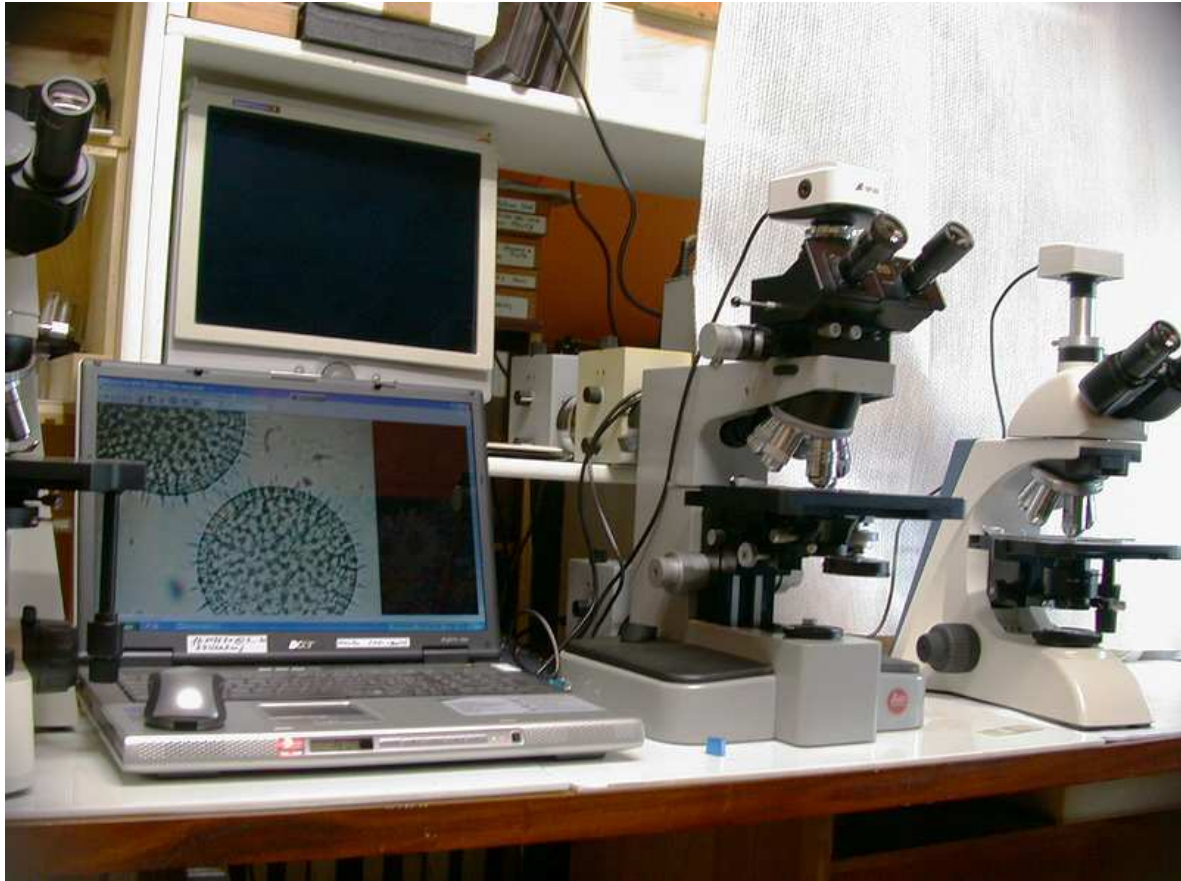


emplacement réservé pour logo
Hainaut Développement



(Mon coin labo, avec caméras numériques, photo M. Lecomte, novembre 2007)

Séminaire de microscopie générale, au Domaine de Massembre, à Heer-Agimont (Belgique)

du 21 au 26 avril 2008

Organisateur : Marcel LECOMTE

mlecomte@skynet.be

<http://www.champignons-passion.be>

SOMMAIRE :

Page :

3	: préambule
6	: photos de diverses installations microscopiques
7	: quel microscope choisir ?
9	: photos de microscopie
10	: les constituants du microscope : mécanique et optique
12	: oculaires et objectifs
13	: modus operandi pour la réalisation d'une observation type au microscope photonique à fond clair
14	: microscope et premiers accessoires : lames PO et CO – stockage et nettoyage
15	: huile à immersion – nettoyage des oculaires et des objectifs
17	: la 1 ^{ère} observation
19	: utilisation du microscope et de réactifs chimiques pour l'étude des champignons ; techniques d'observation
22	: un peu de vocabulaire micro-mycologique
23	: photos de microscopie
24	: la coloration des coupes : limites et réalités (généralités) – les différents types de colorations
27	: la coloration régressive
29	: technique complète de préparation d'une coupe à destination définitive
30	: généralités relatives à la fixation
31	: fixateurs coagulants et non coagulants
32	: les mélanges fixateurs
33	: de la théorie à la pratique : le contenu cellulaire
34	: étude des parois cellulaires
36	: généralités relatives à l'inclusion
37	: photos relatives au microtome
38	: généralités relatives à la coloration : les liquides de ramollissement – les réactifs colorants
39	: les colorants à part entière : métachromatie et orthochromatie
42	: les réactifs sulfoaldéhydiques
43	: le sulfobenzaldéhyde
44 & 45	: asques et ascospores
46	: les coupes en microscopie : un problème évident et peu facile à solutionner
47	: les coupes à main levée
48	: les microtomes de Ranvier, de Génat et de Minot
49	: le collage des spores et des coupes : la solution à beaucoup de problèmes de coloration – réalisation d'un frottis de spores
51	: le collage des coupes pour la coloration
53	: les milieux d'observation à utiliser pour l'examen d'une préparation microscopique – l'indice de réfraction
54	: quelques indices de réfraction intéressants
55	: les préparations ponctuelles – les préparations semi-définitives
56	: les préparations définitives
58	: à propos du marquage des objectifs Leitz (Frédéric Bret)
59	: bibliographie

Conventions au niveau des photos :

- l'indication relative au grossissement de l'image représente le grossissement de l'objectif, utilisé avec des oculaires de 10x → x100 signifie donc que l'image est grossie 1000 fois.
- si une photo ou une préparation ne portent pas de nom d'auteur, cela signifie qu'elles ont été réalisées par M. Lecomte

PREAMBULE

La microscopie ouvre les portes d'un univers parallèle à notre monde de tous les jours. Le pouvoir de définition de notre œil a des limites physiques insurmontables, et tout ce qui est de taille inférieure au $\frac{1}{2}$ ou au $\frac{1}{4}$ de mm se confond dans l'uniformité de l'indistinct. L'homme a cherché depuis longtemps à pénétrer cet univers, mais il a fallu attendre le 17^{ème} siècle (Leeuwenhoek et Hooke) pour que des privilégiés entrouvrent les portes de ce monde fascinant et mystérieux.

Ayant eu la chance dès mon jeune âge d'être initié et intéressé à l'observation de la nature par un grand-père très « savant » (horloger de métier, il n'avait pas de diplôme sinon celui de l'école primaire, mais possédait un sens de l'observation du détail infallible à propos des choses qui l'entouraient), j'ai voulu très vite aller plus loin dans le monde du petit et j'ai reçu mon premier microscope monoculaire à 14 ans. Je me suis rendu compte très vite que cet univers était tellement vaste et diversifié qu'il faudrait un jour s'obliger à des choix difficiles et négliger certaines disciplines pour en approfondir d'autres.

La passion aidant, j'ai privilégié l'entomologie, la botanique et puis la mycologie.

Photo 1 : diatomées



Dans cette dernière discipline, Il apparaît comme une évidence que le microscope est devenu un outil indispensable pour la détermination des différentes espèces de Macromycètes, qui intéressent près de 90 % des mycologues ou mycophiles. C'était

déjà le cas pour les Ascomycètes, Discomycètes ou autres Myxomycètes. La plupart des clés de détermination récentes des Basidiomycètes rendent son utilisation impérative, à titre de confirmation d'une hypothèse, et parfois même sous peine d'un échec quasi certain.

Les mycologues l'ont compris et il suffit de voir les salles de travail lors des congrès ! Il y a 25 ans, il était rare de rencontrer plus de 10 utilisateurs de cet outil précieux, qui semblait réservé à de vénérables savants détenteurs d'un savoir inaccessible au commun des mortels mycophiles... Lors des récents congrès de la Société Mycologique de France, plus de la moitié des participants utilisaient cet appareil optique.

Il faut cependant être conscient qu'il s'agit d'un engagement sérieux et d'une dépense à ne pas effectuer à la légère ou sur un « coup de tête », car elle nécessite un investissement financier important.

A l'heure actuelle, un microscope de très bonne qualité (mon maître-achat, avec tête trinoculaire et revolver à 5 objectifs plans infinis), apte à satisfaire des exigences élevées, coûte 1.250,00 € ; un microscope de laboratoire et de recherche, portant un label prestigieux, coûte entre 2.500 et 4.000,00 € pour le modèle de base, selon la marque choisie et les accessoires fournis.

Photos 2 & 3 : cellules épithéliales de la bouche, x100

Nous ne nous donnons pas le droit, dans le cadre de ce travail, de citer une marque précise ! A chacun de se renseigner et de faire son choix selon son budget ...



Nous sommes cependant convaincus qu'il n'est pas nécessaire de choisir un appareil très haut de gamme pour être satisfait, et il est possible d'améliorer le matériel acquis par des achats additionnels futurs.

Il est toujours plus simple de demander l'avis d'un utilisateur chevronné qui vous fera part de son expérience... et souvent vous évitera ses erreurs « de jeunesse » !

Une autre raison semble décourager beaucoup de personnes : c'est l'apparente difficulté de la microscopie, car elle a la réputation d'une science hermétique, ésotérique, à même d'effrayer les mieux intentionnés et réservée à une minorité privilégiée d'initiés !



C'est faux ! Les difficultés techniques existent, certes, mais elles sont plus apparentes que réelles. La connaissance et l'utilisation de techniques simples, de réactifs et colorants faciles à se procurer, vous donnera des résultats immédiats et extrêmement encourageants. Ajoutez-y méticulosité et méthode, et le tour est joué !

il faut tenir compte également de cet outil

extraordinaire que constitue Internet qui permet de prendre contact avec n'importe qui dans le monde ou de consulter les immenses littérature et documentation qui sont mises à notre disposition.

Notre objectif unique et essentiel, au travers des pages suivantes, est de vous aider à progresser, en vous faisant partager notre modeste expérience. Nous avons tenté d'effectuer un tri important en éliminant les techniques et les produits chimiques qui ne sont accessibles que dans des laboratoires spécialisés.

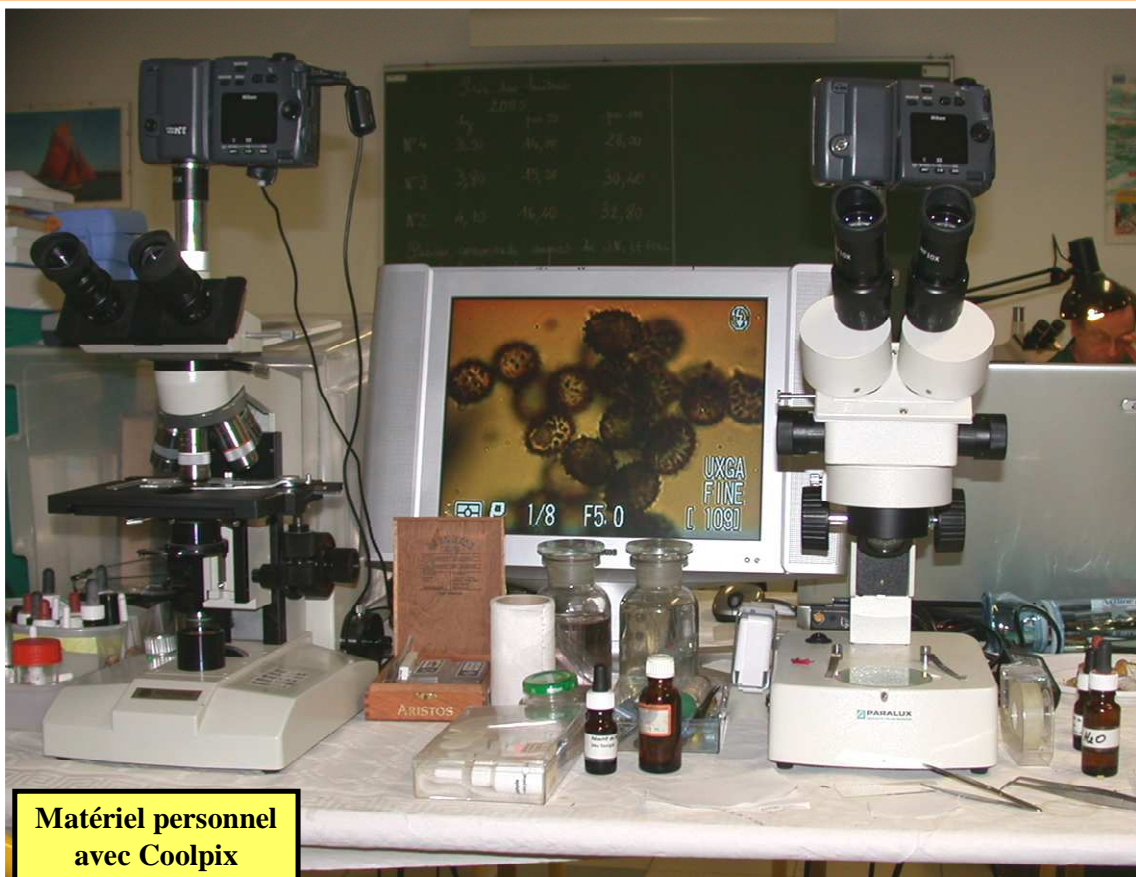
Alors, bon courage dans votre démarche et gardez toujours à l'esprit cette remarque émise par un de mes anciens élèves : « Il n'y a pas de questions stupides, il n'y a que des réponses idiotes ! ».

Nos remerciements vont à Philippe DUFOUR et à Didier BAAR (†) qui m'ont initié à la microscopie, et à Jean LACHAPELLE (†) pour l'aide apportée dans nos recherches communes.

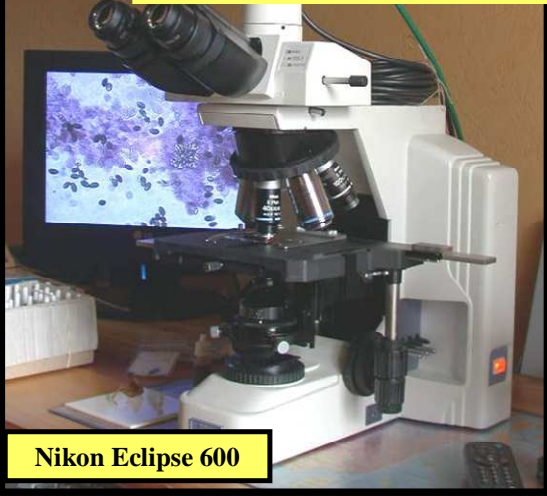
Marcel LECOMTE



Photo 4 : conidies de *Pseudovalsa lanciformis*, x100 – coloration à la fuchsine acide



Matériel personnel avec Coolpix



Nikon Eclipse 600



Zeiss Axioskop 2

Du matériel très haut de gamme, utilisé par des mycologues de mes amis !

Quel microscope choisir ?

Vous avez cerné vos objectifs et longuement réfléchi à votre engagement !

Vous disposez d'un certain budget !

MAIS, n'oubliez pas que vous devez encore tenir compte de certains critères pour fixer votre choix définitif !

Il vaut mieux prévoir et réfléchir longuement qu'assumer des regrets tardifs !

