passage du corps gras à l'état de cristal liquide : dans le cas 1, en refroidissant ou en montant dans le sirop de lévulose; dans le cas 2, en chauffant légèrement. Si l'on réussit à obtenir des sphérocristaux, on peut éliminer les glycérides et les acides gras; si l'on n'y réussit pas, il y a présomption, mais non certitude, d'existence de glycéride ou d'acide gras.

## 2. Réactions dites spécifiques utilisant des matières colorantes.

### A. Réaction de Lorrain SMITH au bleu de Nil.

*Technique.* — 1<sup>o</sup> Fixer au formol, couper par congélation; ou bien utiliser des coupes de tissus frais; 2<sup>o</sup> colorer 10 à 20 minutes dans une solution concentrée de sulfate de

bleu de Nil; 3<sup>o</sup> laver rapidement; 4<sup>o</sup> différencier dans l'eau acétique à 1 pour 100 jusqu'à teinte uniforme; 5<sup>o</sup> rincer; 6<sup>o</sup> monter à la glycérine ou à la glycérine gélatinée.

D'après Lorrain SMITH, les graisses neutres (glycérides) sont colorées en rouge, les acides gras en bleu. Les noyaux et les fibres élastiques sont également bleu foncé; les cytoplasmes sont bleu pâle.

Le mécanisme de cette réaction serait le suivant, d'après l'opinion la plus courante (EISENBERG, FAURÉ-FREMIET, DIETRICH, etc.) (1).

Les solutions de sulfate de bleu de Nil sont assez fortement hydrolysées; à côté du sel qui est bleu existe la base libre du bleu de Nil, de couleur rouge. La base rouge se dissoudrait exclusivement au niveau des glycérides, tandis que le sel bleu se combinerait exclusivement aux acides gras (pour donner les savons du bleu de Nil). Dans le cas de mélanges, on aura, bien entendu, toutes les teintes intermédiaires entre le rouge et le bleu. D'après L. SMITH, l'emploi du sulfate de bleu de Nil permettrait donc de distinguer les glycérides des acides gras; les autres lipides seraient incolores.

Les assertions de Lorrain SMITH n'ont pas été vérifiées. BÆMINGHAUS avait cru pouvoir conclure d'études *in vitro* effectuées sur des lipides purs que le bleu de Nil est un réactif de l'acide oléique et de ses esters. L'acide oléique se colorerait en bleu, ses esters en rose, tous les autres corps gras restant incolores.

KAUFFMANN et LEHMANN ont repris la question en étudiant cette fois des mélanges de lipides. Leur conclusion est pessimiste : la méthode de L. SMITH n'a aucune valeur. Cependant, en examinant les protocoles de KAUFFMANN et LEHMANN, on observe que chaque fois qu'un mélange de corps gras se colore en rose, il renferme de la trioléine (ou un triglycéride non saturé). Mais l'inverse est loin d'être vrai : beaucoup de mélanges riches en acide oléique ou en trioléine, ou bien ne se colorent pas, ou bien se colorent en bleu.

Quant à la coloration bleue qui, dans l'idée classique, devrait être caractéristique des acides gras, elle n'a aucune signification. Beaucoup de mélanges renfermant des acides gras libres ne se sont pas colorés (31 cas observés); la non-coloration est la règle quand il s'agit d'acides gras saturés. D'autre

---

(1) Cette théorie n'est pas exacte. Des faits encore inédits nous ont convaincu que le composant rouge extractible des solutions de bleu de Nil n'est pas la base libre de celui-ci, mais une impureté provenant de l'oxydation du bleu.

part, des mélanges ne renfermant pas d'acides gras du tout se sont colorés en bleu (7 cas observés).

De tout cela, on peut, nous semble-t-il, conclure comme suit : une coloration rose par le bleu de Nil signifie présence d'un glycéride non saturé (trioléine); une coloration bleue n'a aucune signification; un résultat négatif n'a aucune signification.

Noter qu'une coloration bleue par le bleu de Nil ne signifie pas présence d'un corps gras : le bleu de Nil, colorant basique, colore beaucoup d'éléments cellulaires banaux.

B. *Méthode de FISCHLER*. — BENDA avait montré l'affinité des acides gras pour les métaux lourds. Avec l'acétate de cuivre, ils donnent des sels de cuivre (oléate, stéarate, palmitate de Cu) verts. Pour rendre ceux-ci plus visibles, FISCHLER met secondairement le cuivre en évidence par l'action de l'hématoxyline : il se forme la laque de cuivre de l'hématoxyline, de coloration bleu noir intense.

*Technique*. — 1<sup>o</sup> Fixer au formol; couper par congélation; 2<sup>o</sup> les coupes sont traitées 24 heures à 37<sup>o</sup> par une solution concentrée d'acétate de cuivre; 3<sup>o</sup> laver soigneusement à l'eau distillée plusieurs fois renouvelée; 4<sup>o</sup> 20 minutes dans l'hématoxyline de WEIGERT : solution *a*, hématoxyline, 1<sup>cc</sup> + alcool absolu, 10<sup>cc</sup>; solution *b*, solution concentrée de carbonate de lithine, 1<sup>cm<sup>3</sup></sup> + eau distillée, 90<sup>cm<sup>3</sup></sup>. Quelques jours avant l'emploi, mélanger *a* et *b*; 5<sup>o</sup> rincer; 6<sup>o</sup> différencier dans ferricyanure de K, 2<sup>cc</sup>,5 + borax, 2<sup>cc</sup> + eau distillée, 100<sup>cm<sup>3</sup></sup>; 7<sup>o</sup> laver à fond à l'eau distillée; 8<sup>o</sup> monter à la glycérine, ou à la glycérine gélatine; on peut arriver à monter au baume, en opérant vite.

FISCHLER croyait sa méthode caractéristique des acides gras libres ou des savons, à l'exclusion de leurs esters glycériques ou cholestériques et des lipines. Cette opinion a été acceptée généralement et classiquement, la méthode de FISCHLER sert à distinguer les acides gras de leurs esters.

En réalité, la spécificité de la méthode de FISCHLER est nulle.

Tout d'abord, la méthode n'est pas spécifique des corps gras : se colorent également les composés calciques et ferrugineux (cf. Histochemie de Ca et de Fe), plus certains éléments tissulaires, granulations des éosinophiles, mastocytes, etc. La méthode de FISCHLER ne peut donc servir de méthode de détection des corps gras en général.

D'autre part, l'expérience démontre qu'elle n'est pas le moins du monde spécifique des acides gras libres.

KAUFFMANN et LEHMANN ont trouvé le Fischler négatif dans des mélanges

renfermant des acides gras libres (5 cas observés) et positif dans des nombreux mélanges n'en renfermant point (15 cas observés). Ils font valoir très justement que l'acétate de cuivre peut non seulement donner avec les acides gras des savons de cuivre, mais former également des sels complexes avec des mélanges de graisses convenables (composés d'adsorption?) et, par hydrolyse, libérer de l'acétate basique de cuivre adsorbable par des corps gras.

La méthode de FISCHLER n'a donc aucune valeur histochimique et est tout juste bonne pour une distinction d'ordre purement morphologique.

C. *Méthode de SMITH-DIETRICH pour les « lipoides »*. — Cette méthode consiste à traiter les corps gras par une solution de bichromate de K. Les lipines (« lipoides ») s'oxydent facilement en s'unissant au chrome du bichromate, d'une façon d'ailleurs encore assez obscure. Le chrome est secondairement en évidence par la formation de sa laque d'hématoxyline.

*Technique.* — 1° Fixer au formol; couper par congélation; 2° les coupes sont traitées 1 à 2 jours à 37° par une solution de bichromate de K à 5 pour 100; 3° laver à fond à l'eau distillée; 4° colorer 4 à 5 heures à 37° dans l'hématoxyline de KULTSCHITZKY : solution mère d'hématoxyline à 10 pour 100 dans l'alcool absolu (mûrie au moins six mois), 10<sup>cm<sup>3</sup></sup> + acide acétique à 2 pour 100, 90<sup>cm<sup>3</sup></sup>; 5° laver; 6° différencier une nuit dans le mélange borax-ferricyanure de WEIGERT : borax, 2<sup>κ</sup> + ferricyanure de K, 2<sup>κ</sup>, 5 + H<sup>2</sup>O, 100<sup>cm<sup>3</sup></sup>; 7° laver soigneusement; 8° monter au sirop de lévulose ou au sirop d'Apathy. On peut effectuer une coloration nucléaire au carmin aluné ou à la safranine. Résultat : « lipoides » en bleu foncé; le reste incolore.

Sur la question de la spécificité de cette réaction, il n'existe que relativement peu de divergences. ESCHER la trouve spécifique pour les lipines, à condition de ne prendre en considération qu'une teinte noire franche; une teinte grisâtre est donnée par un grand nombre de corps gras, saturés ou non et n'a aucune valeur.

KAUFFMANN et LEHMANN confirment les résultats d'ESCHER et considèrent en outre comme peu convenable la température de 37° généralement adoptée pour le traitement au bichromate : à cette température on obtient beaucoup de résultats négatifs. C'est à 60° qu'il faut opérer.

Dans leurs recherches, les mélanges ne renfermant pas de lipines n'ont jamais donné de résultats positifs, sauf cependant deux mélanges de cholestérides non saturés. A part ces deux dernières exceptions, la réaction apparaît donc comme spécifique des lipines. Un résultat négatif ne signifie

pas absence de lipine, car fréquemment des mélanges qui en renferment ne donnent pas de réaction (20 cas observés).

En résumé, un résultat positif semble caractéristique d'une lipine, à condition que l'on puisse exclure la présence de cholestérides (cf. KAUFFMANN-LEHMANN) ou du cholestérol (cf. KAWAMURA). Si l'on ne peut exclure la présence de ces corps, il reste un léger doute. Un résultat négatif ne permet aucune conclusion.

D. *Méthode de CIACCIO pour les « lipoides »*. — Principe : un traitement des pièces par une solution de bichromate rend les « lipoides » insolubles dans les solvants ordinaires des graisses. Ils gardent cependant leur affinité pour le Soudan; sur coupes à la paraffine, on pourra donc les mettre en évidence par le Soudan, alors que tous les autres lipides auront disparu.

CIACCIO comprend sous le nom de lipoides les phospholipides saturés et non saturés (par exemple lécithine, céphaline, myéline, sphingomyéline) et les mixtures de cholestérol ou de cholestérides avec l'acide oléique.

*Technique.* — 1° Fixer de petits fragments 2 jours dans : bichromate de K à 5 pour 100, 80 + formol, 20 + acide acétique, 5<sup>cm<sup>3</sup></sup> (l'acide acétique peut être remplacé par : acide formique, 4 à 5 gouttes); 2° postchromer 5 à 8 jours dans le bichromate de K à 3 pour 100; 3° laver 24 heures à l'eau courante; 4° alcools croissants, 24 heures; alcool absolu, 2 heures; 5° inclusion à la paraffine en respectant les temps ci-dessous : sulfure de carbone ou xylol, 1 heure; xylol paraffine à 60°, 1 heure; paraffine pure, 1 heure à 1 heure et demie; 6° les coupes déparaffinées sont conduites dans l'alcool à 70°; 7° colorer 30 minutes à 1 heure à 30° dans : alcool à 80, 95<sup>cm<sup>3</sup></sup> + acétone, 5<sup>cm<sup>3</sup></sup> + Soudan III à saturation (solution préparée à 50°, puis refroidie et filtrée); 8° rincer à l'alcool à 50°; 9° laver à l'eau; coloration nucléaire à l'hémalun facultative; 10° monter au sirop d'Apathy. Résultat : « lipoides » jaune orange et le reste incolore.

D'après notre expérience, il est avantageux de remplacer le Soudan III par le noir Soudane B; dans ce cas, coloration nucléaire au carmalum ou à la safranine. Les corps gras, colorés en noir bleuâtre, sont bien plus visibles.

Pour CIACCIO, la chromisation limitée à une semaine insolubilise les « lipoides » à l'exclusion de tous les autres corps gras. La rapidité avec laquelle se produit l'insolubilisation est d'ailleurs variable suivant la nature du lipide considéré. Ainsi les phosphatides non saturés sont insolubilisés par une chromisation de 1-2 jours; les mélanges de phosphatides non saturés et de cholestérol ou de cholestérides sont insolubilisés en 2-4 jours; les phosphatides saturés en 5 jours; les mélanges de

cholestérol et d'acide oléique en 7 jours; les glycérides et les acides gras ne sont pas insolubilisés, même après 8 jours de chromisation.

KAUFFMANN et LEHMANN, dans des travaux très poussés au point de vue histochimique et au point de vue chimique pur, se sont élevés avec beaucoup de vigueur contre cette manière de voir. Sont CIACCIO-positives *toutes* les graisses à caractère non saturé : l'acide oléique et tous ses dérivés, trioléine, esters oléiques du cholestérol, lécithine, etc.; sont CIACCIO-négatifs tous les corps gras saturés : acides stéarique et palmitique, leurs esters glycériques et cholestériques. La réaction de CIACCIO n'est pas caractéristique des lipoides; c'est en réalité une réaction de corps non saturés.

CIACCIO cependant ne s'est pas déclaré convaincu par les expériences de KAUFFMANN et LEHMANN et maintient que l'oléine et les acides gras non saturés, après chromisation, sont extraits intégralement, même mélangés à des phosphatides; seuls, ceux-ci sont insolubilisés.

Pour notre part, nous nous avouons fortement impressionné par les arguments de KAUFFMANN et LEHMANN et, en attendant confirmation des résultats actuellement obtenus, nous ne pouvons que recommander la plus grande prudence dans l'interprétation de la réaction de CIACCIO : rien n'est moins certain qu'elle soit spécifique des « lipoides ».

E. *Méthode II de CIACCIO pour les phospho- et galactolipines.* — Tout récemment, CIACCIO vient de proposer une nouvelle méthode dans le but de détecter histochimiquement les lipides acétono-insolubles, c'est-à-dire les phospho- et galactolipines. Cette méthode diffère assez profondément de la méthode précédente; aussi l'appellerons-nous méthode de CIACCIO n° II. Elle consiste essentiellement à pratiquer sur les pièces une extraction acétonique, puis à pratiquer une coloration de corps gras. Seules les lipines ont résisté à l'extraction; seules, donc, elles apparaîtront colorées dans les préparations.

KUTSCHERA-AICHBERGEN, SHAPIRO avaient déjà eu l'idée de différencier les lipines des autres corps gras en se basant sur leur insolubilité dans l'acétone; mais sur des pièces ou des coupes traitées par l'acétone, il leur fut impossible de mettre aucun corps gras en évidence par quelque méthode que ce fût. D'où ils avaient conclu à l'impossibilité de détecter histochimiquement les lipines en général. CIACCIO montra que leur échec était dû à deux faits : tout d'abord que les phospholipines ne sont pas

intégralement insolubles dans l'acétone, tout particulièrement quand elles sont associées à d'autres lipides ou à du cholestérol; ensuite, que les lipines sont facilement émulsionnables et passent en solution colloïdale dans l'eau ou les solutions salines. On peut obvier à cet inconvénient en pratiquant l'extraction des lipides acétonosolubles, non par de l'acétone pure, mais par de l'acétone additionnée de sels de cadmium (1).

*Technique.* — 1<sup>o</sup> Fixation des pièces dans le formol salé de POLICARD ou, mieux, dans : formol (pur ou dilué à moitié), 50<sup>cm<sup>3</sup></sup> + acétone, 50<sup>cm<sup>3</sup></sup> + chlorure de sodium, 0<sup>gr<sup>ms</sup></sup>, 9; 2<sup>o</sup> après 24 heures de fixation, passages successifs d'une durée d'une heure chaque fois, dans des solutions acétoniques de concentration croissante : A, acétone, 70 + solution à 10 pour 100 de nitrate de cadmium, 10<sup>cm<sup>3</sup></sup> + eau, 20<sup>cm<sup>3</sup></sup>; B, acétone, 80 + solution à 10 pour 100 de nitrate de cadmium, 10<sup>cm<sup>3</sup></sup> + eau, 10<sup>cm<sup>3</sup></sup>; C, acétone, 90 + solution à 10 pour 100 de nitrate de cadmium, 10<sup>cm<sup>3</sup></sup>; 3<sup>o</sup> passages successifs dans deux ou trois bains d'acétone additionnée de 2 pour 100 d'une solution saturée de nitrate de cadmium dans l'alcool absolu; durée totale des passages : 24 ou 48 heures; le dernier passage peut s'effectuer à la température de 37°. Après ce traitement, passages successifs dans des solutions hydro-acétoniques de concentration décroissante (90, 80, 70, 60, 50 pour 100) additionnées d'une solution de nitrate de cadmium à 10 pour 100, de telle sorte que la concentration finale de ce sel soit de 1 pour 100; 4<sup>o</sup> passage pendant quelques heures dans : acétone + bichromate de K à 5 pour 100; 5<sup>o</sup> diluer ensuite progressivement ce mélange, dans lequel les pièces sont plongées, par une solution de bichromate de K à 5 pour 100, puis passer finalement pendant 2 ou 3 jours à 37° dans le bichromate à 5 pour 100; 6<sup>o</sup> laver 12 à 24 heures dans l'eau courante. Couper, soit par congélation, soit après inclusion à la paraffine [effectuée de préférence de la façon suivante : série de solutions acétoniques de concentration croissante; acétone; acétone + éther de pétrole (de point d'ébullition 30-50°); éther de pétrole; éther de pétrole + paraffine à 37°, paraffine]; 7<sup>o</sup> les coupes sont colorées 2 à 3 heures par le Soudan III (il nous semble que le noir Soudane donnerait de meilleurs résultats à cause de son grand pouvoir colorant), puis après différenciation par l'alcool à 50°, par l'hémalum. Ou bien, on colore les coupes par le procédé de SMITH-DIETRICH (voir plus haut).

En suivant cette technique, CIACCIO dit obtenir une insolubilisation complète, ou à peu près, des phospho et galactolipines des tissus, pendant

---

(1) C'est là une idée que STÜLER avait déjà exploitée pour mettre au point une méthode également destinée à mettre en évidence les phospholipines. Après insolubilisation de ceux-ci par l'action d'acétone additionnée de sels de cadmium, STÜLER pratiquait une inclusion à la celloïdine. Sur les coupes, il essayait de retrouver les corps gras; mais la technique qu'il employait dans ce but — mordantage au molybdate d'ammonium, suivi d'une coloration à l'hématoxyline — est si peu spécifique que sa méthode ne peut être citée que pour mémoire.



que tous les autres lipides sont dissous. Bien entendu, on doit tenir compte des quelques lipides qui sont totalement insolubles dans tous les solvants organiques, c'est-à-dire en ligne principale des chromolipoides. Si l'on veut éliminer leur présence, il est nécessaire d'exécuter des préparations de contrôle sur des pièces fixées directement par l'alcool absolu et incluses à la paraffine. Seuls les corps gras qui n'apparaîtront pas sur ces pièces de contrôle peuvent être considérés comme lipines; les autres sont des chromolipoides.

Cette nouvelle méthode de CIACCIO, pour autant que nous puissions en juger par un examen théorique, paraît rationnellement conçue et promet de très intéressants résultats. Nous espérons que les constatations expérimentales ultérieures viendront en confirmer la valeur.

F. *Réaction iodophile de ROMIEU pour les lécithines.* — ROMIEU a montré que les lécithines se colorent en brun acajou par l'iode ioduré; la coloration rappelle fortement la réaction de Cl. BERNARD pour le glycogène. En se débarrassant du glycogène par un traitement approprié, on arrive à ne colorer que les lécithines.

*Technique.* — 1° Fixer au formol; 2° déshydrater par l'acétone anhydre (les lécithines sont insolubles dans l'acétone); 3° inclure à la paraffine; couper; 4° déparaffiner les coupes en les traitant quelques heures à l'étuve par un bain d'acétone (flacon bouché); 5° passer par l'eau tiède (élimination de l'acétone et du glycogène); 6° recouvrir de HCl à 10 pour 100; chauffer jusqu'à l'émission des premières vapeurs; 7° sans laver, traiter quelques minutes par : iode, 6<sup>g</sup> + iodure de K, 8<sup>g</sup> + eau distillée, 150<sup>cm<sup>3</sup></sup>; 8° laver 2 secondes à l'eau distillée; 9° monter à la glycérine neutre.

Résultat : fond jaune très pile, parties riches en lécithine rouge acajou tournant au violet. Les préparations ne se conservent que quelques heures.

D'après ROMIEU, la réaction serait due à la formation d'iodocholine, se produisant surtout bien après une légère hydrolyse de la lécithine, et est donnée aussi bien par la lécithine libre que par la lécithine combinée. La distinction avec l'amyloïde se fait en utilisant l'acide sulfurique très étendu, qui, après traitement par l'iode, colore l'amyloïde en bleu violacé.

G. *Autres méthodes.* — Bien d'autres méthodes basées sur l'emploi de matières colorantes ont été proposées.

On peut les grouper en trois catégories. Les unes étudient l'action des colorants d'aniline basiques ou acides sur les lipides en vue de leur distinction histochimique. Dans cet ordre d'idées, signalons les études de SMITH, LOISEL, FAURÉ-FREMIET, MAYER et SCHAEFFER, ESCHER, etc. Les autres étudient l'action de mordants métalliques, secondairement mis en évidence par l'action d'un colorant à laque. Les dernières, enfin, ont trait aux colorations acido-résistantes et aux colorations du type de la méthode de GRAM;

elles ont fait par exemple l'objet de recherches de DEUSSEN, EISENBERG, GUERLET, MAYER et SCHAEFFER, GUTSTEIN, HATTINGER, REICHERT, STEARN, ALLEN et ESTHER, STOELTZNER.

Sur la valeur et les possibilités de telles méthodes, nous croyons qu'on peut conclure ainsi. Si on les applique à l'étude de substances *que l'on sait de façon certaine* être constituées par des lipides (action du Soudan, du Noir soudane, etc.), elles pourront probablement, dans l'avenir, rendre des services, et permettront peut-être de différencier histochimiquement les divers lipides les uns des autres. Mais dans l'état actuel de nos connaissances, elles ne sont guère utilisables, car l'étude de leur spécificité n'a été faite que sur des corps gras purs et non sur des mélanges de corps gras. Or, on sait, depuis KAUFFMANN et LEHMANN, combien les mélanges de lipides peuvent se comporter différemment de leurs composants pris isolément. De ce côté, on peut espérer acquérir des résultats définitifs, en se servant de la méthode expérimentale de KAUFFMANN et LEHMANN par exemple. Mais, d'autre part, ces réactions ont été souvent appliquées à des éléments dont on n'était pas sûr qu'ils étaient des lipides, dans le but précisément de démontrer leur nature lipidique. Ainsi, par exemple, on a constaté qu'après chromisation les mitochondries se colorent par l'hématoxyline ferrique; c'est le procédé de REGAUD; on en a conclu à la nature lipidique du chondriome. Ou bien, on a rapporté la coloration de BENDA des mitochondries à la présence dans leur substance d'un composé lipidique, parce que les acides gras, traités par cette méthode, se colorent de la même façon. De telles conclusions nous paraissent dépasser les résultats de l'expérience. Rien ne prouve à l'heure actuelle que ces méthodes de coloration sont *spécifiques* des lipides et ne peuvent être données par exemple par des protides ou d'autres substances. Assurément, elles peuvent donner des indications d'ordre général et orienter les recherches, mais il nous semble dangereux d'en tirer des conclusions définitives. Ainsi, dans le cas du chondriome, il faudrait démontrer sa nature lipidique par des réactions que l'on sait être spécifiques des lipides, par exemple la coloration au Soudan ou au Scharlach; or, comme on le sait, ce n'est que dans de rares cas que ces dernières réactions colorent le chondriome. Bien entendu, nous ne voulons pas affirmer l'absence d'un composant lipidique dans les mitochondries; nous disons simplement que les preuves de sa présence indubitable manquent dans la plupart des cas.

### 3. Réactions n'utilisant pas de matières colorantes :

A. Réactions dérivées de la réaction de LIEBERMANN-BURCHARDT. —

1. Méthode de A. SCHULTZE (1). — C'est une variante de la réaction bien connue de LIEBERMANN-BURCHARDT pour la mise en évidence du cholestérol et de ses esters.

1<sup>o</sup> Fixer au formol; couper par congélation; 2<sup>o</sup> exposer les coupes au moins 4 jours, plus en hiver, en pleine lumière, si possible au soleil; 3<sup>o</sup> monter la coupe sur porte-objet, l'essorer *soigneusement* au buvard; 4<sup>o</sup> couvrir la coupe de quelques gouttes d'acide acétique + d'acide sulfurique, àà (se conserve quelques semaines); 5<sup>o</sup> poser la lamelle; examiner dans le réactif. Résultat : cholestérol et ses esters colorés en bleu foncé ou rouge pourpre, virant ensuite au vert. Les préparations ne se conservent que quelques heures.

Dans cette réaction, l'exposition en pleine lumière est nécessaire pour transformer le cholestérol en oxycholestérol. L'action de la lumière peut être remplacée par un traitement de 1 à 2 jours à 37<sup>o</sup> dans une solution à 2,5 pour 100 d'alun de fer.

Nous préférons employer, au lieu du mélange acide acétique-acide sulfurique, le mélange anhydride acétique-acide sulfurique (àà) (indiqué par SCHULTZE dans son travail primitif), qui ne nécessite pas, d'après ce qu'on sait, la transformation du cholestérol en oxycholestérol et qui permet donc de sauter le temps 2 de la méthode définitive de SCHULTZE.

2. Méthode de ROMIEU. — ROMIEU fait agir l'acide sulfurique et l'anhydride acétique successivement et non simultanément.

1<sup>o</sup> Fixer au formol ou au BOUTIN sans acide acétique; 2<sup>o</sup> couper par congélation; monter a coupe sur lame; essorer; 3<sup>o</sup> couvrir la coupe d'une goutte d'acide sulfurique concentré, laisser agir 3 à 15 secondes; 4<sup>o</sup> arrêter l'action de l'acide sulfurique en ajoutant 2 à 3 gouttes d'anhydride acétique; laver avec quelques gouttes du même liquide; 5<sup>o</sup> mettre une lamelle; uter à la paraffine. Examiner immédiatement; la préparation ne se conserve pas.

Résultat : cholestérol et ses esters en violet lilas ou rouge pourpre tournant ensuite au vert.

Ces deux méthodes, applications de la réaction de LIEBERMANN, sont spécifiques du cholestérol et de ses esters. C'est un point qui ne prête guère à discussion (les objections de KIMMELSTIEL ont été abondamment réfutées par les travaux de SCHULTZE et LOHR, LAUX, KAUFFMANN et LEHMANN, etc.).

---

(1) On ne la confondra pas avec la réaction de R. SCHULTZE pour le cholestérol, qui s'effectue au moyen d'acide nitrique.

Il nous semble cependant opportun de mettre en garde contre une erreur d'interprétation : la couleur bleue, violette ou rouge du début de la réaction n'est pas absolument caractéristique; ce qui l'est, c'est son virage au vert au bout d'un certain temps. L'acide sulfurique, à lui seul, donne en effet des colorations bleues, violettes ou rouges avec des corps qui n'ont rien à voir avec le cholestérol; par exemple le carotène et les carotinoïdes donnent une couleur bleue, les galacto-lipines une couleur rouge pourpre.

Une réaction positive prouve la présence de cholestérol ou de ses esters, mais une réaction négative ne prouve pas définitivement son absence (SCHULTZE, KAUFFMANN et LEHMANN).

Au point de vue purement histologique, on notera que ces réactions sont assez brutales, à cause de l'emploi de réactifs énergiques; elles donnent cependant de très belles images, facilement lisibles.

Méthode de GOLODETZ et de STÖKER : Sur les coupes par congélation, ces auteurs ont fait agir un mélange de formol à 30 pour 100 (2 parties) et d'acide sulfurique (5 parties). En 1 à 2 minutes, le cholestérol se colore en brun rouge foncé. Nous citons cette méthode pour mémoire, car elle n'est pas spécifique : d'après BRUNSWICK, elle est donnée également par divers corps gras ne renfermant pas de cholestérol ou de ses dérivés. La couleur brune de la réaction peut être confondue d'ailleurs avec le charbonnement produit par l'action brutale de l'acide sulfurique.

*B. Réactions à la digitonine.* — WINDAUS a montré que le cholestérol libre donne, avec une solution alcoolique de digitonine, un complexe insoluble et bien cristallisé, insoluble dans l'eau, l'acétone, l'éther, très peu soluble dans l'alcool à 96° froid, mieux dans l'alcool bouillant, bien soluble dans l'acide acétique glacial et très soluble dans la pyridine.

BRUNSWICK a utilisé le premier cette réaction en Histo chimie. Il fait agir entre lame et lamelle une solution à 0,5 pour 100 de digitonine dans l'alcool 85° sur la coupe à examiner; en quelques instants, on voit apparaître des aiguilles de digitonine-cholestérol.

LEULIER et REVOL, après fixation au formol, réservent une partie de la pièce pour être coupée par congélation comme témoin, puis plongent la pièce 8 à 10 jours dans une solution de digitonine dans l'alcool à 45-50°. Couper par congélation, monter à la glycérine gélatinée.

Nous préférons opérer sur la coupe même et non sur la pièce : 1° immerger la coupe quelques heures dans une solution à 0,5 pour 100 de digitonine dans l'alcool à 50°; 2° rincer

à l'alcool à 50°; 3° rincer à l'eau, monter au sirop d'Apathy ou à la glycérine-gélatine.

Les coupes s'observent au microscope polarisant. Entre nicols croisés, on voit apparaître les aiguilles ou les rosettes du complexe cholestérol-digitonine. Pour différencier ce complexe des esters du cholestérol (également biréfringents, voir plus haut), LEULIER et REVOL conseillent de colorer au Soudan. Les esters du cholestérol sont colorés par le Soudan et leur biréfringence a disparu. Le complexe cholestérol-digitonine ne se colore pas et reste biréfringent.

Cette réaction est strictement spécifique pour le cholestérol et n'est pas donnée par ses esters. Par recouplement avec les réactions colorées précédentes, on peut donc différencier le cholestérol libre des cholestérides.

C. Réaction de CASANOVA. — Cette réaction, citée par CRÉTIN et par PARAT, est destinée à la mise en évidence des lécithines. Elle consiste à faire agir une solution d'acide sulfurique concentré renfermant du molybdate d'ammonium; les lécithines donnent naissance à une coloration rouge passant ensuite au bleu. Elle n'a rien de spécifique, car elle est due à la présence, dans la lécithine, du radical oléique. C'est donc, au fond, une réaction de corps gras non saturé et nous ne la citerons qu'à titre documentaire.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

Un index bibliographique plus complet se trouve dans LISON (L.), *Bull. Hist.*, 10, 1933, p. 238 et 292.

ABRAMI et ASCHOFF, *Proc. Roy. S.*, 78, 1906. — ARDNT, *Ziegler*, 72, 1924; *Z. wiss. M.*, 41, 1924, p. 481; *Verh. d. path. Ges.*, 20, 1925; *Zbl. Path.*, 35. — ASCHOFF (L.), *Ziegler*, 47, 1925. — BENDA, *Virch.*, 161, 1900. — BERG, *Osmiumsäure in Enz. mikr. Techn.*, III Aufl. — BOEMINGHAUS, *Ziegler*, 67, 1920, p. 534. — BRUNSWICK, *Z. wiss. M.*, 39, 1922, p. 316. — CIACCIO (C.), *Zbl. Path.*, 20, 1909, p. 385 et 771; *Virch.*, 199, 1910, p. 378; *A. Zellf.*, 5, 1910, p. 235; *Anat. Anz.*, 35, 1910, p. 17; *Ziegler*, 50, 1911, p. 317; *Zbl. Path.*, 24, 1913, p. 49; *Boll. Soc. Biol. sper.*, 1, 193 , p. 47; *Ass. Anat.*, 25, 1930; *Boll. Soc. Biol. sper.*, 6, 1931, p. 301; 9, 1934, p. 137. — CHRISTELLER, *Zbl. Path.*, 27, 1916. — DADDI, *A. ital. Biol.*, 26, 1896, p. 142. — DA ROCHA LIMA, *Verh. d. path. Ges.*, 15, 1922, p. 173. — DIETRICH, *Ibid.*, 7, 1910. — DOLFINI, *Pathologia*, 20, 1928; *Monit. zool. ital.*, 40, 1929; p. 362; *Bull. Hist.*, 6, 1929, p. 137. — EISENBERG, *Virch.*, 199, 1910. — FAURÉ-FREMIET (E.), *Anat. Anz.*, 26, 1910, p. 196; 40, 1911, p. 378. — FISCHLER, *Zbl. Path.*, 15, 1904, p. 913; *Ziegl. Festschrift Arnold*, 1904. — KAUFFMANN et LEHMANN, *Zbl. Path.*, 37, 1926, p. 145; *Virch.*, 260, 1930, p. 493. — KUTSCHERA-AICHBERGEN, *Virch.*, 256, 1926. — LEULIER et REVOL, *Bull. Hist.*, 3, 1926, p. 316. — LEULIER et NOEL, *Ibid.*, 7, 1930, p. 242. — MICHAELIS, *Virch.*, 164, 1901. — MILLOT et GIBERTON, *Biol.*, 97, 1927, p. 1674. — ROMIEU, *Biol.*, 92, 1925, p. 787; *Ass. Anat.*, 20, 1925, p. 345; *Biol.*, 96, 1927, p. 1232; *Acad.*, 184, 1927, p. 106. — SCHMIDT, *Die Bausteine des Tierkörpers im polarisierten Licht*, 1928 (Cohen, Bonn). — SMITH (L.), *Jl. Path.*, 11, 1906; 12, 13, 1907; 27, 1924, p. 115.

## IV. — TABLE DICHOTOMIQUE D'ANALYSE HISTOCHEMIQUE DES LIPIDES.

A la lumière des constatations expérimentales et des critiques qui viennent d'être développées, l'histochimie des corps gras apparaît suivant un jour très différent de ce qu'il est dans la doctrine classique. On a vu que beaucoup de réactions généralement considérées comme spécifiques n'ont qu'une valeur extrêmement faible. Il n'y a pas lieu de s'abandonner au pessimisme et de déclarer, comme certains l'ont fait (KUTSCHERA-AICHBERGEN, KAUFFMANN et LEHMANN), qu'il n'y a pas d'histochimie des lipides et que la seule méthode d'analyse est l'analyse macroscopique quantitative. Au contraire, nous pensons qu'il est possible, avec les méthodes actuelles, d'aborder le problème.

Une revision s'impose, c'est entendu, mais tout n'est pas sans signification dans les méthodes d'analyse des lipides. Certaines ont une valeur spécifique réelle.

Afin de concrétiser les données obtenues par notre critique des méthodes de détection des lipides, nous avons réuni en une table dichotomique les méthodes dont la valeur histochimique a été démontrée. Cette table exprime de façon synthétique toutes les possibilités de l'Histochimie actuelle dans ce domaine. Ces possibilités, comme on le verra, sont limitées. L'Histochimie ne peut encore permettre de distinguer entre elles que quelques catégories de lipides; les autres sont encore inaccessibles à la recherche rigoureuse. Arrivé à ce point, où l'on aboutit au diagnostic « lipide indéterminable avec exactitude par voie histochimique », on doit avouer franchement son impuissance, et ne considérer toutes les réactions que l'on pourrait effectuer ultérieurement que comme de l'analyse morphologique, d'une valeur incontestable certes, mais non plus comme de l'Histochimie.

La table est construite d'après le modèle des tables dichotomiques à double entrée. Elle a été conditionnée, non pas seulement pour servir à l'analyse de corps purs, mais à celle de mélanges, c'est-à-dire, somme toute, pour les conditions ordinaires de travail de l'Histologie. Dans le cas de mélanges, elle ne conduit qu'à un des constituants de ceux-ci. Comme l'identification des autres constituants n'est généralement pas possible avec certitude ou du moins ne l'est qu'avec une extrême difficulté, la table a été composée de façon à conduire d'emblée à celui des constituants

dont la présence peut être considérée à bon droit comme présentant généralement le plus de signification, à savoir le cholestérol, ses dérivés et les lipines.