ALORS, voici encore quelques dernières remarques pratiques issues de notre expérience personnelle, ... mais qui sont simplement informatives...

Le microscope monoculaire existe encore sur le marché, mais il est devenu désuet car son grand inconvénient est la fatigue générée par l'usage d'un seul œil.

- Notre choix va au minimum vers le microscope binoculaire, car la vision stéréoscopique nous semble essentielle pour l'appréciation des détails.
- Cependant, nous nous tournons sans hésitation aucune vers un système trinoculaire, si on envisage l'usage d'un appareil photo (argentique ou numérique), ou d'une caméra vidéo à brancher directement sur le microscope.



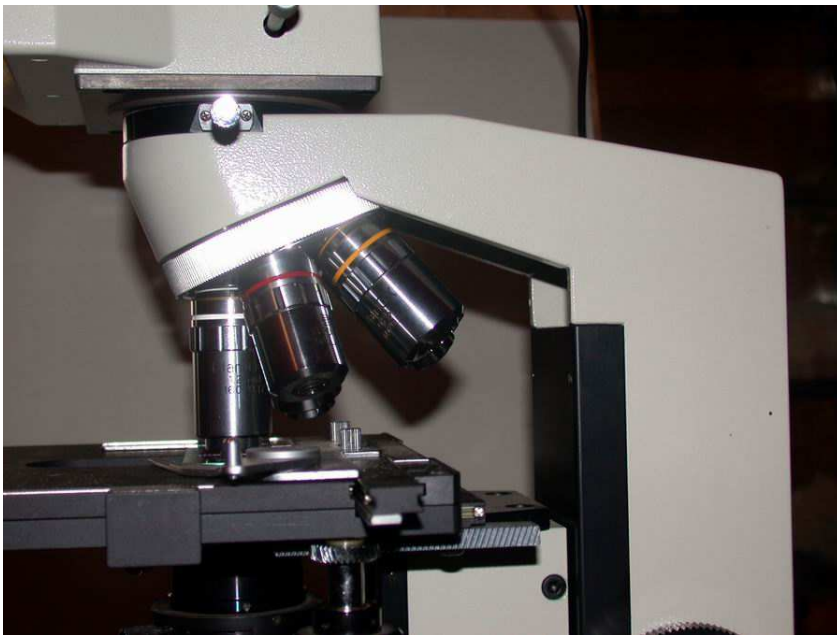
→ Il faut savoir que depuis l'apparition sur le marché de l'appareil photo numérique, la photo microscopique devient d'une facilité quasi enfantine ... et les fichiers générés sont encore plus facilement envoyés aux quatre coins du monde, grâce au réseau Internet.

Photo 4 : modèle avec tube à dessiner et tête trinoculaire amovible, de marque Paralux

- Il est impératif de choisir un modèle à platine d'observation horizontale, sinon nous serons gênés par les déplacements du milieu d'observation de la préparation, s'il est très liquide.
- Dans une configuration normale, on utilise des oculaires 10x ainsi que les objectifs suivants : 10x, 20x, 40x (63x) et 100x à immersion, ce qui donne des grossissements de l'ordre de 100, 200, 400 (630) et 1.000x. Nous pensons qu'un révolvrer à 5 objectifs offre les meilleures possibilités.
- Pratiquement, nous avons pu constater que la recherche de grossissements de l'ordre de 1.500x à 2.000x n'apporte pas grand chose sur la plupart des micros-

copies ; des résultats corrects ne sont possibles que sur du matériel de très haut de gamme !

- La qualité des objectifs est très variable :
 - la série achromatique est d'un bon rapport qualité – prix jusqu'au 40x, mais si on passe à l'immersion, les limites sont très visibles et décevantes
 - la série planachromatique se révèle excellente
 - Il existe des objectifs de haut de gamme (planapochromatiques) dont un seul coûte plus cher qu'un microscope normal complet ! (mais Internet ouvre maintenant la porte d'un marché de l'occasion très intéressant...). Vous comprendrez aisément que ce matériel est quasi toujours l'apanage d'institutions scientifiques : rares sont les amateurs qui peuvent se permettre un achat de 40 à 50.000,00 Euro, pour un loisir !
- la qualité de la source d'éclairage est particulièrement importante (halogène si possible, car les lampes à incandescence donnent une dominante orangée) ; les bricoleurs électroniciens se tournent maintenant vers les leds (Light Emitting Diodes ou diodes électroluminescentes) qui génèrent une lumière très vive quasi sans échauffement.



- prévoir un coffret de transport solide.
- Il faut aussi tenir compte de la possibilité éventuelle d'y ajouter un tube à dessiner ou une chambre claire, même si ce matériel est de moins en moins utilisé et semble tomber en désuétude, avec l'arrivée des photos numériques.

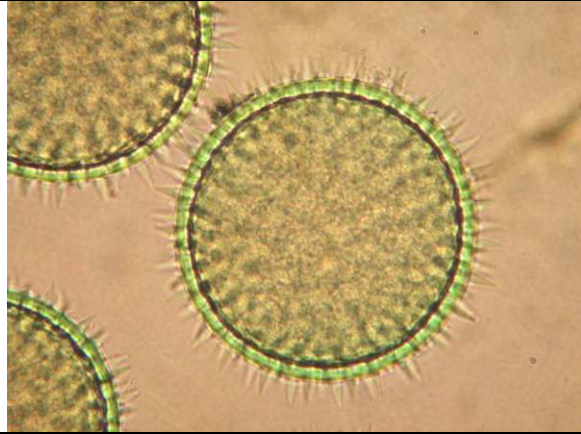
ter un tube à dessiner ou une chambre claire, même si ce matériel est de moins en moins utilisé et semble tomber en désuétude, avec l'arrivée des photos numériques.

Photo 6 : tourelle avec 5 objectifs planachromatiques sur microscope Euromex trino GTPL 3035

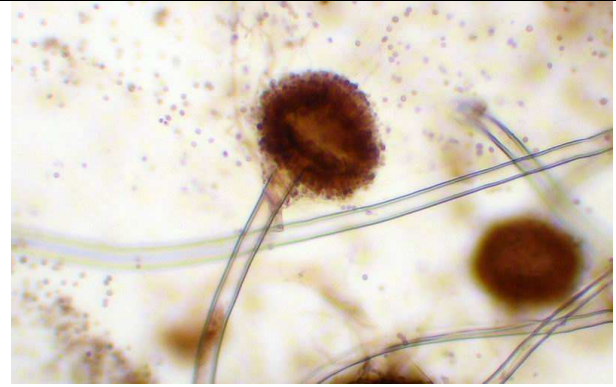
Des remarques :

→ Nous considérons qu'une des premières qualités d'un microscope réside dans l'obligation de ne pas devoir changer la mise au point (ou très peu...) lorsqu'on change d'objectif, en faisant tourner le revolver porte objectifs : c'est, à nos yeux, un critère de choix déterminant !

→ N'achetez pas un microscope sans le voir et l'essayer, soit chez le vendeur ou chez une connaissance apte à vous conseiller et n'hésitez pas à demander l'assistance d'un ami, utilisateur chevronné !



grains de pollen de rose trémière, x63



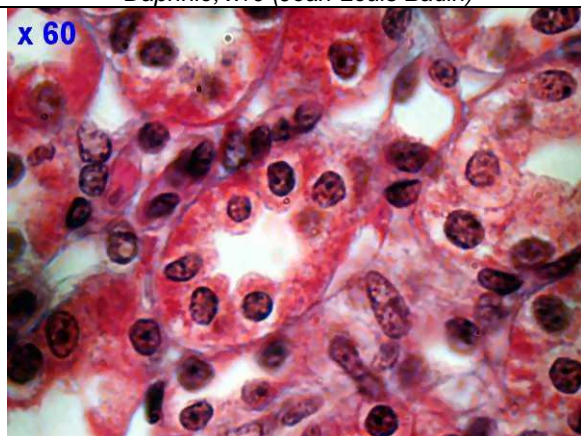
Aspergillus sur pain, x40



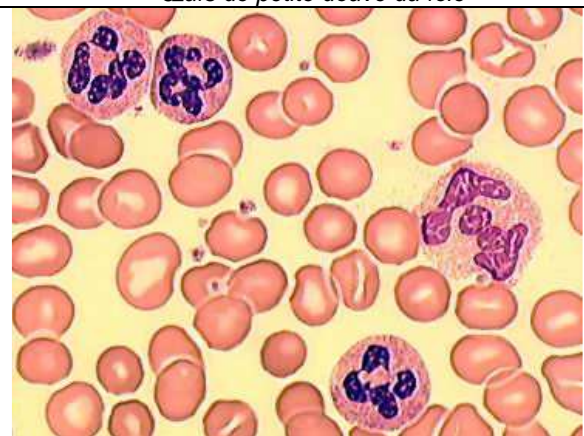
Daphnie, x10 (Jean-Louis Badin)



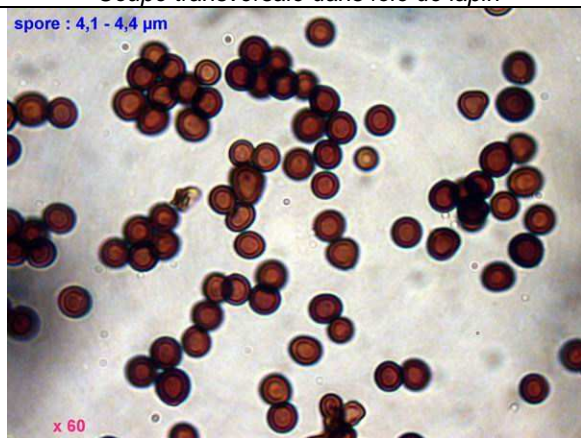
Œufs de petite douve du foie



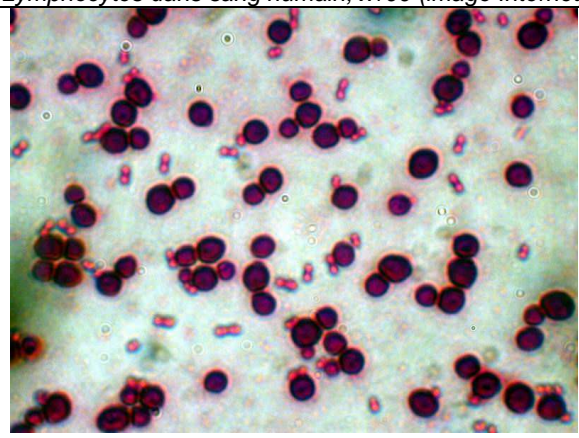
Coupe transversale dans foie de lapin



Lymphocytes dans sang humain, x100 (image Internet)



Spores de Sclerotinia geaster (Gastéromycète)

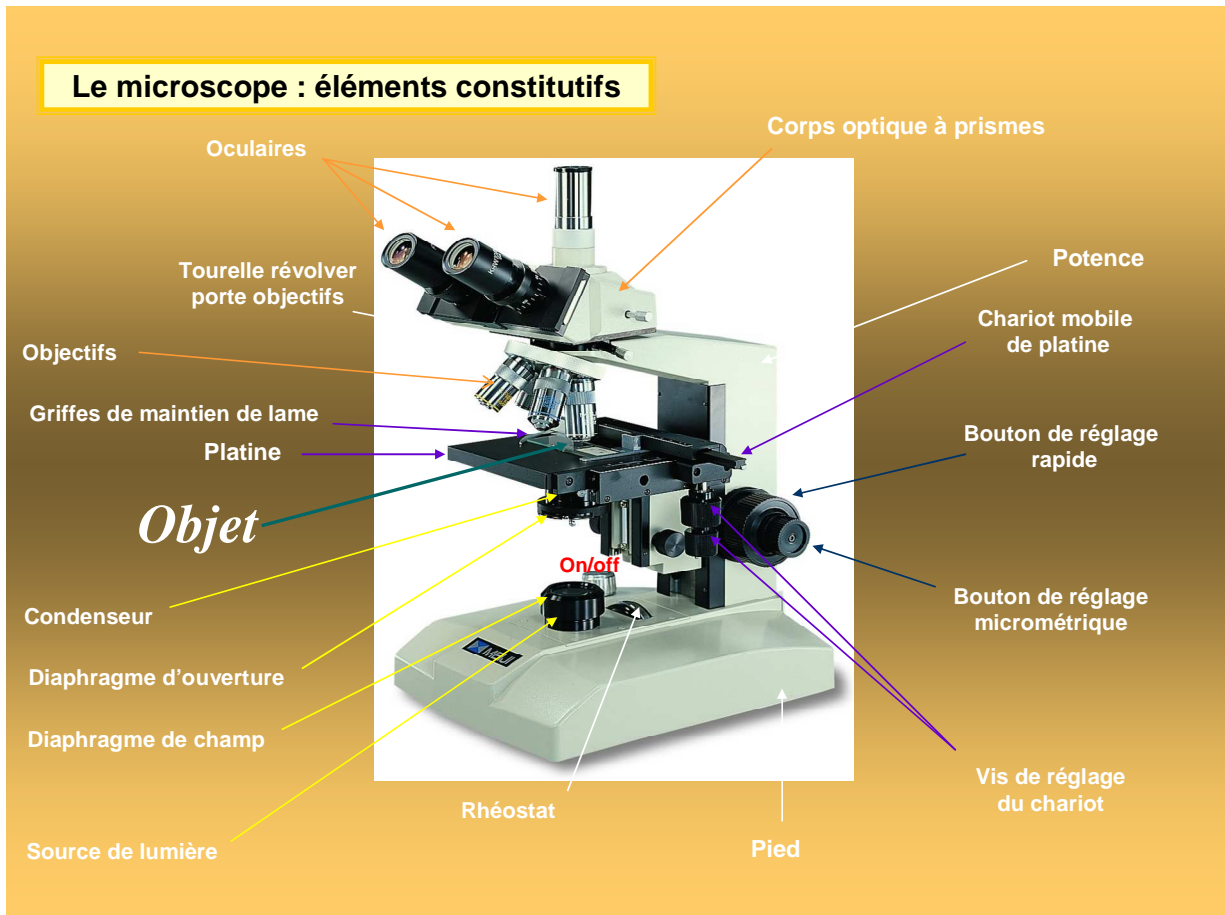


Microcoques et bactéries, x100

LES CONSTITUANTS DU MICROSCOPE :

Nous nous attacherons ici à la description des éléments d'un microscope classique optique, dit « à fond clair » (appelé aussi photonique, car il utilise la lumière, les photons).

Photo 07 : image didactique réalisée par Philippe Dufour



1. LA PARTIE MECANIQUE comprend :

- le statif (pied + potence)
- le tube porte oculaires
- le revolver (ou tourelle) porte objectifs

Le statif comporte :

- un pied très lourd qui assure la stabilité de l'ensemble
- une potence qui supporte le tube optique, une platine porte-objets (qui se déplace de gauche à droite et d'avant en arrière à l'aide de molettes) et les boutons de réglage macrométrique et micrométrique, le condensateur mobile

le tube porte oculaires :

- le système binoculaire a remplacé avantageusement le tube monoculaire, car il permet une meilleure vision tout en générant beaucoup moins de fatigue visuelle

- pour permettre la prise de vues photographiques (argentiques ou numériques), ou l'utilisation d'une caméra vidéo, certains appareils sont munis d'un 3^{ème} tube réservé à cette destination : on parlera alors de microscope trinoculaire !
- l'écartement des 2 tubes oculaires est réglable de manière à s'adapter à l'écartement interpupillaire de l'utilisateur ; sur du bon matériel, on trouvera des oculaires grand champ de 20 mm (très pratique pour les porteurs de lunettes) avec ajustement de dioptrie (+/- 5) pour chaque œil



Photo 08 : microscope trinoculaire BKX5000 (mon maître-achat actuel) équipé d'une caméra numérique

Le revolver (ou tourelle) porte objectifs :

il s'agit d'une partie mobile pouvant porter de 3 à 5 objectifs de grossissements différents ; un nombre élevé d'emplacements est un avantage incontestable, surtout si on a l'intention d'installer un contraste de phase (cela évite les démontages répétés toujours néfastes au niveau de la poussière).