#### TABLEAU D'ANALYSE.

- §. Sur une coupe microscopique par congélation, montée au sirop de lévulose, sans coloration préalable, corps gras présentant une couleur propre, généralement jaune, orangée ou brune.
- 1. Traités par une solution d'iode ioduré, donnent une coloration noir verdâtre ou brunâtre; traités par une solution d'acide chromique, se décolorent en un temps plus ou moins long. (*Carotinoïdes.*)
  - 2. Ces réactions négatives; par l'acide sulfurique, parfois coloration rouge. (*Chromolipoïdes.*)
- §. Sur une coupe microscopique, corps gras ne présentant pas de couleur propre.
- 1. Réaction de LIEBERMANN (technique de SCHULTZE ou de ROMIEU) positive : coloration bleue, pourpre ou violette, *virant ensuite au vert.*
    - Réaction à la digitonine (technique de BRUNSWICK ou de LEULIER-REVOL) : obtention de cristaux apparaissant fortement illuminés entre nicols croisés, incolores par toutes les méthodes de coloration histologique. (*Cholestérol libre.*)
    - Réaction à la digitonine : pas de précipité cristallin. (*Cholestérides.*)
  - 2. Réaction de LIEBERMANN négative après des essais répétés : pas de coloration ou coloration brunâtre ou rougeâtre.
    - O. Montés dans le sirop de lévulose, sans coloration et examinés entre nicols croisés, s'illuminent en montrant une croix de polarisation. (*Lipines.*)
    - O. Montés dans le sirop de lévulose, sans coloration et examinés entre nicols croisés, ne s'illuminent pas, ou bien s'illuminent, mais sans montrer de croix de polarisation.
      - ×. Réaction de SMITH-DIETRICH à 50° positive : coloration noir franc. (*Lipines.*)
      - ×. Réaction de SMITH-DIETRICH négative; coloration grise ou pas de coloration.
        - 1. Par la réaction de L. SMITH au sulfate de bleu de Nil, coloration rose. (*Glycérine non saturée.*)
        - 2. Par la réaction de L. SMITH au sulfate de bleu de Nil, ou bien coloration bleue, ou bien pas de coloration. (*Glycérine saturée ou non saturée, ou acide gras, ou lipine.*)

Il doit bien être entendu que les indications fournies par la table n'ont de valeur que si elles sont acquises en suivant exactement la marche indiquée. Certaines réactions n'ont en effet de valeur que si l'on a pu exclure au préalable la présence d'autres substances pouvant donner des réactions interférentes. Elle n'est valable que si la nature grasse de la substance a été préalablement démontrée (caractères de solubilité, voir page 192; méthodes générales de coloration, voir page 193).

## APPENDICE.

### LA RÉACTION PLASMALE.

Au cours de leurs études sur la réaction nucléale, FEULGEN et ses collaborateurs s'aperçurent que dans le cytoplasme de nombreuses cellules, existe une substance différente des acides nucléiques qui, après certains traitements, donne une réaction positive avec le réactif de SCHIFF. Ils la nommèrent « plasmalogène ». Elle est insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques et peut être extraite des cellules par l'alcool.

Le plasmalogène par lui-même ne réagit pas avec le réactif de SCHIFF. En revanche, les agents hydrolysants ( $HCl$   $n/10$ ) le transforment lentement (3 heures à la température ordinaire), ou un traitement par le sublimé le transforme instantanément en « plasmal », substance également insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques. Le plasmal présente toutes les réactions des aldéhydes : coloration violette par l'action du réactif de SCHIFF, production d'hydrazone, de semi-carbazone, de thiosemi-carbazone avec la phénylhydrazine, la semi-carbazide, la thiosemi-carbazide. Le plasmal a pu être isolé et semble, d'après les recherches de FEULGEN, IMHAUSER et BEHRENS, être constitué par un mélange d'aldéhyde stéarique et d'aldéhyde palmitique dans la proportion 10/90.

Sous le nom de « réaction plasmale », FEULGEN et VOIT comprennent la coloration violette avec le réactif de SCHIFF, se produisant instantanément après action du sublimé (ou en présence de sublimé) ou bien en quelques heures en l'absence de traitement par le sublimé (dans ce dernier cas, l'acidité du réactif de SCHIFF produit elle-même l'hydrolyse).

La réaction plasmale ne doit pas être confondue avec la réaction nucléale dont on a déjà longuement parlé plus haut. Les deux réactions n'ont de commun que l'emploi du réactif de SCHIFF. Dans la réaction nucléale, le



traitement par ce réactif est précédé d'une courte hydrolyse acide; dans la réaction plasmale, d'un traitement au sublimé. La réaction nucléale se distingue encore de la réaction plasmale par le fait qu'elle reste positive après un traitement même prolongé par l'alcool, alors que la réaction plasmale disparaît presque toujours.

La réaction plasmale au niveau des fibres élastiques constitue une exception à cette dernière règle. Elle montre une remarquable résistance à l'alcool et persiste même sur des coupes à la paraffine. Quelques autres réactions plasmales se montrent également alcoolrésistantes, mais à un degré bien moindre.

FEULGEN et VOIT considèrent le plasmalogène comme une substance « lipode ». C'est pourquoi il est logique d'étudier la réaction plasmale, qui sert à le mettre en évidence, à la suite des méthodes générales de détection des corps gras.

*Technique.* — La réaction plasmale doit s'accomplir soit sur tissus frais, soit sur coupes par congélation de tissus fixés. On ne peut évidemment se servir de coupes à la paraffine, ni de coupes à la celloïdine, puisque les passages dans les solvants des corps gras font disparaître le plasmalogène et le plasmal.

Le mieux est de préparer deux coupes. L'une sera passée pendant quelques minutes dans une solution saturée de sublimé, pendant que l'autre, qui servira de témoin, sera aissée un temps équivalent dans de l'eau distillée. Ensuite, après rinçage, les préparations seront traitées par le réactif de SCHIFF pendant 15 minutes et rincées en suivant exactement les mêmes modalités techniques que celles qui ont été décrites à propos de la réaction nucléale. On veillera soigneusement aux rinçages à l'eau chargée d'acide sulfureux, exactement pour les mêmes raisons que celles dont on a alors parlé. Les préparations sont alors montées au sirop d'Apathy ou à la glycérine-gélatine. La présence de plasmalogène se marque par une coloration rouge violette.

On peut également pratiquer la réaction sur des pièces fixées au sublimé, mais alors on manquera de coupe témoin. VERNE fixe dans du chlorure de platine à 1 pour 100, soit dans un liquide composé de 50 parties de solution aqueuse saturée de sublimé et de 50 parties de solution à 1 pour 100 de chlorure de cadmium ou de nitrate d'urane.

Les fixateurs renfermant du bichromate, de l'acide chromique ou du tétroxyde d'osmium doivent être évités, car ils peuvent oxyder les substances à rechercher. FEULGEN et VERNE proscrirent le formol comme pouvant par lui-même réagir avec le réactif de SCHIFF et interférer avec la réaction plasmale. Avec CORDIER (recherches inédites), nous avons constaté que cette crainte est vaine et que la réaction plasmale peut très bien s'effectuer sur des coupes d'objets fixés au formol; il suffit, avant l'action du sublimé, de pratiquer un rinçage soigneux des coupes à l'eau distillée pour enlever toute trace de formol. Cette façon de procéder donne le gros avantage d'une fixation histologique impeccable et permet d'obtenir des coupes témoins.

FEULGEN et ses collaborateurs, au cours de leurs études, avaient insisté

sur la large répartition du plasmalogène. VERNE, reprenant ces expériences de façon systématique, est arrivé à des conclusions intéressantes. Tout d'abord, la réaction n'a pas la généralité que lui prête FEULGEN. Ce n'est pas un corps universellement répandu dans le protoplasme qui est en cause (1).

Au contraire, la substance qui donne la réaction est strictement localisée. Un grand nombre d'éléments cellulaires ne donnent absolument aucune réaction (globules sanguins, éléments lymphoïdes, thymus, épithéliums malpighiens, foie); la réaction est faible et diffuse au niveau d'autres éléments (muscle, thyroïde, pancréas, épithélium intestinal); enfin, elle est élective et intense dans certains éléments qu'elle caractérise vraiment (certains tubes urinaires, gaines de myéline, petites cellules pulmonaires, surrénale, corps jaune).

La réaction donnée par les fibres élastiques a des caractères un peu différents et ne peut guère rentrer dans ces catégories. Comme FEULGEN, VERNE note qu'elle est contingente. Nulle pour le tissu élastique du poumon, elle est tantôt positive, tantôt négative pour le tissu élastique de vaisseaux dans les organes. Il s'agit probablement d'une substance fixée par adsorption de façon spécialement énergique sur le tissu élastique lui-même; cette substance ne doit pas se trouver dans tous les organes, d'où l'irrégularité de la réaction.

Examinant de plus près ses résultats, VERNE note qu'il existe entre les substances donnant la réaction plasmale et les lipides histologiquement décelables des relations indubitables dans l'espace comme dans le temps. Un grand nombre d'enclaves grasses passent par trois stades. Dans le premier, elles donnent les réactions des lipides (Soudan, etc.), mais non la réaction plasmale; dans un deuxième, il y a coexistence des réactions des corps gras et de la réaction plasmale; le stade final donnerait seulement la réaction plasmale. C'est ce que l'on observe par exemple au niveau du rein, du corps jaune, des petites cellules pulmonaires. Dans certains cas (muscle, gaine de myéline), on observe uniquement le stade 2. Dans

---

(1) Pour cette raison, VERNE rejette comme impropre le terme de « réaction plasmale » et propose d'appeler « réaction de FEULGEN » la réaction de SCHIFF obtenue après l'action du sublimé. Cette terminologie ne nous semble pas à recommander, car beaucoup d'auteurs désignent sous le nom de réaction de FEULGEN la réaction nucléale, dont la signification, comme on le sait, est entièrement différente.

d'autres (cellules hépatiques, fasciculée de la cortico-surrénale), on ne dépasse pas le stade *in vivo*; mais artificiellement, par l'action d'oxydants, tels que le permanganate de potassium, l'eau oxygénée, on peut faire apparaître des corps donnant la réaction de SCHIFF.

Les composés aldéhydiques révélés par la réaction plasmale sont donc des produits d'oxydation physiologique de corps gras, probablement non saturés. *In vivo*, ces composés aldéhydiques n'existent pas à l'état libre : ils sont en quelque sorte « masqués », en raison d'une combinaison fragile avec une substance inconnue, et sont libérés par un traitement au sublimé ou par des acides dilués.

*In vitro*, là où ils n'existent pas normalement, on peut les faire apparaître en faisant agir des agents oxydants.

Le cas de la surrénale a été étudié spécialement par VERNE. Dans la zone fasciculée de la cortico-surrénale, on n'observe jamais normalement la formation de composés aldéhydiques, contrairement à ce qui se passe dans la plupart des organes comportant un métabolisme intense des corps gras. Ce n'est que par une oxydation artificielle que l'on peut en faire apparaître dans cette région. Au contraire, dans la glomérulaire, se décèlent de façon discrète, et dans la réticulaire et la médullaire en abondance des composés présentant la réaction plasmale. Il s'agit de substances formées par oxydation, aux dépens de lipides non saturés, et analogues à celles trouvées dans d'autres organes. La spongieuse est une zone d'accumulation à métabolisme ralenti, suivant la conception de GOORMAGHTIGH, et l'apparition de composés aldéhydiques dans les zones interne et externe de la surrénale est en faveur des théories qui admettent une double évolution des éléments de cette corticale. Quant aux composés donnant la réaction plasmale dans la médullaire surrénale, leur apparition est sans rapport direct avec l'adrénaline, mais paraît dépendre de la diffusion de substances provenant de la corticale, en l'absence de laquelle elles ne se forment pas (dans les organes chromaffines simples par exemple). Cette constatation établit objectivement l'existence de relations fonctionnelles entre la corticale et la médullaire, relations dont la signification est encore toutefois obscure.

Ces constatations et celles de GUYON sur les dégénérescences wallériennes montrent l'intérêt que présente la réaction plasmale dans l'étude des lipides; nous pensons que c'est là une technique qui mérite d'entrer dans la pratique courante de l'histo chimie des lipides. Du point de vue

morphologique seul, elle constitue une technique nouvelle, sortant de la banalité des méthodes habituelles de coloration et dont on peut escompter des résultats nouveaux. Du point de vue purement histo-chimique, elle appelle des études nouvelles plus approfondies. Elle pose en effet de nombreux problèmes : la nature précise des composés révélés par la réaction, la forme sous laquelle ils existent à l'état masqué *in vivo*, le mode d'action du sublimé pour opérer le « démasquage », le mécanisme de l'oxydation des lipides *in vitro*, etc.

### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

BEHRENS (M.), *Hoppe-S.*, 191, 1930, p. 183. — FEULGEN (R.), *Abd. Hdb.*, V, 2, 1926. — FEULGEN (R.) et VOIT (K.), *Pflüger*, 206, 1924, p. 389. — FEULGEN (R.) et BEHRENS (M.), *Hoppe-S.*, 177, 1928, p. 221. — FEULGEN (R.), IMHAUSER (L.) et BEHRENS (M.), *Hoppe-S.*, 180, 1929, p. 161. — GUYON (L.), *Biol.*, 109, 1932, p. 1101. — VERNE (J.), *Bull. Soc. Neur.*, 1927; *Bull. Hist.*, 4, 1928; *Ass. Anat.*, 23, 1928, p. 469; *Biol.*, 99, 1928, p. 266; *Ann. Physiol. Phys.-chim. biol.*, 5, 1929, p. 245; *A. Anat. micr.*, 25, 1929, p. 137. — VOSS (H.), *Z. mikr.-anat. Forsch.*, 10, 1927, p. 583; *Z. Anat.*, 94, 1931, p. 712; *Verh. Anat. Ges.*, 39, 1931, p. 227.

## CHAPITRE XIII.

### LIPIDES MASQUÉS ET LIPOPHANÉROSE.

Les corps gras histochimiquement décelables par les méthodes habituelles ne représentent qu'une partie souvent assez faible des corps gras totaux des tissus. Dans les organes où les techniques histologiques ne révèlent aucune trace de lipide, l'extraction et l'analyse chimique en décèlent une quantité notable. Les lipides font partie intégrante de tout protoplasme vivant et il n'est pas de cellule qui en soit dépourvue.

CIACCIO a bien situé la question en classant les corps gras en trois groupes : 1<sup>o</sup> substances absorbées formant des réserves, utilisées pour la combustion et peut-être pour la synthèse; 2<sup>o</sup> corps gras étroitement associés à la fonction de glandes endocrines spécialisées (cortex surrénal, corps jaune, etc.); 3<sup>o</sup> corps gras représentant un constituant fondamental des cellules, physiologiquement stable et ne variant guère quantitativement sauf dans des conditions anormales. Les deux premières catégories constituent des « graisses ou lipoides métaboliques », l'autre les « lipoides histogènes » ou « histolipoides ».

Les lipides immédiatement décelables par les techniques histochimiques habituelles sont presque uniquement les lipides métaboliques. Sur les autres, règnent encore beaucoup d'obscurité et d'incertitude. Cet état de choses semble dû au fait que les histolipoides, que les recherches chimiques décèlent en quantité remarquablement constante dans tous les éléments cellulaires, s'y trouvent en grande partie sous un état physico-chimique spécial; ils sont « masqués ».

On connaît mal la façon dont ces lipides sont ainsi masqués. On sait cependant qu'on a pu préparer *in vitro* des complexes, spécialement des complexes lipoprotidiques, dans lesquels le composant lipidique ne présente plus les réactions caractéristiques des lipides. Leur constitution précise est d'ailleurs assez obscure. Ainsi, MACHEBŒUF a préparé des complexes

cholestérol-protides sous forme de gels parfaitement transparents; dans ces gels, le stérol est masqué, car, malgré leur richesse considérable, ils n'en abandonnent pas à un de ses meilleurs solvants, l'éther éthylique.

Un certain nombre d'auteurs admettent que certaines conditions, physiologiques ou pathologiques, peuvent provoquer la séparation d'une partie des lipides de pareils complexes : beaucoup de granulations lipidiques apparaissant lors du métabolisme cellulaire seraient le résultat d'un tel démasquage (GILLIERMOND). Ce processus s'appelle la « lipophanérose »; il s'accomplirait avec le maximum d'intensité dans les éléments cellulaires en dégénérescence. La dégénérescence grasseuse — qu'il faut distinguer de la surcharge grasseuse — consisterait donc simplement en la destruction de complexes lipoprotidiques et la séparation des lipides en une phase non dispersée, donc accessible à la technique histologique normale.

D'autre part, des interventions diverses semblent bien pouvoir produire artificiellement des modifications analogues dans les complexes protidiques du protoplasme.

DUJARDIN, il y a très longtemps, avait observé que lorsque la cuticule de certains Infusoires est lésée, leur cytoplasme forme au contact de l'eau des gouttelettes, qu'il appelait « boules sarcodiques ». MAGGI homologua ces boules sarcodiques aux figures qui se forment lorsque la myéline entre en contact avec de l'eau : à sa surface se produisent alors des protubérances plus ou moins filamenteuses, dont l'extrémité finit par se renfler en massue. Beaucoup de cytologistes, dans des objets très divers, ont retrouvé ces *figures myéliniques* se produisant, soit sous l'action de l'eau, soit sous l'action de solutions alcalines ou d'oléate de soude (ALBRECHT, SCHNEIDER, VON PROWAZEK, FAURÉ-FREMIET, GICKLHORN, Fr. WEBER, etc.); ils les ont attribuées à la présence de matériaux lipidiques du protoplasme. On sait en effet que certains lipides purs, *in vitro*, donnent régulièrement naissance à des figures myéliniques. Les lécithines les donnent par simple traitement avec de l'eau, tandis que les stérines ne les donnent qu'après traitement par un alcali et en présence d'un acide gras (SENFT). D'autre part, l'analogie entre les figures myéliniques du protoplasme et les sphéro-cristaux de phospholipines est extrêmement grand (RINNE, RUNNSTRÖM) : comme eux, elles sont biréfringentes et présentent en lumière polarisée la croix de Brewster. On peut donc très justement penser que la formation

de figures myéliniques du protoplasme n'est en somme qu'une manifestation de lipophanérose.

D'autres agents chimiques agissant sur des tissus frais peuvent d'ailleurs conduire à la séparation (*Entmischung*) des phases des complexes lipoprotidiques, par exemple les acides concentrés (NOLL et KAWAMURA). Dans ce cas, on voit apparaître sous le microscope des gouttelettes que leur réfringence et leurs caractères optiques en lumière polarisée permettent d'identifier comme des lipides, généralement des cholestérides ou des lipines.

Les procédés de lipophanérose artificielle dont nous venons de parler sont intéressants en ce sens qu'ils permettent de préciser l'état des lipides protoplasmiques. Cependant, pour l'histo chimiste, leur importance n'est que secondaire, car la séparation des phases des complexes s'effectue par une véritable destruction de la morphologie cellulaire. Ils permettent de se rendre compte de l'existence de lipides masqués, mais non de se faire une idée de leur répartition dans la cellule.

C'est à CIACCIO presque uniquement que l'on doit des recherches réellement histo chimiques à ce sujet. Cet auteur s'est efforcé de mettre au point des techniques adaptées à la démonstration localisée des « histolipoïdes ». Les méthodes utilisées doivent répondre à deux conditions : tout d'abord, démasquer les lipides de leur complexe, et ensuite conserver la morphologie cellulaire de façon suffisante pour pouvoir établir des localisations précises. CIACCIO a réalisé deux types de processus lipophanérogènes. Dans le premier type, le démasquage s'effectue en même temps que la fixation ; agissent ainsi des fixateurs renfermant des sels de mercure, de cadmium, d'urane, de cobalt, de zinc et les alcools éthylique et méthylique dilués. Les meilleures formules ne sont pas autre chose que les fixateurs préconisés par CAJAL (formol-urane) et par DA FANO (formol-cobalt) pour la mise en évidence de l'appareil réticulaire interne de GOLGI. Dans les procédés du deuxième type, la lipophanérose est effectuée après fixation au formol. Ici, le démasquage peut se faire par des solutions acides ou alcalines, le phénol, la digestion pepsique ou trypsique ; le procédé au phénol serait le meilleur. Après traitement par l'un ou l'autre des procédés, on pratique le chromage des pièces suivant le procédé indiqué par CIACCIO lui-même pour la mise en évidence des « lipoïdes » (voir p. 205), puis on colore au Soudan III, soit sur coupes par congélation, soit sur coupes à la paraffine.

Étudiant au moyen des méthodes ci-dessus la distribution des « histo-

lipoides » dans la cellule, CIACCIO aboutit aux résultats suivants. Il n'existe pas de substances « lipoides » dans le noyau de la plupart des cellules, sauf peut-être dans quelques éléments sexuels. Au contraire, ce sont des constituants essentiels et constants de deux formations : le chondriome et une formation appelée par CIACCIO formation X, apparentée à l'appareil de GOLGI. En outre on trouve des lipoides masqués dans diverses formations para- et métaplasmatiques : granulations des cellules délomorphes de l'estomac, granulations des leucocytes, granulations vitellines.

L'hypothèse que les éléments chondriosomiques sont constitués par un complexe lipoprotidique a déjà été défendue par un grand nombre de cytologistes, et les données fournies par CIACCIO ne font que les confirmer. Plus intéressantes sont les idées de l'auteur sur la formation X; nous les signalons à titre documentaire sans vouloir les apprécier. Dans tout élément cellulaire, existe un complexe lipoprotidique spécial très labile, qui, suivant la technique employée, donne naissance à des images différentes. Certaines formations considérées comme des organes constants de la cellule ne sont, d'après CIACCIO, que le résultat de modifications physico-chimiques de cette formation : ainsi, par exemple, les appareils de GOLGI, le vacuome, le lacunome, en partie peut-être le lysosome de CHAMPY et les liposomes d'ALBRECHT.

Outre ces éléments, CIACCIO a pu déceler des lipoides masqués dans diverses formations para- et métaplasmatiques : granulations des cellules délomorphes de l'estomac, granulations des leucocytes, granulations vitellines.

Nous ne pouvons discuter ici les vues de CIACCIO sur la nature du chondriome et de la formation X, appareil de GOLGI ou vacuome, suivant le nom qu'on voudra bien lui attribuer; ce sont là des questions extrêmement controversées et qui sortent du cadre de cet ouvrage. Nous devons nous limiter à l'étude des méthodes préconisées.

Il est assez difficile de porter un jugement sur leur valeur, car leur étude n'a pas été reprise. Plusieurs auteurs ont cependant objecté que les lipides mis en évidence par les procédés lipophanéroènes peuvent l'être tout aussi bien par les colorants habituels des lipides sans aucun démasquage. PARAT, dans la discussion de l'exposé de CIACCIO au Congrès des Anatomistes de Liège, faisait ainsi remarquer que, dans le rein, les préparations de CIACCIO montrent, après le soi-disant démasquage, des éléments qui sont parfaitement mis en évidence sans cette opération. Et



GIROUD ajoutait que de nombreux complexes lipoprotidiques, le chondriome par exemple, donnent immédiatement les réactions des corps gras. Plus tard, PARAT estime que le procédé de CIACCIO peut produire une augmentation de la quantité de lipides visibles, mais craint que la brutalité de la technique (au moins de la technique qui est la plus active, mais aussi la plus violente, celle au phénol) ne conduise à des artefacts.

On doit tout d'abord se demander s'il existe réellement des lipides masqués au sens propre du mot. On parle de substances « masquées » lorsqu'elles n'entrent pas en réaction avec leurs réactifs habituels. Or, les lipides faisant partie intégrante du protoplasme sont-ils réellement dans cet état, ou bien plutôt ne sont-ils pas répartis dans la cellule de façon si diffuse que la sensibilité de nos réactifs soit insuffisante? Invité par PRENANT à s'expliquer sur le sens qu'il donne au terme « démasquage », CIACCIO répond : « J'emploie le mot démasquage, sans préjuger de la nature du phénomène; ensuite, je cherche à expliquer le fait en supposant que les lipoides se trouvent en un état très dispersé. Dans ce cas, le terme de démasquage se réfère au passage d'un état très dispersé (une vraie solution colloïdale) à un état moins dispersé (émulsion ou suspension). Dans le premier cas, les lipoides ne sont pas décelables par les moyens en usage pour la mise en évidence des substances grasses, tandis que cela se vérifie dans le deuxième cas. »

Les réactifs actuels des lipides sont peu sensibles, et l'on peut se demander si les résultats négatifs obtenus avec les complexes lipoprotidiques ne sont pas simplement dus à leur trop faible teneur en lipides. La question est importante à résoudre, car dans ce cas les méthodes de « démasquage » de CIACCIO devraient être considérées comme conduisant à des artefacts; en effet, elles ne pourraient rendre les lipides visibles qu'en les concentrant en quelque sorte au niveau de certains éléments protoplasmiques.

Bref, on peut dire que la question des lipides masqués en Histochimie n'est pas mûre et demande de nouvelles recherches.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- CIACCIO (C.), *Boll. Soc. ital. Biol. Sper.*, 1, 1926, p. 1; *Ass. Anat.*, 21, 1926, p. 162. — FAURÉ-FREMIET (E.), *Prot.*, 6, 1929. — GICKLHORN (G.), *Prot.*, 15, 1931. — RINNE, *Koll. Z.*, 60, 1932. — RUNNSTROM, *Prot.*, 4, 1928. — SENFT, *Pharm. Post. Wien.*, 1907. — WEBER (F.), *Prot.*, 19, 1933, p. 455.

## SECTION IV.

### Glucides.

---

## CHAPITRE XIV.

### GLUCIDES.

De tous les glucides, rares sont ceux qui sont accessibles à la recherche histochimique. Les seuls que l'on ait pu déceler et localiser de façon certaine sont des polysaccharides complexes, non azotés, comme le *glycogène*, le *galactogène*, la *cellulose*, la *tunicine*, ou azotés, comme les *acides mucoïtine* et *chondroïtinesulfuriques*, la *chitine*.

A plusieurs reprises, on a essayé de mettre en évidence des glucides plus simples, et en particulier le glucose, dont on connaît le rôle important dans le métabolisme. Dès 1899, DE WAELE avait proposé une réaction de mise en évidence du glucose, malheureusement non spécifique et qui est tombée dans l'oubli. STÜLER a également essayé de déceler histochimiquement le glucose par la réduction d'une solution alcaline d'acétate de cuivre, après une fixation dans un mélange d'alcool, d'éther et d'acétone. Sa méthode, passablement compliquée, n'a donné que des résultats très mauvais dans les mains de WOLFF, de même qu'une autre méthode de SEELIG, basée sur la formation d'osazone et dont l'auteur lui-même avait déjà dû reconnaître le peu de valeur. WOLFF, après des essais avec différentes méthodes, n'a pu obtenir de résultats satisfaisants, et en arrive à un aveu d'impuissance.

Nous pensons que la recherche du glucose n'est pas du domaine de l'Histo chimie, pour la même raison qui nous a déjà fait rejeter pas mal de techniques : le glucose, corps très soluble — et de plus difficilement précipitable — ne peut être immobilisé suffisamment rapidement dans les tissus pour que toute diffusion soit empêchée. Ajoutons que la caractéri-

sation du glucose est par ailleurs assez malaisée et réclame des réactifs généralement très nocifs pour les coupes histologiques, parce que trop alcalins.

## I. — GLYCOGÈNE.

### 1. *La fixation du glycogène.*

Les données concernant la fixation du glycogène sont passablement contradictoires et il nous a semblé opportun d'en dire quelques mots.

Beaucoup d'auteurs, se référant à la solubilité du glycogène dans l'eau et à sa facile précipitation par l'alcool fort, considèrent comme indispensable pour la fixation du glycogène l'emploi de l'alcool absolu. Tel est l'avis par exemple d'ERLICH, BARFURTH, LANGHANS, DELÉPINE, LUBARSCH, BEST, FISCHER, MAYER, VASTARINI-CRESI, FRANKEL, KLEESTADT, GIERKE, etc. Comme l'alcool absolu présente pas mal d'inconvénients au point de vue histologique pur (mauvaise pénétration, mauvaise fixation, rétraction des tissus, durcissement des pièces, etc.), beaucoup d'autres fixateurs ont été préconisés, les uns alcooliques, les autres aqueux. Les citer tous dépasserait le cadre de cet exposé. Parmi ceux-ci, on doit tout spécialement signaler les fixateurs saturés de glucose d'après NEUKIRCH : formol (non dilué) saturé de glucose, solution de sublimé saturée de glucose, etc. ARN<sup>1</sup> a beaucoup recommandé le formol à 10 pour 100 saturé de glucose. Le fixateur de NEUKIRCH au formol-glucose est considéré par plusieurs auteurs (MÜNZER, ROMEIS, BURGGRAEVE) comme conservant le mieux le glycogène dans la cellule. Malheureusement, les pièces ainsi fixées durcissent pendant le passage dans les alcools, à tel point que l'on éprouve les plus grandes difficultés à les couper.

Deux études récentes ont paru sur la valeur comparée des fixateurs du glycogène, l'une de BURGGRAEVE (matériel : foie), l'autre de GRAUPNER (matériel : cartilage). Ces recherches ont donné des résultats assez différents. GRAUPNER recommande le formol, le sublimé, le ZENKER, le MÜLLER-formol et considère comme inférieurs les fixateurs alcooliques et les fixateurs saturés de dextrose, qui produisent trop de rétraction et de durcissement des pièces. BURGGRAEVE, au contraire, a observé que les fixateurs aqueux ne conservent généralement pas le glycogène; le formol (du commerce, non dilué) saturé de dextrose le conserve le mieux, mais durcit beaucoup les pièces; l'alcool fixe bien, mais pénètre mal; on peut améliorer son action

en lui ajoutant du formol (à parties égales — BARK) ou mieux du formol et de l'acide acétique (fixateur de VASTARINI-CRESI : alcool à 95°, 100; formol, 10; acide acétique, 5). La différence entre les résultats de GRAUPNER et de BURGGRAEVE doit être attribuée à la différence de matériel. EHRLICH avait déjà attiré l'attention sur l'inégale solubilité du glycogène des différents tissus. Le glycogène des épithéliums pavimenteux est pratiquement insoluble dans l'eau, celui du cartilage l'est très difficilement, tandis que le glycogène du foie et des leucocytes se dissout très facilement. Il n'est donc pas étonnant que GRAUPNER ait pu conserver le glycogène du cartilage par l'emploi de fixateurs aqueux, alors que BURGGRAEVE, étudiant le foie, a obtenu de piètres résultats avec ceux-ci.

Notre collègue et ami PASTEELS a bien voulu nous communiquer le résultat encore inédit de recherches comparatives sur la fixation du glycogène, recherches qu'il a été amené à effectuer au cours de ses études sur la gastrulation des Téléostéens, où la fixation du glycogène s'est révélée extrêmement malaisée.

PASTEELS, avec M<sup>lle</sup> LÉONARD, a étudié l'action, aussi bien sur des tissus adultes que des tissus embryonnaires, de fixateurs très divers : alcool absolu, alcool 90°; alcool-formol, formol-glucose, liquides de CARNOY, ZENKER, BOUIN, BOUIN-ALLEN, DUSTIN, BATAILLON, TELLYENICKSKY, VASTARINI-CRESI).

Contrairement à l'opinion classique, la fixation du glycogène est très mal assurée par les liquides alcooliques. Les plus mauvais sont les combinaisons ternaires, alcool-chloroforme-acide acétique (CARNOY) ou alcool-formol-acide acétique (VASTARINI-CRESI). L'alcool absolu seul ne conserve pas du tout le glycogène dans les gastrulas, et, dans les tissus adultes, produit des images de fuite très caractérisée. Les résultats les meilleurs sont obtenus par les liquides, même aqueux, contenant de l'acide picrique. Le BOUIN est bon, le BOUIN-ALLEN encore meilleur. Pour les tissus embryonnaires très jeunes, où le glycogène est extrêmement difficile à conserver *in situ*, les meilleurs résultats ont été obtenus par un nouveau fixateur extrêmement riche en acide picrique (1) : dioxane saturé d'acide picrique 8,5; formol 1; acide acétique glacial 0,5.

C'est bien l'acide picrique qui est l'agent actif permettant une bonne fixation; PASTEELS et LÉONARD ont effectué des expériences systématiques

---

(1) Il en contient près de 35 pour 100!

avec deux séries de fixateurs, les uns ne différant des autres que par l'addition d'acide picrique à saturation. Dans tous les cas, les fixateurs picriqués se sont révélés beaucoup supérieurs aux autres et d'autant plus que la solubilité de l'acide picrique était plus grande dans le liquide considéré.

*In vitro*, l'acide picrique ne précipite pas le glycogène. La fixation du glycogène n'est donc pas tant une insolubilisation pure et simple, qu'une immobilisation sur un substrat, protidique ou autre, qui est fixé de façon optimum par l'acide picrique. C'est encore ici une application intéressante d'un principe que nous avons longuement développé dans le Chapitre II (*voir* p. 11).

## 2. Réaction à l'iode.

Ce fut Claude BERNARD, à qui l'on doit la découverte du glycogène, qui indiqua la première méthode histochimique pour la mise en évidence de cette substance. Jusqu'à ces dernières années, la réaction de Claude BERNARD resta la seule qui fût absolument sûre et spécifique du point de vue chimique; toutes les autres méthodes histologiques de recherche du glycogène n'étaient que des méthodes d'analyse chromatique.

Claude BERNARD lui-même, dans ses études célèbres sur le métabolisme des matières sucrées, s'était largement servi de la méthode histochimique. Au moyen de la réaction qu'il avait indiquée, il avait établi l'ubiquité du glycogène dans le monde animal, en avait indiqué les localisations principales et suivi les transformations dans l'organisme au cours de différents états physiologiques ou pathologiques. Ainsi, il avait pu en étudier l'évolution au cours de l'ontogenèse, dans l'œuf et l'embryon des Oiseaux, dans les annexes fœtales des Mammifères, dans les tissus des embryons. Il montra en outre le rôle du foie dans la glycogénèse, la disparition du glycogène des muscles lors de leur fonctionnement, etc. Il faut lire les admirables leçons de Claude BERNARD sur *Les phénomènes de la vie* pour se rendre compte de la quantité et de l'exactitude des notions histophysiologiques ainsi acquises par l'éminent expérimentateur. Les travaux de Claude BERNARD sur le glycogène constituent un des ensembles les plus remarquables d'Histochimie et d'Histophysiologie que l'on puisse trouver.

Comme on le verra, la méthode employée par Claude BERANRD n'a guère subi depuis lors que des variations de détail, ou plutôt des adaptations aux conditions nouvelles causées par le développement de la technique

histologique. Nous ne pouvons mieux faire que de citer le texte de Claude BERNARD lui-même.

« Lorsque l'on a à sa disposition des quantités très petites de tissu, on y décele le glycogène à l'examen microscopique, par la coloration rouge vineux, violacée ou rouge acajou que cette substance prend sous l'influence de l'iode. D'ailleurs, cette recherche offre par elle-même un grand intérêt, en faisant connaître la distribution et la forme anatomique qu'affecte la substance dans les organes. Cette substance est généralement sous la forme de granulations demi-fluides qui diffusent peu à peu après la mort dans les liquides aqueux, mais qui se coagulent au contraire par l'alcool et l'acide acétique cristallisable, etc. Il suffit quelquefois de traiter directement par l'iode une coupe mince du tissu ou de la membrane que l'on veut examiner pour y déceler la matière glycogène sous la forme précédemment indiquée; mais le plus souvent, il faut employer des procédés particuliers de préparation. On déshydrate les tissus en les plongeant dans l'alcool absolu auquel on ajoute un fragment de potasse caustique, ou d'autres fois quelques gouttes d'acide. Après un certain temps d'immersion, on lave la pièce dans l'éther, le chloroforme ou le sulfure de carbone, pour la durcir et lui enlever les matières grasses qui gênent les réactions. La pièce, ainsi préparée, est baignée dans l'alcool iodé ou le chloroforme, ou le sulfure de carbone, ou l'éther iodés, lavée dans l'essence de térébenthine, puis conservée dans du vernis à l'essence. La préparation peut se conserver très longtemps : il faut cependant prendre soin de ne pas la clore complètement. A l'abri de l'air, elle se décolorerait rapidement. »

La réaction à l'iode a été l'objet d'un nombre de modifications extrêmement considérable, motivées surtout par le peu de stabilité des préparations. Signalons parmi ces procédés ceux d'EHRlich, LANGHANS, BARFURTH, DELÉPINE, DRIESENS, LUBARSCH, BEST, KANKATO-BLEIBTREU, GUIZETTI, BRAULT, etc. A titre documentaire, en voici quelques-unes :

Méthode de LANGHANS, variante de CARLETON : 1<sup>o</sup> fixer à l'alcool absolu ou au CARNOY, inclure à la paraffine; 2<sup>o</sup> les coupes, au lieu d'être collées à l'eau albumineuse, le sont dans l'alcool albumineux à 50 pour 100; 3<sup>o</sup> les coupes déparaffinées sont traitées 5 à 10 minutes par le LUGOL (iode, 1; iodure de K, 2; eau, 100); 4<sup>o</sup> déshydrater dans une solution saturée d'iode dans l'alcool absolu; 5<sup>o</sup> essence d'origan; 6<sup>o</sup> xylol, baume. (Note: Avant le traitement par l'iode, on peut colorer à l'hématoxyline de DELAFIELD ou d'EHRlich.)