2. LA PARTIE OPTIQUE comprend :

- la source de lumière et le diaphragme de champ
- le condensateur et le diaphragme d'ouverture
- les oculaires
- les objectifs

La source de lumière :

- sur les bons microscopes modernes, elle est constituée par une lampe halogène
- **l'éclairage de Köhler** permet d'éclairer

tout le champ observé de manière uniforme, au départ d'une source qui n'est pas ponctuelle (filament) → chaque point de l'objet sera éclairé uniformément par l'ensemble des points de la source, et indépendamment de sa structure.

- **un diaphragme de champ** situé à la sortie du système d'éclairage (dans le socle) permet d'ajuster le diamètre de la zone éclairée avec le diamètre de la zone observée

Le condensateur (on dit aussi parfois « condenseur ») :

- il est monté sur une glissière qui permet d'en régler la hauteur en fonction du grossissement recherché
- il contient également **le diaphragme d'ouverture**, qui va permettre d'élargir ou de resserrer les cônes de rayons lumineux générés par la source d'éclairage
- la qualité de l'image VA DEPENDRE FORTEMENT du bon réglage de ces deux éléments
- Il est impératif de le centrer au moyen des deux vis prévues à cet effet, sous peine d'obtenir un éclairage non uniforme
- on y trouve également un élément mobile dans lequel on peut insérer différents filtres colorés, qui vont augmenter les contrastes
→ un filtre bleu élimine la dominante orange rougeâtre

- un filtre jaune élimine la dominante bleue
- un filtre vert élimine la dominante violette
- un verre dépoli est utile en cas d'éclairage médiocre, car il égalise la lumière et l'étale, pour obtenir un large cône lumineux

Photo 09 : microscope trinoculaire ARX3000 équipé d'un contraste de phase



Les oculaires :

- ils jouent le rôle d'une loupe d'excellente qualité et arrivent à corriger les défauts de certains objectifs
- ils portent une inscription numérique précédée de « x » : x10 signifie un grossissement de 10 fois
- il est fortement conseillé de se tourner vers des oculaires à grand champ, qui sont utilisables par les porteurs de lunettes
- nous sommes partisan de l'utilisation d'ocilletons en caoutchouc (si on ne porte pas de lunettes) qui se placent sur les oculaires et permettent d'éviter des entrées de lumière parasite et de reflets
- pour les binoculaires, ils sont positionnés sur un système permettant de régler l'écartement interpupillaire
- les bons oculaires disposent également d'un réglage dioptrique permettant de récupérer une éventuelle différence d'acuité visuelle
- s'il est fréquent d'effectuer des mesures, il est conseillé de remplacer un oculaire normal par un oculaire micrométrique, permettant, au grossissement x1000, de déterminer un nombre précis de microns (μm) → un micromètre oculaire doit être étalonné à l'aide d'un micromètre objet, lors de la 1^{ère} utilisation

Les objectifs :

- ils se placent à demeure sur la tourelle et présentent des grossissements différents



- leur rôle consiste à fournir une image non déformée et agrandie de l'objet observé
- ce sont sans doute les éléments les plus importants et les plus déterminants lors d'un achat

Photo 10 : cet objectif planapochromatique 100x à immersion, avec un $n=1,40$ est une merveille technologique

- ils portent des inscriptions très intéressantes : exemple : 160/0,17 – 100/1,25
 - 160 mm est la longueur du tube optique

- 0,17 est l'épaisseur recommandée pour la lame porte objet
- 100 est la valeur du grossissement
- 1,25 est l'ouverture numérique (notion complexe qui sort du cadre de cet article)

**MODUS OPERANDI pour la réalisation d'une observation type au microscope
photonique à fond clair**

1. mettre sous tension le système d'éclairage
2. ouvrir en grand les diaphragmes de champ (dans le socle) et d'ouverture (dans le condenseur)
3. positionner la préparation sur la platine
4. régler l'écartement interpupillaire (on ne doit voir qu'une seule image, unique et circulaire)
5. régler les dioptries des oculaires
6. mettre au point avec l'objectif x10 par exemple
7. régler l'intensité lumineuse à l'aide du potentiomètre (une lumière trop vive fatigue grandement la vue et réduit fortement le temps d'observation possible)
8. régler le diaphragme de champ
9. régler la hauteur du condenseur (plus le grossissement est important, plus il doit être près de la préparation)
10. régler le diaphragme d'ouverture
11. placer éventuellement un filtre coloré
12. placer une gouttelette d'huile sur la préparation pour utiliser l'objectif à immersion
13. avec les objectifs x40 et supérieurs, il est impératif d'utiliser uniquement la molette de déplacement micrométrique, sous peine d'écraser la préparation et de polluer la lentille de l'objectif (les objectifs de bonne qualité sont munis d'une tête rétractable qui permet d'éviter cette grave erreur de manipulation)

REMARQUES :

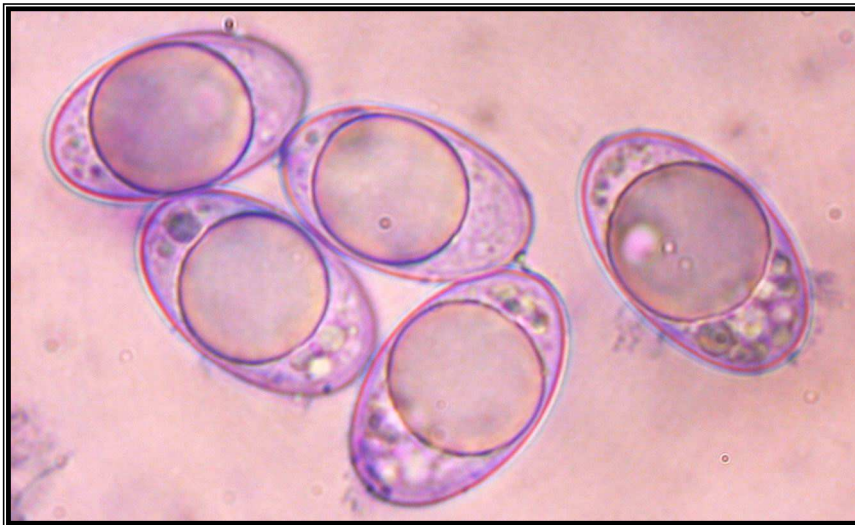
- tous les réglages mentionnés ci-dessus concernent un microscope de laboratoire ou de recherche. Certains dispositifs n'existent pas sur les microscopes de moindre qualité !
- si vous utilisez de l'huile d'immersion synthétique, il n'est pas nécessaire de nettoyer à chaque fois l'objectif à immersion

TRES IMPORTANT : après usage du microscope, le coiffer de la housse prévue à cet effet, car la poussière est son pire ennemi ; il faudra veiller à ce que les lentilles des oculaires, du condenseur et de la source d'éclairage soient vierges de toute particule !

Microscope et premiers accessoires

- prendre le temps de découvrir toutes les possibilités de la merveille que vous venez d'acquérir
- apprendre à utiliser le condensateur (parfois appelé condenseur) avec le diaphragme
- prendre conscience de l'importance du variateur d'intensité lumineuse
- centrer le faisceau lumineux dans le champ de vision (utilisation des vis de centrage du condensateur)
- régler en hauteur toute la partie mobile qui se trouve sous la platine
- vérifier la présence d'un porte filtre (le filtre bleu est souvent utilisé)

Photo 11 : ascospores de *Geopora arenicola* (Ascomycète) – obj. 63x planapochromatique à immersion

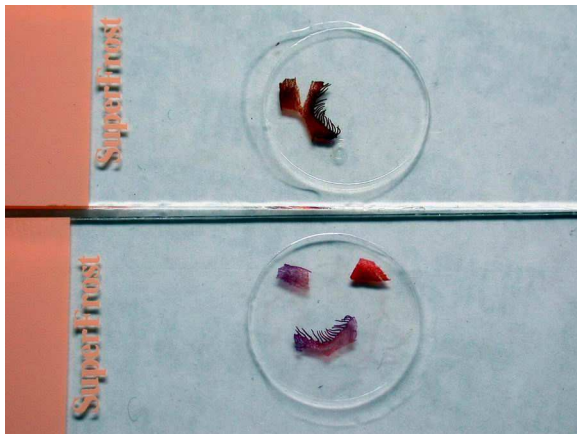


Lames porte-objet (PO) et couvre-objet (CO) :

Les lames PO (de format courant, 26 x 76 mm) se présentent de manière générale, sous deux formes :

- 1/ modèle simple à coins droits
- 2/ modèle à coins rodés et à bande dépolie, permettant l'écriture

Notre préférence va vers le second modèle, car le risque de coupure est éliminé et il permet de noter directement des préparations qu'on souhaite garder définitivement...



Les lames CO offrent plusieurs formats :

- 18 x 18 mm - 20 x 20 mm - 20 x 40 mm
- Circulaire, de diamètre 15, 18, 20, 22

Photo 12 : coupe transversale dans une lame de basidiomycète, avec montage définitif sur une lame inscriptible

Les deux premiers modèles sont utilisés pour les préparations courantes et ponctuelles.

Le 3^{ème} modèle s'avère intéressant pour la conservation de sporées.

Les modèles circulaires sont souvent utilisés pour le montage des préparations définitives à usage didactique.

Nous stockons nos lames usagées dans 2 flacons à col large, rodé, d'environ 0,4 L chacun, avec bouchon de verre, à ouverture suffisante, et dans l'ordre suivant :



Photo 13 : petite verrerie et boîtes de Pétri

1.- solution de stockage : c'est un mélange en parties égales d'eau distillée et d'alcool méthylique (méthanol) : agiter de temps en temps et retirer les lames selon les besoins. Le séchage se fait avec un linge propre (un tissu de toile bien usé, pour éviter les peluches...) ou du papier essuie tout.

« Pour rendre les lames mouillables, passer une fois chaque face dans la flamme non fumeuse d'un brûleur à gaz, puis les essuyer, une fois refroidies, avec un linge imbibé de méthanol » (Didier BAAR).

Cette pratique permet un étalement très facile des liquides sur la lame.

2.- solution de nettoyage : c'est un mélange de détergent vaisselle (1 cm³) avec 9 volumes de méthanol et 1 volume d'acide chlorhydrique concentré : nous y plongeons directement la préparation usagée (PO et CO) ; remuer de temps en temps ! Cette solution a pour but d'éliminer l'huile d'immersion, de dégraisser les lames, et de stériliser celles-ci si on travaille sur des cultures microbiennes. Si vous ne travaillez pas sur du matériel potentiellement dangereux, l'acide chlorhydrique n'est pas nécessaire.

Photo 14 : crochets à venin d'une mygale (Coolpix 4500 sur loupe trinoculaire – photo Jean-Louis BADIN)

Au départ, nous plaçons 50 lames PO dans le flacon de stockage, car les lames neuves sont rarement tout à fait propres.

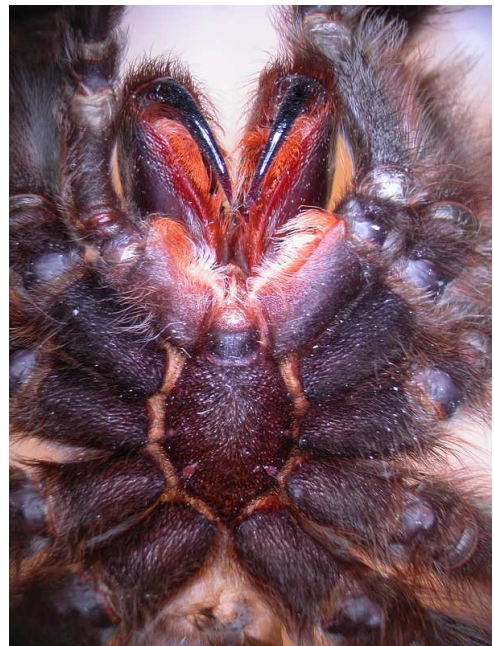
Elles sont prélevées l'une après l'autre, essuyées ... et placées dans le flacon de nettoyage, après usage.

En toute logique, lorsque le premier flacon est vide, l'autre est rempli ! Nous rinçons soigneusement à l'eau courante le contenu de (2) pour le replacer en (1), tout en récupérant éventuellement les lames CO (*)... et le cycle recommence. La solution 2 est changée à chaque rotation de 50 lames !

(*) En ce qui concerne les lames CO, nombre de personnes préconisent le remplacement pur et simple, et ne les récupèrent pas, car leur nettoyage prend trop de temps.

Personnellement, nous les avons récupérées durant très longtemps dans le flacon de nettoyage, et même s'il y a 5 à 10 % de perte (casse), les autres sont stockées dans un petit flacon plat hermétique, avec du méthanol, et réutilisables à volonté. Mais cela s'avère fastidieux à la longue. Maintenant, nous n'utilisons plus que des lames CO circulaires, beaucoup moins fragiles et permettant une meilleure répartition du colorant ou du liquide d'observation.

L'huile à immersion :



Elle peut être de deux sortes :

- d'origine naturelle (huile de cèdre par exemple) : nous la déconseillons fortement car elle sèche rapidement, et finit par former une croûte sur la lentille de l'objectif
- synthétique (c'est celle que nous préférons)



Photo 15 : chenille de ver à soie, x40, montée dans PVAL-alcool polyvinilique lactophénolé

Nettoyage des oculaires et objectifs :

Malgré les recommandations de la plupart des fabricants d'optique, nous ne voyons pas l'intérêt d'utiliser de l'alcool absolu car outre son prix exorbitant et la difficulté de s'en procurer, il est très hygroscopique et se pollue très vite, chaque fois que le flacon est ouvert.

Nous utilisons, pour le nettoyage des optiques, de l'alcool éthylique à 95° ou un mélange d'éthanol à 90° et d'éther sulfurique, en parts égales (appelé liqueur de Hoffmann). Un célèbre fabricant d'optiques annonce un mélange de 70% d'éther, et 30 % d'alcool.

Les avis sont d'ailleurs très partagés à ce sujet !

Marcel LOCQUIN, un maître du microscope, annonce clairement : « *Nous ne savons pas par suite de quelle aberration certaines personnes conseillent d'enlever l'huile avec des solvants. Ces liquides ne peuvent que dissoudre le ciment qui fixe la lentille frontale et amener ainsi une détérioration irrémédiable de l'objectif. Donc ne jamais employer d'alcool, de benzène, xylène, toluène, pour le nettoyage des objectifs à immersion.* ». Cela semble clair et sans appel !

Photo 16 : œuf de phasme (Coolpix 4500 sur loupe trinoculaire – photo Jean-Louis BADIN)

L'objectif à immersion demande un peu de soins :

En situation normale, et en utilisant de l'huile à immersion de synthèse, nous nettoyons cet objectif au maximum quatre ou six fois par an, au cas où des poussières seraient venues se fixer sur l'huile. Cette huile de synthèse s'oxyde très lentement et joue un rôle de protection à l'égard de la lentille.

Cependant, il arrive que lors d'une mauvaise manipulation (mauvais usage des molettes de mise au point surtout...), on casse la lame couvre objets et que l'huile soit polluée par un colorant ; alors il est impératif de nettoyer immédiatement.