Méthode de GAGE: 1<sup>o</sup> fixer dans : alcool 95<sup>o</sup>, 100<sup>cm</sup>; alcool iodé à 10 pour 100 d'iode, 2<sup>cm</sup> 5; acide acétique glacial, 1<sup>cm</sup>; 2<sup>o</sup> inclure à la paraffine; 3<sup>o</sup> étaler les coupes avec le liquide : H<sub>2</sub>O, 250; alcool, 250; NaCl, 1,5; IK, 3; I, 1,5; 4<sup>o</sup> les coupes séchées sont déparaffinées

au xylol et montées, soit à l'huile de vaseline, soit au baume de Canada, sans lamelle.

Méthode de DRIESSEN : 1<sup>o</sup> fixer à l'alcool, inclure à la paraffine ou à la celloidine; 2<sup>o</sup> sur coupes, colorer les noyaux par la cochenille alcoolique concentrée; 3<sup>o</sup> alcool 96<sup>o</sup>; alcool 100<sup>o</sup>; 4<sup>o</sup> 3 à 5 minutes dans le xylol phéniqué-iodé (LUGOL + xylol phéniqué-ana; agiter énergiquement, recueillir le liquide surnageant); 5<sup>o</sup> rincer au xylol phéniqué; 6<sup>o</sup> xylol, baume.

Les méthodes à l'iode sont simples et sûres. La spécificité de la réaction n'est pas entière : l'amyloïde donne une réaction semblable; de plus, certains constituants protéiques sont capables de se colorer en brun par l'iode (réaction iodophile de ROMIEU). On fera donc toujours la contre-épreuve de la salive; le glycogène, en un temps fort court, est hydrolysé par l'amylase salivaire. Une coupe témoin sera donc traitée 30 minutes à l'étuve à 37<sup>o</sup> par de la salive : le glycogène a alors disparu et la réaction à l'iode est devenue négative.

Ainsi contrôlée, la réaction de Claude BERNARD a une haute signification. Les méthodes d'analyse chromatique donnent assurément des préparations plus agréables à l'œil et plus durables; elles doivent cependant toujours être contrôlées par la réaction fondamentale à l'iode.

### 3. Méthodes de coloration du glycogène.

Dans la pratique histologique, les méthodes les plus fréquemment employées pour la détection du glycogène sont des méthodes de coloration. La plus ancienne est la coloration au carmin de BEST, dont la technique est bien connue de tous les histologistes, et qui constitue une excellente méthode, donnant des préparations très claires et très lisibles. La coloration au carmin de BEST ne constitue pas à proprement parler une méthode histo-chimique, car son mécanisme reste obscur; s'agit-il d'un phénomène purement physique de dissolution du colorant dans le glycogène, phénomène analogue à la coloration des lipides, comme le pense PATZELT, ou bien plutôt d'un phénomène chimique, comme le font pressentir les recherches de JEFFERS? c'est ce qu'il est encore difficile de décider. En tout cas, c'est une méthode précieuse qui acquiert une signification beaucoup plus précise si on la fait suivre de l'épreuve de la salive. Au point de vue spécificité, on sait que la méthode de BEST est loin d'être parfaite; elle colore en effet un certain nombre d'éléments protoplasmiques aglycogéniques.

Les autres méthodes de coloration du glycogène sont loin de valoir la méthode de BEST. La méthode de VASTARINI-CRESI à la résorcine-fuchsine ou à la crésolfuchsine a ses partisans et ses détracteurs. Elle non plus n'a rien de spécifique. Quant aux méthodes de MAYER au tanin-fer, de FISCHER au tanin-safranine, de LUBARSCH au violet de gentiane, et d'autres méthodes analogues, elles ne présentent guère qu'un intérêt épisodique.

### 4. Réaction de BAUER.

Tout récemment, BAUER a découvert une réaction histo-chimique du

glycogène qui joint à la spécificité de la réaction à l'iode la précision et la beauté des préparations que donnent les méthodes de coloration.

Elle est basée sur le principe suivant : une oxydation modérée par l'acide chromique dilué transforme le glycogène en une substance dont la constitution chimique n'est pas encore complètement éclaircie, mais qui donne naissance à une coloration rouge violet avec le réactif de SCHIFF. Cette substance a pu être obtenue *in vitro*; contrairement au glycogène, elle n'est pas soluble dans l'eau.

*Technique.* — On peut faire agir l'acide chromique, soit sur les pièces — ce qui revient à employer un fixateur à base d'acide chromique — soit sur les coupes. La méthode originale de BAUER comporte une fixation au BOUIN-ALLEN, puis une inclusion à la paraffine avec le benzoate de méthyle-celloidine comme intermédiaire, d'après la méthode de PETERFI.

PASTEELS et LÉONARD, en conclusion de l'étude comparative citée plus haut, fixent 6 heures au BOUIN-ALLEN (tissus adultes) ou 1 heure au PASTEELS-LÉONARD (tissus embryonnaires ou tissus adultes à glycogène labile), puis pratiquent une inclusion à la paraffine avec dioxane comme intermédiaire (procédé de GRAUPNER et WEISSBERGER).

Les coupes sont alors soumises à l'action d'une solution d'acide chromique à 4 pour 100 pendant 1 heure ou à 1 pour 100 pendant une nuit. L'effet est optimum pour une concentration en acide chromique et une durée de chromisation déterminées. Le temps indiqué semble correspondre à la plus grande généralité des cas; une trop forte concentration et une trop longue durée d'action de l'acide chromique provoquent un affaiblissement de la réaction. Après la chromisation, les coupes sont lavées 5 minutes à l'eau courante, puis traitées pendant 10 à 15 minutes par le réactif de SCHIFF (*voir* préparation de celui-ci, p. 178). Après l'action du SCHIFF, rinçage dans trois eaux sulfureuses successives, comme dans la réaction nucléale; lavage de 10 minutes à l'eau courante. Ensuite coloration nucléaire à volonté et montage au baume. Les éléments renfermant du glycogène sont fortement colorés en rouge violet. Les préparations sont stables.

La réaction de BAUER donne de fort belles préparations très lisibles et très démonstratives. Elle nous paraît devoir être recommandée.

De l'étude de la réaction, telle qu'elle a été effectuée par BAUER, il résulte qu'elle n'est pas en réalité spécifique du glycogène. Elle est donnée — et ceci est hautement intéressant — par d'autres polysaccharides complexes. BAUER l'a observée positive pour le glycogène, l'amidon, la cellulose, la tunicine, le galactogène, mais négative pour l'inuline. L'auteur ne connaît pas, à l'heure actuelle, d'autre substance donnant la réaction; tout spécialement, il note que des substances différentes du glycogène et qui prennent régulièrement le carmin de BEST, comme par exemple le mucus ou les granulations des mastocytes, ne la donnent pas.



Par sa nature, la réaction de BAUER n'est pas spécifique pour un polysaccharide donné; cependant, comme dans les organismes, la coexistence de plusieurs polysaccharides est rare, cette non-spécificité relative n'a que peu d'inconvénients. Pratiquement, la réaction de BAUER s'emploiera donc surtout pour la recherche histochimique du glycogène. Dans les cas où se rencontrent de telles coexistences, la distinction peut s'effectuer par d'autres méthodes; ainsi, chez les Tuniciers, où l'on rencontre du glycogène comme substance de réserve et de la tunicine comme substance de soutien, le simple examen morphologique suffit à effectuer la distinction. Chez certains Mollusques, où le glycogène coexiste avec le galactogène, la distinction s'effectue aisément par des moyens que nous indiquons en étudiant le galactogène.

Comme on l'a vu, la réaction de BAUER consiste en l'accouplement de deux réactions, d'abord une oxydation par l'acide chromique, ensuite l'action du réactif de SCHIFF (comparer avec la réaction nucléale de FEULGEN : hydrolyse acide, puis réactif de SCHIFF). Pour qu'on puisse la déclarer positive au niveau d'un élément donné, on doit effectuer des contrôles (exactement comme dans la réaction de FEULGEN). On doit vérifier que sur une coupe non chromée, la réaction ne se produit pas, de façon à éliminer les substances donnant directement une réaction avec le réactif de SCHIFF. On doit également la trouver négative après l'épreuve de la salive. Enfin, on prendra garde à deux causes d'erreur dues à des fautes techniques : par suite de l'acidité du réactif de SCHIFF, une hydrolyse de l'acide thymonucléique peut se produire et la réaction nucléale apparaître, si l'on prolonge trop l'action de ce réactif; cependant, avec un temps de 10 à 15 minutes à froid, cette hydrolyse ne peut guère avoir lieu. Enfin, une autre cause d'erreur est l'hydrolyse du réactif de SCHIFF avec régénération de fuchsine, par suite de rinçages defectueux; cette cause d'erreur a déjà été envisagée en parlant de la réaction nucléale et l'on se reportera à ce qu'on en a dit alors.

## II. — GALACTOGÈNE.

Le galactogène est une substance assez analogue au glycogène, mais qui, par hydrolyse, donne naissance, non à du glucose, mais à du galactose. Il a été décrit pour la première fois par HAMMARSTEN qui l'avait extrait de

l'escargot. Il s'y trouve localisé dans les glandes albumineuses du manteau (MAY, BAUER).

Il se distingue du glycogène par un certain nombre de caractères chimiques et histochimiques, que nous avons condensés dans le tableau suivant, construit d'après les données de MAY, MAY et KORDOVICH, BAUER.

	Glycogène.	Galactogène.
Iode .....	+	—
Carmin de BEST.....	+	+
Carmin de BEST après épreuve saliva.....	—	+
BAUER .....	+	+
BAUER après épreuve saliva.....	—	—

### III. — CELLULOSE ET TUNICINE.

Dans les organismes animaux, la cellulose est très peu répandue et ne se trouve que chez les Tuniciers (tunicine). La cellulose est soluble dans l'oxyde de cuivre ammoniacal (réactif de SCHWEITZER) et donne une réaction caractéristique avec l'iode. En la traitant successivement par du liquide de *Lugol* et de l'acide sulfurique à 33 pour 100, il se produit une coloration bleue. Le chlorure de zinc iodé (chlorure de zinc, 30; IK, 5; iode, 1; eau, 14) la colore en violet. Les colorations ainsi obtenues ne sont pas stables. On trouvera de plus amples renseignements sur la question dans les Manuels d'Histo chimie végétale.

### IV. — CHITINE.

Chez beaucoup d'Invertébrés, chez certains Protistes et Champignons, le squelette est formé de chitine. La chitine doit être rapprochée des polysaccharides car, par hydrolyse, elle fournit des chitosamines, dérivés aminés de glucides.

Comme le remarque SCHULZE, les zoologistes ont l'habitude d'appeler chitine les substances cuticulaires des Invertébrés, dès qu'elles ont une certaine consistance, sans apporter une preuve positive de son existence. La raison en est que les réactions de la chitine, jusque dans un passé assez peu éloigné, n'étaient guère commodément réalisables en Microchimie, et moins encore en Histo chimie. La plupart des réactions proposées sont en effet extrêmement brutales.

SCHULZE classe les méthodes de recherche de la chitine en deux grands groupes. Les premières s'effectuent avec destruction des parties molles. La plus connue est celle de VON WISSELING; elle consiste à chauffer l'objet en tube scellé à 180° avec une lessive de potasse à 60 pour 100; ce traitement transforme la molécule de chitine en une substance moins complexe, la chitosane, qui, traitée par l'iode et l'acide sulfurique dilué, donne lieu à une coloration violette. Une autre réaction, due à BRUNSWICK, consiste à traiter par la potasse à 50 pour 100 pendant 15 minutes au bain d'huile à 160°, puis à faire agir de l'acide nitrique à 50 pour 100; il se forme des sphérites de nitrate de chitosane. SCHULZE et KUNIKE ont indiqué une troisième réaction, basée sur l'action d'une solution de naphthol en solution sulfurique concentrée, et s'effectuant encore une fois après traitement par la potasse à chaud. Ces méthodes, que nous avons citées à titre documentaire, ne peuvent évidemment répondre aux desiderata de l'histo chimiste, qui exige fondamentalement le respect de la Morphologie.

Dans le deuxième groupe de SCHULZE, se trouve une réaction s'effectuant avec conservation des parties molles et pouvant donc être utilisée en Histo chimie. C'est la réaction de SCHULZE au diaphanol-chlorure de zinc iodé.

Le chlorure de zinc iodé, qui constitue un bon réactif général pour un certain nombre de polysaccharides, ne donne que des résultats irréguliers avec la chitine. Certaines chitines donnent lieu à des colorations bleues ou violettes, tandis que d'autres ne réagissent pas. Certains auteurs (ZANDER, WESTER) avaient été jusqu'à dire que la réaction n'était pas due à la chitine elle-même, mais à une impureté. SCHULZE montra qu'après un traitement par le diaphanol (acide chlor-dioxyacétique,  $\text{CO OH}-\text{CCl}(\text{OH})_2$ ), la chitine donne régulièrement une coloration intense avec le chlorure de zinc iodé.

*Technique.* — L'objet à étudier est plongé pendant 24 heures ou plus dans du diaphanol, à l'obscurité et dans un flacon fermant hermétiquement. Après un lavage soigné, la préparation est recouverte de chlorure de zinc iodé (iode, 1%, 6; iodure de K, 10%; eau, 14%; — chlorure de zinc, 60%; eau, 14%. Mélanger les deux solutions et filtrer sur coton de verre; avant l'emploi, vérifier que le liquide colore le papier filtre en violet). La présence de chitine se marque par une coloration violette, qui n'apparaît souvent qu'après un lavage à l'eau.

SCHULZE donne de l'action du diaphanol une théorie intéressante. On sait que, dans le règne végétal, la substance de soutien principale de la plante, la cellulose, ne se trouve ordinairement pas libre, mais en liaison intime avec d'autres substances, désignées sous le nom d'*incrustes*. Ainsi,

dans les membranes lignifiées, la cellulose se trouve incrustée de lignine et à tel point qu'elle ne s'y trouve plus immédiatement décelable. Pour pouvoir la mettre en évidence, il faut d'abord se débarrasser de la lignine. SCHULZE admet que la chitine dans les organismes animaux se trouve ainsi incrustée par des substances organiques — en premier lieu par des pigments mélaniques, mais aussi par des substances incolores — et qu'il est nécessaire de faire disparaître ces incrustes pour pouvoir déceler la chitine. Le diaphanol — qui est d'ailleurs un agent de dépigmentation énergique — a la propriété de dissoudre les incrustes, aussi bien ceux des membranes végétales que ceux de la chitine. Cette intéressante interprétation rapproche singulièrement la chitine des membranes végétales : les unes et les autres sont constituées de polysaccharides complexes, souvent en liaison avec des substances incrustantes. Il est à noter que l'action du diaphanol s'exerce sans aucun dommage pour les tissus et ne modifie en rien la morphologie cellulaire.

Sur le mécanisme plus approfondi de la réaction et sur le mode d'action du chlorure de zinc iodé, on consultera les études de KUHNELT, trop longues à rapporter ici.

Comme on l'a dit plus haut, la réaction au chlorure de zinc iodé est donnée également par la cellulose et la tunicine. Si l'on veut éviter toute confusion avec celles-ci, on traitera par le liquide de Lugol et l'acide sulfurique dilué (1 à 2 pour 100). La cellulose et la tunicine se colorent en bleu, tandis que la chitine se colore seulement en brun plus ou moins foncé.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

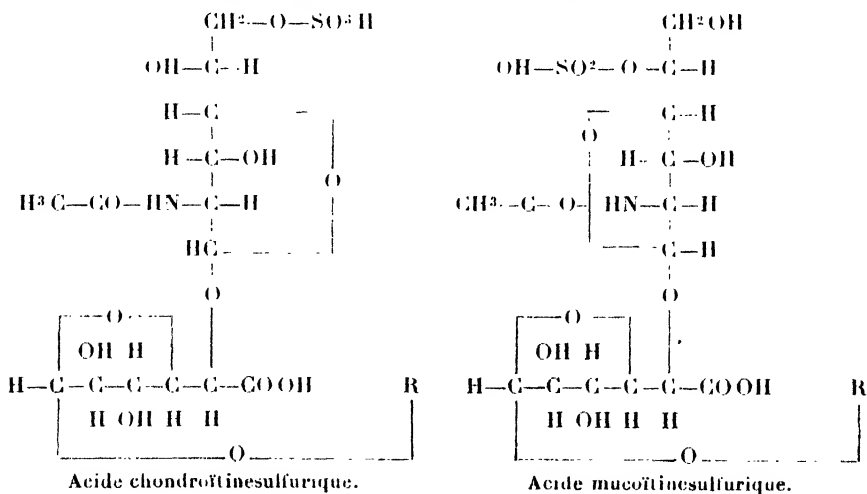
- ARNDT (H. S.), *Zbl. Path.*, 35, 1925, p. 545. — BAECKER, *Mikrokosm.*, 21, 1927, p. 168. — BARFURTH, *A. mikr. Anat.*, 25, 1885, p. 260. — BAUER (H.), *Z. Zellf.*, 15, 1932; *Z. mikr.-anat. Forsch.*, 33, 1933, p. 143. — BEST, *Ziegler*, 33, 1903, p. 585; *A. mikr. Anat.*, 23, 1906, p. 319. — BURGGRAEVE (P.), *Geneeskund. Tijdschr.*, 46, 1931; *Bull. Hist.*, 10, 1933, p. 73. — DELÉPINE, *Jl. of Physiol.*, 1891. — DE WAELE, *Livre jubilaire van Bambeke*, 1899. — DRIESSEN, *Zbl. Path.*, 16, 1905, p. 129. — DOLFINI (G.), *Mon. zool. ital.*, 100, 1929, p. 115. — EHRLICH (P.), *Z. klin. M.*, 6, 1883, p. 33. — FRANKEL, *Virch.*, 204, 1911, p. 200. — GRAUPNER, *Bull. Hist.*, 10, 1933, p. 214. — GRAUPNER et WEISSBERGER, *Zool. Anz.*, 96, 1931, p. 204. — HAMMARSTEN (O.), *Pflüger*, 36, 1885. — JEFFERS (K.), *Bio. Z.*, 223, 1930, p. 184. — KAN KATO, *Pflüger*, 127, 1909, p. 126. — KLEESTADT (W.), *Erg. Path.*, 11, 1911, p. 349. — KUHNELT (W.), *Biol. Zbl.*, 48, 1928, p. 374. — LANGHANS, *Virch.*, 120, 1890, p. 28. — LUBARSCH, *Virch.*, 135, 1894, p. 149; 183, 1906, p. 188; *Art. Glycogen*, in *Hdb. mikr. Techn.*, 2<sup>e</sup> Aufl. (Berlin, 1910; Urban et Swarzenberg). — MAY (F.), *Z. Biol.*

91, 1931. — MAY (F.) et KORDOVITCH (Z.), *Biol.*, 93, 1932, p. 233. — MAYER (P.), *Z. wiss. M.*, 26, 1909, p. 513. — NEUKIRCH, *Virch.*, 200, 1910, p. 73. — MUNZER (Th.), *Z. ges. Neurol.*, 112, 1928, p. 288. — NOEL (R.), *Arch. Anat. Micr.*, 19, 1923, p. 1. — PASCHUTIN, *Zbl. med. Wiss.*, 1884. — PATZELT (V.), *Wien. klin. W.*, 41, 1928, p. 563. — POLICARD et NOËL (R.), *Biol.*, 86, 1922, p. 118. — ROQUES (H.), *Biol.*, 95, 1926, p. 575. — ROMIEU (M.), *Ass. Anat.*, 23, 1928, p. 404. — SCHULZE (P.), *Verh. deutsch. zool. Ges.*, 1913 et 1922; *Biol. Zbl.*, 42, 1922, p. 388; *Z. Morph. Oekol. Tiere*, 2, 1925. — SCHULZE (P.) et KUNIKE (G.), *Biol. Zbl.*, 43, 1923, p. 556. — SEELIG, *A. exp. Path.*, 37, 1921, p. 156. — SFULER, *Zbl. Path.*, 33, 1923, p. 89. — VASTARINI-CRESI, *Atti R. Accad. med chir. Napoli*, 1909; *Monit. zool. ital.*, 31, 1921, p. 134. — ZIEGLWALLNER, *Z. wiss. M.*, 28, 1911, p. 154. — WOLFF (J.), *Zbl. Path.*, 36, 1925, p. 12.

## APPENDICE.

### ESTERS SULFURIQUES DES POLYSACCHARIDES ET MUCOPROTIDES.

Un certain nombre de polysaccharides importants sont en réalité des esters sulfuriques, composés du type  $R\text{-OSO}^3\text{H}$ , ou des sels qui en dérivent surtout des sels de calcium  $(R\text{-OSO}^3\text{H})^2\text{Ca}$ . Tels sont par exemple l'acide chondroïtinesulfurique, constituant important du cartilage (MORNER, SCHMIEDEBERG, ODDI, SAWJALOW, LEVENE, etc.) et l'acide mucoïtinesulfurique, constituant des mucines. Ces deux substances, très voisines l'une de l'autre, sont des polysaccharides, qui, par hydrolyse, fournissent une hexosamine, de l'acide glycuronique, de l'acide acétique et de l'acide sulfurique en proportion équimoléculaire. Les formules suivantes, dues à LEVENE, représentent leur constitution probable.



On n'a représenté que la moitié des formules. La moitié droite, simplement représentée par R (ou R') est le redoublement de la moitié gauche, rattachée par le pont oxydique —O—.

Ces substances forment le groupe prosthétique des protéines conjuguées connues sous le nom de *mucoprotides*.

Les acides chondroïtine et mucoïtinesulfuriques ne sont pas les seuls esters sulfuriques de polyoses existant dans la nature. Bien au contraire, des substances ayant une constitution analogue se montrent extrêmement répandues chez les êtres vivants, comme on le dira plus loin.

Dans des recherches récentes, LISON vient de montrer que la détection histochemique des esters sulfuriques des polyoses est réalisable. Il a pu montrer, en effet, qu'un phénomène tinctorial connu depuis longtemps des histologistes, la *métachromasie*, est en réalité une véritable réaction histochemique spécifique de ces substances.

Sous le nom de *métachromasie*, on désigne, depuis EHRlich, le fait que certains colorants teignent certains éléments histologiques en une nuance différente de celle de la solution colorante. Ainsi, la thionine, colorant bleu violet, teint la plupart des éléments basophiles des tissus en bleu violet, mais colore en rouge la substance fondamentale du cartilage, le mucus, les granulations des mastocytes, la métachromatine (volutine) des protistes et quelques autres éléments encore. Les colorants ainsi capables de colorer certains éléments histologiques en des nuances différentes sont des *colorants métachromatiques*; les éléments qui se colorent en une teinte différente de la teinte normale du colorant sont dits *éléments chromotropes* ou quelquefois aussi *éléments métachromatiques*. Il doit être bien entendu que sous le nom de métachromasie, on doit comprendre les phénomènes de polychromie obtenus par l'emploi d'un seul colorant, chimiquement défini et à l'état pur; lorsque la polychromie résulte de l'affinité différente des éléments du tissu pour certains constituants d'un mélange de colorants, il s'agit d'un phénomène tout différent, que l'on peut avantageusement appeler, avec MICHAELIS, « allochromasie ».

LISON s'est attaché à élucider le mécanisme et la signification de ce curieux phénomène, qui, malgré des recherches assez nombreuses (EHRlich, MAYER, PAPPENHEIM, MICHAELIS, VON MÖLLENDORFF, LEHNER, HOLMES), était resté très obscur.

On ne discutera pas en détail ici le mécanisme de la métachromasie; nous nous contenterons de quelques indications qui ont une certaine importance pratique. Les colorants

métachromatiques, et eux seuls parmi les colorants basiques, sont susceptibles d'exister en solution aqueuse sous deux formes différentes, l'une de teinte « normale », l'autre de teinte « métachromatique », en état d'équilibre. Dans les solutions aqueuses diluées, et dans les solutions non aqueuses quelle que soit leur concentration, la forme stable est la forme « normale » (bleue, pour la thionine). Dans les solutions aqueuses concentrées, une partie de la forme normale se transforme en la forme « métachromatique » (rouge, pour la thionine). Le phénomène est réversible et certains facteurs favorisent l'une ou l'autre forme aux dépens de l'autre. Ainsi, la dilution de la solution, l'élévation de la température, la présence de sels, l'abaissement du pH favorisent la forme « normale ». Réciproquement, la concentration de la solution, l'abaissement de la température, l'augmentation du pH (1) favorisent la forme métachromatique. Ces phénomènes, qui peuvent être suivis spectroscopiquement, expliquent les changements de coloration que subissent les colorants métachromatiques en solution aqueuse.

Ceci étant, l'introduction dans la solution d'un colorant métachromatique, d'une très petite quantité d'une solution pure d'une substance chromotrope déplace de façon massive l'équilibre en faveur du composant « métachromatique ». Ce phénomène se traduit par un virage immédiat de la solution. Par exemple, si à une solution très diluée, bleue, de bleu de toluidine, on ajoute une petite quantité d'une solution pure de chondroitinesulfate de calcium, on la voit immédiatement virer au rouge violacé. Ce « virage métachromatique » n'est pas dû à la libération de la base du colorant, comme le veut la théorie hydrolytique de la métachromasie. Dans le virage métachromatique, il s'agit bien d'un déplacement d'équilibre entre deux formes du colorant. En effet, on peut le redéplacer en sens inverse, en faisant agir les facteurs qui favorisent la forme normale. Ainsi, en chauffant la solution qui a viré, en l'acidifiant, en y ajoutant un excès de sels neutres, de l'alcool, de l'acétone, etc., on la voit revenir vers la teinte normale, bleue, du colorant. La coloration redevient rouge violacé, si on la refroidit, la neutralise ou éloigne par un moyen quelconque les sels, l'alcool, l'acétone, etc.

Ceci permet de définir plus étroitement ce que l'on doit considérer comme coloration métachromatique. Tout élément histologique se colorant d'une nuance différente de celle qui est considérée comme « normale » pour le colorant envisagé, n'est pas nécessairement chromotrope. Pour qu'il le soit, il faut que la teinte résulte bien de son action propre sur le colorant; autrement dit, on doit voir apparaître la teinte métachromatique dans des conditions où la seule forme stable est la forme « normale ». Ainsi, lorsque l'on colore une coupe par une solution très concentrée de bleu de toluidine, un grand nombre d'éléments se colorent en violacé; c'est sans aucune signification, car dans les solutions aqueuses concentrées du colorant, préexiste déjà une notable quantité de la forme rouge du bleu de toluidine. Au contraire, lorsqu'on voit des éléments se colorer en rouge violet dans des solutions diluées de colorant ou dans des solutions acides (à pH 2 ou 3 par exemple) où seule, la forme normale est stable, on peut affirmer que la substance est chromotrope.

(1) Bien entendu, dans les limites où cette élévation de pH respecte le sel colorant. Une alcalinisation trop forte libère la base du colorant (qui, pour la thionine, est orange) et cause donc le virage de la solution. Ce « virage ionique » n'a rien de commun avec le virage métachromatique.

Un bon moyen pour reconnaître si un élément histologique est chromotrope consiste à colorer par une solution aqueuse relativement concentrée de colorant (par exemple par du bleu de toluidine à 0,5 pour 100), puis, après rinçage abondant à l'eau distillée, à monter la préparation dans la gomme-sirop d'APATHY. Ce milieu est nettement défavorable à la forme métachromatique; après quelques heures, tous les éléments « orthochromatiques » (qui auraient pu adsorber le colorant sous sa forme métachromatique) ont viré vers la teinte normale, bleue, tandis qu'au contraire, les éléments réellement chromotropes ont conservé leur nuance violette ou pourpre.

Le fait important, mis en évidence par LISON, c'est que le « virage métachromatique » constitue une véritable réaction micro et histochimique spécifique. Ce qui a permis d'étayer solidement la démonstration, c'est la constatation que la métachromasie n'est pas seulement un phénomène purement tinctorial, mais peut être reproduite dans des tubes à essai, avec des solutions de substances pures.

Ceci étant acquis, l'auteur a reconnu que les propriétés chromotropes du cartilage, connues depuis longtemps, sont dues à sa teneur en acide chondroitinesulfurique : une solution pure d'acide chondroitinesulfurique fait virer instantanément une solution d'un colorant métachromatique. De même, le mucus doit sa métachromasie à la présence de l'acide mucœitinesulfurique. Ces deux substances étant des esters sulfuriques de polysaccharides, l'auteur a recherché si d'autres substances naturelles, de composition analogue, ne présentent pas les mêmes propriétés. Il en est bien ainsi : l'agar, le carrageen, les géloses extraites de *Ceramium rubrum*, *Delesseria sanguinea*, *Polysophonium fastigiata*, *Plumaria elegans*, *Asco-phylum nodosum*, *Laminaria digitata*, qui toutes sont des esters sulfuriques de polysaccharides, donnent la réaction métachromatique. D'autre part, ce sont les seules substances chimiquement définies qui, *in vitro*, se révèlent douées de propriétés chromotropes. Un grand nombre de substances ont été essayées, tant inorganiques qu'organiques — et parmi celles-ci, au moins les têtes de série des grandes fonctions (alcools, cétones, aldéhydes, acides, amines, phénols, éthers) et des représentants des substances biologiques importantes (protides, lipides glucides,); — aucune n'est chromotrope.

Pour renforcer l'idée que la réaction métachromatique pourrait être l'apanage exclusif des esters sulfuriques de poids moléculaire élevé, deux séries d'expériences ont été effectuées.

Dans la première, on a cherché à savoir ce qui se passerait si, à une substance métachromatique, on enlevait le radical sulfurique, sans rien



changer au reste de la molécule. L'expérience, faite sur l'acide chondroïtinesulfurique, a donné des résultats concluants : le pouvoir chromotrope disparaît quand on enlève le radical sulfurique.

Dans la deuxième série, on a choisi des substances non chromotropes, renfermant au moins un radical alcoolique R-OH, et l'on a transformé ce radical en l'ester sulfurique correspondant R-OSO<sup>3</sup>H. On a ainsi préparé les esters sulfuriques de l'alcool éthylique, du  $\beta$ -naphtol, du thymol, de l'acide digallique, du cholestérol, du glucose, du saccharose, de l'amidon, de l'acide arabique, de la cellulose, de la chitine, du glycogène. L'étude de ces dérivés donne des résultats très intéressants. Alors que les substances mères n'ont aucun pouvoir chromotrope, leurs esters sulfuriques sont doués de propriétés métachromatiques énergiques, à condition que leur poids moléculaire soit assez élevé. Pour les esters des polysaccharides colloïdaux étudiés (amidon, gomme arabique, cellulose, chitine, glycogène), la sensibilité de la réaction métachromatique est énorme; dans des conditions favorables, on peut voir se produire un virage dans une solution de bleu de toluidine, en y ajoutant un dix-millième de milligramme d'ester, et il est possible de déceler la présence de celui-ci dans des solutions diluées au cinq-millionième. Pour des esters de poids moléculaire moindre, la réaction devient bien moins accentuée. Pour le cholestérylsulfate de sodium, la réaction est encore assez sensible; elle l'est moins pour les esters du saccharose, du glucose, de l'acide digallique; elle devient très difficilement perceptible pour l'ester sulfurique du thymol; elle est négative pour les esters du naphtol et de l'alcool éthylique.

On peut donc conclure que le virage métachromatique d'un colorant est une véritable réaction chimique spécifique; elle est l'apanage exclusif des esters sulfuriques de poids moléculaire élevé.

Grâce à cette réaction, il sera donc possible de suivre au sein des tissus le métabolisme de ces substances.

Dans ces dernières années, l'intérêt des esters sulfuriques en biologie s'est révélé beaucoup plus grand qu'on ne l'avait cru tout d'abord, ainsi que vient de l'écrire LEVENE. Ces substances apparaissent, en effet, singulièrement répandues dans tout le domaine des êtres vivants. On peut les classer en trois groupes. Le premier comprend les sulfoconjugués des composés phénoliques et indoliques; ce sont essentiellement des produits d'élimination des organismes animaux. Le deuxième groupe comprend les esters sulfuriques des sénevol, substances qui sont exclusivement d'origine

végétale. Enfin, le troisième comprend les esters sulfuriques des polysaccharides. Seules les substances du troisième groupe ont un poids moléculaire suffisant pour donner la réaction métachromatique. Aussi, quoique la réaction métachromatique indique seulement la présence d'un ester sulfurique de poids moléculaire élevé, en pratique, elle servira à déceler les esters sulfuriques des polysaccharides; c'est pourquoi nous avons placé l'étude de la métachromasie dans le chapitre des glucides.

En biochimie, les seuls esters sulfuriques que l'on ait identifié de façon certaine dans les organismes animaux sont l'acide chondroïtinesulfurique et l'acide mucoïtinesulfurique. Ils sont extrêmement répandus dans tous les tissus de soutien, chez les Vertébrés comme chez les Invertébrés (*voir* à ce sujet de récentes études de GARRAULT) et leur importance dans le métabolisme de ces tissus paraît grande. Nous ne doutons pas, qu'au moyen de la réaction métachromatique, on n'arrive à préciser plus exactement encore leur localisation.

Signalons, à ce sujet, que, par voie histochimique, il est possible de résoudre simplement un problème qui a longtemps divisé les auteurs. On a pensé (MÖRNER, SCHMIEDEBERG et bien d'autres) qu'un des constituants essentiels de l'amyloïde est l'acide chondroïtine-sulfurique. Effectivement, d'organes atteints d'amyloïdose, on a pu extraire chimiquement cette substance. Mais, pour HANSEN, l'acide extrait proviendrait, non des nodules d'amyloïde, mais des tissus environnants.

L'étude histochimique donne raison à HANSEN. La substance amyloïde n'est pas douée de propriétés chromotropes. Elle ne fait virer aucun des colorants métachromatique, sauf toutefois le violet de méthyle. Or, toute substance chromotrope agit sur tous les colorants métachromatiques, sans exception. Il est encore difficile à l'heure actuelle d'expliquer la coloration rouge de l'amyloïde par le violet de méthyle, et d'autant plus que ce colorant, qui se déméthyle spontanément, est toujours constitué par un mélange de dérivés méthylés de la fuchsine, et n'a jamais pu être obtenu à l'état pur. Cette coloration n'a d'ailleurs aucun des caractères fondamentaux de la réaction métachromatique, tels qu'on les a définis plus haut; notamment, elle n'est pas influencée par l'élévation de la température, ni par l'acidité du milieu.

Enfin, la connaissance exacte de la valeur de la métachromasie permet d'élucider la nature chimique de certains éléments chromotropes des tissus, dont l'extraction n'avait pu être réalisée et dont la constitution restait toujours discutée. Nous citerons, par exemple, les granulations des mastocytes, et la métachromatine des protistes. Ce n'est pas le lieu de discuter ici toutes les hypothèses qui ont été avancées à leur sujet, le plus souvent sans base expérimentale bien sérieuse. La réaction méta-

chromatique démontre qu'elles sont constituées par un ester sulfurique de poids moléculaire élevé, vraisemblablement d'un polysaccharide.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

LISON (L.), *Bull. Acad. Roy. belg. Classe Sciences*, 19, 1933, p. 1332; 20, 1934, p. 1160  
*Biol.*, 118, 1935, p. 821; *Arch. Biol.*, 46, fasc. 4, 1935 (voir Bibliographie plus étendue dans ce dernier article).