Le 2e cas de figure qui demande un nettoyage est que sur la plupart des microscopes, l'objectif à immersion et l'objectif grossissant 63x (ou 40x) ont exactement la même longueur et que parfois, on passe malencontreusement avec le second sur la goutte d'huile déposée sur la lame ; le second objectif est alors pollué et il est impératif de le nettoyer immédiatement, car cet objectif n'est pas prévu pour l'immersion et vous ne verrez plus rien ! **Il est donc important de toujours tourner le révoluer dans le même sens.**

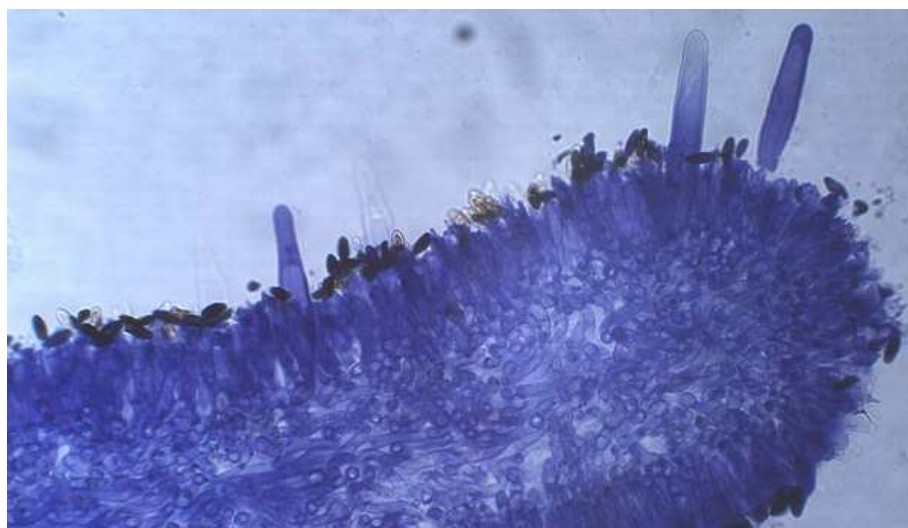
La première observation :

Photo 17 : chloroplastes d'une algue filamenteuse, x40



- l'objet à observer doit être le plus mince possible.
 - l'objet à observer ne peut pas être opaque et doit au moins être translucide : n'oublions pas que l'éclairage se fait par transparence !
 - vous l'avez placé sur une lame porte objet, baignant dans une goutte d'eau, puis recouvert d'une lame couvre objet (CO)
 - tapoter la lame CO avec une gomme, afin d'aplatir l'objet à observer sans la casser .
 - utiliser un bout de papier essuie tout pour absorber l'excès de liquide.
- placer la préparation sur la platine.
 - faire le point d'abord avec le grossissement 100x afin d'avoir une vision d'ensemble de la préparation, et de pouvoir repérer les éléments qui vous intéressent. On peut utiliser ici sans inconvénients la mollette de mise au point rapide, puis affiner avec la mollette micrométrique.

Photo 18 : macrocystides, spores et trame – coupe transversale dans lame de l'hyménophore de *Chrogomphus ochraceus* x63



- ensuite augmenter le grossissement et régler l'éclairage en conséquence. Si votre matériel est de bonne qualité, vous ne devez quasi pas rectifier la mise au point ... sinon avec la mollette micrométrique.
- vous aller passer à l'immersion : déplacer légèrement le revolver porte objectifs de manière à ce que la préparation se trouve entre les objectifs 40x (60x) et 100x ; déposer une gouttelette d'huile à immersion sur la préparation et positionner l'objectif 100x.
- Vous constatez maintenant que l'objectif à immersion et la préparation sont réunis par une minuscule colonne d'huile qui est traversée par les rayons lumineux et améliore sensiblement l'indice de réfraction.
- Aux grossissements 400x (600x) ou 1000x, ne jamais utiliser la mollette de déplacement rapide, sous peine d'écraser la préparation et de polluer l'objectif, qui devra alors être nettoyé impérativement (voir ci-dessus).

Vous venez d'observer un objet qui mérite à vos yeux d'être conservé pour la postérité : il faudra alors envisager une préparation définitive ... mais c'est une autre histoire, dont nous vous entretiendrons dans un prochain chapitre !



Photo 19 : armature buccale d'un ténia parasite du chat

UTILISATION du MICROSCOPE et de REACTIFS CHIMIQUES pour l' ETUDE des CHAMPIGNONS TECHNIQUES D'OBSERVATION

Considérations :

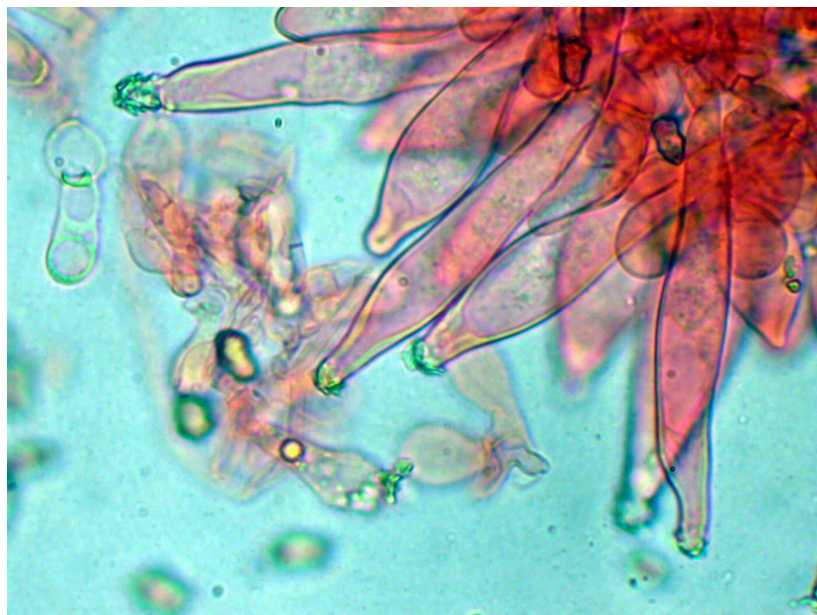
L'utilisation de réactifs chimiques constitue une nécessité impérieuse pour l'étude et la détermination des champignons, même si cela rebute nombre de personnes ... Nous parlerons de réactions microchimiques lorsqu'elles interviennent sur des éléments à observer impérativement au microscope, sous forme de colorations diverses ou par manque de réaction.

Il nous paraît intéressant de préciser que ces réactifs ont pour objectif unique d'orienter une détermination. De même, notre intention n'est pas de faire école et d'imposer des techniques de manipulation, mais simplement d'exposer notre mode de travail et quelques tours de main. Nous souhaitons aussi aider les débutants à aborder un travail passionnant, mais qui peut s'avérer rébarbatif et décourageant, sans la connaissance de quelques éléments de base et astuces pratiques.

Techniques d'observation :

Quelques remarques et conseils !

- Nous pensons qu'il faut toujours s'obliger à examiner une préparation d'abord dans de l'eau pure, même si celle-ci est destinée à un examen avec d'autres réactifs ou colorants, car ces derniers, en raison de leur caractère acide ou alcalin, peuvent dégrader voire dissoudre certaines sécrétions ou excréctions cellulaires, modifier ou altérer certains pigments, faire disparaître certaines structures ou encore changer l'aspect du contenu cellulaire. L'eau permet également de



percevoir les couleurs « naturelles » de l'objet examiné et, pratiquement, ne coûte quasi rien. Cependant, nous préférons utiliser de l'eau distillée ou bidistillée, car elle est exempte de calcaire et autres impuretés.

Photo 20 :cystides couronnées de cristaux chez Inocybe lacera – coloration au rouge Congo SDS

- Lorsqu'il s'agit d'observer des spores

provenant d'exsiccata notamment, nous avons constaté qu'elles ont une fâcheuse tendance à flotter à la surface de l'eau et à migrer vers l'extérieur lorsqu'on pose la lamelle de verre sur la préparation ; pour contrer cet inconvénient majeur, nous utilisons une solution aqueuse de détergent de vaisselle à 1 %, qui joue le rôle d'agent mouillant et contribue ainsi à « noyer » les spores dans le milieu d'observation (le résultat est encore meilleur avec les agents mouillants utilisés pour le développement photographique).

- Lors de l'observation de spores dans de l'eau, nous rencontrons souvent un phénomène très désagréable : il se forme des courants de déplacement du liquide qui entraînent les spores et rendent l'observation difficile et la microphotographie impossible. L'utilisation de milieux d'observation plus denses, comme le lactophénol ou le chloral lactophénol s'avère alors indispensable. Cependant, nous utilisons également la solution de détergent mentionnée ci-dessus additionnée de 20 % de glycérine pure. Ces liquide plus visqueux limitent sensiblement ou totalement les mouvements et empêchent le dessèchement de

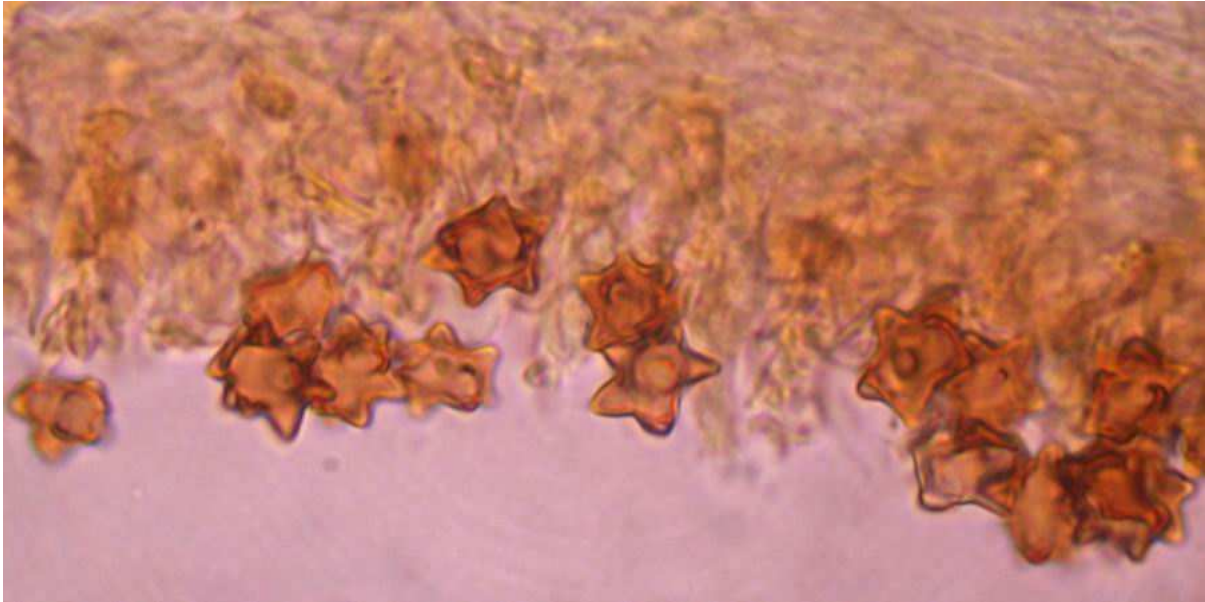
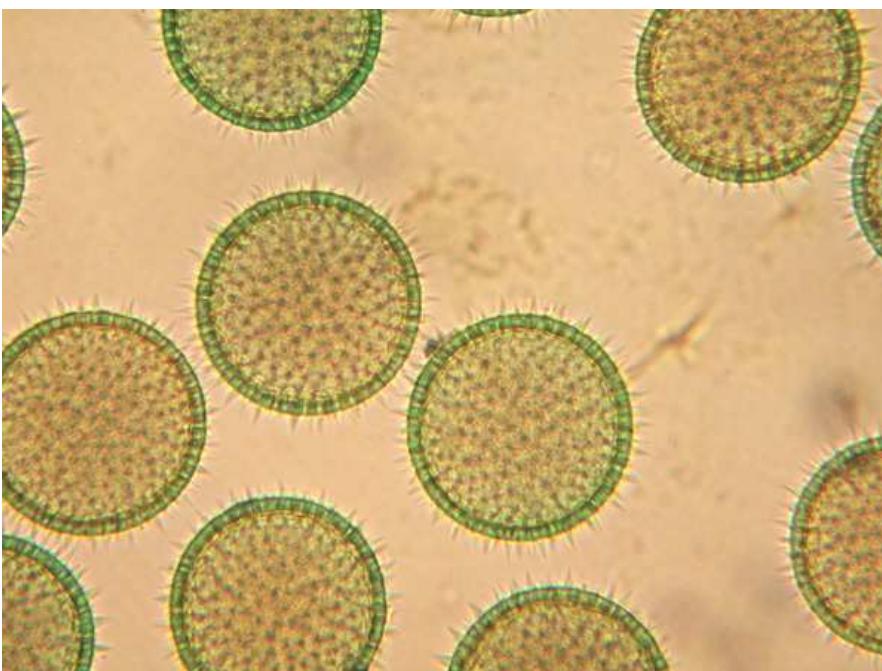


Photo 21 : spores d'*Inocybe asterospora* (Basidiomycète), colorées au rouge Congo ammoniacal, x100 à immersion

Photo 22 : grains de pollen de rose trémière, x20

la préparation durant plusieurs jours (on parle alors de préparations semi-permanentes).



- Lorsqu'on veut obtenir une contraction des vacuoles cellulaires, on dissout dans l'eau une quantité variable de sel, de sucre ou de glycérine.
- Lors des coupes, il arrive que les espaces entre les hyphes soient remplis d'air, et alors les préparations sont diffi-

lement interprétables ; il suffit de poser une goutte d'ammoniaque entre lame et lamelle de verre et chauffer jusqu'à ébullition, pour chasser l'air indésirable.

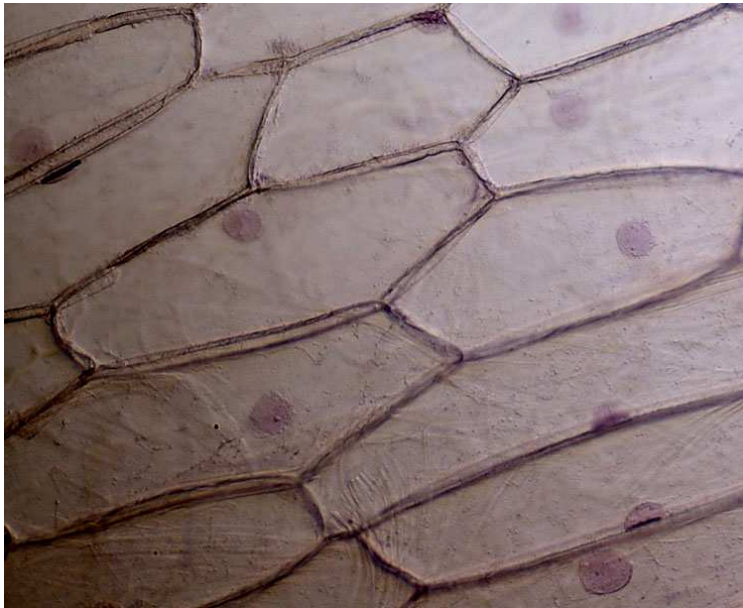


Photo 23 : cellules épithéliales de pelure d'oignon, avec coloration du noyau, x20

- Il est impératif de « regonfler » les parties dures des fragments d'exsiccata avant observation ; plusieurs possibilités se présentent :
 - la soude et la potasse en solution aqueuse à 5 %, utilisées à froid, sont excellentes, mais le matériel doit y séjourner 1 à 2 jours : ce laps de temps a

pour avantage de faire disparaître le contenu cellulaire, d'éclaircir les parties foncées et de faciliter l'étude des parois chitineuses qui nous intéressent.