=====

## SECTION V.

### Pigments.

---

## CHAPITRE XV.

### PIGMENTS.

---

L'étude des pigments constitue certainement un des plus importants chapitres de l'Histochimie. De bonne heure, la présence dans les tissus d'inclusions naturellement colorées a attiré l'attention des biologistes, et des travaux en nombre considérable se sont succédés pour décrire leur morphologie, élucider leur genèse, déterminer leur constitution chimique, éclaircir leur rôle dans le métabolisme général des individus.

Dans ce qui va suivre, nous n'envisagerons pas le problème des pigments dans sa généralité. La question exigerait des développements absolument hors de proportion avec les dimensions de cet ouvrage. Notre exposé n'aura donc pas le moins du monde la prétention d'être complet.

Nous négligerons systématiquement un grand nombre de pigments importants, soit qu'on ne les rencontre guère dans le règne animal (pigments appartenant aux groupes des anthoxanthines, anthocyanes, dérivés du pyrane, du xanthone, de l'isoquinoléine, de la phénazine), soit qu'ils se rencontrent dans le règne animal, mais de façon épisodique seulement (dérivés de l'indol, pigments puriques, turacine, hémérythrine, hémocyanine, etc.), ou bien qu'ils ne soient pas accessibles à la recherche histochimique (Atmungsferment, etc.). Pour l'étude détaillée et la bibliographie concernant les pigments, nous renvoyons au beau livre de VERNE, qu'on pourra compléter au point de vue plus spécialement chimique par la récente monographie de BERGMANN.

Nous étudierons successivement : I, les Carotinoïdes; II, les Chromo-lipoïdes; III, les pigments d'origine protidique (Mélanines); IV, quelques

pigments à noyau tétrapyrrolique, à savoir : 1<sup>o</sup> l'hémoglobine et ses dérivés ; 2<sup>o</sup> les porphyrines.

## I. — CAROTINOÏDES.

On sait que les pigments de ce groupe sont des hydrocarbures non saturés et non azotés. Par leur constitution chimique, ils sont absolument différents des corps gras ; cependant, comme dans les organismes on les rencontre presque toujours à l'état de solution dans des lipides, on les a souvent confondus avec ceux-ci.

L'ancien terme « lipochrome », par lequel on désignait anciennement ces pigments, exprimait cette confusion ; actuellement « lipochrome » doit être défini : une solution d'un carotinoïde dans un corps gras (celui-ci incolore par lui-même).

Le terme « lutéines » qui désignait plus spécialement les lipochromes de couleur jaune doit être écarté, comme ne répondant plus à l'existence d'un composé chimiquement défini.

A. *Caractères physiques.* — 1<sup>o</sup> Pigments généralement jaunes ou rouges, présentant en solution dans des solvants appropriés des spectres d'absorption caractéristiques.

2<sup>o</sup> Insolubles dans l'eau, la glycérine, le formol, les solutions aqueuses diluées d'acides et d'alcalis.

3<sup>o</sup> Solubles assez lentement dans l'alcool froid, plus vite dans le chloroforme, l'acétone, le toluol, l'éther de pétrole. Solubilité considérable dans le sulfure de carbone (1).

4<sup>o</sup> Cristallisation : procédé utilisé en botanique, inapplicable en Histo-chimie animale (VERNE).

B. *Caractères chimiques.* — 1<sup>o</sup> Oxydabilité. — S'oxydent aisément en se décolorant : a, placer le tissu dans une cloche contenant de l'oxygène ou même de l'air, à une douce chaleur et à la lumière : le pigment se décolore mais très lentement ; b, plonger le tissu dans une solution diluée (1 pour 100 par exemple) d'acide chromique ou de bichromate de potassium : le pigment blanchit rapidement.

---

(1) Ils résistent donc parfois assez bien à l'inclusion à la paraffine, si celle-ci est effectuée assez rapidement.

2<sup>o</sup> Action de l'acide sulfurique. — L'acide sulfurique concentré donne avec tous les carotinoïdes une coloration bleue intense, puis détruit le pigment.

3<sup>o</sup> Composé iodé. — Le dérivé iodé des carotinoïdes est violet foncé avec, en lumière réfléchie, des reflets métalliques. Cette réaction est très caractéristique. Traiter le pigment ou la coupe le contenant par une solution iodo-iodurée (iode, 1 ; iodure de K, 7 ; H<sup>2</sup>O, 100), constater l'apparition d'une couleur violette foncée.

C. *Diagnostic différentiel.* — La confusion peut être faite avec des chromolipoïdes, rarement avec des mélanines très claires. On identifiera toujours aisément les carotinoïdes par les réactions à l'acide sulfurique et à l'iode, qui sont très caractéristiques. On ne se fierà pas trop aux caractères de solubilité, qui peuvent être fortement influencés par des impuretés. On n'attribuera pas non plus trop d'importance aux réactifs généraux des lipides : les carotinoïdes purs donnent des réactions négatives, mais leurs produits d'oxydation ou le substratum gras les tenant en dissolution peuvent fournir des réactions positives.

*Annexe : Carotinalbumines.* — Ce sont des pigments formés d'une combinaison entre un carotinoïde et un protide.

Pigments de couleur très variable (noir, bleu, vert, violet, brun, rouge), solubles dans l'eau en donnant une solution colloïdale, insolubles dans tous les solvants organiques. Présentent un caractère très spécial qui les fait reconnaître aisément : tous les agents physiques (chaleur) ou chimiques (fixateurs) agissant sur les protides précipitent l'albumine et mettent le carotinoïde en liberté : l'exemple le plus frappant est la carapace du homard, contenant une carotinalbumine bleue que l'ébullition scinde en un protide et un carotinoïde rouge.

## II. — CHROMOLIPOÏDES.

Les chromolipoïdes de CIACCIO (*braunes Abnutzungspigment* des auteurs allemands, *lipofuscines* de BORST) sont des pigments constitués par des corps gras ou des dérivés de ceux-ci. On notera la différence entre les carotinoïdes et les chromolipoïdes. Les premiers sont généralement dissous dans des corps gras, leur constitution en étant très différente

(hydrocarbures); les chromolipoïdes sont des corps gras ou des dérivés de corps gras, colorés par eux-mêmes (1). La constitution chimique des chromolipoïdes est mal connue, car leur extraction est hérissée de difficultés. D'après les recherches de HUECK, MULON, CIACCIO, ce sont des pigments qui résultent de l'oxydation de corps gras. Au fur et à mesure que l'oxydation se poursuit, leur coloration propre devient de plus en plus foncée, cependant que leur affinité pour les réactifs colorants des lipides reste à peu près inchangée; en même temps, leur solubilité dans les solvants des corps gras diminue jusqu'à devenir nulle. On les rencontre très fréquemment dans les tissus animaux, par exemple dans les cellules nerveuses, dans les cellules interstitielles du testicule, dans la surrénale, dans les tubes rénaux de nombreux Vertébrés inférieurs; ils sont extrêmement fréquents chez les Invertébrés. Histologiquement, ils forment une classe à caractères bien tranchés.

A. *Caractères physiques.* — 1<sup>o</sup> Pigments jaunes, bruns ou noirs. Pas de spectre caractérisé.

2<sup>o</sup> Insolubles dans l'eau, les solutions acides ou alcalines. Solubilité dans les solvants des corps gras très variable, suivant leur état d'oxydation; généralement solubilité très réduite ou nulle et donc conservation aisée sur les coupes à la paraffine.

B. *Caractères chimiques.* — 1<sup>o</sup> Réaction à l'iode négative; l'acide sulfurique concentré les colore souvent en rouge brun, jamais en bleu.

2<sup>o</sup> Colorables par le Noir soudane B, le Soudan III et le Scharlach, souvent même après inclusion à la paraffine.

3<sup>o</sup> Les autres réactions des corps gras (acide osmique, bleu de Nil, FISCHLER, SMITH-DIETRICH) sont inconstantes.

D'après CIACCIO, on peut distinguer les uns des autres : *a*, chromolipoïdes provenant de phosphatides : Scharlach et Soudan faibles; SMITH-DIETRICH positif après courte chromisation, FISCHLER négatif; *b*, chromolipoïdes provenant d'acides gras : Soudan et Scharlach fortement positif; SMITH-DIETRICH ne réussit qu'après longue chromisation; FISCHLER positif.

4<sup>o</sup> Décolorés par l'action très prolongée de l'eau oxygénée.

5<sup>o</sup> Ne réduit pas le nitrate d'argent ammoniacal (réaction argentaffine

---

(1) L'ancienne classe de « lipochromes » est donc actuellement scindée en *carotinoïdes* d'une part et *chromolipoïdes* d'autre part.

négative), et ne s'imprègnent pas par les techniques d'imprégnation argentique.

C. *Diagnostic différentiel*. — 1<sup>o</sup> Avec carotinoïdes : ne donnent pas les réactions à l'iode et à l'acide sulfurique; sont beaucoup moins solubles dans les solvants organiques.

2<sup>o</sup> Avec mélanines : ne se dissolvent pas dans les alcalis, se colorent par Soudan et Scharlach; ne réduisent pas l'argent ammoniacal (caractéristique).

Méthode de HUECK : colorer par le bleu de Nil; traiter ensuite les coupes 24 heures par l'eau oxygénée à 3 pour 100 (— H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du commerce à 12 volumes) : les grains de mélanine sont décolorés, les grains chromolipoides apparaissent en bleu.

3<sup>o</sup> Avec pigments d'origine hématiche; pas toujours facile : les chromolipoides donnent en effet parfois, mais pas souvent, les réactions du fer avec ou sans démasquage.

### III. — MÉLANINES.

Les mélanines sont des pigments jaunes, bruns ou noirs, de composition chimique encore mal définie, très résistants aux agents chimiques, résultant d'une action fermentative sur des produits de désintégration des protides.

Ils sont extrêmement répandus chez les êtres vivants et soulèvent un nombre imposant de problèmes : constitution chimique, origine, mécanisme de la mélanogenèse, signification physiologique, etc.

Leur très large répartition zoologique et leur extrême inaltérabilité a fait qu'ils se sont imposés de bonne heure à l'attention des biologistes et particulièrement des morphologistes. C'est à tel point que lorsqu'un morphologiste parle de pigment sans spécifier davantage, c'est presque toujours de mélanine qu'il s'agit. A plusieurs endroits de ce livre, on a effleuré quelques questions relatives aux mélanines et particulièrement à la mélanogenèse (*voir* p. 155 et p. 292). On rappellera ici les principaux caractères qui permettent de les identifier.

A. *Caractères physiques*. — 1<sup>o</sup> Pigments variant du noir au jaune clair en passant par toute la gamme des bruns, quelquefois un peu violacés.



2<sup>o</sup> Insolubilité totale dans tous les solvants minéraux et organiques connus.

B. *Caractères chimiques.* — 1<sup>o</sup> Extrême résistance envers tous les agents chimiques; ne sont pas modifiés par les acides, même très concentrés. Sont cependant dissoutes avec plus ou moins de facilité par les lessives alcalines (NaOH, K OH) concentrées.

2<sup>o</sup> Sont décolorées assez facilement par les oxydants les plus variés. Cette décoloration (*dépigmentation*) est une opération fréquemment réalisée en histologie dans le but de se débarrasser du pigment masquant par son abondance les structures cytologiques. La dépigmentation par les oxydants est très caractéristique des mélanines et peut être employée comme réaction histochimique.

*Dépigmentation par le chlore* (MAYER). — 1<sup>o</sup> Au fond d'un flacon, déposer des cristaux de chlorate de potasse, ajouter de l'alcool à 50°; 2<sup>o</sup> au moyen d'une pipette, faire parvenir au contact du lit de chlorate 1 ou 2<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'acide chlorhydrique concentré; 3<sup>o</sup> le chlore se répand dans le liquide; y plonger les coupes jusqu'à blanchiment du pigment (généralement 24 heures).

*Dépigmentation par l'acide chlorique* (GRYNFELT et MESTREZAT). — 1<sup>o</sup> A 15<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'alcool à 90° ajouter 2<sup>cm<sup>3</sup></sup> de la solution d'acide chlorique préparée comme suit : dissoudre à 50°, 50<sup>g</sup> de chlorate de baryum dans 70<sup>cm<sup>3</sup></sup> de H<sup>2</sup>O. Après refroidissement, ajouter par petites portions 8<sup>cm<sup>3</sup></sup>,5 d'acide sulfurique pur dilué dans 40<sup>cm<sup>3</sup></sup> de H<sup>2</sup>O. Le sulfate de baryum précipite et l'acide chlorique reste en dissolution. Après repos, décanter en flacon bouché à l'émeri et conserver à l'obscurité; 2<sup>o</sup> laisser 10 à 12 heures en contact; rincer à l'alcool puis à l'eau. Ce procédé est un des meilleurs.

*Dépigmentation au brome* (MAWAS). — Traiter les coupes 12 à 24 heures par une solution aqueuse de brome à 20 gouttes par 100<sup>cm<sup>3</sup></sup>.

*Dépigmentation à l'eau oxygénée.* — Traiter les coupes par l'eau oxygénée du commerce à 12 volumes, neutralisée. Ce procédé, très lent, demande parfois plusieurs semaines.

*Dépigmentation au diaphanol* (SCHULZE). — Le diaphanol (acide chlordingoxyacétique), d'après SCHULZE, dépigmente admirablement sans léser aucunement les tissus. Traiter 24 heures à l'obscurité dans un flacon fermant hermétiquement.

*Autres procédés : Acide chromique* (MAWAS). — Faire agir sur les coupes de l'acide chromique de 1 à 2 pour 100; dure souvent assez longtemps, décolle quelquefois les coupes.

*Permanganate de potassium* (ALFIERI). — 1<sup>o</sup> Traiter les coupes par le permanganate de K à 1 pour 1000, 2 à 24 heures; 2<sup>o</sup> laver à grande eau; 3<sup>o</sup> traiter par l'acide oxalique à 3 pour 1000; 4<sup>o</sup> laver.

3° Enfin, propriété très caractéristique, les mélanines et les propigments mélaniques sont *argentaffines* : elles réduisent le nitrate d'argent ammoniacal directement, sans l'intervention d'aucun réducteur (*voir* définition de l'argentaffinité à l'article *phénols*). Sur cette propriété est basée la méthode de MASSON pour la mise en évidence de la mélanine. En outre, elles s'imprègnent facilement par toutes les méthodes d'imprégnation argentique (FONTANA, BIELCHOWSKI, DEL RIO-HORTEGA, ACHUCARRO, etc.). Cette argentophilie est évidemment beaucoup moins caractéristique que l'argentaffinité; il est donc préférable d'employer, pour la recherche histochimique du pigment mélanique, la réaction argentaffine d'après MASSON (*voir* technique, p. 148).

C. *Diagnostic différentiel*. — L'extrême résistance des mélanines envers les solvants et réactifs chimiques, leur décoloration par les oxydants et leur pouvoir réducteur envers le nitrate d'argent ammoniacal sont des propriétés très caractéristiques, qui suffisent à établir la nature mélanique d'un pigment.

#### IV. — PIGMENTS A NOYAU TÉTRAPYRROLIQUE ET LEURS DÉRIVÉS.

##### 1. *Hémoglobine et ses dérivés*.

###### I. *Hémoglobine*.

L'hémoglobine est un pigment qui n'est pas très facile à déceler histochemiquement. Presque toujours, il est à l'état dissous, soit dans une cellule, soit dans un plasma; sa solubilité dans tous les solvants rend sa fixation malaisée.

D'autre part, ses caractères physiques sont trop peu caractéristiques. L'appréciation de ses bandes d'absorption au microspectroscope est souvent très malaisée sur les coupes et ne permet d'ailleurs pas une localisation précise.

La détection histochimique de l'hémoglobine s'effectue le plus commodément en se basant sur ses propriétés peroxydasiques.

Le réactif le plus employé est la benzidine. Elle a été utilisée sur des tissus frais principalement par M. PRENANT et SLONIMSKI; sur des pièces fixées, des procédés sont dus à LEPEHNE, LISON, SLONIMSKI et LAPINSKI.

*Méthode de LISON*. — 1° Fixer 24 heures par le formol-plomb (formol neutre, 10; acétate de plomb, 2.5; H<sup>2</sup>O, 100) des pièces très minces, afin de transformer l'hémoglobine

en hématine (1); 2° couper à la paraffine ou, de préférence, par congélation; traiter les coupes quelques minutes par l'acide nitrique dilué, pour se débarrasser des précipités de plomb; 3° plonger les coupes pendant 5 minutes à 60° dans le réactif ainsi préparé : dissoudre 0<sup>g</sup>,1 de benzidine dans 10<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'eau distillée bouillante; compléter jusqu'à 30<sup>cm<sup>3</sup></sup> au moyen d'eau oxygénée et réchauffer jusqu'à 60°; un trouble dans la solution ne gêne pas; 4° rincer à l'eau à 60° puis à l'eau froide; 5° coloration de fond au vert de méthyle (2 pour 1000); 6° monter les coupes à congélation dans la gomme-sirop d'APATHY. Les coupes à la paraffine sont essorées au buvard, puis traitées par l'isosafrol  $\alpha$  jusqu'à éclaircissement complet (une demi-heure généralement). Toluène. Monter à l'huile de cèdre. Hémoglobine en brun foncé; noyaux verts.

*Méthode de SLONIMSKI-LAPINSKI.* — 1° Fixer 15 à 24 heures dans : ferricyanure de K, 2<sup>g</sup>,5 à 4<sup>g</sup>; formol, 10 à 20<sup>cm<sup>3</sup></sup>; H<sup>2</sup>O, 100. L'hémoglobine est ainsi transformée en méthémoglobine; 2° laver 24 heures à l'eau courante; 3° inclure, de préférence à la celloidine-paraffine d'après PETERFI; 4° traiter les coupes déparaffinées par le réactif suivant : 0<sup>g</sup>,1 à 0<sup>g</sup>,2 de benzidine sont dissous dans 2 à 3<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'alcool à 96°; verser la solution dans une boîte de PETRI contenant 10<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'alcool à 70°, puis ajouter 2<sup>cm<sup>3</sup></sup> de perhydrol (MERCCK) à 4 pour 100 et 1<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'une solution de benzidine dans l'acide acétique concentré; 4° rincer dans l'alcool à 70°; 5° coloration de contraste par le vert de méthyle ou le rouge neutre; 6° monter rapidement la série des alcools, xylol-baume. Hémoglobine en brun.

D'autres réactifs de peroxydases peuvent être utilisés. Très recommandables sont les zinc-leucos de LISON, qui donnent des préparations bien plus claires et plus lisibles que la benzidine.

Fixer, soit au formol-plomb de LISON, soit au formol-ferricyanure de SLONIMSKI-LAPINSKI. Couper par congélation. Traiter les coupes par une solution d'un zinc leuco (préparation, voir p. 268) fraîchement filtrée et additionnée extemporanément de 10 pour 100 d'eau oxygénée du commerce. Rinçage. Coloration de fond à volonté. Montage au sirop d'APATHY ou au baume.

Ces méthodes donnent souvent de belles préparations; mais un résultat négatif ne prouve pas l'absence d'hémoglobine; on observe quelquefois des échecs partiels ou totaux, dus à des causes encore indéterminées. D'après notre expérience personnelle, on obtient régulièrement de bons résultats sur coupes par congélation ou sur pièces entières; sur coupes à la paraffine, les résultats sont beaucoup plus irréguliers.

La réaction peroxydasique n'est pas spécifique de l'hémoglobine. Dans le groupe des pigments tétrapyrroliques, elle est donnée par l'hémoglobine, l'oxyhémoglobine, la carboxyhémoglobine, la méthémoglobine, l'hémoglobine oxyazotique, l'hématine et l'hémochromogène; elle n'est pas donnée par l'hématoporphyrine, ni l'hématoïdine, ni l'hématosidérine.

---

(1) Qui donne également la réaction.

De plus, elle peut être donnée par les peroxydases des tissus. La distinction est généralement facile à faire, grâce à la thermostabilité des propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine et de ses dérivés : un chauffage à 180° pendant 20 minutes ne les altère pas, alors que toutes les autres peroxydases des tissus sont détruites. Signalons cependant qu'il existe d'autres peroxydases thermostables, notamment celles qui apparaissent lors de l'autolyse des tissus (*voir* p. 283). C'est pourquoi les réactifs à la benzidine donnent souvent des réactions positives au niveau des noyaux cellulaires en dehors de la présence d'hémoglobine; le réactif au zinc-leuco ne donne pas lieu à de telles pseudoréactions.

Signalons, pour mémoire, les caractères de colorabilité de l'hémoglobine, qui n'ont naturellement aucune valeur spécifique : affinité marquée pour l'éosine, la safranine, l'orangé, l'hématoxyline ferrique de HEIDENHAIN. Citons également pour mémoire une méthode de coloration due à OKAJIMA, basée sur une affinité pour la laque molybdique de l'alizarine.

*Dérivés de désintégration de l'hémoglobine.* — On connaît le schéma de la dégradation de l'hémoglobine *in vitro* : un premier stade produit la séparation de la partie protidique de celle-ci, la globine, et d'un groupement pigmentaire prosthétique, l'hématine. En poussant plus loin, celle-ci se dédouble en fer et en hématorporphyrine. Au sein des tissus, cette dégradation ne s'effectue pas suivant le même processus; en effet, l'hématine n'apparaît que très exceptionnellement dans les organismes et l'hématorporphyrine est un produit purement artificiel, qu'on n'a jamais trouvé dans un organisme animal vivant. Les produits de dégradation normaux de l'hémoglobine sont d'une part un pigment ferrugineux, l'hémosidérine, et d'autre part un pigment non ferrugineux; ce dernier peut être un pigment biliaire, et dans ce cas sa production se fait presque toujours sans apparition de stades figurés, ou bien un pigment figuré, l'hématoïdine, d'ailleurs très voisin des pigments biliaires. Dans des circonstances particulières, comme la malaria, on peut voir apparaître un pigment spécial, le pigment malarique. Enfin, dans certains foyers hémorragiques, on a vu prendre naissance un troisième pigment, l'hémofuscine, qui n'est pas autre chose qu'un pigment chromolipoïde.

II. *Hémosidérine* (rubigine, pigment ocre, ferratine, ferrine, sidérine).

Ce pigment est caractérisé par la présence de fer facilement décelable.

On a pas mal discuté sur sa constitution chimique. Beaucoup ont admis qu'il s'agissait d'un albuminate de fer, ou bien d'un composé formé par l'union assez lâche d'un protide et d'oxyde ferrique ou d'oxyde ferreux, AUSCHER et LAPICQUE ont isolé de sang extravasé un pigment formé d'oxyde de fer hydraté ( $\text{Fe}^2\text{O}^3 + 3 \text{H}^2\text{O}$ ) contenant en outre une petite quantité de matière organique qu'on ne pouvait en séparer sans l'altérer profondément; ils l'ont considéré comme l'hémosidérine. Récemment, utilisant une très ingénieuse méthode de BEHRENS destinée à isoler à l'état pur les éléments cellulaires, ASHER a isolé l'hémosidérine. Le pigment renferme le fer, non pas à l'état d'oxyde, mais à l'état d'hydrate  $\text{Fe}(\text{OH})^3$ ; d'après l'auteur, ce fer doit être désigné sous le nom d'hémosidérine; cependant, les granulations pigmentaires isolées renferment, outre le fer, des éléments protidiques (25-36 pour 100) et du phosphate de calcium.

A. *Caractères physiques.* — Pigment de couleur jaune, ocre ou rouille; situation le plus généralement intracellulaire; insoluble dans l'eau et les solvants organiques usuels, soluble dans les acides et insoluble dans les alcalis, même concentrés.

B. *Caractères chimiques.* — Le plus caractéristique est la présence de fer, généralement masqué, mais toujours aisément démasquable (*voir* techniques de démonstration du fer au Chapitre VII). Les agents oxydants ne le décolorent pas et la réaction argentaffine est toujours négative. Les colorants spécifiques des corps gras (noir Soudane B, Soudan III, Scharlach, etc.) ne le colorent pas.

C. *Diagnostic différentiel.* — 1<sup>o</sup> Avec chromolipoides; parfois malaisé quand ceux-ci donnent la réaction du fer (*voir* à l'article Chromolipoides); 2<sup>o</sup> avec mélanines (*voir* à l'article Mélanine); 3<sup>o</sup> avec hématoïdine (*voir* ci-dessous).

### III. *Hématoïdine.*

L'hématoïdine a été décrite pour la première fois par VIRCHOW dans de vieux foyers hémorragiques. Contrairement à l'hémosidérine, elle n'est presque jamais intracellulaire; c'est un produit nettement pathologique, alors que l'hémosidérine apparaît dans beaucoup d'organes à l'état normal. Sa principale caractéristique, comme l'avait déjà vu VIRCHOW, est de donner la réaction de GMELIN.

A l'heure actuelle, la plupart des auteurs semblent admettre l'identité de l'hématoïdine et de la bilirubine; ce serait donc un isomère de l'hématoporphyrine. Cependant, des opinions différentes ont été émises : HUECK, tout en la rapprochant de la bilirubine, pense que l'hématoïdine contient encore des substances lipoides. CLAUDE et LOYER, qui appellent l'hématoïdine « pigment jaune », ont cru qu'elle est un pigment ferrugineux dont le fer serait aussi solidement « masqué » que dans l'hémoglobine et par conséquent non décelable. Ces idées ne semblent pas devoir être retenues.

A. *Caractères physiques.* — Se présente soit sous forme amorphe, en granulations ou en boules, ou bien sous forme cristalline, en plaquettes rhombiques, en tablettes ou en aiguilles réunies souvent en faisceaux. Insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther, assez soluble dans le chloroforme et le sulfure de carbone. Insoluble dans les acides dilués, soluble dans les alcalis.

B. *Caractères chimiques.* — Ne donne pas les réactions du fer; n'est pas décolorée par les agents oxydants; ne réduit pas le nitrate d'argent ammoniacal. Donne la réaction de GMELIN : traitée par de l'acide nitrique concentré, se dissout progressivement en s'entourant d'anneaux colorés, de couleurs diverses, rouges, bleus et verts. Cette réaction est capricieuse. On l'obtient régulièrement avec l'hématoïdine cristalline; avec celle qui est à l'état amorphe, il est beaucoup plus difficile de l'obtenir et, souvent, on ne peut reconnaître qu'un anneau plus ou moins rouge.

#### IV. *Bilirubine et biliverdine.*

Ces deux pigments, l'un rouge brunâtre, l'autre vert, peuvent se rencontrer, surtout à l'état pathologique, sous forme figurée dans les cellules ou les tissus. Leurs réactions sont celles qui viennent d'être décrites pour l'hématoïdine.

#### V. *Pigment malarique.*

Sous l'action des Hématozoaires de la malaria, l'hémoglobine se dégrade en donnant naissance à un pigment spécial, de constitution chimique mal connue. Il est presque toujours intracellulaire et ressemble assez, au point de vue morphologique, à de la mélanine. Il s'en distingue surtout par la réaction argentaïne, qui est négative.

A. *Caractères physiques.* — Se présente sous forme de petites granulations

intracellulaires, noires ou brunâtres. Insoluble dans l'eau et les solvants organiques usuels. Insoluble dans les solutions aqueuses acides; se dissout en 24 heures dans l'alcool sulfurique à 40-50°. Soluble dans les solutions alcalines. Soluble dans le sulfure jaune d'ammonium.

B. *Caractères chimiques.* — Ne présente pas les réactions usuelles du fer. Il y a des indications contradictoires au sujet de l'action des agents oxydants tels que l'eau oxygénée; les uns prétendent que le pigment malarique se décolore, les autres qu'il reste inchangé. La réaction argentaffine est négative, de même que les colorations par les colorants spécifiques des lipides.

C. *Diagnostic différentiel.* — 1° Avec mélanine : la solubilité très aisée dans les solutions alcalines diluées, la solubilité dans le sulfure d'ammonium, la réaction argentaffine négative permettent de distinguer aisément le pigment paludéen de la mélanine.

2° Avec chromolipoides : les caractères de solubilité dans les solutions alcalines et le résultat négatif des colorants spécifiques de lipides sont des signes distinctifs très caractéristiques.

3° Avec précipités formolés : les fixateurs formolés, surtout assez concentrés, produisent facilement dans les tissus des précipités brunâtres désignés par les auteurs allemands sous le nom de « Formolniederschläge ». Ce pigment artificiel, qui semble bien résulter d'une action du formol sur l'hémoglobine des tissus, se rapproche du pigment paludéen par beaucoup de caractères. Comme celui-ci, il est soluble dans les alcalis même dilués surtout en solution alcoolique (les procédés de VEROCAY et de KARDASEWITSCH, qui consistent à traiter les coupes, soit par de l'alcool à 70° renfermant 0,1 pour 100 de KOH, soit par de l'alcool à 70° additionné de 1 à 3 pour 100 de NH<sup>3</sup>, sont basés sur cette propriété et sont utilisés pour se débarrasser des précipités dus au formol); insoluble dans les autres solvants, il ne donne pas les réactions du fer, ni des corps gras, ni la réaction argentaffine.

La distinction entre pigment paludéen et formol-pigment se fera surtout en se basant sur leur morphologie. Le pigment formolé est réparti de façon irrégulière dans les tissus et peut apparaître aussi bien intracellulaire qu'extracellulaire; le pigment malarique est toujours intracellulaire et n'existe que dans des cellules bien déterminées (cellules sanguines, cellules appartenant au système réticulo-endothélial).

## 2. *Porphyrines.*

Les porphyrines sont des pigments constitués essentiellement par l'union de quatre groupements pyrrol. De leurs quatre atomes d'azote, deux ont des propriétés basiques; les deux autres, des propriétés acides; les porphyrines sont capables de donner des sels complexes avec des métaux. Suivant la porphyrine envisagée, les noyaux pyrroliques portent des chaînes latérales plus ou moins substituées. On connaît des porphyrines naturelles (oo-, uro-, coproporphyrines) présentes dans les organismes normaux ou pathologiques, et des porphyrines artificielles (proto-, hémato-, méso-, étio-porphyrines, etc.) obtenues à partir de l'hématine ou de la chlorophylle.

### 1. *Méthodes d'étude histochemique des porphyrines.*

Chimiquement, les porphyrines sont caractérisées et se différencient entre elles par leurs caractères de solubilité, de cristallisation, leur point de fusion et leur spectre de fluorescence en lumière ultraviolette.

De tous ces caractères, les seuls utilisables en Histochemie sont les caractères de fluorescence et, à un degré très accessoire, les spectres d'absorption. Il n'existe aucune réaction chimique des porphyrines utilisable en Histochemie. « La recherche de la nature porphyrique d'une substance ne peut être réalisée spécifiquement que par l'examen de la fluorescence en combinaison avec la recherche microspectrale. » Une identification de l'espèce de porphyrine est dans certaines limites possible (BORST et KÖNIGSDORFFER).

Dans les tissus, les porphyrines se reconnaissent à la fluorescence *rouge* ou *orange* qu'ils présentent en lumière de WOOD (lumière ultraviolette filtrée vers 3600 Å). La plupart des fluorescences rouges que l'on rencontre dans les êtres vivants sont dues à des porphyrines (DERRIEN et TURCHINI). Cependant, ce caractère n'est pas suffisant : pour pouvoir affirmer à coup sûr qu'il s'agit bien d'une porphyrine, il est nécessaire d'étudier le spectre de la lumière de fluorescence.

Les porphyrines pures, à l'état solide, ne sont jamais fluorescentes. Ce n'est qu'en solution que la fluorescence apparaît. Les caractères spectroscopiques de leur spectre d'émission varient d'ailleurs avec le solvant envisagé : on distingue ainsi des spectres de fluorescence alcaline, neutre ou acide. Dans les tissus, les porphyrines peuvent, selon les cas, être ou ne pas être fluorescentes.



On doit distinguer avec BORST et KONIGSDORFFER la « fluorescence primaire » et la « fluorescence secondaire ». Sous le terme de fluorescence primaire, on comprend la fluorescence des tissus, des cellules ou de corps figurés se produisant sous l'action des ultraviolets sans l'adjonction de produits chimiques. On parle de fluorescence secondaire, lorsque la fluorescence n'apparaît qu'après l'action d'une substance chimique. Les substances chimiques produisant la fluorescence secondaire sont en réalité des solvants : sous leur action, la substance passe en solution et alors seulement s'illumine.

*A. Fluorescence primaire.* — Lorsqu'on examine au microscope de fluorescence (voir p. 49), de préférence en lumière incidente, une coupe de tissu ou un fragment d'organe monté dans l'eau ou la glycérine, on voit tous les tissus et organes présenter une certaine fluorescence primaire, presque toujours blanchâtre, avec différentes nuances. Cette fluorescence dite fondamentale (*Stamm* ou *Grundfluoreszenz*), observée au microspectroscope, donne un spectre continu plus ou moins large, s'étendant généralement entre le rouge et le bleu verdâtre. Lorsque des porphyrines sont présentes, dans les conditions où elles donnent une fluorescence primaire, on les voit s'illuminer en rouge ou orangé. Au spectroscope, sur le fond continu de la fluorescence fondamentale, apparaissent des bandes plus ou moins larges, situées dans le rouge. En solution pure et dans un solvant donné, la position de ces bandes est constante et caractéristique de la porphyrine étudiée; dans les tissus, cette position est quelque peu variable, mais pas assez pour qu'on ne puisse généralement l'identifier. Lorsque la fluorescence est faible, seule la bande principale apparaît. Dans le tableau suivant, inspiré des études de BORST et KONIGSDÖRFFER, nous donnons les principales valeurs des bandes de fluorescence primaire des trois porphyrines naturelles, telles qu'elles ont été observées dans les tissus animaux. Les spectres ainsi observés sont des spectres de type alcalin.

Protoporphyrine..	678-673		634-627		continu jusqu'à 500	
Uroporphyrine ..	682	674	657	649-629	622-619	592-80
		Min	Min	Min	+++	
Coproporphyrine.			648		620-611	
			+		++	

L'intensité des bandes est désignée par des +. Min signifie la position d'un minimum entre deux bandes. Les chiffres indiquent les limites

où peuvent se trouver les maxima d'intensité des bandes; en largeur, les bandes sont souvent notablement plus étendues.

*B. Fluorescence secondaire.* — Pour obtenir une fluorescence secondaire, on traite la coupe par un solvant approprié. La porphyrine passe en solution et s'illumine brillamment en orangé ou rouge. Le plus souvent, quand il s'agit d'une substance figurée, on voit celle-ci rester obscure et sa périphérie s'entourer d'un halo de diffusion illuminé. Lorsque le réactif a une réaction énergique, la dissolution s'effectue vite, le halo s'étend rapidement en largeur, la diffusion est rapide et la durée pendant laquelle l'observation est possible est courte. Lorsque le réactif est trop faible, la dissolution ne s'effectue pas. Il y aura donc intérêt à essayer l'action des réactifs à différentes concentrations. On notera que, dans les milieux alcalins, la lumière ultraviolette détruit assez rapidement les porphyrines et que, par conséquent, leur fluorescence peut s'éteindre. Les réactifs utilisables en vue de la production de fluorescences secondaires sont assez nombreux. Ce sont soit des acides : H Cl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, acide acétique, à différentes concentrations, soit des bases : K OH, NaOH, NH<sub>3</sub>, pyridine, sulfure d'ammonium. Un des réactifs les plus employés par BORST et KÖNIGSDÖRFFER est le mélange glycérine-ammoniaque dans les rapports 2-1 ou 3-1. Ce mélange, à action douce, est spécialement recommandé comme donnant des images claires et nettes. Le mélange glycérine-sulfure d'ammonium, dans les mêmes proportions, éventuellement avec addition de K OH décínormal, peut être également utilisé. Il présente en outre l'avantage de distinguer les pigments non ferrugineux des pigments ferrugineux. Ceux-ci donnent naissance à du sulfure de fer, qui apparaît noir (en lumière normale). Lorsqu'on utilise des coupes à la paraffine, les auteurs recommandent de déparaffiner la coupe au xylol, de passer directement dans la glycérine, puis de faire agir le réactif entre lame et lamelle sous le microscope; le xylol en excès ralentit encore l'action dissolvante du réactif. On commence à examiner la préparation en lumière ordinaire pour se repérer, puis on passe à l'examen en rayons ultraviolets, le contrôle s'effectuant toujours en lumière normale.

Les fluorescences secondaires, examinées au microscope, donnent naissance à des spectres de bandes. La position de ces bandes dépend du solvant employé et est alors caractéristique de la porphyrine étudiée.

Il n'est pas possible de décrire ici ces spectres de bandes : on les recherchera dans le travail de BORST et KÖNIGSDORFFER.

Lorsqu'on se trouve en présence de pigments complexes, on arrive à identifier de façon certaine la ou les porphyrines présentes dans la coupe en utilisant des méthodes de micro-extraction fractionnée. Traitant une coupe par une goutte d'un solvant approprié (éther par exemple), on constate la disparition de la porphyrine de la coupe, pendant que, dans le solvant, on la caractérise d'après ses réactions spectrochimiques. Ce procédé, très sûr et très élégant, a été employé souvent par BORST et KÖNIGSDORFFER. On ne peut détailler ici cette méthode car son application réclame le secours de nombreuses données numériques spectroscopiques dont nous ne pouvons encombrer ce livre.

## II. Quelques résultats de la recherche histochimique des porphyrines.

Le chapitre de la recherche histochimique des porphyrines, si l'on fait abstraction d'anciens travaux de STUBEL, d'ailleurs contestés par HELLER, sur la présence d'hématoporphyrine chez les Vers de terre, s'ouvre par les belles études de DERRIEN et TURCHINI. Ces auteurs démontrent, dans le tractus génital de la Poule, une sécrétion d'ooporphyrine sous forme de granulations brunâtres, s'effectuant dans les mêmes cellules qui sécrètent le calcaire coquillier. La présence dans la même cellule d'une porphyrine et de sels calcaires étant un fait assez curieux, les auteurs se demandèrent s'il n'y avait pas là plus qu'une coïncidence et si l'on ne pouvait supposer une relation entre la porphyrine et la calcification. Et en effet, plus tard, ils observèrent la présence de porphyrine dans un certain nombre d'autres organes en voie de calcification : os, dents, canalicules salivaires, etc. C'est là un premier résultat, et important, de l'histochimie des porphyrines.

D'autre part, DERRIEN et TURCHINI découvrirent la présence de porphyrine dans la glande de HARDER des Rongeurs du genre *Mus*. Cette porphyrine se présente sous forme de mottes ou de granulations d'un pigment rouge brunâtre et s'est révélée à l'examen spectrochimique comme étant de l'ooporphyrine. Les recherches de DERRIEN et TURCHINI ont été confirmées par FABRE, BOIS, BORST et KÖNIGSDORFFER. A l'heure actuelle, la glande de HARDER peut être considérée comme objet classique dans l'étude histochimique des porphyrines.

En Histopathologie <sup>(1)</sup>, la recherche histochimique des porphyrines a également fait l'objet d'importantes recherches. POLICARD décrit ainsi une porphyrine dans des sarcomes expérimentaux du Rat. La porphyrine est dite par l'auteur être de l'hématoporphyrine, mais en l'absence de mesure spectroscopique, on peut en douter, car l'hématoporphyrine est un produit artificiel. Dans la laderie du Porc, DERRIEN observe la présence de protoporphyrine dans les cysticerques, fait qui est peut-être en rapport avec l'activité calcifiante à leur niveau. FABRE et SIMONET, dans l'intoxication au sulfonal, montrent la répartition à l'état diffus dans les organes d'une porphyrine identifiée spectroscopiquement.

Le travail histochimique capital dans le domaine pathologique est le gros volume de BORST et KÖNIGSDÖRFFER. Ce livre est le protocole d'autopsie d'un cas célèbre de porphyrie congénitale <sup>(2)</sup>, le cas MATHIAS PETRY, déjà étudié de la façon la plus approfondie par H. FISCHER, O. SCHUMM et PAPPENDIECK au point de vue chimique, par H. GUNTHER et H. WEISS au point de vue clinique. L'étude de BORST et KÖNIGSDÖRFFER est faite de la façon la plus fouillée et la plus rigoureuse; aussi le travail de ces deux auteurs dépasse-t-il et de beaucoup ce qu'on pouvait attendre de l'examen d'un cas pathologique. Dans ce livre touffu, on trouve en effet des techniques histochimiques nouvelles délicates et rigoureuses concernant non seulement les porphyrines, mais également tous les dérivés de l'hémoglobine. On y trouve non seulement une analyse très poussée des pigments présents dans le cas PETRY, mais aussi des données précieuses sur la constitution et la recherche des pigments tétrapyrroliques et des pigments ferrugineux du métabolisme normal. On y trouve enfin, à côté d'importantes considérations sur la pathogénie de la porphyrie et sur le métabolisme histochimique des porphyrines, d'importantes recherches sur le métabolisme constructif et dégradatif des pigments sanguins. Aussi est-il difficile d'en donner une idée, même incomplète. Laissant de côté les faits et les interprétations se rapportant au cas PETRY et à la porphyrie congénitale en général, c'est-à-dire

---

<sup>(1)</sup> Des recherches encore inédites, que nous avons effectuées avec A.-P. DUSTIN et J. THOMAS ont montré que le pigment caractéristique du chlorome, dont la constitution chimique était inconnue, n'est pas autre chose qu'une porphyrine.

<sup>(2)</sup> Les auteurs français parlent généralement de « porphyrinurie ». BORST et KÖNIGSDÖRFFER préfèrent « porphyrie ». La porphyrinurie n'est en effet qu'un des symptômes de cette maladie, par ailleurs caractérisée par un trouble général du métabolisme porphyrique.

tout ce qui se rapporte à l'ordre pathologique, nous résumerons les résultats observés dans les domaines physiologique et histochimique.

1° Une dégradation de l'hémoglobine en porphyrine, fer et globine (c'est-à-dire la dégradation de l'hémoglobine telle qu'on l'obtient *in vitro*) ne peut être constatée dans l'organisme vivant. De même, on ne peut établir une dégradation de l'hémoglobine en pigment biliaire en passant par un stade porphyrine.

2° Une dégradation du cytochrome en porphyrine, fer et globine est théoriquement possible; on ne possède pas d'argument suffisant ni pour ni contre cette hypothèse.

3° La synthèse de l'hémoglobine s'effectue dans la vie embryonnaire en passant par un stade porphyrine (protoporphyrine). En effet, dans les érythroblastes de l'embryon, avant l'apparition de l'hémoglobine, on peut mettre en évidence de grandes quantités de protoporphyrine, qui disparaît au fur et à mesure que l'hémoglobine apparaît. Chez l'adulte, en cas de besoin (anémie pernicieuse) ce processus peut se reproduire. Chez l'adulte normal, les quantités de porphyrine décelable sont trop réduites pour qu'on puisse mettre en évidence avec certitude une synthèse d'hémoglobine passant par le stade porphyrine.

4° Outre les porphyrines intervenant dans le métabolisme de l'hémoglobine, et *indépendamment* de ce métabolisme, existent des porphyrines désignées sous le terme « Organporphyrine ».

La porphyrine des os et des dents (uroporphyrine) semble être synthétisée par les érythroblastes et être secondairement stockée dans les organes en voie de calcification. La porphyrine (protoporphyrine) des glandes de HARDER est soit synthétisée sur place, soit apportée par des érythroblastes. Les mégaloblastes pendant la vie embryonnaire et fœtale renferment de l'uro- et de la coproporphyrine.

En résumé, les porphyrines apparaissent dans l'organisme comme d'importants métabolites, soit comme intermédiaires dans la synthèse de l'hémoglobine, soit comme produits de synthèse définitifs dans certains organes, soit comme produits d'excrétion.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

Une bibliographie très étendue concernant les pigments se trouve dans VERNE (J.), *Les pigments dans l'organisme animal* (Encyclopédie scientifique, Paris, Doin, 1926).

On pourra consulter en outre les revues générales suivantes : BERGMANN (E.), *Erg. Physiol.*, 35, 1933, p. 158. — HUECK (W.), *Pigmentstudien* (Ziegler, 54, 1912, p. 68); *Die pathologische Pigmentierung in Hdb. der allgem. Pathol. von Krehl Marchand*, III, 2, 1921, p. 298. — OBERNDORFFER (S.), *Die pathologische Pigmente* (*Erg. Path.*, 19, II Abt., p. 47, — SCHMIDTMANN (M.), in *Methodik der wiss. Biol.*, 1, p. 981 (Berlin, Springer, 1926).

Concernant les porphyrines, consulter BORST et KÖNIGSDORFFER (H.), *Untersuchungen über Porphyrie unter besonderer Berücksichtigung des Porphyria congenita* (Leipzig, Hirzel, 1929); voir, en outre, la bibliographie du Chapitre V.

---

## SECTION VI.

### Ferments.

## CHAPITRE XVI.

### PEROXYDASES ET PHÉNOLASES.

A en juger par le nombre et l'importance des travaux qui lui ont été consacrés, l'étude morphologique des ferments devrait paraître comme un des chapitres les plus évolués de l'Histochimie. En réalité, il n'en est rien et, malgré la masse des documents accumulés, ce domaine est certes le plus embrouillé de toute l'Histochimie.

Il y a à cela plusieurs raisons. Tout d'abord, des auteurs, employant des méthodes semblables ont été conduits à des résultats fort différents; de là à juger les méthodes mauvaises, il n'y a qu'un pas. Aujourd'hui, on a reconnu que des changements très minimes dans une technique sont d'une importance capitale. Fait aisé à comprendre : les ferments sont extrêmement sensibles à toutes sortes d'actions physiques ou physico-chimiques. Si l'on ne travaille pas toujours exactement dans les mêmes conditions, on ne peut que s'attendre à d'énormes variations dans les résultats. Or, beaucoup d'auteurs ayant travaillé avec une réaction l'ont modifiée à leur gré. C'était parfaitement légitime; mais ce qui ne l'est pas, c'est d'enregistrer sous la dénomination de la réaction originale des résultats obtenus avec une réaction modifiée. Notons-le bien, cette erreur a toujours été commise de la meilleure foi du monde : le changement introduit dans la technique paraissait tellement insignifiant! Nous voilà devant une première source de complications : sous le même nom, on désigne des réactions ayant des significations différentes. Ainsi, sous le nom de réaction du bleu d'indophénol, ou de *Nadiréaction*, on comprend des méthodes

qui, toutes, ont en commun l'emploi d'un mélange équimoléculaire de diméthylparaphénylène-diamine et de naphthol; mais suivant qu'on utilise une solution alcaline ou une solution neutre, ou une solution tamponnée à des pH donnés, on met en évidence des formations absolument différentes.

Une autre source de complications est produite par l'imprécision des termes que continuent à employer les histologistes et qui, en Biochimie, ont un sens tout autre. Ainsi, les « oxydases » des histologistes ne sont pas les oxydases des biochimistes. Sous ce nom, ceux-ci désignent tous les ferments capables de catalyser une réaction d'oxydation; par exemple, les phénolases, les purinoxydases, la succinoxydase, la laccase, la tyrosinase, l'alcoolase, etc. Ce que les histologistes nomment oxydases, ce sont en réalité les phénolases, qui ne forment qu'une partie des oxydases *sensu stricto*. Cette confusion de mots crée un quiproquo perpétuel. Combien d'interprétations fantaisistes n'ont pas d'autre origine! L'histologiste met en évidence des phénolases. Prenant la partie pour le tout, il les nomme oxydases et s'imagine avoir mis en évidence les ferments qui catalysent les oxydations en général dans la cellule; en réalité, ces ferments ne catalysent de façon certaine qu'une seule réaction d'oxydation : celle du réactif employé, qui est un phénol ou un corps à structure analogue. Cette question de définition des termes a une importance capitale; si l'on s'y était attaché, on aurait évité bien des discussions stériles <sup>(1)</sup>. Avant de bâtir des hypothèses et de forger d'ingénieuses théories sur des faits, il importe de préciser leur portée. Aussi, soucieux d'essayer de clarifier un sujet si touffu, aurons-nous soin d'établir l'exacte valeur des techniques et des méthodes proposées.

Les caractères histochimiques généraux des ferments se fondent sur leurs propriétés telles qu'elles ont été établies par les recherches de chimie physiologique.

Rappelons qu'on appelle ferments « des substances à action catalytique, produites par les cellules vivantes, sans que leur action soit liée aux processus vitaux en tant que tels — capables de favoriser des processus chimiques, tout en restant eux-mêmes inchangés par ce processus — travaillant de façon spécifique, c'est-à-dire n'agissant que sur des substances

---

<sup>(1)</sup> A titre documentaire, voir la polémique entre M. PRENANT d'une part, MARINESCO et FIESSINGER d'autre part.



de constitution structurale et stéréochimique tout à fait définies » (OPPENHEIMER).

Des propriétés des ferments, nous ne retiendrons que celles-ci, qui peuvent éventuellement servir en Histo chimie à confirmer leur nature : ils sont thermolabiles et détruits de façon irréversible par l'action d'une température donnée; leur activité ne se manifeste que dans des conditions de milieu bien déterminées (pH, concentration saline, température, etc.); ils sont détruits par certains agents chimiques.

Les ferments accessibles à l'expérimentation histo chimique sont uniquement des ferments oxydants ou réducteurs; ils appartiennent donc au grand groupe des oxydases *sensu lato*. Des nombreuses oxydases décrites en chimie physiologique ne sont décelables histo chimiquement de façon certaine que : 1<sup>o</sup> les peroxydases; 2<sup>o</sup> les phénolases, presque toujours appelées faussement oxydases par les histologistes; 3<sup>o</sup> la tyrosinase et la dopaoxydase. De mise en évidence plus hypothétique sont les oxydo-réductases; aussi, quoique des travaux récents leur aient été consacrés, notamment les très intéressantes recherches de WERMEL et de ROSKIN, on ne les étudiera pas ici (1).

A propos de chaque groupe de ferments, nous étudions successivement : 1<sup>o</sup> les propriétés générales des ferments envisagés; 2<sup>o</sup> les méthodes de mise en évidence; 3<sup>o</sup> la valeur signalétique de ces réactions. Dans ce chapitre, nous étudierons les peroxydases et les phénolases, qui sont en relation étroites les unes avec les autres, ainsi qu'on le verra plus loin.

## I. — PEROXYDASES.

Les *peroxydases* sont des ferments qui augmentent extrêmement le pouvoir oxydant des peroxydes pour certains accepteurs, ce pouvoir oxydant ne se manifestant normalement, toutes conditions égales d'ailleurs, qu'avec une extrême lenteur. En d'autres termes, le système peroxyde + peroxydase est capable de réaliser rapidement l'oxydation de substances que le peroxyde à lui seul n'effectuerait qu'avec une extrême lenteur.

---

(1) On n'étudiera pas non plus les conceptions de UNNA et de son école sur les lieux d'oxygène (*Sauerstofforte*) et les lieux de réduction (*Reduktionsorte*). Les critiques nombreuses qui leur ont été adressées ont bien montré leur caractère spéculatif et hypothétique. En outre, leur étude paraît devoir être rattachée à celle des potentiels d'oxydo-réduction et sont donc du cadre de ce livre.

En d'autres termes encore, une peroxydase est un ferment qui catalyse la décomposition des peroxydes, l'oxygène produit lors de cette décomposition servant à oxyder un accepteur approprié.

Comme peroxydes, peuvent entrer en ligne de compte soit l'eau oxygénée, soit tout autre peroxyde substitué.

Les accepteurs oxydables par le système peroxyde-peroxydase sont assez nombreux. Beaucoup sont des phénols, mais il n'en est pas nécessairement ainsi. Afin de fixer les idées, citons quelques oxydations réalisées par les peroxydases en présence d'eau oxygénée : 1<sup>o</sup> une oxydation inorganique : oxydation de l'acide iodhydrique en iode libre; 2<sup>o</sup> des oxydations organiques de diphénol en quinhydrone et quinone, du pyrogallol en purpurogalline, du gâicol en tétragâicoquinone, du phénol, des crésols ortho et para, des naphthols en produits fortement colorés mal définis; 3<sup>o</sup> des oxydations d'amines *aromatiques* : de l'orthophénylènediamine en diaminophénazine, de la benzidine en diphénoquinonediimine, de la métaphénylènediamine et un certain nombre d'autres polyarylamines en produits fortement colorés mal définis; 4<sup>o</sup> des oxydations de leucodérivés de colorants (1) : de la phénolphtaline en phénolphtaléine, des leucos de fuchsine acide et de violet acide en les colorants correspondants, du mélange  $\alpha$  naphtol + *p*-phénylènediamine (ou les dérivés méthylés de celle-ci) en indophénol; 5<sup>o</sup> des oxydations de divers composés aromatiques : la vanilline en déhydrovanilline, la morphine en oxydimorphine, du thymol en dithymol, de l'eugénol en dieugénol, etc.

On notera que toutes ces réactions (à part l'oxydation de l'acide iodhydrique) sont des réactions d'oxydation et de condensation de noyaux aromatiques et que l'oxydation porte toujours uniquement sur des atomes d'hydrogène.

L'importance de cette constatation sera mise en vedette plus loin (p. 289).

De tous les réactifs cités plus haut, peu ont été utilisés en Histologie. Beaucoup, en effet, donnent des réactions colorées trop pâles ou trop peu intenses pour permettre une observation microscopique commode;

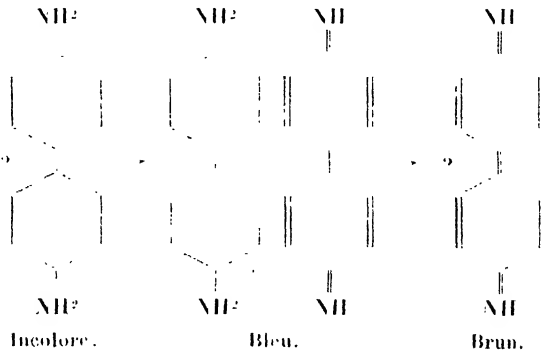
---

(1) Il s'agit toujours de colorants à structure quinonique, dont le leuco a la constitution, soit d'un phénol, soit d'une amine; le passage du leuco au colorant correspond donc à l'oxydation d'un polyphénol (ou polyamine) en la quinone (ou la quinoneimine) correspondante, et rentre donc au fond dans les deux catégories précédentes.

d'autres exigent des conditions de milieu (alcalinité) peu compatibles avec la bonne conservation des coupes ou des tissus.

Le premier réactif utilisé en Histologie fut le gaiacol; il servit à ZUCKERKANDL dans des études sur le colostrum. Il n'a plus qu'un intérêt historique.

A. *Réaction à la benzidine.* — Le plus employé est la benzidine, utilisée pour la première fois dans ce but par les ADLER (1904-1906). L'étude chimique de la réaction a été faite par MADELUNG. Par l'action du couple peroxyde-peroxydase, la benzidine est oxydée en un corps de couleur bleu foncé (bleu de benzidine), à constitution méridiquinoïdique, formé par l'association d'une molécule de benzidine avec une molécule de diphénoquinonediimine. Il est donc à la benzidine ce que la quinhidrone est à l'hydroquinone. Le bleu de benzidine, assez instable, n'est qu'un produit intermédiaire d'oxydation; il s'oxyde lui-même rapidement en donnant de la diphénoquinonediimine (ou des polymères de celle-ci?) de couleur brune. L'ensemble de ces transformations est indiquée ci-dessous (on a adopté la formulation de WILLSTAETTER et PICCARD; les pointillés représentent des valences partielles au sens de la théorie des complexes de WERNER).



L'oxydation de la benzidine, d'après MADELUNG, ne s'effectue pas en milieu neutre privé de sels; des traces d'acides ou de sels la favorisent fortement; un grand excès l'arrête.

La réaction à la benzidine a reçu des applications histologiques surtout de KREIBICH (1910) (qui, au lieu de la benzidine, employait son dérivé monosulfoné), FISCHER (qui fit un large usage de l'homologue diméthylé

de la benzidine, la tolidine), FIESSINGER et ROUDOWSKA (1912), GRAHAM (1918), MARINESCO (1919), M. PRENANT (1924), LOELE (1926).

Les techniques proposées par ces différents auteurs montrent d'assez grandes différences; en fait, ces variantes donnent des résultats à peu près identiques, contrairement à ce qu'on observera pour les oxydases (*voir plus loin*). La raison profonde en est que les peroxydases sont des ferments assez résistants et peu sensibles à l'influence du milieu. Ainsi elles résistent bien à l'action du formol, de l'alcool, du toluène. Il est donc possible de travailler après fixation, soit sur coupes par congélation, soit même sur coupes à la paraffine. Certaines peroxydases résistent même à une courte ébullition. Leur action oxydante se manifeste le mieux en solution légèrement acide. Cependant, elles tolèrent de grands écarts de pH (de pH 2 à pH 12 pour une peroxydase de *Cochlearia*; EULER et BOLIN); la concentration en peroxyde peut aussi varier dans de larges limites (M. PRENANT): la concentration seuil en  $H_2O_2$  est extrêmement basse. Aussi n'y a-t-il pas intérêt à épiloguer sur les différentes modalités techniques.

A titre documentaire, nous donnerons la technique de M. PRENANT, qui nous paraît spécialement convenir aux recherches sur les tissus frais, non fixés, et celle de LOELE, mieux adaptée aux frottis et aux coupes.

*Méthode de M. PRENANT.* — Plonger des fragments assez minces de tissu pendant quelques minutes dans une solution saturée de benzidine acidifiée par quelques gouttes d'acide acétique; ensuite, les plonger dans de l'eau oxygénée à 1 volume (perhydrol dilué au 1/100<sup>e</sup>, ou bien eau oxygénée du commerce à 12 volumes diluée au 1/12<sup>e</sup>), les y laisser quelques minutes, puis examiner dans de l'eau ou un sérum physiologique.

*Méthode de LOELE.* — Préparer une solution de benzidine dans l'eau; filtrer avant l'emploi: à 50<sup>cm</sup> du liquide, ajouter 1<sup>cm</sup> de  $H_2O_2$  (perhydrol) à 1 pour 1000. Dans cette solution, qui est neutre, certaines peroxydases se colorent d'emblée en brun, d'autres en bleu pour devenir finalement brunes. Il nous paraît plus avantageux de l'acidifier légèrement par de l'acide acétique; de cette façon, toutes les peroxydases se colorent en bleu.

Au lieu de cette méthode, on peut aussi employer les méthodes de LISON et de SLONIMSKI pour la mise en évidence de l'hémoglobine, ces réactions étant en réalité des réactions de peroxydases (*voir p. 250*).

L'inconvénient de toutes ces méthodes est qu'il est impossible d'obtenir des préparations stables; les artifices proposés pour conserver le bleu de benzidine échouent et l'on finit par obtenir une coloration brunâtre assez pâle et peu visible. Il vaut mieux examiner les préparations dans l'eau ou le sirop d'APATHY que de monter au baume par la méthode ordinaire;

l'alcool extrait en effet toujours une partie de la couleur. La déshydratation à l'isosafröl  $\alpha$  d'après LISON permet cependant de monter au baume sans inconvénient les coupes à la paraffine; pour les coupes par congélation, cette méthode ne convient pas (<sup>1</sup>).

**B. Naphtolperoxydasereaktion (LOELE).** — L'oxydation de l' $\alpha$ -naphtol en une matière colorée violette par l'action d'une oxydase ou d'un système peroxyde-peroxydase a été décrite pour la première fois par BOURQUELOT. Elle a été reprise en Histologie par LOELE, qui ne paraît d'ailleurs pas avoir connu les travaux de ce dernier.

LOELE fixe les tissus dans du formol neutre à 10 pour 100, coupe par congélation, puis traite par le réactif suivant : verser dans 1 litre d'eau physiologique (0,85 pour 100 de NaCl) une cuillerée d' $\alpha$ -naphtol; agiter et laisser reposer 3 jours; puis filtrer; cette solution se conserve environ 1 mois; au moment de l'emploi, ajouter, à 50<sup>cm³</sup> de la solution, 1<sup>cm³</sup> d'une solution de perhydrol à 1 pour 100. Laisser agir quelques minutes puis rincer et examiner dans la glycérine. Les peroxydases sont colorées en violet foncé.

Les préparations obtenues par cette méthode ne se conservent pas. Afin d'obtenir des préparations durables, LOELE se base sur une curieuse observation : les éléments qui ont oxydé le naphtol ont acquis une basophilie extrêmement prononcée. Ils retiennent les colorants basiques avec une telle énergie qu'ils résistent à l'action décolorante prolongée des alcools.

Les préparations, obtenues par la méthode indiquée plus haut, sont traitées quelques minutes par un mélange naphtol-violet de gentiane préparé comme suit : à la solution pure saturée d' $\alpha$ -naphtol (préparation voir plus haut), on ajoute goutte à goutte une solution alcoolique saturée de violet de gentiane jusqu'à ce qu'un trouble apparaisse; puis on ajoute goutte à goutte de l'alcool à 70<sup>v</sup> jusqu'à ce que la solution redevienne claire. Différencier dans l'alcool à 50<sup>v</sup> jusqu'à ce que seules les substances naphtol positives apparaissent colorées en violet. Monter la préparation à la glycérine.

**C. Réaction aux zinc-leucos (LISON).** — Les fuchsinés sulfonées réduites par la poudre de zinc et l'acide acétique donnent des leucodérivés stables. Ces « zinc-leucos » sont recolorés par le couple peroxyde + peroxydase.

On prépare le réactif en chauffant le mélange suivant : violet acide (ou fuch sine acide), 1<sup>g</sup>,5 ; zinc en poudre, 10<sup>g</sup>; acide acétique glacial, 2<sup>cm³</sup>; eau, 100<sup>cm³</sup>. Après quelques instants, la

(<sup>1</sup>) Bien entendu, avant le montage, on peut colorer le fond de la coupe ou les noyaux par un colorant histologique quelconque.

solution perd sa couleur primitive et devient paille ou ambrée. Après refroidissement, ajouter encore 2<sup>cm³</sup> d'acide acétique. Le « zinc-leuco » ainsi obtenu se conserve plusieurs jours sans se recolorer; s'il est altéré, il suffit de le faire bouillir de nouveau.

Au moment de l'emploi, à 10<sup>cm³</sup> de la solution filtrée du zinc-leuco, on ajoute 1<sup>cm³</sup> d'eau oxygénée du commerce à 12 volumes. Plonger les coupes à examiner 5 à 10 minutes dans le mélange. Rincer, colorer le fond par une coloration histologique quelconque, monter au baume suivant les techniques habituelles. Les préparations sont très belles et stables. Pour l'usage hématologique, le réactif sera dilué 5 à 10 fois (1).

FAUTREZ (communication personnelle) a observé que le zinc-leuco du Bleu patenté (Patentblau) présente de grands avantages. Sa solution, de couleur vert grisâtre, se conserve très longtemps (plus d'un an); la coloration bleu verdâtre qu'il communique aux peroxydases est très intense et bien visible. Préparation et mode d'emploi comme pour les autres zinc-leucos.

## II. — PHÉNOLASES.

*Phénolases* (BATELLI et STERN), *Polyphénoloxydases* (BOURQUELOT), *Phénoloxydases* (SARTHON), *Laccases* (BERTRAND, CHODAT).

Les phénolases sont des ferments qui catalysent l'oxydation, par l'oxygène de l'air, de toute une série de substances, qui sont *exactement* les mêmes que celles qui sont oxydées par le système peroxyde-peroxydase et ont été décrites plus haut. Le système phénolase + O<sub>2</sub> a donc *exactement* la même action que le système peroxydase + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Avant d'aller plus loin, précisons un point de nomenclature. Ce que les histologistes appellent oxydases, ce sont en réalité les phénolases, qui ne constituent qu'une partie assez restreinte des oxydases *sensu lato*. Le terme phénolase, que nous adoptons après beaucoup de biochimistes, n'est pas très heureux, on doit bien l'avouer. Tout d'abord, d'après la nomenclature actuellement en usage, le terme phénolase devrait signifier : « Qui hydrolyse les phénols ». Or, l'action du ferment sur les phénols est oxydative et non hydrolytique. De plus, les « phénolases » n'oxydent pas que des phénols, mais aussi des amines aromatiques, des composés cycliques divers et l'acide iodhydrique. Aussi, un autre terme serait-il préférable; malheureusement, aucun des remplaçants proposés n'a conquis droit de cité. En tout cas, et c'est là un point sur lequel nous devons insister, nous nous refusons à employer le terme « oxydase » qu'on trouve régulièrement sous la plume

---

(1) La critique des réactions des peroxydases a été jointe à celle des phénolases (voir page 278).

des morphologistes. Utiliser ce terme, c'est courir inévitablement à de grosses erreurs d'interprétation et jouer perpétuellement sur des équivoques (p. 287).

Ainsi qu'on l'a dit plus haut, les actions oxydatives des phénolases sont exactement les mêmes, ni plus ni moins, que celles que réalisent les peroxydases en présence d'un peroxyde.

Il est un point cependant sur lequel l'action des phénolases diffère assez profondément de celle des peroxydases. Elles sont en général beaucoup plus fragiles. Elles résistent beaucoup moins bien aux agents de destruction, soit physiques, soit chimiques. La plupart sont irréversiblement inactivées par une température de 60°, à laquelle résistent bien les peroxydases; certaines, mais pas toutes, sont tuées par les acides (la plus sensible est certainement la laccase de BERTRAND, déjà tuée par un acide à N/2000). Des agents chimiques variés se montrent en outre fortement toxiques pour elles. Les plus actifs sont les cyanures qui inhibent les phénolases à des doses extrêmement faibles. L'action des agents fixateurs utilisés en Histologie est spécialement à considérer : le sublimé est toxique pour presque toutes les phénolases, tandis que la formaldéhyde ne l'est pas pour toutes.

Les phénolases sont également beaucoup plus exigeantes que les peroxydases vis-à-vis des conditions du milieu. La plupart n'exercent leur activité que dans des conditions d'optimum bien déterminé : tout particulièrement le pH du milieu a une très grosse importance, ainsi qu'on le verra plus loin. Quelques-unes seulement — ce sont généralement aussi les plus résistantes au point de vue des agents léthaux — peuvent se montrer actives dans des conditions de milieu assez étendues.

Toutes ces considérations ont une grosse importance pratique. Dans le domaine des phénolases, il importe de travailler dans des conditions rigoureusement déterminées et reproductibles. Combien de résultats discordants n'ont pas d'autre source que des techniques différant en apparence de peu, en réalité de beaucoup !

A. *Réactions au bleu d'indophénol.* — La réaction au bleu d'indophénol offre un certain intérêt historique, car elle fut la première utilisée en Biologie pour déceler des ferments oxydants. En 1881, les chimistes allemands KOEHLIN et WITT, oxydant par le bichromate un mélange équimoléculaire de *as*-diméthylparaphénylènediamine et de naphthol  $\alpha$  avaient obtenu un





Les caractéristiques de cette réaction sont : 1<sup>o</sup> de s'effectuer sur du matériel fixé dans un liquide formolé; 2<sup>o</sup> d'utiliser une solution de naphтол  $\alpha$  + diméthylparaphénylènediamine (mélange *nadi*) *alcaline*.

*Technique* : I. *Fixation du matériel*. -- Fixer au formol (4 à 10 pour 100); couper par congélation. Une inclusion à la paraffine est possible (STRASSMANN) si l'on opère rapidement. Autant que possible, colorer immédiatement après avoir coupé. Un trop long séjour des coupes dans l'eau a une influence défavorable sur la réaction.

Les frottis sont fixés, soit aux vapeurs de formol, soit au mélange formol (10) alcool 96<sup>o</sup> (40) pendant 2 heures.

II. *Préparation des réactifs*. -- Préparer les solutions suivantes : A, faire bouillir 1<sup>o</sup> d' $\alpha$ -naphтол avec 100<sup>ml</sup> d'eau distillée; ajouter ensuite goutte à goutte une solution de potasse à 25 pour 100 jusqu'à ce que le naphтол fondu se soit dissous. Laisser refroidir; cette solution se conserve 1 mois à l'obscurité; B, solution à 1 pour 100 de diméthyl-*p*-phénylènediamine base, dans l'eau distillée, de préférence bouillie. Il est à conseiller d'employer de la diméthyl-*p*-phénylènediamine fournie en tubes scellés; conservée en vrac, elle s'altère très vite en devenant noirâtre. La solution se conserve 2 à 3 semaines à l'obscurité. On peut utiliser à la place de la base le chlorhydrate de diméthyl-*p*-phénylènediamine qui est un peu plus stable (GRAFF). Immédiatement avant l'emploi, on mélange parties égales de A et B, et l'on filtre.

Le réactif ainsi préparé correspond à la formule originale de SCHULTZE; mais, comme il est passablement oxydable par la simple action de l'air, on a proposé, de divers côtés, de le diluer beaucoup plus. Des solutions au 1/1000<sup>e</sup> sont parfaitement utilisables.

III. *Conduite de la réaction*. — Les coupes ou les frottis sont plongées dans le réactif étalé en couche mince au fond d'une boîte de PETRI; on agite celle-ci, de façon à assurer largement l'oxygénation du liquide. La réaction se produit en quelques instants, de 1 à 5 minutes : les granulations renfermant des phénolases se colorent en bleu foncé; ensuite, rincer à l'eau distillée.

Les préparations ne sont pas durables. Pour les stabiliser, on peut utiliser le procédé de GRAFF. Plonger les préparations 2 à 3 minutes dans une solution de Lugol diluée au tiers; dans cette solution, les granules deviennent bruns. Ensuite, laver à l'eau distillée, rendue alcaline par l'addition de quelques gouttes de solution saturée de carbonate de lithium, jusqu'à ce que les grains aient repris leur belle couleur bleue. Puis, à volonté, coloration de fond au carmalun, safranine, brun de Bismarck, etc.; montage dans la glycérine, la glycérine-gélatine ou la gomme sirop d'APATHY.

SCHMORL, pour stabiliser les préparations, recommande, au lieu de Lugol, une solution concentrée de molybdate d'ammonium.

La M. *nadi*-réaction a été surtout employée dans les recherches hémato-logiques. Ce qui fait son grand intérêt, c'est qu'elle met en évidence en les colorant en bleu foncé tous les éléments de la série myéloïde sans

exception : myéloblastes, myélocytes et leucocytes mûrs des séries neutrophiles, éosinophiles, pseudo-éosinophiles et basophiles. Les formes mères présentent très peu de granulations; au fur et à mesure que leur évolution se poursuit, elles s'enrichissent en granulations M. nadi-positives. C'est à ce fait que la réaction doit son nom de « myéloxydase-réaction ». Aucune autre cellule sanguine que celles de la série myéloïde ne donne de réaction : les lymphocytes et les plasmotocytes restent incolores (1). Au moyen de cette réaction, il est donc par exemple aisé de distinguer l'une de l'autre, au premier coup d'œil, une leucémie myéloïde d'une leucémie lymphoïde.

Outre les cellules des lignées myéloïdes, la méthode colore, chez l'Homme, des granulations dans les cellules séreuses des glandes salivaires et des glandes lacrymales, et dans les syncytioblastes du placenta. Chez les Vertébrés supérieurs, on ne connaît jusqu'ici qu'une seule autre localisation de M. nadi-oxydase; la trachée du Mouton (LOELE).

Chez les animaux autres que l'Homme et les Vertébrés supérieurs, la réaction a été peu appliquée, sauf par LOELE, qui en fait une étude assez étendue. De ces recherches, il résulte bien que la répartition des cellules M. nadi-oxydase positives est très irrégulière, à la fois au point de vue de leur distribution dans les groupes zoologiques et de leur distribution tissulaire dans les animaux examinés. Il n'est pas possible d'entrer ici dans les détails. Qu'on retienne cependant qu'il existe un assez grand nombre d'animaux qui ne possèdent pas de cellules à M. nadi-oxydase.

2° G. nadi-oxydaseréaction (GRÄFF). — Synonymes : Labile oxydase-reaktion (v. GIERKE), Gewebs-oxydasereaktion (GRÄFF).

VON GIERKE observa qu'en traitant des coupes de tissus *non fixés* par un mélange « nadi » préparé *sans addition d'alcali*, on obtient une coloration bleue de certaines cellules qui ne la donnent pas quand on les traite par la technique originale de SCHULTZE, c'est-à-dire après fixation formolée et en employant un « nadi » alcalin. Les « oxydases » (= phénolases) ainsi mises en évidence, il les dénomma « oxydases labiles » par opposition aux « oxydases stables » démontrées par la technique de SCHULTZE.