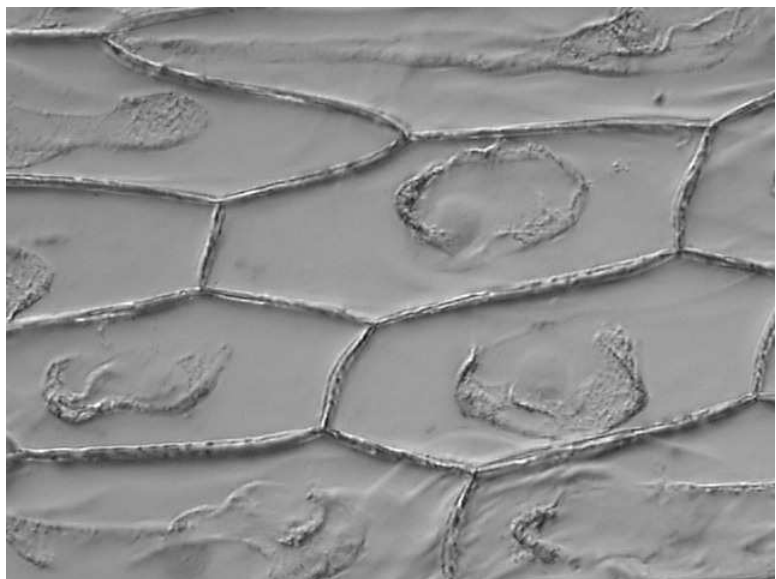
- pour des observations immédiates, nous proposons de regonfler (en quelques secondes) à la chaleur (ébullition), entre lame et lamelle, en utilisant un des produits suivants :
 - solution aqueuse sirupeuse d'hydrate de chloral (elle a notre préférence en raison de sa grande transparence)
 - chloral lactophénol (excellent également)
 - lactophénol
 - acide lactique
 - ammoniaque concentré

Les milieux d'observation cités ci-dessus sont placés selon un ordre dégressif de préférence personnelle.

Photo 24 : cellules épithéliales de pelure d'oignon, observées en contraste de phase, x20

- Une bonne observation d'une dissociation, d'une coupe ou d'une sporée est grandement améliorée par l'utilisation combinée de colorants. En voici un exemple :
Pour l'étude d'un scalp, nous allons combiner les milieux d'observation, réactifs ou colorants suivants :

- chloral lactophénol pour le pileipellis



- réactif de Melzer ou sulfovanilline pour les laticifères
- Congo ammoniacal pour les sphérocystes

Un peu de vocabulaire :

Les CYSTIDES (éléments semblables aux basides, mais stériles) se retrouvent partout sur un sporophore et leur localisation précise est aidée par un préfixe : voici les termes les plus utilisés !

- CHEILOcystides : sur l'arête des lames
- CAULOcystides : à la base du pied
- PLEUROcystides : sur la face des lames
- PILEOcystides ou DERMATOcystides : sur la cuticule du chapeau (surface pileïque)
- LAMPROcystides : utilisé pour des grosses cystides
- LEPTOcystides : utilisé pour des petites cystides
- GLEOcystides : s'utilise quand elles sont SV+ (réaction positive à la sulfovanilline)
- CHRYSOcystides : leur contenu est jaune avec NH_4OH (ammoniaque) et elles sont ++ (réaction nettement positive) au bleu coton ; elles sont constantes chez *Hypholoma* et *Stropharia*, inconstantes chez *Pholiota* et *Hemipholiota*, inexistantes chez *Inocybe*...

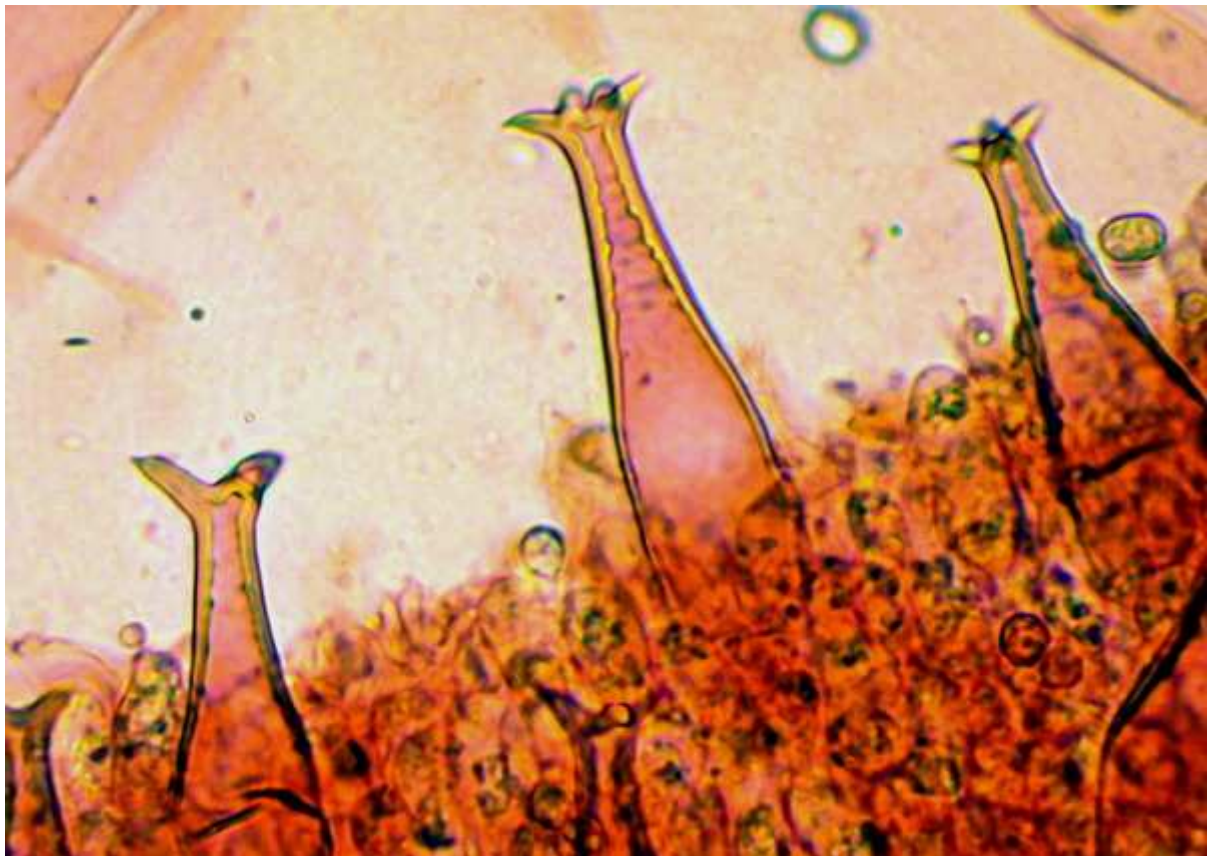


Photo 25 : cystides à crochets chez *Pluteus cervinus*, x63



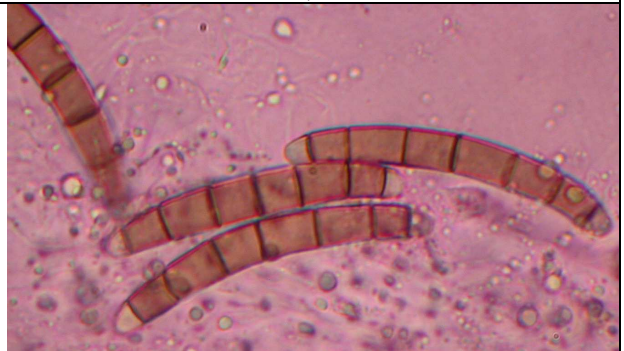
Gliocladium album (moisissure) – x40 photo (saisie avec caméra Deltapix)



Spores d'*Aleurodiscus amorphus*, avec réaction amyloïde, x63



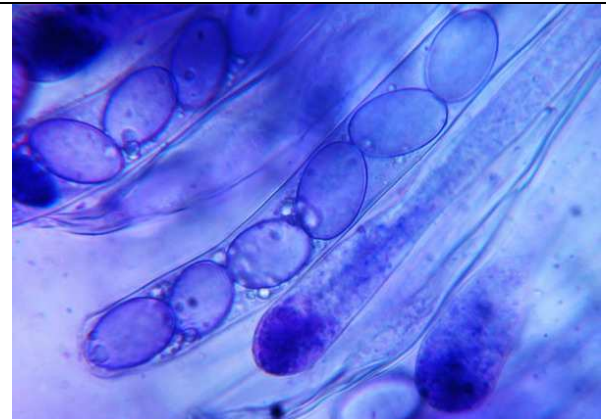
Grains de pollen de pin, traités au lactophénol puis colorés à la fuchsine acide, x40



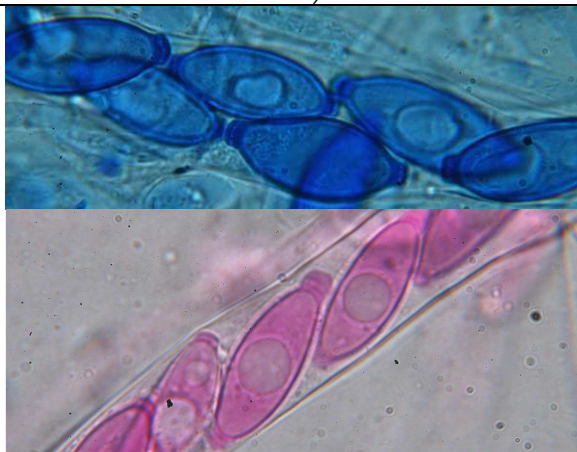
Conidies de *Campilospora spinifera*



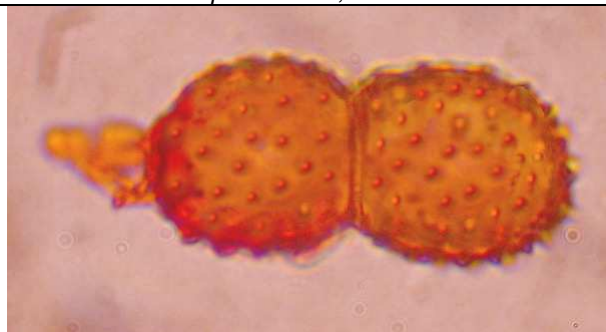
Ecidiospores de *Aecidium ari* (rouille d'*Arum maculatum*)



Asques avec ascospores, et paraphyses, chez *Mitrophora libera*, x163



Ascospores de *Gyromitra gigas*, x63



Téleutospore de *Tranzchelia fusca*, x63

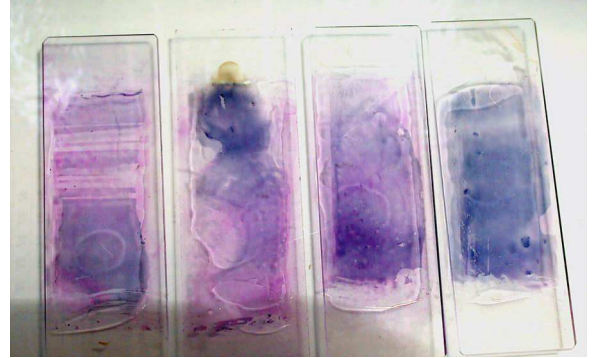
La COLORATION des coupes : limites et réalités !

GENERALITES

Il suffit de consulter un manuel de technique microscopique pour se rendre compte que la théorie de la coloration joue un très grand rôle en histologie ou en cytologie. Mais comme l'abondance est aussi néfaste que la disette, le débutant se trouve submergé par une quantité incroyable de recettes, où il devient bien difficile d'effectuer un choix.



Galle sur feuille de chêne, x63



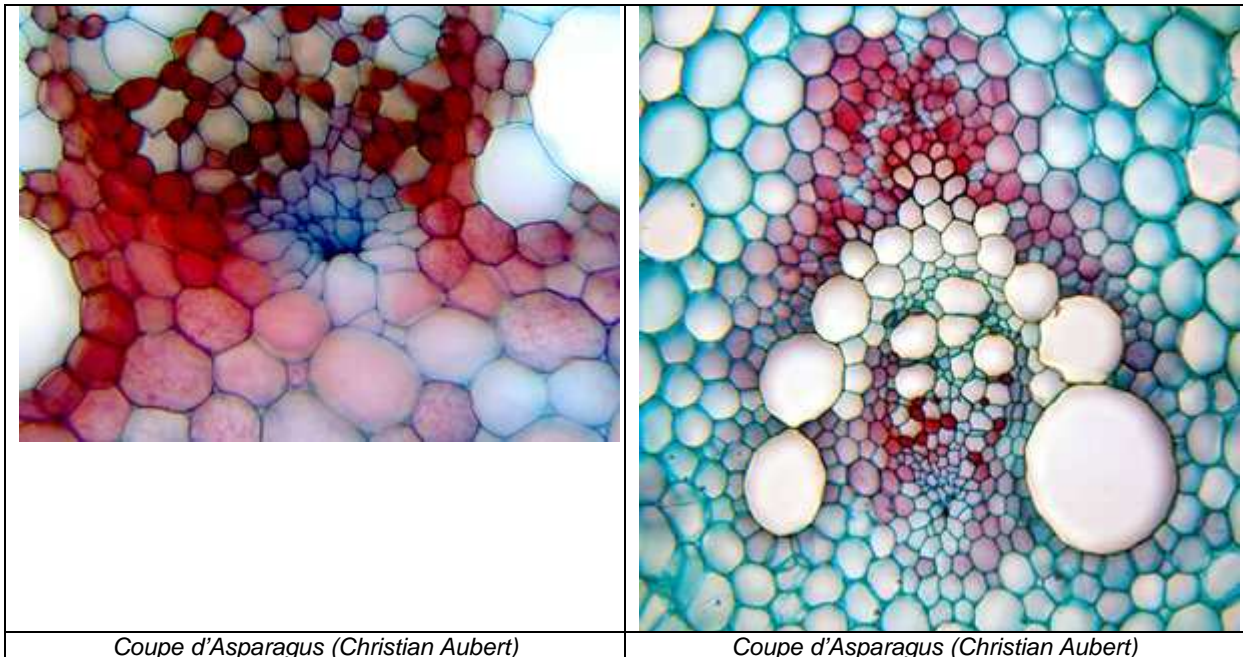
Frottis de sang de porc

Il ne faut quand même pas oublier que nombre de découvertes essentielles ont été réalisées par nos prédécesseurs, sans l'usage de colorants et en utilisant des techniques rudimentaires. L'examen de cellules fraîches et vivantes reste essentiel.

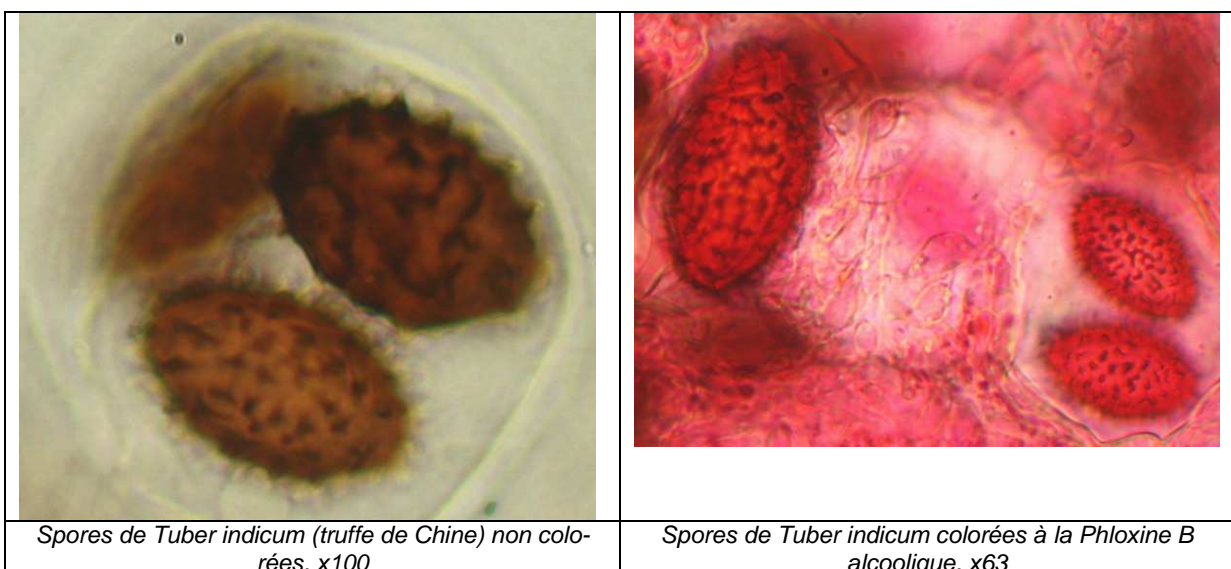
Voici tout un éventail d'appellations que vous rencontrerez dans les livres que vous serez amenés à consulter tôt ou tard !