S. GRÄFF, dans d'importants travaux, montra que la concentration en

---

(1) Cependant, SCHULTZE a trouvé quelques granulations M. nadi-positives dans des grands mononucléaires.

ions hydrogène du mélange nadi était de toute première importance pour la réussite de la réaction; en outre, la valeur du pH optimum varie pour chaque espèce cellulaire. Afin de stabiliser les valeurs du pH, GRAFF utilise des solutions tamponnées.

*Technique* : I. *Préparation des solutions*. — A. Préparer une solution mère d' $\alpha$ -naphтол à 10 pour 100 dans l'alcool; au moment de l'emploi, cette solution est à diluer au 1/100<sup>e</sup> avec de l'eau distillée.

B. Solution de chlorhydrate de diméthylparaphénylènediamine à 1,2 pour 1000; conserver à l'obscurité en flacons bien bouchés, de préférence avec des bouchons paraffinés.

C. Solutions tampons : les solutions tampons employées doivent pouvoir couvrir une zone comprenant les pH de 3,0 à 12,0. Les solutions mères sont les suivantes; elles doivent être établies avec le plus grand soin; se servir pour les confectionner de ballons jaugés et non d'éprouvettes graduées.

$\alpha$ . NaOH normal : 40<sup>g</sup>,01 NaOH pour 1000<sup>cm</sup><sup>3</sup> H<sup>2</sup>O.

$\beta$ . Carbonate de Na cristallisé : 14<sup>g</sup>,3 CO<sup>3</sup>Na<sup>2</sup>, 6 H<sup>2</sup>O pour 100<sup>cm</sup><sup>3</sup> H<sup>2</sup>O.

$\gamma$ . Glycocolle : 7<sup>g</sup>,5 pour 100<sup>cm</sup><sup>3</sup> H<sup>2</sup>O.

$\delta$ . Phosphate sodique secondaire (=disodique) : 11<sup>g</sup>,9 pour 1000<sup>cm</sup><sup>3</sup> H<sup>2</sup>O.

$\epsilon$ . Phosphate potassique primaire (=monopotassique) : 9<sup>g</sup>,1 pour 1000<sup>cm</sup><sup>3</sup> H<sup>2</sup>O.

$\zeta$ . Acétate sodique : 13<sup>g</sup>,6 CH<sup>3</sup>CO<sup>2</sup>Na 3 H<sup>2</sup>O pour 100<sup>cm</sup><sup>3</sup> H<sup>2</sup>O.

$\eta$ . Acide acétique normal : 60<sup>g</sup>,03 acide acétique cristallisable pour 1000<sup>cm</sup><sup>3</sup> H<sup>2</sup>O.

Ces solutions mères sont à diluer 10 fois avant l'emploi, *sauf les solutions de phosphates*.

D. Préparation des solutions nadi + tampon.

Le mélange nadi est préparé en prenant parties égales des deux solutions A (diluée au 1/100<sup>e</sup>, comme dit plus haut) et B; on y ajoute alors le tampon dans les proportions indiquées par les tableaux suivants, empruntés à GRAFF. Le mélange du nadi avec le tampon doit être effectué au moment de l'emploi. Les pH indiqués ci-dessous sont approximatifs et constituent la valeur moyenne des titrages de GRAFF. Cette approximation est d'ailleurs généralement suffisante. Si plus de précision est désirée, il faut titrer les mélanges au moyen d'indicateurs; pour cette méthode, se référer à l'article original de GRAFF.

Le Tableau 1 correspond à un mélange renfermant environ 0,5 pour 1000 de nadi; le Tableau 2 à un mélange ne renfermant environ que 0,1 pour 1000.

A titre documentaire, signalons que, chez les animaux, les résultats les plus favorables s'échelonnent vers 8,2, 8,1 et 7,8; chez les plantes entre 3,4 et 5,9.

TABLEAU I (mélange nadi, 50,0 + tampon, 10,0).

pH.	Na OH $\alpha$ .	CO <sup>3</sup> Na <sup>2</sup> $\beta$ .	Glyco- colle $\gamma$ .	Phos- phate diso- dique $\delta$ .	Phos- phate mono- potas- sique $\epsilon$ .	Acétate Na $\zeta$ .	Acide acé- tique $\eta$ .
>12.....	10,0	-	-	-	-	-	-
11,6.....	6,5	3,5	-	-	-	-	-
11,0.....	8,0	-	2,0	-	-	-	-
10,8.....	5,0	5,0	-	-	-	-	-
9,5.....	2,5	7,5	-	-	-	-	-
9,2.....	5,0	-	5,0	-	-	-	-
9,0.....	1,5	8,5	-	-	-	-	-
8,2.....	4,0	-	6,0	-	-	-	-
7,8.....	3,0	-	-	7,0	-	-	-
7,4.....	2,0	-	-	8,0	-	-	-
7,0.....	-	-	-	10,0	-	-	-
6,5.....	2,0	-	-	-	-	8,0	-
5,9.....	1,0	-	-	-	-	9,0	-
4,5.....	-	-	-	-	-	5,0	5,0
4,0.....	-	-	-	-	-	3,0	7,0
3,4.....	-	-	-	-	-	1,0	9,0
< 3,0...	-	-	-	-	-	-	10,0

Nadi sans tampon = 3,0.

TABLEAU 2 (mélange nadi, 5,0 + tampon, 20,0).

pH.	Na OH.	CO <sup>3</sup> Na <sup>2</sup> .	Glyco- colle.	Phos- phate Na <sup>2</sup> .	Phos- phate K.	Acétate Na.	Acide acétique.
>12.....	2,0	18,0	-	-	-	-	-
11,5.....	1,0	19,0	-	-	-	-	-
10,7.....	-	20,0	-	-	-	-	-
10,6.....	10,0	-	10,0	-	-	-	-
9,1.....	4,0	-	16,0	-	-	-	-
8,1.....	-	-	-	20,0	-	-	-
7,2.....	-	-	-	16,0	4,0	-	-
6,8.....	-	-	-	10,0	10,0	-	-
6,4.....	-	,	-	-	20,0	-	-
5,8.....	10,0	-	-	-	-	-	10,0
4,6.....	-	-	-	-	-	10,0	10,0
4,0.....	-	-	-	-	-	4,0	16,0

3,6..... Nadi, 5,0 + H<sup>2</sup>O, 20,0 sans tampon.

II. *Conduite de la réaction.* — L'examen doit avoir lieu aussitôt que possible après la mort, les G. nadioxydases étant extrêmement labiles. Conserver les tissus autant que possible à la glacière. On opère sur des tissus non fixés, soit débités en coupes, au rasoir ou au microtome à congélation, soit dissociés ou dilacérés. Le plus souvent, on voit déjà macroscopiquement le bleuissement des tissus après quelques minutes. La réaction terminée, on rince le tissu avec une solution physiologique, puis, après coloration nucléaire (facultative) au carmin lithiné, on examine au microscope dans une solution d'acétate de potassium. La confection de préparations durables n'est pas possible.

Une réaction positive se présente le plus souvent sous forme d'un précipité de matière colorante à l'intérieur du cytoplasme de la cellule, le noyau restant toujours incolore. Lorsque la réaction est faible, on observe seulement une coloration diffuse grisâtre ou bleu violet de tout le cytoplasme, correspondant à une très grande dispersion de la matière colorante dans la cellule. Les graisses présentes dans les cytoplasmes se colorent généralement en violet ou lilas, à cause de la solubilité bien connue du bleu d'indophénol dans les corps gras.

Chose remarquable, alors que la M. nadi-oxydaseréaction se trouve très strictement limitée à de rares espèces cellulaires, il n'existe guère, d'après GRAFF, de cellule qui ne soit capable de donner une G. nadi-oxydaseréaction, quand, bien entendu, on se place dans les conditions favorables. Le domaine de cette réaction est donc bien nettement différent de celui de la myélooxydaseréaction.

Les G. nadi-oxydases sont très sensibles à tous les agents toxiques en général. Elles ne peuvent généralement plus être mises en évidence après fixation formolée. Elles sont tuées par les cyanures à concentration de 1 pour 100 à 1 pour 1000 en quelques minutes, alors que les M. nadi-oxydases ne sont pas influencées par ce traitement (HALLHEIMER).

B. *Phénolréaction (naphtolréaction) (LOELE).* — Le réactif utilisé dans cette méthode est une solution alcaline d' $\alpha$ -naphtol (ou plus exactement une solution de naphtolate de sodium). Par l'action des oxydases, il se forme une matière colorante violet à violet noirâtre.

*Technique.* — Dans un tube à essai, à une pincée d' $\alpha$ -naphtol, on ajoute goutte à goutte une lessive de potasse à 10 pour 100 en agitant, jusqu'à ce que le naphtol soit entièrement dissous. On ajoute ensuite 200<sup>mm</sup> d'eau; la solution, utilisable après 24 heures, se conserve environ 3 semaines.

Les coupes par congélation, de matériel fixé au formol, sont plongées dans le réactif pendant quelques minutes; les oxydases y prennent une teinte violette ou noire.

Les préparations ne sont pas stables. On peut cependant obtenir des préparations durables en se basant sur le fait que la matière colorante produite retient avec une très grande énergie les colorants basiques (violet de méthyle, par exemple). LOELE opère comme suit : à la solution de naphtolate de soude préparée comme plus haut (mais non diluée), on ajoute d'abord une quantité égale de glycérine ou de glycol (qui sert de protecteur en empêchant la précipitation du colorant). Puis on dilue au dixième avec de l'eau de source et l'on ajoute quelques gouttes de solution saturée de violet de méthyle ou de violet de gentiane. Traiter les coupes plusieurs heures par le mélange, puis alcool, xylol, baume. Granulation d'oxydases en bleu violet.

La réaction ainsi effectuée est appelée par LOELE « réaction primaire ». LOELE mentionne également une « réaction secondaire ». Elle repose sur le fait que certaines structures cellulaires, qui ne fournissent normalement pas de « réaction primaire », la donnent quand elles ont été traitées par des extraits de certains Mollusques (*Limax cinereus*, *Arion rufus*) très riches en naphtoloxydases. Les substances réagissant ainsi sur le naphtol sont nommées par l'auteur « aldamin »; il considère en effet qu'elles seraient constituées essentiellement par un groupement aldéhyde-aminobase (*ald-amin*).

Les considérations sur lesquelles LOELE appuie ses conceptions paraissent extrêmement spéculatives et plus basées sur des comparaisons que sur des raisons. Il semble tout aussi logique d'admettre que les naphtoloxydases, présentes dans les extraits de Mollusques et qui, comme tous les ferments d'ailleurs, sont adsorbables, sont adsorbées spécifiquement par certaines structures sans perdre pour cela leur faculté de réagir avec le naphtol. D'où l'existence de la « réaction secondaire ». Quelle que soit l'opinion que l'on admette, la réaction secondaire de LOELE ne nous paraît pas constituer une réaction histochimique proprement dite et l'on ne la discutera pas ici.

C. *Autres réactions.* — Beaucoup d'autres réactifs, choisis dans la liste que nous avons signalée plus haut (voir le chapitre Peroxydases), pourraient être utilisés en Histochimie. Quelques-uns l'ont été, mais de façon très restreinte. Signalons seulement deux réactions de SCHULZE : la « modification B » de SCHULZE, dans laquelle on utilise un mélange d'une solution à 2 pour 100 de  $\beta$ -naphtolate de soude (mikrocidin) et d'une solution à 1 pour 100 de chlorhydrate de diméthylparaphénylènediamine; la « modification C » de SCHULZE qui utilise un mélange d'une solution

alcaline d' $\alpha$ -naphтол et d'une solution à 1 pour 100 de paranitroso-diméthylaniline; les granulations phénolasiques y deviennent brun noir.

### III. — DISCUSSION GÉNÉRALE.

#### 1. *La valeur des réactifs utilisés.*

Le premier point à examiner lorsqu'on veut discuter le problème histo-chimique des ferments est de préciser la valeur des réactifs utilisés. Ici, comme partout ailleurs en Histo-chimie, deux questions se posent : 1<sup>o</sup> le réactif est-il spécifique; 2<sup>o</sup> la localisation observée est-elle exacte?

La réponse à la première question ne soulève guère de difficultés. Il suffit de savoir si le réactif employé est réellement signalétique d'une oxydation catalytique. Tous les réactifs de peroxydases ou de phénolases utilisés en Histologie, sans exception, sont des substances ou des mélanges de substances qui, incolores par eux-mêmes, donnent par oxydation des matières vivement colorées. Pour que le réactif puisse être considéré comme impeccable, il suffit donc que son oxydation spontanée soit pratiquement négligeable. Les réactifs étudiés plus haut satisfont en général à cette condition. Cependant, pour les réactions au bleu d'indophénol, quelques restrictions s'imposent; le mélange nadi est assez oxydable au contact de l'air et son emploi nécessite quelques précautions. DIETRICH a émis à son sujet des objections qui visent à lui enlever toute valeur : il admet que toute réaction au nadi revient à la coloration secondaire de vacuoles lipidiques ou d'inclusions grasses par le bleu d'indophénol formé par l'oxydation spontanée du nadi au contact de l'air. Cette objection fait état d'un fait réel, mais elle est beaucoup trop absolue. Il est exact que du bleu d'indophénol peut se former au sein du mélange nadi et colorer secondairement des inclusions lipidiques; le fait a été vérifié bien des fois, par exemple par PIGHINI, GRÄFF, PRENANT.

Le bleu d'indophénol existant ainsi dans des solutions *non fraîches* de nadi peut même servir à colorer histologiquement les lipides (ZWEIBAUM et MANGENOT, ZWEIBAUM). Seulement, il s'en faut, et de beaucoup, que les images données par la nadiréaction soient identiques à des images de coloration de corps gras. Les localisations d'indophénoloxydase ne correspondent pas du tout aux localisations de corps gras dans les tissus. Généralement, la distinction entre la réaction vraie et la pseudoréaction donnée

par les graisses est très facile à faire; les phénolases sont bleu foncé, tandis que les corps gras sont toujours beaucoup plus pâles et de nuance lilas. De toute façon, l'emploi des précautions techniques nécessaires (fraîcheur des réactifs) et un peu de discernement dans l'examen des préparations permettent d'éviter sans difficulté cette cause d'erreur.

Les autres réactifs de peroxydases et de phénolases étudiés plus haut sont exempts de cette cause d'erreur. La benzidine, par exemple, est extrêmement stable en solution aqueuse, quoiqu'en ait dit SARTORY, et l'est encore pas mal en présence d'eau oxygénée. Toutes les objections que l'on pourrait imaginer contre ce réactif sont levées par les scrupuleuses vérifications de FISCHER et de M. PRENANT. Il semble bien qu'il en soit de même pour l' $\alpha$ -naphтол, employé par LOELE, quoique la vérification n'ait pas été poussée aussi loin.

La deuxième question : « La localisation des catalyseurs observés correspond-elle à leur localisation réelle? », ne peut être tranchée aussi aisément.

Tous les histologistes qui se sont occupés des ferments oxydants ont remarqué que les réactions des phénolases ou des peroxydases sont localisées à des granulations cytoplasmiques; exceptionnelles sont les réactions diffuses. Ils ont admis que les granulations mises ainsi en évidence par leurs réactifs sont réellement des granulations chargées de peroxydases ou de phénolases, ou, comme on dit souvent, des granulations peroxydasiques ou « oxydasiques ». Cependant, A.-Ch. HOLLANDE, dans des études extrêmement intéressantes, a émis des doutes sur cette fonction.

Pour HOLLANDE, la localisation granulaire de la réaction serait secondaire. Les peroxydases et les phénolases sont présentes quelque part dans la cellule, soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme, elles oxydent le réactif, et le produit coloré de la réaction, *par un phénomène purement tinctorial*, va se fixer secondairement sur les granulations dites peroxydasiques ou « oxydasiques ». Le fait que celles-ci se colorent lors de la nadi-réaction par exemple ne prouve pas qu'elles sont réellement le support de la nadi-oxydase, mais simplement qu'elles ont une affinité pour le bleu d'indo-phénol formé. Corollaire : si l'affinité pour le produit final de la réaction manque, la réaction restera agranulaire, diffuse et non visible au microscope.

Cette opinion très neuve paraît au premier abord hardie, voire même hasardée, mais on doit avouer que les arguments de l'auteur sont impressionnants.



Le premier fait, mis en évidence par HOLLANDE, c'est qu'il est possible d'obtenir *exactement* les effets d'une nadi-réaction en employant une solution non pas de nadi, mais de son produit d'oxydation, c'est-à-dire de bleu d'indophénol. On prépare une solution alcoolique de bleu d'indophénol pur; puis, au moment de l'emploi on l'étend au 1/10<sup>e</sup> avec de l'eau distillée. On verse sur un frottis de sang desséché; au bout d'une demi-heure les granulations des leucocytes de la série myéloïde et eux seuls se sont colorés, exactement de la même façon que si l'on avait employé du mélange nadi. Dans ce cas, il s'agit d'une coloration par précipitation, comparable aux procédés de coloration dérivés du ROMANOWSKY (GIEMSA, TRIBONDEAU, HOLLANDE, etc.). Le bleu d'indophénol est insoluble dans l'eau. Au moment où l'on dilue sa solution alcoolique par de l'eau, le colorant se trouve en quelque sorte dans un état métastable et montre une tendance marquée à la précipitation. Cette précipitation s'effectue électivement sur les éléments qui ont une certaine affinité pour le colorant lui-même. Les granulations des leucocytes polynucléaires ont donc une affinité particulière pour le bleu d'indophénol naissant en solution aqueuse. Le fait qu'elles se colorent par le mélange nadi ne prouve donc pas qu'elles soient le support du nadi-ferment: celui-ci peut très bien se trouver quelque part ailleurs dans le cytoplasme; au moment où le ferment agit et où le colorant se forme, celui-ci se dépose, à l'état naissant, sur les granulations *qui ont de l'affinité pour lui*. Les granulations des leucocytes sont donc, non pas des granulations d'oxydases, mais des granulations *indophénophiles*.

De même, les granulations dites à peroxydases sont tout aussi bien mises en évidence en employant des solutions hydroalcooliques convenables des produits d'oxydation de la benzidine. Les granulations dites peroxydasiques ne sont donc pas autre chose que des granulations *oxybenzidinophiles*.

FIESSINGER et JAMIN ont nié la réalité de la réaction de HOLLANDE; M. PRENANT a pourtant pu l'obtenir de façon absolument constante et régulière. Là où la réaction à la benzidine est négative, celle de HOLLANDE l'est également; là où celle-ci est positive, à quelques exceptions près, celle-ci est également positive.

Cependant, si M. PRENANT reconnaît l'exactitude matérielle des faits démontrés par HOLLANDE, il ne peut suivre cet auteur dans son interprétation et maintient que les peroxydases animales sont bien localisées sur des granulations ou d'autres corps figurés; en aucun cas, elles ne sont diffuses. Il serait trop long de développer ici l'argumentation de M. PRENANT

qui, appuyée par des expériences précises, paraît assez convaincante. Pourtant, il n'en reste pas moins que la réaction de HOLLANDE existe et qu'il n'est pas possible de l'interpréter autrement que comme un phénomène tinctorial.

La question, à notre avis, ne semble pas entièrement vidée. Les matières colorantes formées par l'oxydation d'un réactif de peroxydases ou de phénolases ne sont pas des matières inertes. Comme tous les colorants, elles ont une affinité pour certains éléments tissulaires. Il s'agit de savoir jusqu'à quel point cette affinité peut modifier le résultat d'une réaction peroxydasique ou phénolasiq. Pour HOLLANDE, « la coloration ne pourra s'établir que si le colorant qui prend naissance peut être absorbé (disons plutôt *adsorbé*) par la substance qui constitue la granulation ». Ce raisonnement, notons-le bien, doit être valable, que la granulation soit elle-même ou ne soit pas porteuse de ferment.

D'après cela, il nous semble bien que l'on puisse envisager deux éventualités; ou bien, on pourra *perdre* des localisations de ferments, parce que le substrat morphologique auquel le ferment est attaché n'a pas d'affinité tinctoriale pour le colorant représentant le produit final de la réaction. Ou bien on pourra avoir des *localisations fausses* de ferments, parce que le colorant formé aura en outre de l'affinité pour d'autres éléments du cytoplasme que celui qui porte le ferment. Dans ce cas, la valeur d'un réactif histologique de ferment dépend non seulement de sa faculté de réagir avec le ferment (condition *sine qua non*), mais aussi de ses facultés de s'adsorber au substrat qui le porte.

Cette conception, qui est nouvelle, nous semble pouvoir inspirer des recherches futures. Elle nous paraît expliquer, en partie, un désaccord qui existe entre biochimistes et histologistes. Pour les biochimistes, il n'existe pas de peroxydase ou de phénolase spécifique, toutes les peroxydases et phénolases connues oxydent tous les réactifs dont la liste a été donnée et non pas certains d'entre eux; au contraire, les histologistes, par certains réactifs, obtiennent des résultats négatifs là où d'autres réactifs en donnent de positifs. Il nous semble qu'une partie des divergences observées puissent être rapportées aux différences d'affinité tinctoriales des matières colorantes formées (<sup>1</sup>). Quelques exemples peuvent être cités;

---

(<sup>1</sup>) Nous disons une partie parce qu'une autre peut être attribuée, avec GRÄFF, aux différences d'optimum d'action entre le ferment et son réactif. Certains réactifs sont plus

le noyau des leucocytes polynucléaires manifeste toujours une activité peroxydasique envers la benzidine, tandis qu'il donne des résultats négatifs avec les zinc-leucos de la fuchsine acide; or, le bleu de benzidine est un colorant basique (M. PRENANT), tandis que la fuchsine acide est un colorant acide. Le nadi met en évidence les granulations des leucocytes myéloïdes tandis que d'autres mélanges synthétiques, extrêmement voisins, ne les colorent pas (HOLLANDE).

Les indications de ce genre sont encore malheureusement trop peu nombreuses pour qu'on puisse en tirer des conclusions définitives. De nouvelles investigations sont nécessaires.

## 2. La nature fermentative des catalyseurs étudiés. *Pseudoperoxydases et pseudophénolases.*

Étant admis que les réactifs utilisés mettent en évidence une action catalytique, il reste encore à savoir si cette action catalytique est bien due à la présence d'un ferment ou bien à celle d'un catalyseur quelconque. La discrimination n'est pas toujours facile, et elle l'est d'autant moins que la distinction entre catalyseurs chimiques et ferments n'est pas toujours elle-même bien tranchée, même théoriquement. Cependant, sans entrer dans le détail de la question, on peut considérer qu'un des meilleurs critères pour distinguer les ferments des autres catalyseurs est leur *thermostabilité*. On ne connaît aucun ferment vrai qui ne soit détruit à la température de 100°; les plus résistants de tous, les peroxydases, ne supportent l'ébullition que pendant un temps très court, quelques minutes tout au plus.

Or, il existe des substances ayant des propriétés peroxydasiques ou phénolasiques nettes, et qui sont thermostables. Ces substances, qu'on peut appeler avantageusement *pseudoperoxydases* (BUCKMASTER) et *pseudophénolases* (= pseudooxydases FISCHER), se rencontrent assez fréquemment dans les recherches morphologiques et il nous semble opportun d'en dire quelques mots.

Parmi les pseudoperoxydases les plus intéressantes, on doit signaler

oxydables que d'autres; donc, un ferment d'activité faible pourrait oxyder facilement les uns tout en n'attaquant que mal les autres. D'autre part, certains réactifs s'oxydent mieux en solution alcaline, d'autres en solution neutre ou acide. Si l'optimum d'activité du ferment se trouve dans une zone acide, on comprend que les réactifs du premier groupe donneront des résultats moins bons que ceux du second.

des pigments respiratoires importants. On sait depuis fort longtemps que l'hémoglobine fonctionne comme une peroxydase. Des réactions basées sur ce principe sont passées dans la technique normale de la médecine légale ou du laboratoire clinique. Il a été montré par MOITESSIER — et depuis par beaucoup d'autres — que cette action est bien due à l'hémoglobine et non à une peroxydase qui y serait mêlée. Des applications histologiques de cette propriété ont été signalées au chapitre des pigments. Non seulement l'hémoglobine donne des réactions positives, mais également tous ses dérivés, à condition qu'ils renferment encore du fer dans leur molécule; par exemple, l'oxyhémoglobine, la carboxyhémoglobine (BERTRAND), la méthémoglobine (LIEBERMANN), l'hématine. La chlorocruorine des Sabeliens et des Chlorhaemiens a également un pouvoir peroxydasique marqué (FLEIG, M. PRENANT).

L'hémérythrine des Géphyriens, en revanche, donne des résultats négatifs, de même que l'hémocyanine (FLEIG, M. PRENANT).

Le pouvoir peroxydasique de l'hémoglobine et de ses dérivés se conserve intact après un chauffage à 180° pendant une demi-heure, alors que toutes les peroxydases vraies sont détruites à 120°. Sur un autre point encore, l'hémoglobine se distingue des peroxydases vraies : les concentrations minimum et optimum en  $H^2O^2$  nécessaires pour la réaction sont notablement plus élevées que pour les peroxydases vraies (FIESSINGER et ROUDOWSKA).

Plus remarquable encore, nous semble-t-il, est le pouvoir pseudo-peroxydasique et pseudophénolasique qu'acquièrent nombre de noyaux cellulaires après la mort et surtout après autolyse.

Certains auteurs ont voulu attribuer au noyau un rôle oxydant dans la cellule. En se servant de réactifs assez analogues au mélange nadi, LILLIE a obtenu des colorations du noyau et des substances périnucléaires, et par là a cru mettre ce pouvoir en évidence. UNNA a affirmé également le pouvoir oxydant nucléaire. FISCHER, se servant de la réaction peroxydasique à la tolidine, trouve que tous les noyaux sans exception sont capables d'oxyder la réaction en bleu de tolidine. Cette réaction des noyaux est d'ordre pseudoperoxydasique, car elle se produit même après un chauffage à 120°; elle ne se produit plus après chauffage à 180°. FISCHER signalait qu'en réaction supravitale, il lui était arrivé de ne pas obtenir de réaction nucléaire, mais il considérait ces résultats négatifs comme non décisifs et contredits par les résultats positifs obtenus.

Or, il s'en faut de beaucoup que les auteurs qui se sont succédé depuis aient confirmé les résultats de LILLIE et de FISCHER. En dehors de quelques cas particuliers, la plupart des auteurs ont constaté que les réactifs de peroxydases ne sont pas oxydés au niveau des noyaux cellulaires. Cette contradiction a été levée en partie par M. PRENANT, qui fit des constatations extrêmement curieuses. Très rares sont les noyaux capables de catalyser *in vivo* ou tout de suite après la mort l'oxydation du système benzidine + eau oxygénée. Mais quelque temps après la mort, lorsque l'autolyse commence, les noyaux de certains tissus commencent à donner des résultats positifs. Chez les Vertébrés, il suffit de trois heures d'autolyse à la température du laboratoire pour obtenir des réactions très intenses sur la plupart des tissus. Dès lors, les résultats de FISCHER se comprennent aisément; cet auteur travaillait régulièrement sur des tissus conservés 48 heures à la glacière. M. PRENANT signale cependant que chez certains animaux, surtout chez les Crustacés et les Insectes, il y a des tissus sur lesquels on n'arrive pas à constater ce phénomène, même après autolyse prolongée.

Ces phénomènes d'apparition de pouvoir peroxydasique ou plutôt pseudoperoxydasique dans les noyaux après la mort, tels qu'ils ont été décrits par M. PRENANT, et dont des observations personnelles nous ont permis de vérifier l'exactitude, sont extrêmement troublants. Tout d'abord, ils amènent M. PRENANT à conclure que le pouvoir oxydant des noyaux envers les réactifs de peroxydases n'a rien à voir avec le pouvoir oxydant nucléaire tel qu'il existe ou plutôt peut exister *in vivo*. En effet, on peut grouper les noyaux en une série; certains noyaux oxydent les réactifs supravitalement, d'autres ne l'oxydent qu'après une autolyse plus ou moins prolongée, d'autres ne l'oxydent jamais. Rien ne dit que, dans les premiers termes, la réaction est bien vitale et ne constituerait pas un cas limite où le noyau s'altérerait particulièrement vite. Et PRENANT remarque qu'en tout cas cette série n'est d'aucune façon parallèle à une série plausible d'oxydations physiologiques croissantes.

Ensuite, et c'est là un point sur lequel l'attention de M. PRENANT ne s'est pas portée, on doit se demander quel est l'origine et le mécanisme de ce curieux phénomène. Comment se fait-il que cette pseudoperoxydase nucléaire ne puisse être mise en évidence *in vivo*? Deux hypothèses sont possibles : ou bien, il s'agit d'une substance qui est mise en liberté lors de l'autolyse du noyau; ou bien c'est une substance qui, présente dans la

cellule vivante à l'état diffus et à une concentration trop faible pour être décelée, s'adsorbe sur la chromatine après la mort et se concentre ainsi de telle façon qu'elle devient décelable (1). Rien à l'heure actuelle ne nous permet de décider. C'est là une des nombreuses questions qui, dans l'Histochimie des ferments, demande de nouvelles recherches.

Signalons enfin que les pigments respiratoires et la pseudoperoxydase nucléaire ne sont pas les seules pseudoperoxydases. FISCHER a en effet constaté la thermostabilité des peroxydases existant dans les cellules ou organes suivants : granulations des mastocytes, plasma des lymphocytes, substance fondamentale du cartilage, blocs de NISSL. Ces dernières ont été moins étudiées que les précédentes. Il serait intéressant de vérifier si elles existent *intra vitam* ou si elles n'apparaissent qu'après autolyse, comme les pseudoperoxydases nucléaires. On remarquera le fait curieux que les substrats portant ces pseudoperoxydases sont tous fortement basophiles, comme la chromatine nucléaire; on peut demander si, de ce fait, un rapprochement ne pourrait être effectué entre les pseudoperoxydases nucléaires et les peroxydases portées par ces formations.

Les pseudophénolases (= « pseudoxydases ») sont trop peu étudiées pour qu'on puisse en parler ici. FISCHER, qui a observé le premier leur existence, les rapproche des pseudoperoxydases. On ne peut discuter cette hypothèse parce que leur existence n'est pas certaine, le blanc de rongalite utilisé par FISCHER n'étant pas lui-même de façon certaine un réactif de phénolase.

### 3. Relations entre peroxydases et phénolases.

Les relations entre peroxydases et phénolases ont fait l'objet de nombreuses études biochimiques. On ne les rappellera pas ici et l'on se contentera de signaler la théorie de BACH et CHODAT. Pour ces auteurs, toute phénolase serait constituée par la somme d'une peroxydase et d'une *oxygénase*; l'oxygénase est une substance capable, à partir de l'oxygène moléculaire, de former un peroxyde. Dans l'oxydase, l'oxygénase inter-

---

(1) Dans ce cas, il ne s'agit certainement pas d'hémoglobine; la réaction se produit aussi bien sur la cornée (FISCHER), laquelle, comme on sait, est dépourvue de sang, que chez des animaux dépourvus de pigments sanguins (M. PRENANT).

Serait-ce peut-être le cytochrome?

viendrait d'abord pour former un peroxyde, puis le système peroxyde + peroxydase oxyderait l'accepteur.

Au point de vue purement histologique, les relations entre peroxydases et oxydases sont étroites; ce fait justifie la présentation en un seul chapitre des peroxydases et des phénolases.

Cependant, on doit bien dire que la question n'est pas encore entièrement clarifiée.

Il y a bien des cas où le ferment histologiquement décelable donne aussi bien les réactions de peroxydases que les réactions de phénolases. Citons, par exemple, les granulations des leucocytes de la série myéloïde, les cellules séminales des Gastéropodes pulmonés, les branchies des Lamellibranches (M. PRENANT) et de nombreuses localisations déterminées par LOELE. Cependant, dans bien des cas, il y a non-concordance entre les réactions des peroxydases et celles des phénolases. LOELE observe que toute substance qui donne l' $\alpha$ -naphtoloxydase-réaction donne également toutes les autres réactions de phénolases et de peroxydases. De plus, traitées par le formol, toutes les naphtoloxydases se détruisent lentement; dans ce processus toutes les réactions disparaissent l'une après l'autre, toujours dans le même ordre; d'abord les naphtoloxydases, puis les peroxydases, enfin la réaction au bleu d'indophénol. D'après LOELE, dans la décomposition des oxydases, seraient libérés les autres ferments. HIRSCHFELD et NEUMANN estiment de même que les peroxydases des granulations leucocytaires seraient un produit de décomposition des oxydases. Ces affirmations ne nous paraissent pas suffisamment étayées. On peut tout aussi bien admettre qu'une baisse progressive de l'activité d'un ferment unique atteigne l'un après l'autre des réactifs de sensibilité moindre.

M. PRENANT, étudiant les relations entre peroxydases et phénolases, discute plusieurs hypothèses possibles sans pouvoir affirmer la véracité de l'une plutôt que l'autre. Il concluait, et cette conclusion nous paraît encore vraie aujourd'hui, qu'il existe assurément une liaison entre les phénomènes oxydasiques et les phénomènes peroxydasiques, liaison qui permet, dans de nombreux cas, de ne pas établir de distinction entre eux. Cependant, il ne faut rien exagérer; cette liaison est loin d'être générale.

#### 4. *Le rôle physiologique des peroxydases et phénolases.*

A. *Rôle métabolique général.* — Le problème du rôle physiologique des peroxydases et phénolases histochimiquement décelables est extrêmement

ardu. Il est évident — mais des histologistes l'ont quelquefois oublié — qu'on ne peut pas le résoudre par le seul secours de la morphologie et qu'on doit faire appel aux connaissances biochimiques acquises sur les ferments oxydants. Or, il s'en faut, et de beaucoup, que celles-ci soient définitives.

Les considérations qui suivent sont donc plutôt d'ordre indicatif; elles ont surtout pour but d'essayer de mieux situer le problème que d'en tirer des conclusions absolues. Fidèle à l'esprit de critique qui anime ce livre, nous tâcherons surtout de dégager la signification réelle des réactions utilisées et de voir ce qu'il est légitime et ce qu'il est illégitime d'en tirer.

Un certain nombre d'auteurs (spécialement GRÄFF, KATSUNUMA, MARINESCO, FIESSINGER) ont admis que les ferments que l'on peut déceler histochimiquement dans les cellules — il s'agit spécialement des nadi-oxydases — jouent un rôle important dans le métabolisme. Pour eux, la réaction au bleu d'indophénol permet d'analyser la propriété d'oxydation des cellules vivantes et de mesurer l'intensité des oxydations respiratoires. Les catalyseurs d'oxydation que leurs réactifs mettent en évidence ne seraient pas autre chose que les catalyseurs qui permettent les oxydations cellulaires. « Les granulations dites oxydasiques contiennent un agent d'accélération des oxydations et cette accélération est en rapport avec les phénomènes d'oxydation intracellulaire » (MARINESCO).

Les auteurs ci-dessus se sont en outre attachés à montrer que, dans les cellules où l'on peut supposer une activité métabolique intense, on trouve plus de granulations oxydasiques qu'ailleurs. Ainsi, les animaux hibernants présentent moins d'oxydases que les animaux actifs (KATSUNUMA); dans les organes en régénérescence ou en croissance, on trouve des « oxydasophores » en grand nombre (MARINESCO); dans l'avitaminose des Pigeons, on trouve une diminution des nadi-oxydases dans le cerveau (GRÄFF); les cellules du foie, les leucocytes des homéothermes, lieux d'activité intense, renferment beaucoup de granulations de nadi-oxydase, les cellules conjonctives en renferment peu; les poïkilothermes sont relativement pauvres en ferments oxydants. Les leucocytes, riches en ferments oxydasiques et peroxydasiques, jouent un rôle très important dans la fièvre, le choc hémoclasique, les infections, etc. (FIESSINGER) (1).

---

(1) Signalons ici une très intéressante observation de OKKELS, tout récemment parue (*Biol.*, 116, 1934, p. 252). Au cours de la première heure qui suit l'injection d'extrait



On en tire la conclusion : Une réaction oxydasique intense indique une activité vitale intense.