- A. **la NON COLORATION** : elle consiste à observer l'organisme vivant ou la coupe de tissu, animal ou végétal, simplement dans de l'eau : on perçoit les couleurs naturelles et les manifestations vitales.
- B. **la COLORATION VITALE** : elle consiste à soumettre l'organisme vivant qu'on veut étudier à l'action d'un colorant spécifique à très faible dose, qui va se fixer sur les cellules à observer, sans altérer les fonctions vitales, ... du moins, durant un certain temps. Un colorant vital sera donc une substance peu ou pas toxique, utilisée à dilution très importante.
- C. **la COLORATION LETALE** : la plupart des colorants agissent sur des cellules mortes, tout simplement parce qu'ils nécessitent une fixation préalable. C'est dans ce groupe que notre action va se situer essentiellement.
 - 1. On parlera de **COLORATION DIRECTE** lorsque celle-ci se produit par simple immersion dans un bain de colorant, qui agit directement sur les composants cellulaires.
 - 2. On parlera de **COLORATION INDIRECTE** lorsque celle-ci ne peut se produire sans l'intervention d'un agent mordant ; avant la coloration, il est impératif de « mordancer », c'est-à-dire pratiquer le mordantage (faire agir une autre subs-

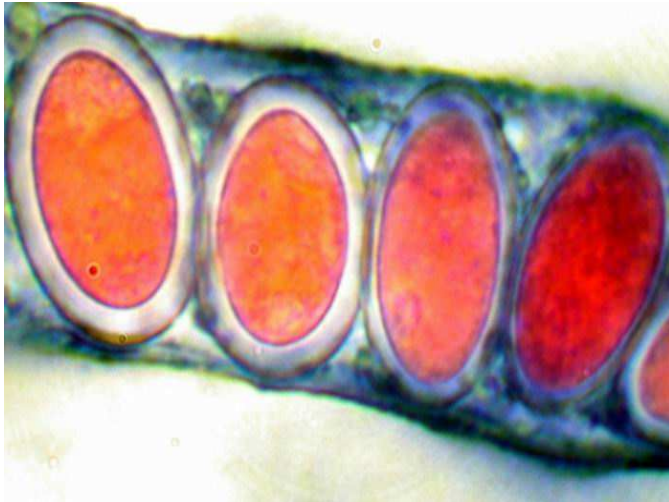
tance qui va « préparer le terrain » au colorant et lui permettre de se fixer sur les éléments à colorer). Sans l'agent de mordantage, la coloration est impossible, ou difficile à réaliser.



3. Lors d'une **COLORATION PROGRESSIVE**, on va utiliser des colorants en faible solution qu'on va laisser agir longtemps sur les coupes, jusqu'à obtention de la couleur souhaitée et définitive. L'opérateur doit donc surveiller régulièrement sa coloration et l'arrêter au moment choisi, par lavage.
4. Lors d'une **COLORATION REGRESSIVE**, on va colorer les sujets de manière excessive, pour ensuite les décolorer à l'aide d'un agent chimique approprié, appelé « différenciateur ». Il est fortement déconseillé d'utiliser des colorants trop concentrés. Il faut prendre le temps et se dépêcher lentement.



5. La **COLORATION SIMPLE** est obtenue avec une seule couleur simple (acide ou basique) ; elle sera nucléaire ou plasmatique, selon le pH du colorant (retenons que les noyaux sont très souvent sensibles aux colorants basiques).
- elle sera **monochromatique** lorsque tous les éléments à colorer prennent le ton du bain colorant.
 - elle sera **métachromatique** lorsque certains éléments à colorer font virer la couleur vers un ton tout à fait différent du bain colorant.



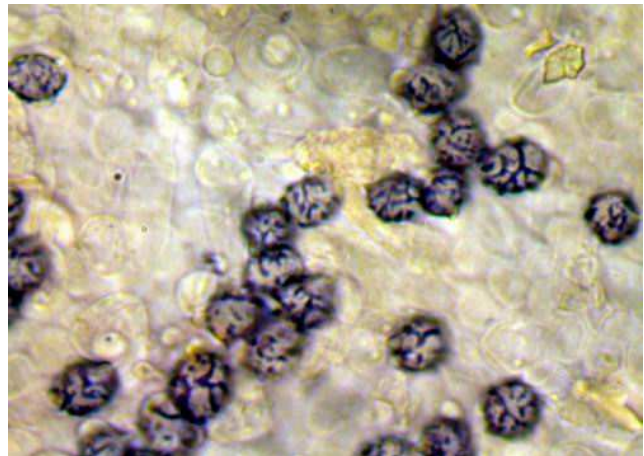
Spores de *Disciotis venosa* traitées par le principe de coloration simultanée, avec du bleu Soudan III lactophérol et de l'éosine jaunâtre (x100)

6. On parlera de **COLORATIONS COMBINÉES** lorsqu'on fera agir plusieurs colorants, de manière simultanée ou successive. Ces colorants seront toujours acides ou basiques.
- dans les **COLORATIONS SIMULTANÉES**, chaque colorant agit pour son propre compte.

- dans les **COLORATIONS SUCCESSIVES**, chaque colorant peut agir pour son propre compte, ou bien se comporter en différenciateur pour un des autres colorants.

Spores de *Lactarius luridus* réagissant au réactif iodo-ioduré de Melzer (réaction amyloïde)

7. Pour des **COLORATIONS PANOPTIQUES**, nous allons utiliser des colorants neutres. Elles permettent de valoriser un grand nombre d'éléments, avec une grande variété de tonalités chromatiques.



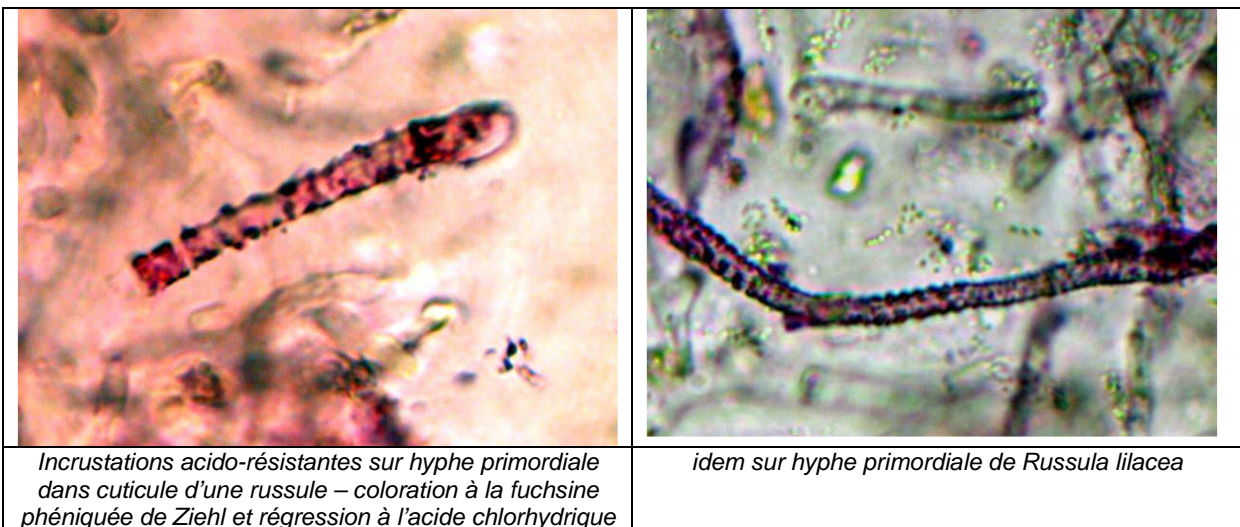
8. La **COLORATION DE MASSE** a été beaucoup utilisée par nos prédécesseurs et est quelque peu tombée en désuétude. Elle consistait à colorer des animaux ou des végétaux entiers. Elle nécessite évidemment des colorants très pénétrants, comme le carmin ou l'hématéine (un dérivé de l'hématoxyline) ; elle permet d'effectuer directement des coupes et de les monter sans fixation. Cependant, on peut considérer que ces colorations manquent de finesse dans le résultat final.

La COLORATION REGRESSIVE

En théorie, le principe est très simple : *il suffit de surcolorer (colorer avec excès) une préparation microscopique à l'aide d'un colorant déterminé, et puis de ramener la coloration au niveau recherché (décolorer), à l'aide d'un autre agent chimique, appelé « différenciateur ».*

Pratiquement, l'application du principe est souvent moins aisée !

- Il faut d'abord savoir que ce type de coloration ne s'applique souvent qu'à des frottis (ce qui est peu courant en mycologie, à moins de considérer une sporée comme un frottis : pourquoi pas ?) ou à des coupes très minces et bien régulières. Cependant, nous l'utilisons pour mettre en évidence les incrustations acido-résistantes sur les hyphes primordiales de la cuticule de certaines russules.



- L'usage d'un fixateur est recommandé.
- Comme ce sont des préparations qui demandent du temps, nous conseillons de les monter au Baume du Canada, si le résultat obtenu s'avère valable, afin de les conserver sous forme de préparations définitives.
- Il est important de prendre des notes au sujet des expériences réalisées, notamment quant au temps d'application des différents produits.

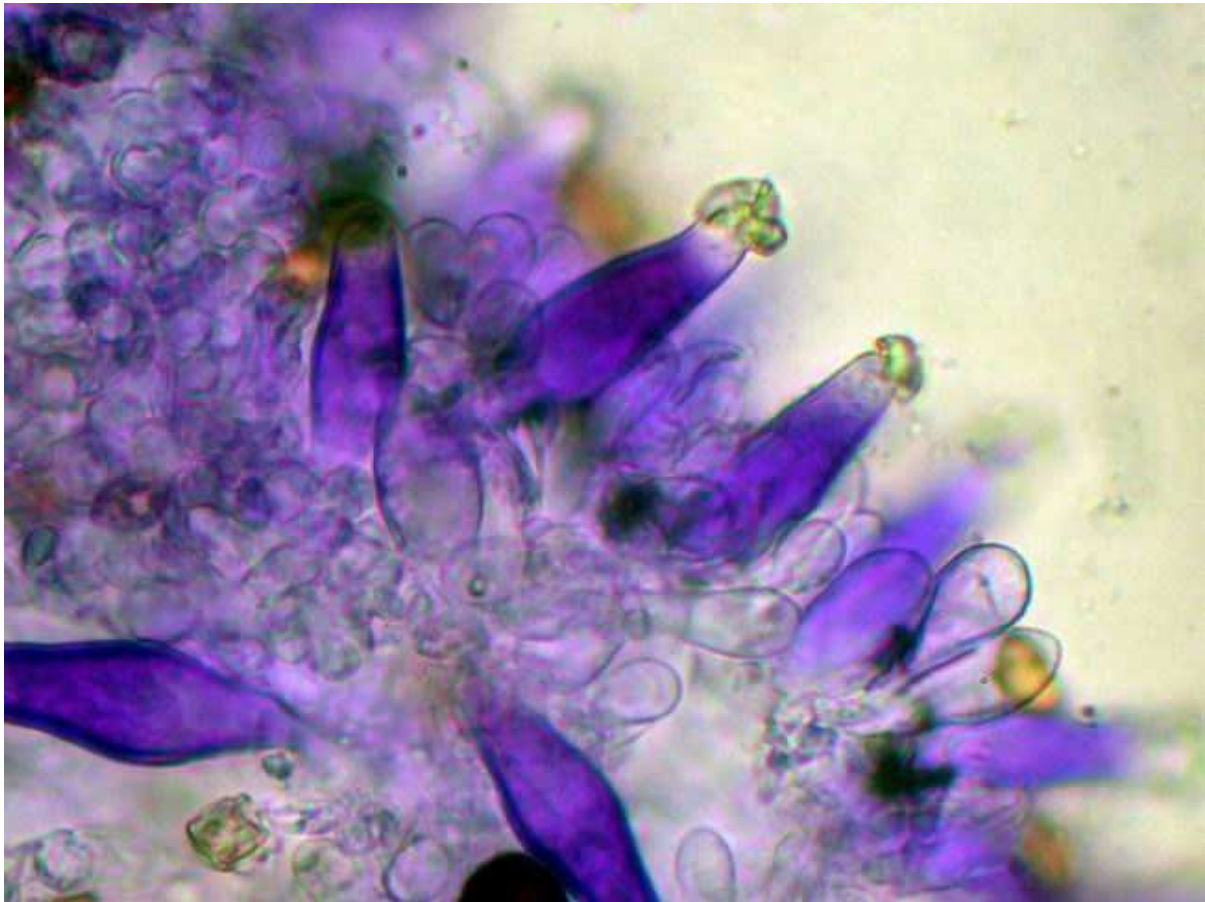
Mode opératoire :

- **Effectuer une coupe très mince** au microtome à main (modèle de Ranvier) ; utiliser de la moelle de sureau ou du polystyrène extrudé pour faciliter la tâche.
- **Pratiquer la FIXATION** de la coupe à l'aide d'un fixateur (parfois aussi appelé « agent mordant ») : ce sont des mélanges assez complexes, à base d'acide picrique et d'acide chromique, la plupart du temps ! ... voir nos fiches techniques à ce sujet !
- **Bien rincer** à l'eau !
- **Pratiquer la COLORATION** à l'aide d'un colorant choisi, comme l'hématoxyline, la safranine, le violet de gentiane, l'orange G, le vert lumière, la Fuchsine de Ziehl, la phloxine, l'éosine jaunâtre... durant une période qui varie selon les colorants (de 15 minutes à 12 heures...). La concentration de la solution de colorant a

beaucoup d'importance ! Une règle à retenir : des solutions diluées agissent lentement mais de manière beaucoup plus élective !

- **Bien rincer** à l'eau !
- **Pratiquer la DIFFERENCIATION (la régression)** qui se fait en général à l'aide d'alcool (éthanol plutôt que méthanol) à 90-95° ou d'alcool chlorhydrique (alcool avec 1 à 5 % d'acide chlorhydrique).
- **Arrêter la DIFFERENCIATION** avec de l'eau pour des préparations ponctuelles, ou avec du xylène (xylol), qui stoppe instantanément la régression et permet le montage dans le Baume du Canada, dont il est le solvant par excellence.

Il s'agit là d'une succession d'opérations qui demandent du temps et auxquelles il faudra apporter du soin et de la minutie, afin d'arriver avec une quasi certitude à un résultat correct !