Si l'on veut discuter sainement cette théorie, on doit tout d'abord s'attacher à détruire l'effet de suggestion que réalise la terminologie habituelle des histologistes. Ceux-ci parlent de peroxydases et d'*oxydases*. Un rapprochement fallacieux s'effectue dans l'esprit entre « oxydations intracellulaires » et « oxydases ». Et ce raisonnement ne s'effectue pas seulement inconsciemment ; des auteurs l'écrivent en toutes lettres. « Toutes les cellules respirent, c'est-à-dire réalisent des oxydations ; ces oxydations sont le fait de diastases oxydantes, c'est-à-dire d'oxydases. Or, les histologistes mettent en évidence des oxydases. Donc ces oxydases contrôlent les oxydations cellulaires. » Le sophisme est évident quand on est averti que les « oxydases » des histologistes ne représentent qu'une partie des oxydases en général.

Si l'on élimine la confusion créée par les termes, le problème se présente sous un jour singulièrement différent de celui où on le voit souvent. Toute la question est de savoir si les « oxydases » des histologistes — qui ne sont ni plus ni moins que des phénolases — réalisent ou peuvent réaliser les oxydations caractéristiques de la vie.

En fait, il nous semble que les arguments présentés par les histologistes, soit pour, soit contre cette théorie, ne peuvent utilement servir.

Que les « oxydases » puissent être décelées dans toutes les cellules, dans tous les tissus, dans tous les animaux, comme le veulent les auteurs qui se sont servis de la G. nadi-réaction (GRÄFF, KATSUNUMA, HALLHEIMER, MARINESCO, par exemple) ou bien qu'au contraire on ne les trouve que rarement, dans certaines espèces cellulaires seulement, sans aucune répartition zoologique ou tissulaire régulière, comme l'affirment unanimement tous les auteurs qui se sont servis, soit d'un autre réactif que le nadi, soit de celui-ci dans d'autres conditions que celle où s'effectue la G. nadi-réaction ; que la quantité « d'oxydases » soit plus considérable dans des tissus « actifs » que dans des tissus à activité réduite, comme le prétendent

---

préhypophysaire s'observe un stade d'intense thyroestimulation. Au cours de cette période, par ailleurs caractérisée par des signes morphologiques et physiologiques très nets, OKKELS a constaté une très forte augmentation du nombre de granulations peroxydasiques au niveau des cellules thyroïdiennes. L'auteur, tout en montrant la plus grande prudence dans l'interprétation de cet intéressant phénomène, ne peut s'empêcher de lui attribuer une importante signification. Les résultats obtenus ne peuvent en effet traduire autre chose que des différences fonctionnelles.

certains ; ou que cette distribution différente soit plutôt le fait de simples coïncidences, comme l'affirment d'autres, tout cela constitue un ensemble de considérations extrêmement intéressantes, mais reste en fait en dehors du nœud du problème. Celui-ci est en réalité bien simple. Les ferments oxydants des histologistes sont capables de réaliser l'oxydation d'un certain nombre d'accepteurs — à savoir de l'acide iodhydrique et d'un certain nombre de corps aromatiques, phénols et arylamines. Sont-ils capables de réaliser *aussi* les oxydations physiologiques, c'est-à-dire de glucides, de lipides, de protides, de réaliser des oxydations respiratoires, c'est-à-dire s'effectuant avec absorption d'oxygène (soit moléculaire, soit combiné) et dégagement de  $\text{CO}^2$  ? La réponse est nette : non. L'action des phénolases et peroxydases actuellement connues est rigoureusement sélective et limitée aux accepteurs dont nous avons donné la liste plus haut. Les oxydations qu'elles catalysent sont toujours du même type : ce sont des oxydations assez superficielles, portant sur des atomes d'hydrogène, s'effectuant avec élimination d'eau, aboutissant presque toujours à des composés plus complexes que le corps primitif. Jamais l'oxydation ne rompt une chaîne carbone-carbone et jamais, par conséquent, il n'y a de  $\text{CO}^2$  dégagé.

Il est donc certain que les phénolases et peroxydases ne sont pas des ferments qui réalisent *par eux-mêmes* les oxydations respiratoires. Il faut cependant se garder d'être trop absolu et d'affirmer que ces ferments ne sont pour rien dans les oxydations cellulaires. En réalité, dans ce domaine, l'obscurité est encore totale. « C'est une question entièrement ouverte de savoir si l'oxydation de ces substances étrangères à l'organisme (c'est-à-dire des accepteurs oxydés normalement par les phénolases et peroxydases) concourt au métabolisme des matériaux nutritifs de la cellule, ou bien le catalyse de façon indirecte, ou bien s'effectue pour elle seule, sans influence sur ce métabolisme » (LIPSCHITZ). La discussion de cette importante question est d'ordre purement biochimique et dépasse le cadre de ce livre. On se contentera de signaler un fait intéressant ; c'est que la G. nadi-oxydase de GRAFF nous semble bien identique à l'indophénoloxydase de KEILIN. KEILIN, comme on le sait, homologue ce dernier à l'*Atmungsferment* de WARBURG. Celui-ci, comme on le sait, est capable de réaliser l'oxydation de substances non autoxydables, comme le cytochrome ; cette réaction serait la première d'une série de réactions oxydatives concourant à la respiration cellulaire.

B. *Rôle dans la pigmentogenèse.* — M. PRENANT a établi dans un grand nombre de cas typiques, une association entre les peroxydases et certains pigments. Chez des Mollusques Lamellibranches et Prosobranches, chez des Annélides, à côté de cellules à pigments, on peut observer des cellules à peroxydases, dont l'aspect et la morphologie sont exactement semblables. Il existe même parfois des cellules à peroxydases qui présentent l'aspect ramifié de chromatophores typiques. Souvent il existe des cellules mixtes, renfermant ensemble peroxydases et grains de pigments. En offrant aux animaux un chromogène approprié, on parvient à faire fabriquer un pigment artificiel par les cellules à peroxydases. Les chromogènes utilisés ont tous été des ortho ou parapolyphénols et polyamines aromatiques, donc de constitution assez voisine de celle des accepteurs utilisés comme réactifs de peroxydases. De tels chromogènes pouvant exister normalement dans les organismes animaux, par exemple l'acide homogentisinique, l'acide uroleucique, la dioxyphénylalanine, M. PRENANT admet que les peroxydases, dans les cas cités, peuvent contribuer à la pigmentogenèse. Cependant ce rôle n'est pas général, car il y a bien des cas où les peroxydases ne sont pas en relation avec la pigmentogenèse; il y aurait vraisemblablement alors absence de chromogène. Le rôle des peroxydases dans la pigmentogenèse serait en quelque sorte fortuit et résulterait de la rencontre accidentelle du ferment avec le chromogène.

D'autres exemples d'intervention d'oxydases et de peroxydases dans la pigmentogenèse ont été rapportés. VAN HERWERDEN, ayant localisé une oxydase dans le manteau de *Limnea ovata*, lui attribue un rôle dans la formation des bandes colorées de la coquille. VOINOV et M<sup>me</sup> VOINOV, chez *Simulium*, ont observé la parenté entre des cellules à peroxydases (détectées à la diméthylparaphénylènediamine + H<sup>2</sup>O<sup>2</sup>) et des cellules à pigment qui paraissent en dériver.

De son côté, LOELE, chez un certain nombre de Mollusques, a observé des rapports comparables à ceux qui ont été décrits par M. PRENANT.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- ADLER (R. et O.), *Hoppe-S.*, 41, 1906, p. 38; *Bio. Z.*, 1, 1904, p. 59. — BACH, *Chem. Ber.*, 40, 1907, p. 3188; *Bio. Z.*, 42, 1908, p. 417. — BOURQUELOT, *Jl Pharm. et Chim.*, 6<sup>e</sup> série, 4, 1897, p. 241. — CHODAT, *Abderh. Hdb.*, 4, 1925, p. 1, 3, 386. — DIETRICH, *Zbl. Path.*, 19, 1908; *Erg. Path.*, 13, 1909. — EHRLICH (P.), *Das Sauerstoffbedürfnis der*

*Organismen* (Berlin; Hirschwald, 1885). — EULER (H.) et BOLIN (I.), *Hoppe-S.*, 61, 1909, p. 1. — FIESSINGER, *Biol.*, 1919; *Les ferments des leucocytes* (Paris; Masson, 1923). — FIESSINGER (N.) et ROUDOWSKA, *Arch. Med. exp.*, 1912. — FISCHER (R.), *Wien. K. W.*, 23, 1910; *A. mikr. Anat.*, 83, 1913. — FURSENKO, *Zbl. Path.*, 22, 1911, p. 97. — GIERKE (E.), *Münch. med. W.*, 44, 1911; *Zbl. Path.*, 27, 1916. — GRAEFF (S.), *Zbl. Path.*, 27, 1916, p. 318; *Frankf. Z. Path.*, 11, 1920, p. 358; *Ziegler*, 70, 1922; *Z. allg. Physiol.*, 20, 1922; *Mikromorphologische Methode der Fermentforschung* (*Abderh. Hdb.*, 1926); *Zbl. Path.*, 35, 1925, p. 381. — GRAHAM, *J. med. Research.*, 35, 1918, p. 39. — HALLHEIMER, *Ziegl.*, 73, 1925, p. 80. — VAN HERWERDEN (M. A.), *Biol. Zbl.*, 43, 1923; *Arch. Anat. Hist. Embr.*, 4, 1925, p. 27. — HOLLANDE (A.-Ch.), *Biol.*, 79, 1916, p. 946; *Acad.*, 178, 1924, p. 15; *Bull. Hist.*, 1, 1924, p. 422. — KATSUNUMA (S.), *Med. Kl.*, 20, 1924, p. 1582; *Intracelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese* (Iena; Fischer, 1924). — KREIBICH, *Wien. K. W.*, 1910. — LILLIE, *Amer. J. Physiol.*, 7, 1902. — LIEBERMANN, *Pflüger*, 104, 1904, p. 227. — LINOSIER, *Biol.*, 50, 1898, p. 373. — LIPSCHITZ (W.), *Pflüger*, 191, 1921, p. 1; *Abderh. Hdb.*, 1925. — LOELE (W.), *Die Phenolreaktion und ihre Bedeutung für die Biologie* (Leipzig; Klinkhardt, 1912); *Fol. Haemat.*, 14, 1912, p. 26; *Erg. Path.*, 16, 1913, p. 11; *Zbl. Path.*, 34, 1924, p. 225; *passim in Virch.* 1926-1932. — MADELUNG, *Hoppe-S.*, 71, 1910, p. 324. — MARINESCO (G.), *Biol.*, 81, 1919; 87, 1922; *Rev. gén. Sc.*, 32, 1921; *Bull. Hist.*, 2, 1925. — MOITESSIER, *Biol.*, 54, 1904. — NEUMANN, *Fol. Haemat.*, 32, 1924, p. 95. — PIGHINI, *Bio. Z.*, 42, 1912. — PRENANT (M.), *Arch. Morph. exp. gén.*, 2, 1924; *Bull. Hist.*, 1, 1924, p. 499; 2, 1925, p. 329. — ROHMANN et SPITZER, *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 28, 1895. — SCHULTZE (W. H.), *Münch. K. W.*, 1909; *Verh. path. Ges.*, 13, 1909; *Ziegler*, 45, 1909; *Münch. med. W.*, 42, 1910, p. 271; *Oxydasereaktion und verwandte Reaktionen in Enz. mikr. Techn.*, III Aufl. (Berlin; Urban et Schwarzenberg, 1926). — VOINOV et M<sup>mo</sup>, *Biol.*, 90, 1924. — WINCKLER (F.), *Fol. Haemat.*, 3, 1907, p. 323. — ZUCKERKANDL, *Wien. K. W.*, n<sup>o</sup> 33, 1905.

---

## CHAPITRE XVII.

### TYROSINASE ET DOPA-OXYDASE.

#### 1. *Tyrosinase.*

La tyrosinase est un ferment oxydant qui agit spécifiquement sur la tyrosine et ses dérivés pour former une mélanine. Elle est essentiellement différente des phénolases et des peroxydases. Ces derniers n'agissent pas sur la tyrosine; la réciproque n'est pas vraie, car la tyrosinase agit généralement sur les réactifs des phénolases et des peroxydases, quoique d'une autre manière (pour les détails sur ces différences, consulter les travaux de CHODAT).

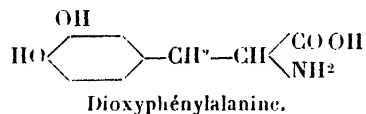
La tyrosinase joue un rôle important dans la mélanogénèse, tant chez les animaux que chez les végétaux et les biochimistes ont pu l'extraire de nombreux êtres vivants. Les recherches chimiques sur la tyrosinase sont nombreuses. Au point de vue morphologique, cependant, très peu d'études ont été faites pour la rechercher dans les tissus animaux. Nous ne connaissons à ce sujet que les travaux de HASEBROEK. Traitant pendant 1 à 24 heures des ailes de certains papillons avant leur pigmentation, par une solution saturée à froid de tyrosine, il a constaté la formation d'un pigment violet noir. Le pigment formé reproduit exactement les dessins de l'aile normalement pigmentée. On reviendra plus loin sur ces expériences à propos de la dopaoxydase.

Étant donnée la large répartition zoologique des tyrosinases, il semble étonnant que l'on possède si peu de données histochimiques sur leur localisation. De nouvelles recherches dans cette voie donneraient sans doute des résultats intéressants.

#### 2. *Dopaoxydase.*

Après que GUGGENHEIM eut découvert dans les feuilles de *Vicia faba*, qui se mélanisent en se desséchant, d'importantes quantités de dioxyphénylalanine (en abréviation d.o.p.a. ou dopa), BLOCH en arriva à penser que ce

corps constituerait le chromogène prémélanique normal chez les Mammifères.



Sous l'action d'un ferment spécifique, la dopaoxydase, il s'oxyderait en fournissant la mélanine. La dopaoxydase se trouverait localisée dans certaines cellules de la peau, du follicule et de la matrice du poil, certaines tumeurs épithéliales, etc. On peut mettre en évidence la dopaoxydase sur des coupes de peau fraîche, histochimiquement, en lui fournissant son chromogène normal, la dopa : il se forme alors un pigment analogue à la mélanine, la dopamélanine. Cette réaction — « doparéaction » — prouve donc, d'après BLOCH, la présence d'un ferment mélanisant. De plus, ce ferment serait spécifique, en ce sens qu'il agit exclusivement sur la dopa et se montre inactif envers tous les autres réactifs d'oxydases ou de peroxydases.

La technique utilisée par BLOCH est la suivante :

On plonge des fragments de tissu frais dans une solution tiède d'agar, et laisse refroidir jusqu'à obtention d'une gelée ferme. On coupe alors au microtome à congélation. Les coupes, qui seront les plus minces possibles, sont traitées 24 heures à l'obscurité et dans un flacon bien fermé par une solution à 0,1 ou 0,2 pour 100 de dioxyphénylalanine. Si la réaction se produit trop faiblement, opérer à l'étuve à 37°. Rincer à l'eau distillée et monter à la glycérine ou au baume. Coloration du fond facultative, par exemple au vert de méthyle-pyronine.

Cette technique doit être effectuée avec les soins les plus minutieux et la plus grande propreté.

LAIDLAW a proposé une technique plus aisée, dont la principale caractéristique est d'utiliser une solution de dopa tamponnée à pH 7,4 (voir les détails de cette technique dans l'original).

Les résultats obtenus par BLOCH et son école se résument ainsi : la doparéaction n'a lieu qu'à des endroits et chez des individus normalement capables de former du pigment. On ne l'obtient pas avec de la peau d'albinos, ni aux endroits de la peau atteints de vitiligo. Chez les Mammifères, seules des cellules d'origine épithéliale réagissent positivement; les chromatophores dermiques ne réagissent jamais, sauf deux exceptions : au niveau de la tache mongolique, région pigmentée existant dans la zone sacrée chez certaines races humaines (BLOCH) et au niveau des cellules

pigmentaires de la choroïde, du corps ciliaire et de l'iris pendant la vie embryonnaire (MIESCHER). La doparéaction peut persister toute la vie, comme c'est le cas pour les cellules épidermiques, ou n'exister que pendant la période embryonnaire, comme dans l'épithélium pigmentaire de la rétine (MIESCHER).

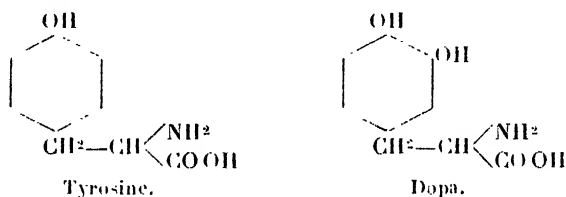
Contre les conceptions de BLOCH, se sont élevées de nombreuses objections. Les uns émettent des doutes sur la nature fermentative de la doparéaction; les autres estiment que la spécificité de la dopaoxydase est rien moins que prouvée.

Les premiers s'appuient sur le fait que la dopa, corps extrêmement labile, est capable de s'oxyder en l'absence de tout ferment, pour donner naissance à des substances brun noirâtre; cette oxydation est considérablement accélérée par une légère alcalinisation du milieu. Cette constatation amène PRZIBRAM à penser que la dopa peut se transformer en mélanine par deux processus distincts : par simple oxydation en solution alcaline d'abord, par action fermentative en milieu neutre ensuite. L'action fermentative est inhibée en milieu acide; c'est pour cette raison que les régions albinotiques donneraient une doparéaction négative, la peau y étant de réaction plus acide qu'ailleurs. HEUDORFER obtient la doparéaction même après fixation au formol et ébullition prolongée; ce fait est d'ailleurs contesté par BLOCH. HEUDORFER et LEMMEL émettent à ce propos une théorie bizarre : ce serait le chromogène prémélanique et non le ferment mélanisant que révélerait la doparéaction. Celle-ci résulterait seulement de la propriété réductrice des propigments et des pigments, et aurait la même signification que la réduction des sels d'argent (réaction argentaffine, voir p. 147). C'est une opinion bien étonnante : un propigment fortement réducteur pour des sels d'argent serait donc oxydant pour la dopa! BLOCH a d'ailleurs répondu à la théorie d'HEUDORFER en montrant d'une part que la doparéaction et la réduction des sels d'argent ne se produisent pas dans les mêmes éléments, d'autre part que la doparéaction est influencée par les agents qui agissent sur les ferments oxydants en général : elle est annihilée par l'ébullition, inhibée par les cyanures, les acides sulfureux et sulfhydrique, le toluol, fortement influencée par l'acidité ou l'alcalinité du milieu.

D'après ces données, il semble bien qu'en définitive on puisse attribuer la doparéaction à une action fermentative; encore faut-il que la technique soit correcte, une solution trop alcaline pouvant se « mélaniser » spontanément et donner lieu à des causes d'erreurs.

Cependant, l'existence de la dopaoxydase en tant que ferment *spécifique* doit être sérieusement mise en doute. BLOCH soutient que la dopaoxydase qu'il met en évidence histochimiquement dans la peau n'agit ni sur la tyrosine, ni sur aucun phénol, amine ou autre composé aromatique. En corollaire, il admet que le chromogène normal dans la peau ne peut être autre chose que la dopa (1).

PRZIBRAM, BRECHER et DEMBOWSKI se refusent à admettre cette théorie. La dopa ne constituerait en réalité qu'un indicateur de la présence d'une tyrosinase, bien plus sensible que la tyrosine parce que plus oxydable. Comme on le sait, la dopa ne diffère de la tyrosine que par un OH en plus, mais cette modification la rend bien plus labile.



Si donc on a affaire à une tyrosinase très peu active, celle-ci sera capable d'oxyder la dopa, alors que la tyrosine elle-même ne sera guère attaquée. Lorsqu'on fait agir une tyrosinase sur une solution de dopa, on constate l'apparition de teintes qui se succèdent pour aboutir finalement au noir de la mélanine; la succession de ces teintes est la même lorsqu'on se sert de tyrosine. CHODAT, puis MEIROWSKI ont confirmé les idées de PRZIBRAM. En revanche, HASEBROEK a effectué sur la pigmentation des Phalènes des observations qu'il a interprétées comme montrant la non-identité de la tyrosinase et de la dopaoxydase; l'hémolymphe des œufs et des larves noircit la dopa et pas la tyrosine; celle des chrysalides ou du papillon adulte noircit à la fois la dopa et la tyrosine; les organes privés de sang réagissent à la dopa et pas à la tyrosine. D'autres composés phénoliques — crésol, alcaptone, hydroquinone et d'autres diphénoles — ne réagissent pas. D'après HASEBROEK, il existerait donc primitivement une dopaoxydase; la tyrosinase n'apparaîtrait que plus tard. En réalité, comme le fait remar-

(1) Précisons bien la position de BLOCH : la dopaoxydase n'agit que sur la dopa. L'inverse n'est pas exact; la dopa peut être noircie par d'autres ferments, par exemple par les phénolases. BLOCH et PECK prônent ainsi la dopa pour la recherche des oxydases des cellules du système myéloïde.



quer VERNE, les données d'HASEBROEK pourraient être interprétées en pensant avec PRZIBRAM que, dans les cas où le ferment n'agit pas sur la tyrosine, c'est déjà une tyrosinase qui existe mais que, trop faible, elle n'agit que sur la dopa.

Cette idée semble d'autant plus vraisemblable que les recherches récentes sur la mélanogenèse, en particulier celles de RAPER, montrent que le premier temps d'action de la tyrosinase sur la tyrosine consiste en l'introduction dans sa molécule d'un groupement OH en ortho, c'est-à-dire en sa transformation en dopa. L'oxydation ultérieure de celui-ci par la tyrosinase aboutit à la 5.6-quinone de l'acide dihydroxyindol-2-carboxylique. Rien d'étonnant donc que les relations entre ces deux corps soient si étroites.

Un fait qui milite encore contre les idées de BLOCH, c'est qu'on n'a jamais pu retrouver de dopa dans les tissus des Vertébrés (SATO et BRECHER). Au contraire, la tyrosine y est décelable. On n'a guère pu trouver la dopa (ou plus exactement une substance présentant des réactions données par la dopa, mais aussi par tous les orthodiphénols) que chez des Invertébrés et particulièrement chez des Lépidoptères : *Saturnia pavonina* et *Eriogaster lanestris* (BRECHER et WINKLER); *Lophyrus pini* (SCIACCHITANO). Et encore, dans ce cas, PRZIBRAM affirme qu'il y a mélanogenèse sans l'intervention d'aucun ferment, l'oxydation de la dopa se produisant toute seule lorsque les conditions d'alcalinité et d'humidité sont favorables.

Résumons ces données sur la valeur histochimique de la doparéaction. Il semble que, bien effectuée, elle soit signalétique d'un ferment intracellulaire; en revanche, il n'est pas encore certain que ce ferment soit une dopaoxydase plutôt qu'une tyrosinase.

Il resterait maintenant à étudier la valeur biologique générale de la doparéaction.

Ce serait là une tâche considérable, qui dépasserait le cadre de cet exposé. Cette question constitue en effet une des données fondamentales d'un problème très épineux, celui de l'origine des cellules pigmentaires chez les Vertébrés. Nous nous contenterons ici de situer la discussion, renvoyant pour une étude plus fouillée au beau livre de VERNE sur les pigments et à l'importante monographie de BIEDERMANN sur les téguments des Vertébrés.

BLOCH, trouvant la doparéaction positive exclusivement au niveau de cellules épidermiques, conclut que la mélanogenèse est exclusivement l'apanage de cellules d'origine épithéliale. Le pigment qu'on rencontre

dans les chromatocytes répartis dans le tissu conjonctif y aurait immigré secondairement.

Or, de nombreux travaux tendent à montrer que la pigmentogenèse s'effectue ou peut s'effectuer dans des éléments mésodermiques; cette théorie s'appuie aussi bien sur des arguments d'ordre purement morphologique que sur des faits histochimiques, tels que la recherche des propigments mélaniques au moyen de la réaction argentaffine. Entre les deux théories, celle de la pigmentogenèse épithéliale s'appuyant sur la doparéaction de BLOCH, et celle de la pigmentogenèse conjonctive, étayée par la réaction argentaffine, il y a donc une flagrante contradiction. Elle pose la question de la signification de la doparéaction. Est-il certain que la doparéaction, si elle révèle un ferment, révèle bien le ferment *normal* de la mélanisation? Des doutes ont été émis à ce sujet, spécialement par PRZIBRAM et ses élèves.

Cependant, il est bien difficile de prendre position dans cette discussion. On peut émettre également l'opinion que la doparéaction, processus physiologique, n'est qu'une des modalités suivant laquelle peut se produire la mélanogenèse, la mélanogenèse conjonctive étant une autre. On a pensé également à une collaboration des cellules épithéliales et des cellules conjonctives, les unes apportant le ferment mélanisant, les autres apportant le chromogène. Encore une fois, ces discussions ne peuvent être poursuivies ici, et nous renvoyons pour les détails aux travaux généraux cités plus haut.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- BIEDERMANN, *Erg. Biol.*, 1, 1926. — BLOCH (Br.), *Arch. f. Dermat.*, 124, 1917, p. 129; *Hoppe-S.*, 98, 1917, p. 226; *A. Dermat. Syph.*, 135, 1924; *Bull. Soc. franç. Dermat.*, 1921. — BLOCH (Br.) et LOEFFLER, *A. klin. Med.*, 1917. — BLOCH (Br.) et RHYNER, *Z. exp. M.*, 5, 1917, p. 180. — BLOCH (Br.) et PECK (S. M.), *Fol. Haemat.*, 41, 1930, p. 166. — BRECHER et WINCKLER, *A. mikr. Anat. Entw.*, 104, 1925. — HASEBROEK (K. A.), *Dermat. Syph.*, 130, 1921; *Biol. Zbl.*, 41, 1921; *Fermentforsch.*, 5, 1921, p. 1; *A. Entw. Mech.*, 52, 1922. — HEUDORFER (K.), *Münch. med. W.*, 1921; *A. Dermat. Syph.*, 134, 1921. — LAIDLAW (G. F.), *Anat. Rec.*, 53, 1932, p. 399; *Amer. Jl. Path.*, 8, 1932. — LAIDLAW (G. F.) et BLACKBERG (S. N.), *Amer. Jl. Path.*, 8, 1932. — LEMMEL, *Zbl. Path.*, 32, 1921, p. 89. — MIESCHER (G.), *A. mikr. Anat.*, 97, 1923. — PRZIBRAM (H.), *Bio. Z.*, 127, 1922. — PRZIBRAM, DEMBROWSKI et BRECHER, *A. Entw. Mech.*, 48, 1921, p. 140. — RAPER (H. S.), *Bio. Jl.*, 20, 1926, p. 735. — RAPER (H. S.) et DULIÈRE (W. L.), *Bio. Jl.*, 24, 1930, p. 239. — SATO et BRECHER, *A. mikr. Anat.*, 104, 1925. — SCIACCHITANO (I.), *A. mikr. Anat.*, 104, 1925.
-

## SECTION VII.

### Vitamines.

## CHAPITRE XVIII.

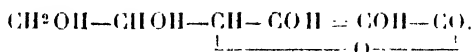
### VITAMINE C.

---

Des recherches toutes récentes viennent d'ouvrir un chapitre nouveau et important de l'Histochimie. On a en effet réussi à caractériser et à localiser histochimiquement la vitamine C dans les tissus animaux.

Ces études sont la conséquence directe des gros progrès qui ont été réalisés dans ces dernières années sur la constitution chimique et les propriétés de la vitamine C. En partant d'un fait bien connu, la grande oxydabilité du facteur antiscorbutique, SZENT-GYÖRGYI a réussi le premier à l'isoler et à déterminer en première approximation sa constitution chimique. Il put extraire de la surrénale d'abord, puis de plusieurs plantes (choux, piment, etc.) une substance à caractère réducteur extrêmement marqué et présentant toutes les propriétés biologiques du facteur antiscorbutique. Cette substance possède une fonction acide, donne la réaction de MOLISCH et fournit une osazone; sa formule brute est  $C^4H^8O^6$ . SZENT-GYÖRGYI appela d'abord la substance ainsi découverte par lui acide hexuronique, puis acide « ascorbique ». La découverte de SZENT-GYÖRGYI provoqua un intense courant de recherches. De nombreux auteurs montrèrent, d'une part, que la substance isolée par cet auteur correspond bien à la vitamine C et, d'autre part, s'attachèrent à approfondir sa constitution chimique. Les travaux de VON EULER, HAWORTH, HIRST, KARRER, VON VARGHA, MICHEEL, KRAFT ont abouti à faire admettre la formule proposée par HAWORTH et HIRST. Cette formule vient d'être confirmée par la synthèse effectuée par REICHSTEIN, GRÜSSNER et OPPENAUER. Elle

s'écrit ainsi :



Il est intéressant de remarquer que le point de départ de la découverte de SZENT-GYÖRGYI est une observation d'ordre morphologique. L'auteur étudiait, chez les plantes, un « facteur réducteur » qu'il soupçonnait être la vitamine C lorsqu'il observa qu'une tranche de surrénale, traitée à l'obscurité par une solution de nitrate d'argent, noircit immédiatement. Le noircissement est localisé à la portion corticale de l'organe, tandis que la médullaire ne réagit pas. C'est en partant de cette donnée que SZENT-GYÖRGYI put isoler de la surrénale le « facteur réducteur », l'obtenir à l'état cristallisé et montrer son identité avec le facteur antiscorbutique.

Un assez grand nombre d'auteurs se sont servis de la propriété indiquée par SZENT-GYÖRGYI — réduction à peu près instantanée du nitrate d'argent en solution neutre, à l'obscurité — pour déceler la vitamine C dans les organes. La plupart cependant se sont contentés de constater macroscopiquement la présence ou l'absence de réduction de l'argent, et n'ont pas fait de recherches microscopiques en vue de serrer de plus près sa localisation. Les premières études à proprement parler histochimiques qui aient été publiées sont, pensons-nous, celles de GOUGH et ZILVA (mai 1933). La méthode de ces auteurs consiste à traiter des fragments de tissu à l'obscurité par une solution à 0,4 pour 100 de nitrate d'argent pendant 15 minutes, puis à rincer, à traiter par une solution à 5 pour 100 d'hyposulfite de sodium et à inclure à la paraffine. Les auteurs étudièrent ainsi, à vrai dire sans trop approfondir le point de vue histologique de la question, la répartition de l'acide ascorbique dans la surrénale, l'hypophyse et l'ovaire de divers animaux. Un peu plus tard, BOURNE, pour tenter d'éviter l'action dissolvante des réactifs fixateurs, préconise la fixation par les vapeurs de formol; cette technique ne paraît pas sans action nocive sur la vitamine et est donc suspecte. GALIVAO et CARDOSO utilisent la méthode primitive de SZENT-GYÖRGYI, mais opèrent en pleine lumière, ce qui en réduit singulièrement la valeur spécifique; on connaît en effet la grande photosensibilité de beaucoup de composés argentiques.

GIROUD et LEBLOND se sont attachés à utiliser une technique impeccable et à approfondir l'étude de la localisation histochimique précise de la vitamine C.

La technique de ces auteurs comprend trois temps. Tout d'abord, ils se débarrassent des chlorures en excès par un lavage dans une solution isotonique indifférente (solution isotonique de lévulose). Dans un deuxième temps, on fait agir le nitrate d'argent. On emploie une solution à 10 pour 100 de nitrate ou d'acétate d'argent, soit neutre, soit de préférence acidifiée à raison de 3 gouttes d'acide acétique pour 100<sup>cm<sup>3</sup></sup>. Pour assurer une bonne pénétration des réactifs, on les injecte par voie vasculaire. Dans un troisième temps, on élimine le sel d'argent en excès par l'eau distillée d'abord, puis par l'hyposulfite de sodium. Lavage secondaire, coupe par congélation ou inclusion à la paraffine. Toutes les opérations se font à l'abri de la lumière (1).

On a déjà parlé à plusieurs reprises dans le courant de cet ouvrage des réactions argentiques en Histochimie et l'on a dit combien leur spécificité apparaît souvent douteuse. Cependant, dans le cas présent, la spécificité de la réaction semble absolument certaine. En étudiant la réaction argentaffine, nous avons déjà noté que les substances capables de réduire le nitrate d'argent ammoniacal par elles-mêmes, sans l'intervention d'aucun autre agent réducteur, ne sont pas fréquentes dans les tissus animaux; c'est pour ce motif que la réaction argentaffine a une valeur signalétique indiscutable. Or, bien plus rares encore sont les substances capables de réduire les sels d'argent en solution neutre ou acide, et surtout de les réduire instantanément; à l'heure actuelle, aucune autre que l'acide ascorbique n'a été signalée dans les tissus animaux. Ni l'adrénaline, ni les autres substances argentaffines, qui réduisent les sels d'argent en solution alcaline et assez lentement, ne donnent la réaction dans les conditions utilisées par GIROUD et LEBLOND. Les auteurs ont d'ailleurs effectué toute une série de tests biologiques qui montrent bien la spécificité de leur technique. La méthode donne des résultats là où l'analyse chimique et biologique a montré l'existence du facteur antiscorbutique (surrénale, corps jaune, organe, citron, chou, etc.); elle donne des résultats négatifs avec des organes ou organismes qui en sont dépourvus, tels que les Champignons. Lorsqu'on extrait l'acide ascorbique par ses solvants (alcool méthylique) ou qu'on le détruit en l'oxydant (iode), la réaction devient négative. Enfin, elle devient négative chez l'animal en état d'avitaminose C et reparait progressivement lorsqu'on effectue la revitamination par l'emploi d'un régime approprié.

D'autre part, après avoir examiné les préparations que GIROUD et

---

(1) Nous remercions MM. GIROUD et LEBLOND qui nous ont très aimablement communiqué leurs documents manuscrits.

LEBLOND ont présentées au Congrès des Anatomistes de 1934, il nous semble bien que la localisation de la substance recherchée peut être effectuée avec une précision largement suffisante au point de vue histologique. Le précipité argentique apparaît en effet toujours bien limité à des espèces cellulaires bien déterminées et il ne semble pas y avoir d'images de diffusion.

Les premières études de GIROUD et LEBLOND ont porté sur la surrénale. SZENT-GYÖRGYI, comme nous l'avons déjà dit, avait montré par des réactions macroscopiques que l'acide ascorbique dans la surrénale se trouvait limité à la portion corticale de celui-ci; la médullaire n'en renferme pas. Il y a donc indépendance entre le métabolisme de l'adrénaline et celui de la vitamine C. SZENT-GYÖRGYI confirma cette donnée en montrant que le corps interrénal des Sélaciens, homologue de la corticosurrénale des Vertébrés supérieurs et ne renfermant pas de tissu de type médullaire, présente exactement les mêmes réactions. GIROUD et LEBLOND, précisant ces notions, montrent que les régions fasciculée et réticulée de la corticosurrénale renferment d'abondantes quantités de vitamine C. La région glomérulaire, elle, n'en renferme pas; ce fait confirme les idées des histologistes qui considèrent cette zone comme inactive ou plutôt comme zone de réserve (GOORMAGHTIGH). L'acide ascorbique n'existe que dans le cytoplasme des cellules, jamais dans le noyau. Dans la surrénale, les granulations argentiques sont complètement indépendantes des gouttelettes lipidiques si abondantes en général dans le cortex; enfin, ces granulations ont une tendance à prendre un « aspect » mitochondrial, ce qui amène à penser à la localisation de l'acide ascorbique au niveau du chondriome. GIROUD et LEBLOND ont pu trouver de l'acide ascorbique en petite quantité dans la médullaire surrénale, chose qui avait échappé à SZENT-GYÖRGYI. Seul un examen microscopique attentif permet de l'y déceler; en effet, la réaction est discrète et très exactement limitée à la zone de la cellule renfermant l'appareil de GOLGI, qui se trouve ainsi très nettement dessiné.

Par leur méthode, GIROUD et LEBLOND ont constaté la présence de vitamine C au niveau de nombreux autres organes, mais tout particulièrement dans les glandes génitales. Dans le testicule, la réaction est très forte dans les cellules interstitielles; son intensité est comparable à celle des cellules de la corticosurrénale; là aussi, la localisation semble être mitochondriale. Beaucoup plus faible est la réaction dans les tubes séminipares;

les cellules de SERTOLI ne présentent que quelques granulations dans le cytoplasme et les cellules séminales une discrète réaction dans la zone de GOLGI. Dans la glande génitale femelle, les auteurs, en collaboration avec M. GIROUX, ont montré l'absence de vitamine C dans les ovocytes, les cellules folliculeuses et le follicule. Au contraire, les cellules de l'interstitielle présentent des réactions intenses. D'autre part, le corps jaune périodique et le corps jaune de grossesse renferment toujours des quantités importantes d'acide ascorbique. La fixation de la vitamine y subit d'ailleurs un cycle comme la cellule lutéinique elle-même et régresse rapidement dans le corps jaune en involution.