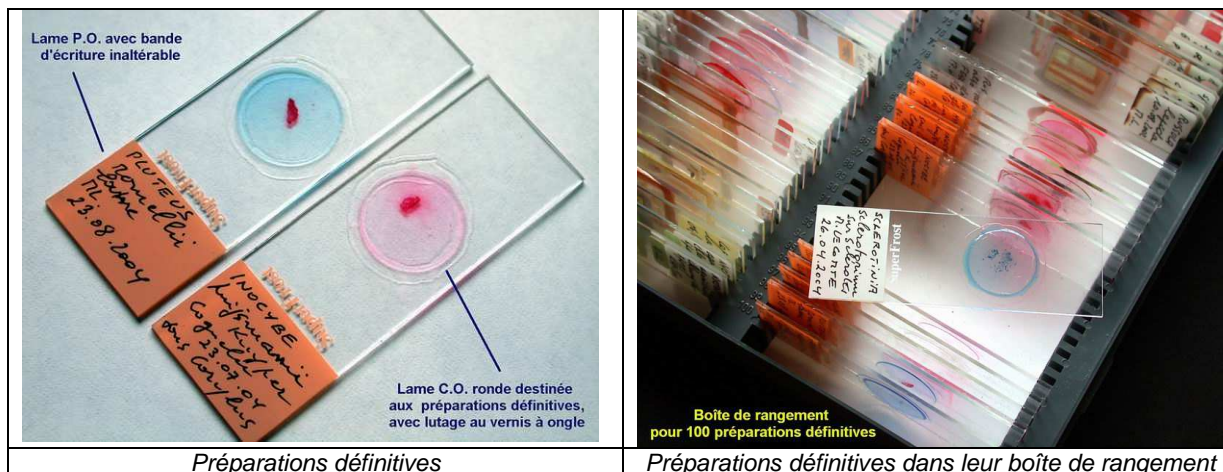


*Cystides couronnées d'acide oxalique chez *Inocybe hirtella* – coloration au réactif de Bailing et régression à l'eau – x63 planapochromatique à immersion*

TECHNIQUE COMPLETE

de préparation d'une coupe à destination définitive

Les méthodes d'examen de matériel à l'état frais donnent la plupart du temps des renseignements incomplets, du fait que **les éléments constitutifs d'une cellule vivante possèdent quasi tous le même indice de réfraction**, ce qui empêche de distinguer avec netteté les détails du noyau ou du cytoplasme.



Préparations définitives

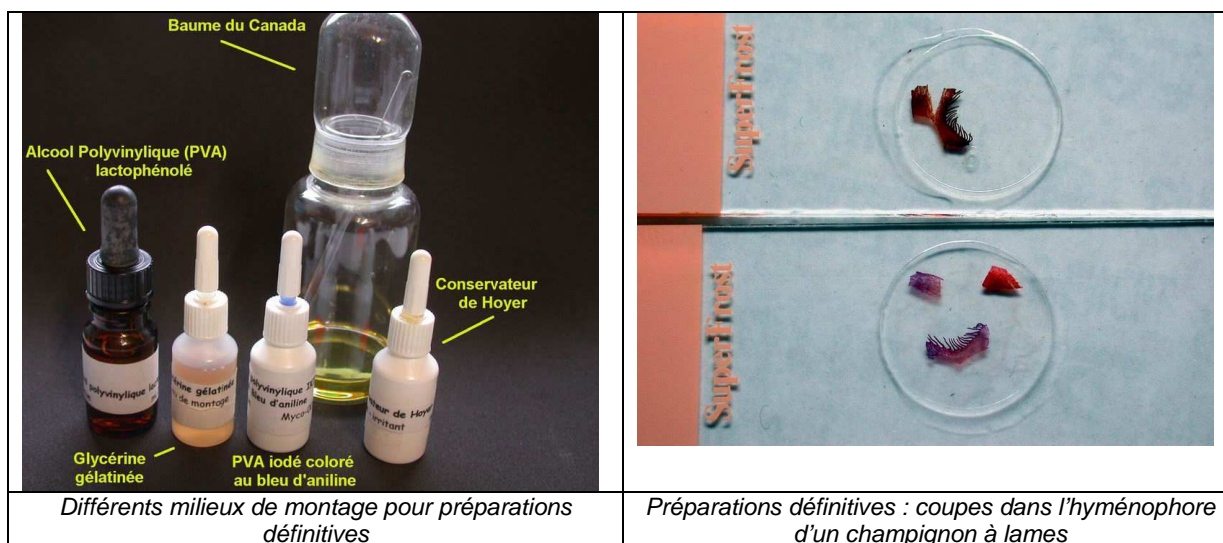
Préparations définitives dans leur boîte de rangement

La seule manière de pallier la similitude de réfringence, sera d'imposer des différences artificielles de coloration. Ce n'est pas si simple que cela, car l'application d'un colorant est soumise à certaines conditions très précises et est quasi toujours létale (voir la fiche technique traitant des colorations).

En outre, lorsqu'on comptabilise le temps passé à tenter de réaliser une préparation correcte, on peut déplorer qu'après examen, elle finisse à la poubelle.

Cette réflexion nous entraîne naturellement à envisager des préparations dites « **dé-finitives** », susceptibles d'être réexaminées après un laps de temps plus ou moins long, de l'ordre de plusieurs années.

Pour information, nous utilisons encore actuellement des préparations réalisées en 1967, lors d'études universitaires, ... et elles n'ont quasiment pas vieilli !



Différents milieux de montage pour préparations définitives

Préparations définitives : coupes dans l'hyménophore d'un champignon à lames

Dans cette optique, il est impératif de passer par des stades bien précis :

- 1/ la **FIXATION**
- 2/ l'**INCLUSION**
- 3/ la **COLORATION**
- 4/ la **CONSERVATION**

Chacun de ces stades va faire l'objet d'une étude détaillée.

Si vous ne souhaitez pas disposer de préparations à longue durée, il est possible alors de simplifier ou d'éliminer certaines étapes.

1. Généralités relatives à LA FIXATION

Elle consiste à immobiliser (tuer) les cellules, en les conservant le plus possible dans un état proche du vital, avec un minimum de déformations.

Une cellule morte va accepter la coloration qui était quasi impossible ou très aléatoire de son vivant. La fixation agit par coagulation ou précipitation de certains composants cellulaires.

Entreprendre une théorie générale de la fixation serait illusoire dans le cadre de ce travail, et cela a été réalisé de la meilleure manière par nos maîtres, Maurice LANGERON et Marcel LOCQUIN.



Des morceaux de tige dans le fixateur AFA

Il est essentiel de savoir au départ quels types de sujets nous allons traiter, car les techniques seront différentes :

- 1/ histologie et cytologie animales, après prélèvements sur des gros sujets
- 2/ étude des Protozoaires et autres animaux microscopiques (uni- ou pluricellulaires)
- 3/ frottis divers
- 4/ parasitologie et mycoses
- 5/ histologie et cytologie végétales

6/ mycologie

Nous nous contenterons de tenter une approche de 2 sujets qui ne nous sont pas tout à fait étrangers : la cytologie végétale et la mycologie !

Nous avons d'ailleurs le sentiment que les techniques appliquées à ces deux disciplines sont sensiblement plus abordables et plus simples, car exigeant moins de manipulations et présentant moins de cas particuliers.

La plus grande difficulté, à notre avis, consiste à effectuer un choix parmi la panoplie énorme de techniques, produits et réactifs, qui nous sont offerts... il y a de quoi y perdre son latin ou la tête !

Pourquoi fixer ?

- pour rendre les constituants cellulaires insolubles
- pour durcir les membranes et les composants cellulaires
- pour augmenter l'indice de réfraction des pièces et conduire ainsi à une meilleure différenciation optique (c'est le fait de la coagulation des albuminoïdes formant la masse cellulaire).
- pour permettre simplement une meilleure observation (la fixation nous paraît importante sinon essentielle, que les préparations soient ponctuelles ou à destination définitive).

Un choix important doit s'effectuer au départ, selon la destination de la préparation.

Avons-nous l'intention d'utiliser :

- un fixateur coagulant
- un fixateur non coagulant

A. Les fixateurs coagulants simples

Nous en retiendrons trois :

- **l' ETHANOL absolu ou ALCOOL ETHYLIQUE absolu** : il ne nous satisfait guère, en raison de son prix exorbitant, de la difficulté extrême de le conserver « absolu » de par son hygroscopie très élevée (car il est tellement hygroscopique que dès qu'on ouvre le flacon il absorbe l'humidité de l'air et n'est donc plus "absolu" - sa conservation implique l'utilisation d'un flacon spécial avec un déshydratant puissant, comme le sodium, et relève d'un laboratoire) → aussi, oublions le !
- **l' ETHANOL ou ALCOOL ETHYLIQUE à 95°** : comme le précédent, il durcit très fort les tissus. Il coagule très bien les protéines mais ne fixe pas les graisses (les lipides sont solubles dans l'alcool) ni les sucres (parmi les hydrates de carbone, seul le glycogène est fixé).
- **le TRINITROPHENOL ou ACIDE PICRIQUE** : il est à la fois fixateur et colorant (jaune). A manipuler avec précaution, car c'est un explosif lorsqu'il est chauffé. Il ne durcit quasiment pas les tissus.

Nous leur préférons des mélanges fixateurs où certains composants se complètent.

B. Les fixateurs non coagulants simples (ils sont nettement plus efficaces que les fixateurs coagulants)

Nous en retiendrons deux :

- **le FORMALDEHYDE ou METHANAL** (dans le commerce, il est vendu sous le nom **de FORMOL** : attention car la solution commerciale est impure ... voir la fiche technique à ce sujet sur notre site !)

Il présente beaucoup de qualités à nos yeux :

- il fixe les lipides
- il ne contracte pas les tissus

- il durcit fortement les tissus
- c'est un excellent fixateur, surtout si on l'additionne de sucre ou d'un sel
- il n'est pas nécessaire de laver la préparation pour la suite des opérations
- par contre, il est incompatible avec la paraffine (s'il s'agit de pratiquer une inclusion)

Walter DIONI a émis de nettes réserves quant à son utilisation en milieu professionnel, pour des raisons évidentes et justifiées de prévention sanitaire, car les techniciens de laboratoire sont exposés aux vapeurs diverses à longueur de journée et d'année.

Nous le citons :

... « Il y a peu d'années, a commencé la tendance à souligner les périls de beaucoup de substances utilisées normalement en microscopie depuis plus d'un siècle. Successivement ont été dénoncés : le formol, le glutaraldéhyde, le dichlorure mercurique, l'acide picrique, l'hydrate de chloral, l'acide phénique, le thymol, le violet de gentiane (ou cristal violet), le rose Bengale, le xylol, le benzol, le toluol, (xylène, benzène, toluène) etc.

La courte liste précédente prive d'ingrédients presque toutes les formules traditionnelles des réactifs pour la microscopie comprenant des fixateurs, des colorants, des agents éclaircisants et des milieux de montage. ... »...

Cependant, dans le cadre de nos activités de loisir réduites à quelques heures par semaine, le danger d'exposition est beaucoup moindre et quasi insignifiant, surtout si vous prenez la peine de travailler dans une pièce bien aérée : ventilation naturelle (fenêtre ouverte) ou forcée (extracteur d'air). A partir du moment où vous manipulez des produits à forte concentration (si vous préparez vous même vos réactifs, fixateurs, colorants ... !), nous conseillons vivement l'installation, dans votre laboratoire, d'une petite hotte de cuisine, dont on ferme également les 2 parois latérales.

- **l'ACIDE ACETIQUE** (il est dit « glacial » lorsqu'il est anhydre) ; on l'utilisera en solution aqueuse à 5 %. Nous lui préférons de loin le précédent, s'il est utilisé seul !

B. Les mélanges fixateurs (il en existe beaucoup et certains à destination très ciblée). Notre choix s'est porté sur des mélanges dont les composants ne sont pas trop coûteux et peuvent être trouvés assez facilement.

Nous utilisons, selon les circonstances :

- **le fixateur de Duboscq-Brasil** (mycologie)
- **le fixateur de Hollande ou de Bouin-Hollande** (mycologie)
- **le fixateur de Carnot** (convient bien pour observer les chromosomes et la mitose)
- **le fixateur de Locquin** (histologie végétale)
- **le fixateur de Halmi** (mycologie)
- **le fixateur lactocuprique** (Protozoaires, Rotifères, Algues...)
- **le fixateur GALA de Dioni** (Protozoaires, Rotifères, Algues...)
- **l'alcool formolé acétique** (formule passe partout)

Tous ces mélanges portent en général le nom de leur inventeur, et certains sont très voisins. Pour les compositions précises et les destinations spécifiques, voir les fiches techniques qui s'y rapportent !

Passons de la théorie à la PRATIQUE :

Au départ, il est important de savoir ce qu'on souhaite observer et il est impératif de se poser les questions suivantes :

- suis-je intéressé par le contenu cellulaire (cytoplasme, vacuoles, nucléole, noyau) ? → **technique A**
- suis-je intéressé par les parois cellulaires (membranes cellulosesiques) uniquement ? → **technique B**

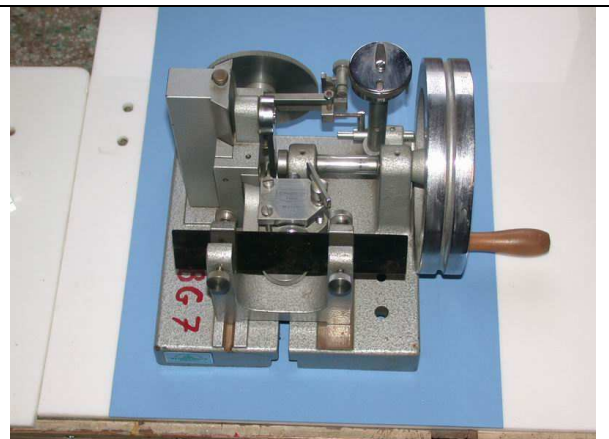
technique A : Nous nous préoccupons du contenu cellulaire

1. **COUPES** : nous effectuons des coupes au microtome de Ranvier (assez facile du fait de la rigidité de la pièce florale) ou à main levée (à la loupe binoculaire) ; nous avons pris l'habitude d'en effectuer 20 à 25, ce qui permet au bout du compte, d'en trouver 2 ou 3 qui sont excellentes !

Une astuce : humidifier l'objet à trancher et la lame du rasoir avec de l'eau alcoolisée (à 5-10 %) afin d'éviter que les coupes collent sur la lame.