Il est intéressant de remarquer que les cellules de l'organisme les plus riches en vitamine C — cortex surrénal, corps jaune, cellules interstitielles — ont de nombreux autres points communs au point de vue histologique.

Enfin, les auteurs, avec RABINOWICZ, ont recherché l'acide ascorbique dans de nombreux autres organes. À part le lobe antérieur de l'hypophyse, aucun ne donne de réaction d'intensité comparable à celle qui a été observée dans les organes dont on vient de parler. On trouve une petite quantité de vitamine dans la cellule hépatique; il y en a également dans les cellules nerveuses, mais non dans la névroglie. Il ne semble pas y en avoir dans les tissus musculaires et conjonctifs, ni dans la thyroïde, la parathyroïde, le thymus.

Toutes les observations ont été contrôlées sur des animaux en état d'avitaminose; le retour des réactions s'observait sur des animaux revitaminés; enfin, l'extraction faisait disparaître les réactions.

L'ensemble de ces remarquables recherches accomplies par GIROUD et ses collaborateurs permet donc de se faire une idée de la répartition et du cycle de la vitamine C dans l'organisme et d'en établir la localisation histologique fine. Le chapitre d'Histochimie qui vient ainsi de s'ouvrir est déjà riche en résultats; il est de ceux qui promettent encore.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- BOURNE (G.), *Austral. JI exper. Biol. a. med. Sc.*, 11, 1933, p. 261. — GIROUD (A.) et LEBLOND (C. P.), *Biol.*, 115, 1934, p. 705, 841 et 1088; *Ass. Anat.*, 1934; *Jl des Sc. méd. de Lille*, 52, 1934, p. 301. — GIROUD (A.), LEBLOND (C. P.) et GIROUX (M.), *Acad.*,

26 février 1934. — GIROUD (A.), LEBLOND et RABINOWICZ (M.), *Biol.*, 115, 1934, p. 1088.  
— GOUGH (J.) et ZILVA (S. S.), *Biochem. Jl*, 27, 1933, p. 1279. — HAWORTH et HIRST.  
*Jl chem. Soc.*, 1270, 1933. — MICHEEL (F.) et KRAFT (K.), *Hoppe-S.*, 222, 1933, p. 235.  
— REICHSTEIN, GRUSSNER et OPPENAUER, *Helv. Chim. Act.*, 16, 1933, p. 1019. — SZENT-  
GYÖRGYI, *Biochem. Jl*, 22, 1928, p. 1387.

Voir en outre une bibliographie très étendue dans : LEBLOND, *Recherches histochimiques sur la localisation et le cycle de la vitamine C* (facteur antiscorbutique) dans l'organisme, 1934, Laval, imprimerie Barnéoud.

-----





## ABRÉVIATIONS

UTILISÉES DANS LES INDEX BIBLIOGRAPHIQUES

---

<i>A. Anat. Mic.</i> .....	Archives d'Anatomie microscopique.
<i>Abderh. Bio.</i> .....	Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden.
<i>Abderh. Hdb.</i> .....	Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.
<i>A. Biol.</i> .....	Archives de Biologie.
<i>Acad.</i> .....	Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences de Paris.
<i>A. Entw. Mech.</i> .....	Archiv für Entwicklungs-Mechanik.
<i>A. Ital. Biol.</i> .....	Archives Italiennes de Biologie.
<i>A. mikr. Anat.</i> .....	Archiv für mikroskopische Anatomie.
<i>An. A.</i> .....	Anatomischer Anzeiger.
<i>An. H.</i> .....	Anatomische Hefte.
<i>Anat. Rec.</i> .....	Anatomical Record.
<i>A. Path.</i> .....	Archives of Pathology.
<i>A. Prot.</i> .....	Archiv für Protistenkunde.
<i>A. Zellf.</i> .....	Archiv für Zellforschung.
<i>A. Zool.</i> .....	Archives de Zoologie expérimentale et générale.
<i>Ber. d. bot. Ges.</i> .....	Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft.
<i>Ber. d. chem. Ges.</i> .....	Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.
<i>Biol.</i> .....	Comptes rendus de la Société de Biologie.
<i>Biol. Rev.</i> .....	Biological Reviews.
<i>Biol. Zbl.</i> .....	Biologisches Zentralblatt.
<i>Bio. Z.</i> .....	Biochemische Zeitschrift.
<i>Berl. K. W.</i> .....	Berliner klinische Wochenschrift.
<i>Bull. Hist.</i> .....	Bulletin d'Histologie appliquée à la physiologie et à la pathologie
<i>Derm. W.</i> .....	Dermatologische Wochenschrift.
<i>Enz. mikr. Techn.</i> .....	Enzyklopädie der mikroskopischen Technik.
<i>Erg. An.</i> .....	Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte.
<i>Erg. Biol.</i> .....	Ergebnisse der Biologie.
<i>Erg. Physiol.</i> .....	Ergebnisse der Physiologie.
<i>Erg. Path.</i> .....	Ergebnisse der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie des Menschen und der Tiere.
<i>Fol. Haem.</i> .....	Folia Haematologica.
<i>Hoppe-S.</i> .....	Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie.

<i>Jl. Anat. Physiol.</i> .....	Journal de l'Anatomie et de la Physiologie.
<i>Jl. Chem. Soc.</i> .....	Journal of the chemical Society.
<i>J. Physiol.</i> .....	Journal of Physiology.
<i>Kl. W.</i> .....	Klinische Wochenschrift.
<i>Lincei.</i> .....	Atti e rendiconti della Accademia dei Lincei.
<i>Mon. Zool. ital.</i> .....	Monitore zoologico italiano.
<i>Münch. med. W.</i> .....	Münchener medizinische Wochenschrift.
<i>Pflüger.</i> .....	Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie.
<i>Proc. Roy. S.</i> .....	Proceedings of the Royal Society of London.
<i>Prot.</i> .....	Protoplasma.
<i>Sc.</i> .....	Science (New-York).
<i>Soc. Chim.</i> .....	Bulletin de la Société chimique de France.
<i>Soc. Chim. Biol.</i> .....	Bulletin de la Société de Chimie biologique.
<i>Verh. d. path. Ges.</i> .....	Verhandlungen der deutschen pathologischen Gesellschaft.
<i>V. Möllend. Hdb.</i> .....	Von Möllendorffs Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.
<i>Virch.</i> .....	Virchows Archiv für pathologische Anatomie, Physiologie und klinische Medizin.
<i>Z. Anat.</i> .....	Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte.
<i>Zbl. Bakt.</i> .....	Zentralblatt für Bakteriologie.
<i>Zbl. Path.</i> .....	Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie.
<i>Z. Biol.</i> .....	Zeitschrift für Biologie.
<i>Ziegler.</i> .....	Zieglers Beiträge zur allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie.
<i>Z. klin. M.</i> .....	Zeitschrift für klinische Medizin.
<i>Z. exp. M.</i> .....	Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin.
<i>Z. mikr.-anat. Forsch.</i> ...	Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung.
<i>Z. wiss. M.</i> .....	Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikrosko- pische Technik.
<i>Z. Zellf.</i> .....	Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie.

---

## TABLE ALPHABÉTIQUE DES AUTEURS.

- Abderhalden — 86, 128.  
 Abel — 159.  
 Abrami — 200.  
 Achard — 108.  
 Adler — 266.  
 Albrecht — 221.  
 Alfieri — 248.  
 Almqvist — 101, 102.  
 Altmann — 13, 59, 197.  
 André — 184, 185, 197.  
 Angeli — 119, 120.  
 Anten — 184, 185.  
 Arcangeli — 118.  
 Ardnt — 198.  
 Arnold — 15.  
 Aschoff — 69, 75, 200.  
 Asher — 252.  
 Askanazy — 96.  
 Asvadourova — 10, 86.  
 Auscher — 252.  
 Axenfeld — 129.  
 Aynaud — 108.  
  
 Bäcker — 85.  
 Baginski — 144, 149.  
 Baniecki — 192.  
 Barbaglia — 66.  
 Barfurth — 226, 229.  
 Bark — 227.  
 Bauer — 11, 178, 180, 182, 230, 231, 232,  
 233.  
 Baumann — 101.  
 Behrens — 99, 101, 215, 252.  
 Benda — 203.  
 Bensley — 110, 116, 117, 119, 128.  
  
 Berg — 11, 128, 180, 197.  
 Bergh — 27, 108.  
 Bergmann — 242.  
 Bernard — 110, 228, 229.  
 Bertolo — 116.  
 Bertrand — 98, 156, 269, 283.  
 Best — 226, 229, 230.  
 Bichat — 1, 38.  
 Biedermann — 22, 296.  
 Blanchetière — 129.  
 Bloch — 156, 292, 293, 294, 295, 296, 297.  
 Bœminghaus — 191, 202.  
 Bogdanowicz — 183.  
 Bois — 258.  
 Bonnamour — 197.  
 Bonnet — 166, 169.  
 Borberg — 143.  
 Borchardt — 100.  
 Borst — 44, 48, 49, 245, 255, 256, 257,  
 258, 259.  
 Botazzi — 158.  
 Bouin — 197.  
 Bourne — 299.  
 Boyce — 95, 96, 97.  
 Brachet (J.) — 182.  
 Bradley — 95, 96, 97, 98.  
 Brandino — 102.  
 Brecher — 295, 296.  
 Brault — 229.  
 Brenckmann — 110.  
 Broussy — 122, 139, 154, 156.  
 Brünauer — 122.  
 Brunswick — 31, 211, 234.  
 Buckmaster — 282.  
 Buffa — 132, 137.

- Bulliard — 122, 133, 134.  
 Bunge — 91.  
 Bureau — 99.  
 Burggraeve (A.) — 2.  
 Burggraeve (P.) — 226.  
  
 Calabresi — 166.  
 Califano — 98.  
 Cameron — 71, 72, 73, 75, 79, 80, 94.  
 Canal — 154.  
 Cardoso — 299.  
 Carleton — 229.  
 Carnot — 51.  
 Carnoy — 38.  
 Casanova — 212.  
 Cesaris Demel — 118.  
 Chambers — 59.  
 Chabannier — 168.  
 Checchi — 118.  
 Chevallier — 166, 168.  
 Chiosa — 90, 91, 95.  
 Chodat — 269, 285, 292, 293, 294.  
 Christeller — 98, 99, 100, 102.  
 Ciaccio — 27, 152, 184, 193, 205, 206, 207,  
 208, 220, 222, 223.  
 Clara — 141, 146, 148, 150, 151, 152, 154,  
 155, 159.  
 Claude — 253.  
 Cohn — 75.  
 Colombo — 75.  
 Comes — 116, 118.  
 Cordier — 15, 26, 99, 100, 103, 124, 139,  
 144, 145, 147, 148, 150, 151, 152, 153,  
 169, 216.  
 Cowper Eaves — 75.  
 Courmont — 184.  
 Créatin — 68, 71, 72, 76, 84, 100, 102, 212.  
 Cristol — 87.  
  
 Daddi — 194.  
 Dagnelie — 195.  
 Danisch — 152.  
 Dastre — 200.  
 Debenedetti — 102.  
 Deckhuysen — 27, 108.  
  
 Defrise — 106.  
 Delépine — 226, 229.  
 Deloyers — 110.  
 Derrien — 47, 49, 50, 130, 255, 258.  
 Deussen — 209.  
 Devaux — 94.  
 De Waele — 225.  
 Dhéré — 49.  
 Dieterle — 90.  
 Dietrich — 202, 205, 278.  
 Dolfini — 191.  
 Doubrow — 87.  
 Driessens — 229, 230.  
 Dubois — 47, 163.  
 Dubuisson — 99.  
 Dulzetto — 133, 134, 135.  
 Dustin (A.) — 181, 259.  
 Dustin (P.) — 164.  
  
 Ebstein — 185.  
 Ehrlich — 19, 160, 226, 227, 229, 237.  
 Eisenberg — 20, 51, 202.  
 Ellinger — 51.  
 Erspamer — 152, 154, 155.  
 Escher — 196, 204, 208.  
 Even — 87.  
  
 Fabre — 258, 259.  
 Falkenberg — 86.  
 Falozzi — 113.  
 Fauré-Frémiet — 121, 202, 208, 211.  
 Fautrez — 269.  
 Favre — 197.  
 Feulgen — 117, 173, 176, 177, 180, 182,  
 183, 215, 216, 217.  
 Feyel — 109, 166, 169.  
 Fidler — 117, 119.  
 Fiessinger — 263, 267, 280, 283, 287.  
 Filippi (de) — 155.  
 Fischel — 266, 279, 282, 283, 284, 285.  
 Fischer (A.) — 226, 230.  
 Fischer (F.-P.) — 51.  
 Fischler — 203, 204.  
 Fitz-Gérald — 110.  
 Fleig — 283.

- Flesch — 79.  
 Fosse — 165, 167.  
 Frankenberger — 101.  
 Freudenberg — 69.  
 Frey — 2, 4.  
 Friedländer — 163.  
 Frommann — 16, 107.  
  
 Gage — 229.  
 Galivao — 299.  
 Gallinal — 99.  
 Gans — 89.  
 Garrault — 241.  
 Gauthier-Villars — 99, 100.  
 Geiger — 65.  
 Gérard — 15, 99, 100, 103, 144, 145, 151,  
 152, 159, 195.  
 Gerlach — 44, 96, 100, 124.  
 Gersh — 13, 15, 59.  
 Giberton — 191.  
 Gierke — 226, 271, 273.  
 Gilson — 93, 118.  
 Giroud — 26, 109, 121, 128, 129, 133, 134,  
 136, 159, 224, 300, 301, 302, 303.  
 Giroux — 302.  
 Godlewski — 182.  
 Gohs — 27, 79.  
 Gola — 133.  
 Golodetz — 211.  
 Golovine — 15.  
 Gömöri — 79.  
 Gössl — 99.  
 Gough — 299.  
 Gräff — 271, 272, 273, 274, 276, 278, 282,  
 287, 288, 289.  
 Graffin — 51.  
 Graham — 267.  
 Grandis — 71, 77, 116.  
 Graupner — 226.  
 Gresson — 182.  
 Groebbels — 27, 106, 108.  
 Gross — 38.  
 Grynfeltt — 87, 144, 163, 248.  
 Guillermond — 221.  
 Gutstein — 8, 40, 209.  
  
 Guyon — 218.  
  
 Haitinger — 48, 52.  
 Hale — 59.  
 Hall — 85.  
 Hallheimer — 276, 288.  
 Halliburton — 68.  
 Hammar — 191.  
 Hammarsten — 117, 232.  
 Hammett — 110.  
 Hamperl — 52, 152, 158.  
 Handwerck — 197.  
 Harris — 116.  
 Hartoch — 51.  
 Harvey — 110.  
 Hasebroek — 156, 292, 295.  
 Hasegawa — 148.  
 Haushalter — 166, 169.  
 Heffter — 133.  
 Heine — 38, 118.  
 Heimstädt — 47, 49.  
 Henle — 2, 143.  
 Henckel — 60, 61.  
 Herdmann — 95, 96.  
 Herrera — 58.  
 Hertwig (G.) — 6, 20, 38, 180.  
 Herwerden — 175, 290.  
 Herzheimer — 6, 86, 112.  
 Heudorfer — 294.  
 Hintzelmann — 111.  
 Hirschfeld — 286.  
 Hirt — 51.  
 Hollande — 184, 279, 280, 281, 282.  
 Hollmann — 169.  
 Holmes — 237.  
 Holthusen — 198.  
 Hope-Hibbard — 181.  
 Hopkins — 132, 133, 135.  
 Hoppe-Seyler — 172.  
 Horning — 62.  
 Hugounenq — 68.  
 Hueck — 246, 247, 261.  
 Hurtley — 128.  
  
 Imhäuser — 215.

- Iwahashi — 101.  
 Jancso — 52, 123.  
 Jacobi — 66.  
 Jeffers — 230.  
 Jirovec — 183.  
 Jolly — 6.  
 Jones — 124.  
 Jonnart — 159.  
 Jørgensen — 175.  
 Joseph — 51.  
 Jourdan — 154.  
 Joyet-Lavergne — 134, 136, 137.  
 Justin-Besançon — 87.  
 Justus — 112, 122.  
 Kardasewitsch — 254.  
 Katsunuma — 287.  
 Kauffmann — 192, 195, 202, 203, 204, 205,  
 206, 209, 210, 213.  
 Kawamura — 205, 222.  
 Kaye — 133, 139.  
 Keilin — 44, 289.  
 Keuscher — 66.  
 Kimmelsiel — 191, 210.  
 Kisser — 68.  
 Klein — 6, 31, 94, 117.  
 Kleestadt — 226.  
 Klotz — 79, 80.  
 Koch — 182.  
 Köchlin — 270.  
 Kockel — 85, 89, 90, 92, 94.  
 Kogel — 49.  
 Komaja — 98.  
 Königsdörffer — 44, 48, 49, 255, 256, 257,  
 258, 259.  
 Kordovitch — 233.  
 Kossa — 27, 76, 79.  
 Kossel — 115, 172, 176.  
 Krasser — 128.  
 Krause — 198.  
 Kreibich — 266.  
 Kühne — 3.  
 Kühnelt — 234, 235.  
 Kuil — 152.  
 Kultschitzky — 151.  
 Kunike — 234.  
 Kutschera-Aichbergen — 149, 191, 206,  
 213.  
 Laidlaw — 293.  
 Langeron — 52, 135.  
 Langhans — 229.  
 Lapicque — 91, 92.  
 Lapinski — 249, 250, 252.  
 Laux — 210.  
 Laves — 166.  
 Leathes — 190.  
 Leblond — 26, 149, 300, 301, 302, 303.  
 Lehner — 237.  
 Lepehne — 249.  
 Lehmann — 3, 47, 49, 192, 195, 199, 200,  
 202, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 213.  
 Lemmel — 110.  
 Léonard — 227, 231.  
 Lépine — 110.  
 Leschke — 27, 106, 111, 114, 165, 194.  
 Leulier — 31, 116, 117, 211, 212.  
 Leutert — 74, 75.  
 Levene — 117, 173, 176, 177, 236, 240.  
 Lieb — 191.  
 Liebermann — 209.  
 Liesegang — 16, 58, 66, 107.  
 Lilienfeld — 25, 115, 118, 174.  
 Lillie — 283, 284.  
 Lipschitz — 289.  
 Lison — 20, 139, 141, 142, 144, 145, 146,  
 150, 151, 153, 155, 157, 158, 159, 160,  
 162, 163, 179, 194, 195, 237, 239, 249,  
 250, 267.  
 Litten — 73.  
 Lloyd — 17, 66.  
 Loele — 267, 268, 273, 276, 277, 279, 286,  
 289.  
 Loisel — 197, 208.  
 Lombardo — 102.  
 Lönnberg — 68.  
 Loyez — 253.  
 Lubarsch — 226, 229, 230.  
 Ludford — 182.

- Macallum — 14, 17, 24, 25, 65, 66, 72, 75,  
 77, 78, 86, 90, 92, 93, 106, 112, 116, 117,  
 118, 121, 174, 175.  
 Mac Crae — 124.  
 Macdonald — 27.  
 Macdonnald — 106.  
 Macht — 159.  
 Madelung — 266.  
 Maggi — 221.  
 Mainini — 70, 77, 116.  
 Mallory — 96.  
 Mangenot — 11, 113, 278.  
 Mann — 5, 19, 121.  
 Marchi — 196, 197.  
 Marfori — 91, 92.  
 Marinesco — 263, 267, 287, 288.  
 Marza — 91, 95, 182.  
 Masson — 148, 152, 153, 248.  
 Mattei — 133, 134, 135.  
 Mawas — 90, 248.  
 May — 233.  
 Mayrhofer — 31.  
 Mayer — 209, 226, 230, 237, 248.  
 Meigen — 83.  
 Meirowski — 295.  
 Melczer — 188.  
 Memmesheimer — 122.  
 Mendel — 95, 96, 97, 98.  
 Merkel — 76.  
 Mestrezat — 248.  
 Metzner — 48.  
 Meyer — 38.  
 Mladenovic — 191.  
 Michaelis — 99, 100, 194, 195, 197, 237.  
 Miescher — 172, 174, 294.  
 Millon — 127, 128.  
 Millot — 159, 188, 191.  
 Mitamura — 15.  
 Mølgaard — 14.  
 Möllendorff (von) — 20, 41, 180, 237.  
 Molisch — 58, 68, 85, 89, 92.  
 Moitessier — 283.  
 Monti — 25, 106, 115, 118, 174.  
 Morat — 200.  
 Morel — 44, 63, 68.  
 Morelli — 123.  
 Muir — 122.  
 Mulders — 2.  
 Mukerji — 182.  
 Mulon — 143, 144, 197, 246.  
 Münzer — 226.  
 Nasmith — 117, 119.  
 Naumann — 48.  
 Nebelthaus — 185.  
 Neumann — 176, 286.  
 Neukirch — 226.  
 Nicolas — 151, 152.  
 Nishimura — 86.  
 Noll — 222.  
 Nye — 96.  
 Oes — 175.  
 Oetreicher — 166, 167, 168.  
 Ogata — 143, 144, 149.  
 Okkels — 60, 89, 99, 100, 108.  
 Oliver — 166, 169.  
 Oppenheimer — 264.  
 Orsenigo — 117, 118.  
 Osborne — 116, 122.  
 Overton — 190.  
 Pappenheim — 174, 237.  
 Parat — 6, 19, 136, 152, 212, 223.  
 Parker — 96.  
 Paruta — 135.  
 Pasteels — 15, 227, 231.  
 Patzelt — 6, 230.  
 Perls — 85, 87.  
 Petey — 44.  
 Pfühl — 12, 15.  
 Pietschmann — 183.  
 Pighini — 278.  
 Piras — 166.  
 Plenk — 110.  
 Polacci — 117, 118.  
 Policard — 3, 19, 22, 30, 33, 38, 44, 46,  
 48, 49, 58, 60, 61, 68, 69, 70, 81, 93,  
 94, 96, 100, 116, 117, 123, 124, 166,  
 168, 175, 186, 197, 258.  
 Posternak — 117.



- Poulsen — 130.  
 Pouyanne — 84, 102.  
 Pratje — 38.  
 Prenant (A.) — 10, 19, 38, 86, 186, 224.  
 Prenant (M.) — 52, 58, 83, 84, 249, 263,  
 267, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285,  
 286, 289.  
 Prowazek — 47, 221.  
 Przesmiccki — 15.  
 Prziham — 294, 295, 297.  
  
 Quastel — 132.  
 Quercigh — 84.  
 Querner — 52.  
 Quincke — 85, 89.  
  
 Rabinovicz — 302.  
 Rabl — 69.  
 Raciborski — 118, 129.  
 Ranvier — 196.  
 Raspail — 3, 57.  
 Raper — 190, 296.  
 Redenz — 180, 181.  
 Reichenow — 183.  
 Revol — 211, 212.  
 Rey — 137.  
 Rinne — 221.  
 Robin — 3.  
 Rocha-Lima — 191.  
 Rochlina — 183.  
 Roehde — 24.  
 Roehl — 72, 73, 74, 75, 78, 80.  
 Rohdenburg — 65.  
 Röhmann — 271.  
 Romeis — 6, 69, 87, 89, 226.  
 Romieu — 128, 129, 208, 210, 230.  
 Rosenheim — 201.  
 Roskin — 264.  
 Rossenbeck — 176, 178, 180, 182, 183.  
 Rossi — 197.  
 Rouslacroix — 192.  
 Roudowska — 283.  
 Ruhemann — 128.  
 Rünström — 221.  
 Russo — 116.  
  
 Sachs — 175.  
 Saint-Hilaire — 186.  
 Salomon — 71, 72.  
 Sartory — 279.  
 Sassuchine — 183.  
 Schaeffer — 208, 209.  
 Scheide — 58.  
 Schlossberger — 3.  
 Schmeltzer — 89, 90.  
 Schmiedeberg — 116.  
 Schmidt — 52, 82, 153, 191, 200.  
 Schmidtmann — 98, 261.  
 Schneider — 93, 221.  
 Schmorl — 69, 77, 79, 188, 272.  
 Schöller — 58.  
 Schoep — 52.  
 Schuckmann — 183.  
 Schuejeninoff — 69.  
 Schultz (A.) — 188.  
 Schultz-Brauns — 14, 58, 61, 81, 87.  
 Schultze (A.) — 210, 211.  
 Schultze (W.) — 66, 69.  
 Schultze (W. H.) — 271, 272, 273, 277.  
 Schulze (P.) — 233, 234, 235, 248.  
 Schumacher — 41, 123.  
 Schuscik — 69, 72, 75, 77, 79, 80.  
 Schwann — 130.  
 Schwartz — 38.  
 Sciacchitano — 296.  
 Scott — 58, 60, 62, 82, 95, 116, 117.  
 Seeger — 156, 157.  
 Seelig — 225.  
 Sehrwald — 110.  
 Senft — 221.  
 Seppili — 166.  
 Shearer — 135.  
 Shapiro — 206.  
 Simonnet — 102, 259.  
 Singer — 49, 51.  
 Skraup — 15.  
 Slonimski — 249, 250, 267.  
 Smith — 115, 120.  
 Smith Lorrain — 201, 202, 204.  
 Spalteholtz — 72, 131.  
 Spatz — 86.

- Starke — 197.  
 Stempel — 186.  
 Steward — 133.  
 Stieglitz — 15, 111.  
 Stoeltzner — 80, 209.  
 Stöker — 211.  
 Stokes — 46.  
 Strassmann — 272.  
 Strelzoff — 75.  
 Stübel — 47, 166, 169.  
 Stüler — 207, 225.  
 Sullivan — 133.  
 Sumita — 73.  
 Swirski — 86.  
 Szent-Györgyi — 151, 298, 299, 301.  
  
 Tada — 101.  
 Takamine — 143.  
 Tannenholz — 122.  
 Tartakowski — 86.  
 Thomas — 259.  
 Thugutt — 84.  
 Tirmann — 89.  
 Tischler — 38.  
 Tomita — 188.  
 Törö — 148, 152.  
 Treadwell — 93.  
 Truc — 51, 101.  
 Tschopp — 58, 61.  
 Turchini — 6, 47, 48, 50, 70, 113, 130, 154,  
 187, 255, 258.  
 Tunnicliffe — 133.  
  
 Unna — 22, 40, 41, 42, 174, 264, 283.  
  
 Vastarini-Cresi — 226, 230.  
 Verdeil — 3.  
 Verne — 144, 145, 156, 159, 177, 180,  
 183, 216, 217, 243, 296.  
 Verocay — 254.  
 Versé — 192, 198.  
  
 Vialli — 141, 153, 154, 155, 159, 164.  
 Villaret — 87.  
 Virchow — 252.  
 Vogt — 15.  
 Voinov — 290.  
 Voit — 180, 215.  
 Vonkennel — 98.  
 Voss — 5, 178, 180, 182.  
 Vulpian — 150.  
  
 Walker — 133, 139.  
 Walter — 166.  
 Watermann — 66.  
 Weber — 221.  
 Weil — 191.  
 Weill — 87.  
 Weissberger — 291.  
 Wermel — 39, 42, 176, 178, 180, 181, 183,  
 264.  
 Wester — 234.  
 Wiener — 91, 92, 93.  
 Windaus — 211.  
 Winckler — 271.  
 Winther — 115, 120.  
 Wisseling — 234.  
 Witt — 193, 270.  
 Wlassak — 196, 197.  
 Woerdemann — 66.  
 Wolff — 225.  
 Wotton — 128.  
 Wurmser — 137.  
 Wurster — 129.  
  
 Zacharias — 38, 130.  
 Zander — 234.  
 Zilva — 299.  
 Zimmermann — 38.  
 Zoia — 118.  
 Zuckerlandl — 266.  
 Zuelzer — 183.  
 Zweibaum — 278.



# TABLE DES MATIÈRES

## PREMIÈRE PARTIE HISTOCHIMIE GÉNÉRALE.

	Pages.
CHAPITRE I. — <i>Introduction historique</i> .....	1
CHAPITRE II. — <i>Les conditions d'exactitude de l'analyse histochimique : 1. Conditions morphologiques. Le problème de la fixation histochimique</i> .....	7
I. Fixation histochimique des substances figurées ou existant en liaison avec un substrat figuré.....	9
II. Fixation des substances non figurées.....	12
CHAPITRE III. — <i>Les conditions d'exactitude de l'analyse histochimique. 2. Conditions chimiques. Histochimie et analyse chromatique</i> .....	19
CHAPITRE IV. — <i>Possibilités et limites de l'Histochimie</i> .....	29
CHAPITRE V. — <i>Méthodes générales de l'Histochimie. L'analyse histochimique par l'étude des propriétés physiques</i> .....	36
I. Caractères de solubilité. La chromolyse.....	36
II. Microspectroscopie. Histospectrographie.....	42
III. Microfluoroscopie. Microspectrofluoroscopie.....	46
IV. Emploi de la lumière polarisée.....	52

## DEUXIÈME PARTIE HISTOCHIMIE SPÉCIALE.

### Section I : Éléments minéraux.

CHAPITRE VI. — <i>Recherche des éléments minéraux in toto. Microincinération</i> .....	57
A. Fixation et préparation des coupes.....	58
B. Incinération.....	61
C. Conservation et examen des spodogrammes.....	61
D. Valeur de la microincinération.....	62

	Pages.
CHAPITRE VII. — <i>Étude des cations</i> .....	65
I. Métaux alcalins.....	65
Sodium.....	65
Potassium.....	65
Thallium.....	66
II. Métaux alcalino-terreux.....	67
Calcium.....	67
1. La précipitation des formes solubles du calcium.....	68
2. Les réactions du calcium ionisé ou ionisable.....	69
A. Réactions de cristallisation.....	69
B. Méthodes aux laques.....	70
C. Méthode au pyrogallol.....	76
D. Méthode de Macallum au sulfate de plomb.....	77
E. Méthodes destinées plus spécialement à la mise en évidence du phosphate de calcium.....	79
3. Les réactions du calcium masqué.....	81
4. Les variétés du calcaire $\text{CO}^3\text{Ca}$ .....	83
Magnésium.....	84
III. Métaux lourds.....	85
Fer.....	85
1. La fixation histochimique du fer.....	85
2. Les réactifs du fer ionisé ou ionisable.....	87
A. Méthodes au bleu de Prusse.....	87
B. Méthodes au bleu de Turnbull.....	88
C. Méthodes au sulfure de fer.....	89
D. Méthodes à l'acide sulfocyanhydrique.....	89
E. Méthodes des laques.....	90
3. Démasquage du fer masqué.....	91
A. Méthodes de Macallum.....	92
B. Démasquage par le chlore-tétrachlorure de carbone.....	94
C. Démasquage par microincinération.....	94
Cuivre.....	95
Zinc.....	98
Bismuth.....	98
Manganèse.....	98
Or.....	99
Plomb.....	101
Mercure.....	102
Nickel.....	102
Uranium.....	103

	Pages.
CHAPITRE VIII. — <i>Étude des anions</i> .....	106
Chlore .....	106
A. Chlorures.....	106
B. Acide chlorhydrique.....	110
Brome .....	110
Iode .....	111
A. Iode ionique (iodures).....	111
B. Iode organique.....	112
C. Iode thyroïdien.....	113
Phosphore .....	113
A. Phosphates solubles en général.....	114
B. Phosphore occulte.....	115
Soufre.....	120
Arsenic.....	122
Silicium.....	123

## Section II : Protides et leurs dérivés.

CHAPITRE IX. — <i>Protides en général</i> .....	126
I. Réactions colorées générales des protides.....	126
II. Réactions par mordantage.....	130
III. Méthodes de digestion artificielle.....	130
CHAPITRE X. — <i>Produits d'anabolisme et de catabolisme des protides</i> .....	132
I. Aminoacides sulfurés et leurs dérivés.....	132
1. Méthodes de recherche.....	133
2. Résultats de la recherche histochimique des composés à fonction sulfhydryle .....	136
II. Composés à fonction phénolique.....	139
1. Méthodes d'étude des composés phénoliques.....	140
2. Résultats de la recherche histochimique des composés à fonction phénolique.....	150
III. Composés indoliques.....	160
1. Méthodes d'étude.....	160
2. Applications et résultats.....	162
IV. Urée.....	164
CHAPITRE XI. — <i>Nucléoprotides et leurs dérivés</i> .....	172
I. Nucléoprotides et acides nucléiques.....	172
1. Introduction .....	172

	Pages.
2. L'analyse chromatique et chromolytique des nucléines.....	174
3. La recherche de constituants minéraux des nucléines.....	174
4. Recherche des nucléines par la nucléase.....	175
5. La réaction nucléale de Feulgen-Rossenbeck.....	176
6. Résultats histochimiques de la réaction nucléale.....	181
II. Purines .....	183
1. Réactions communes à tous les corps puriques.....	184
2. Réactions spéciales des différentes purines.....	186

### Section III : Lipides.

CHAPITRE XII. — <i>Étude générale des méthodes d'analyse histochimique des lipides</i> .....	189
I. La fixation histochimique des lipides .....	191
II. Les réactions histochimiques générales des lipides.....	192
1. Caractères de solubilité.....	192
2. Colorants généraux des lipides.....	193
3. Réduction du tétr oxyde d'osmium.....	196
III. Réactions spéciales des divers lipides.....	198
1. Caractères optiques en lumière polarisée.....	198
2. Réactions dites spécifiques utilisant des matières colorantes.....	201
3. Réactions n'utilisant pas de matières colorantes.....	210
IV. Table dichotomique d'analyse histochimique des lipides.....	213
APPENDICE. — La réaction plasmale.....	215
CHAPITRE XIII. — <i>Lipides masqués et lipophanérose</i> .....	220

### Section IV : Glucides.

CHAPITRE XIV. — <i>Glucides</i> .....	225
I. Glycogène.....	226
1. La fixation du glycogène.....	226
2. Réaction à l'iode.....	228
3. Méthodes de coloration du glycogène.....	230
4. Réaction de BAUER.....	230
II. Galactogène .....	232
III. Cellulose et tunicine.....	233
IV. Chitine .....	233
APPENDICE. — Esters sulfuriques des polysaccharides et mucoprotides.....	236

**Section V : Pigments.**

	Pages.
CHAPITRE XV. — <i>Pigments</i> .....	243
I. Carotinoïdes.....	244
Annexe : Carotinalbumines.....	245
II. Chromolipoïdes.....	245
III. Mélanines.....	247
IV. Pigments à noyau tétrapyrroliques et leurs dérivés.....	249
1. Hémoglobine et ses dérivés.....	249
I. Hémoglobine.....	249
II. Hémosidérine.....	251
III. Hématoidine.....	252
IV. Bilirubine et biliverdine.....	253
V. Pigment malarique.....	253
2. Porphyrines.....	255
I. Méthodes d'étude histochimique des porphyrines.....	255
II. Quelques résultats de la recherche histochimique des porphyrines.....	258

**Section VI : Ferments.**

CHAPITRE XVI. — <i>Peroxydases et phénolases</i> .....	262
I. Peroxydases.....	264
A. Réaction à la benzidine.....	266
B. Naphtolperoxydasereaktion de Loele.....	368
C. Réaction aux zinc-leucos.....	268
II. Phénolases.....	269
A. Réactions au bleu d'indophénol.....	270
B. Phenolreaktion de Loele.....	276
C. Autres réactions.....	277
III. Discussion générale.....	278
1. La valeur des réactifs utilisés.....	278
2. La nature fermentative des catalyseurs étudiés. Pseudoperoxydases et pseudophénolases.....	282
3. Relations entre peroxydases et phénolases.....	285
4. Le rôle physiologique des peroxydases et phénolases.....	286
CHAPITRE XVII. — <i>Tyrosinase et dopaoxydase</i> .....	292



**Section VII : Vitamines.**

	Pages.
CHAPITRE XVIII. — <i>Vitamine C</i> .....	298
ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LES INDEX BIBLIOGRAPHIQUES.....	305
TABLE ALPHABÉTIQUE DES AUTEURS.....	307
TABLE DES MATIÈRES.....	315



## DATE OF ISSUE

This book must be returned within 3, 7, 14 days of its issue. A fine of ONE ANNA per day will be charged if the book is overdue.

---

--	--