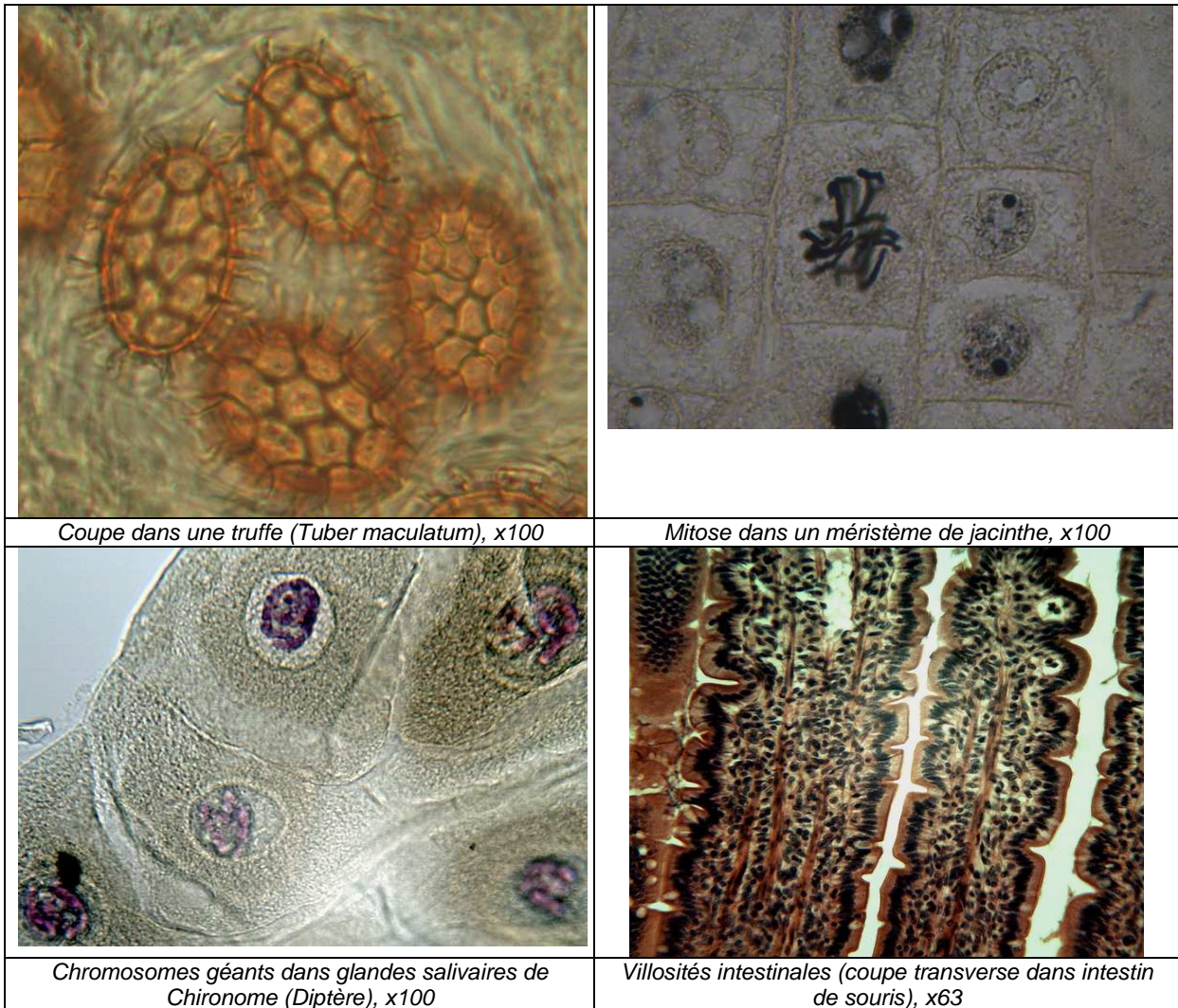
Microtome de Ranvier avec son rasoir spécial



Microtome automatique de Minot

2. **FIXATION** : plonger les coupes dans un bain de formaldéhyde de laboratoire, filtré (le formol commercial est fortement déconseillé) ; quantité à utiliser : 5 à 10 cm³ ; les laisser macérer durant 12 à 24 heures dans le bain ! Utiliser un petit récipient qu'il est possible de boucher, afin de ne pas s'exposer inutilement aux vapeurs de formol.
3. **RINCAGE** : plonger les coupes durant quelques minutes dans 10 cm³ d'eau (nombre d'auteurs préconisent l'inutilité de rincer en présence de formol, mais il nous arrive d'avoir des précipités avec certains colorants)).
4. **COLORATION** : verser 5 cm³ d'eau dans un petit vase Bécher ; y déposer les coupes. Verser 10 gouttes de Rouge Neutre et laisser agir durant 24 heures.

La manipulation des coupes s'avère toujours délicate, surtout si elle est très fine. Aussi, si vous souhaitez éviter ces désagréments, il est plus aisé de les coller à l'albumine directement sur la lame porte-objet et d'utiliser une cuvette à coloration.

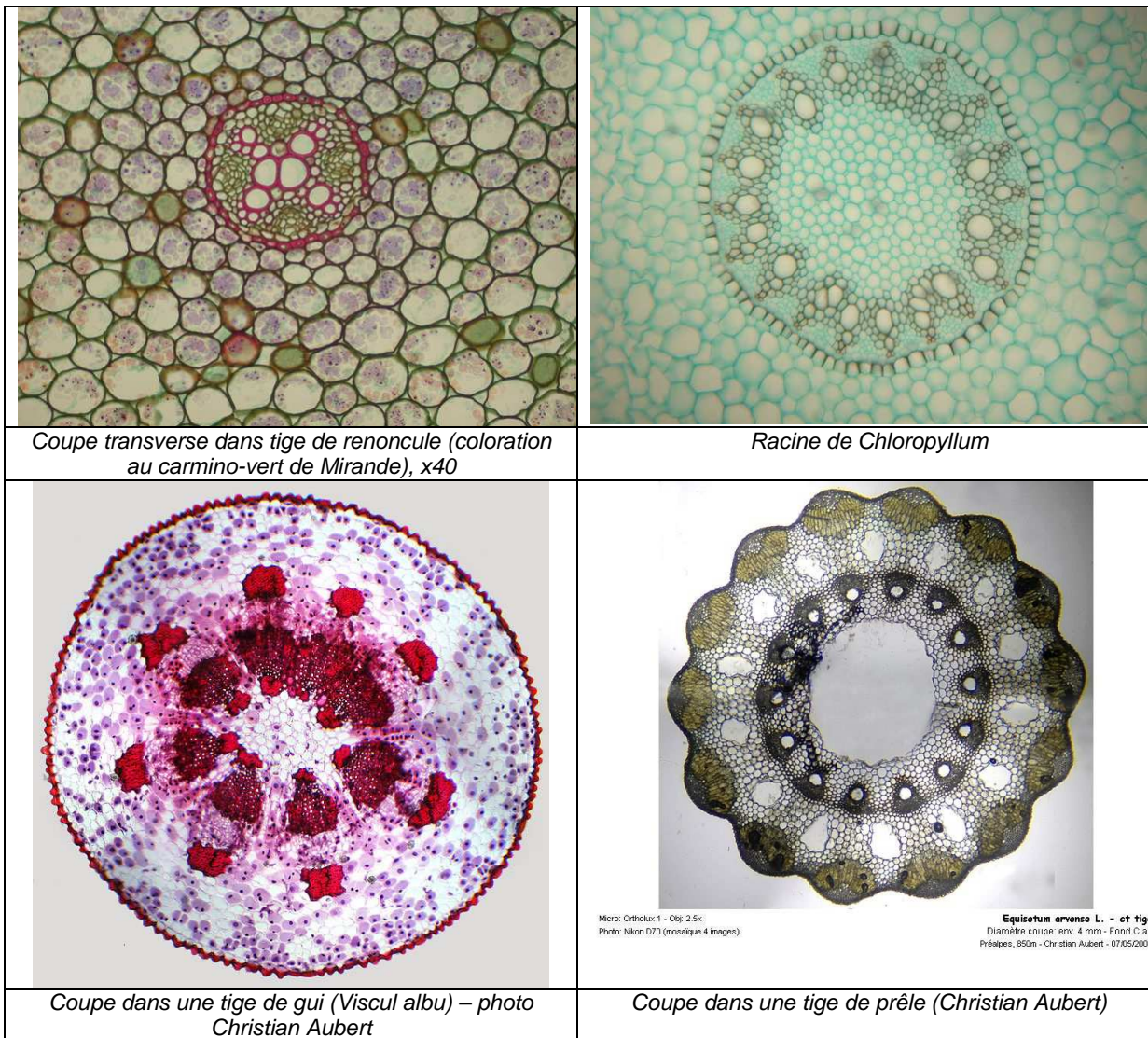


5. **RINCAGE** de la coupe colorée
6. **OBSERVATION** : les noyaux et le cytoplasme sont remarquablement colorés.

technique B : Nous souhaitons étudier les parois cellulaires

Voir la technique A pour les étapes semblables...

1. **COUPES**
2. **DESTRUCTION du contenu cellulaire** : cela se réalise à l'aide d'un bain d'hypochlorite de soude, qui va réduire les tissus végétaux à leur squelette cellulosique ; l'eau de Javel ordinaire n'est pas conseillée, car trop impure ; l'action varie de quelques secondes à 10 minutes, selon l'âge des sujets traités.
3. **RINCAGE** très soigneux : répéter l'opération 2 fois
4. **FIXATION** à l'éthanol à 95°, ou à l'acide picrique



5. COLORATION :

IL est conseillé d'utiliser la combinaison de 2 colorants différents, qui vont se compléter :

- safranine + vert de méthyle,
- safranine + Astra Blue,
- safranine + bleu de méthyle aqueux,
- ou encore carmin aluné + vert d'iode

Exemples pratiques :

- colorer durant plusieurs heures à la safranine alcoolique ; régresser à l'acide chlorhydrique ; laver
- colorer au bleu de méthyle aqueux tiède ; laver → la cellulose est colorée en bleu et les parties ligneuses sont rouges
- colorer au carmin aluné ; laver
- colorer au vert d'iode ou au carmino-vert de Mirande ; laver → la cellulose est colorée en rouge violet et les parties ligneuses sont vert bleuâtre

6. RINCAGE de la coupe colorée

7. OBSERVATION : les parois cellulaires seront remarquablement colorées selon leur nature (ligneuse ou cellulosique)

2. Généralités relatives à L'INCLUSION

Il s'agit d'enfermer l'objet qui servira à effectuer des coupes très fines, dans une masse plastique, qui va la pénétrer dans les moindres recoins de chaque cellule.

La plus utilisée est l'inclusion à la paraffine.

Si elle s'avère obligatoire pour du tissu animal, il y a cependant moyen d'effectuer des coupes sur du matériel mycologique, sans passer par cette étape complexe à mettre en œuvre. Il vaut mieux alors travailler à la loupe binoculaire afin de trancher au plus fin possible.

Nous travaillons à l'heure actuelle sur un nouveau type d'inclusion, à base d'alcool polyvinylique, qui semble beaucoup plus simple d'emploi !



Petit matériel nécessaire pour l'inclusion au PolyEthylèneGlycol



inclusion en cours sur plaque chauffante régulée



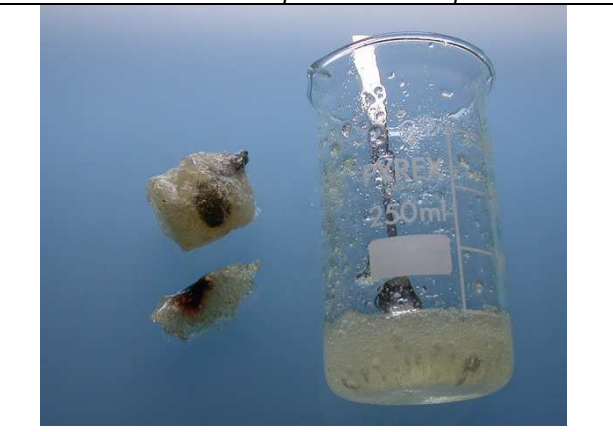
les blocs de PEG en phase de refroidissement



Blocs de PEG prêts à la découpe



Fixation à chaud du bloc sur la tige de support du microtome



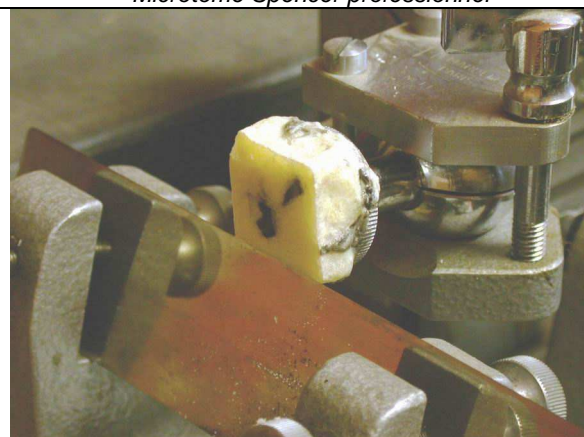
Inclusion dans du PVA (Alcool Poly Vinylique)



Microtome Spencer professionnel



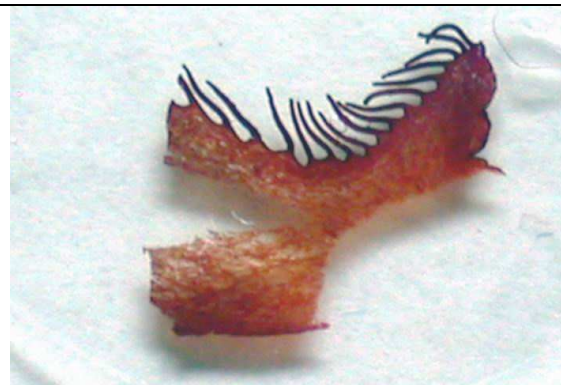
le bloc est prêt pour la découpe



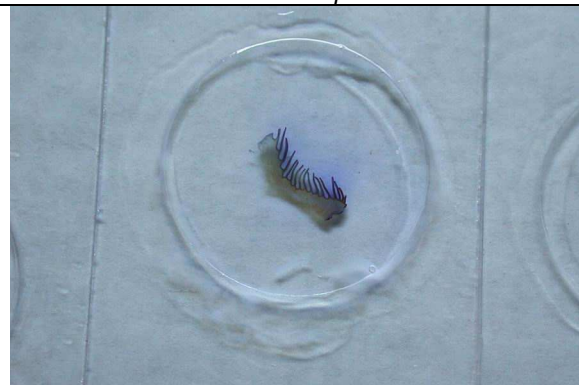
Le bloc de PEG face au couteau du microtome



La découpe



Détail de coupes dans l'hyménophore d'un Basidiomycète lamellé

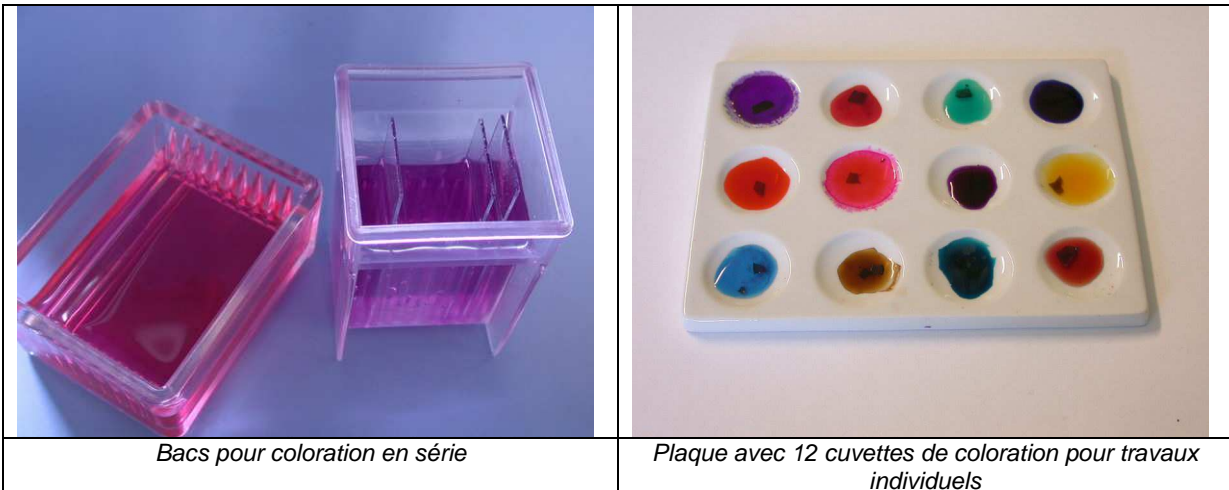


3. Généralités relatives à la COLORATION

LES PRINCIPAUX réactifs ou produits utilisés

Notre liste est encore une fois le résultat d'une expérience personnelle et n'est, en aucune manière, limitative. Elle a pour but de présenter une série de colorants avec leurs principaux objectifs.

Pour les particularités chimiques et techniques de ces colorants, nous vous convions à vous référer aux fiches techniques que nous distribuons avec les préparations réalisées au sein de notre Cercle.



Série 1 : les liquides de ramollissement permettent le ramollissement et le regonflement du matériel desséché, afin de le rendre interprétable, mesurable et observable.

Citons entre autres :

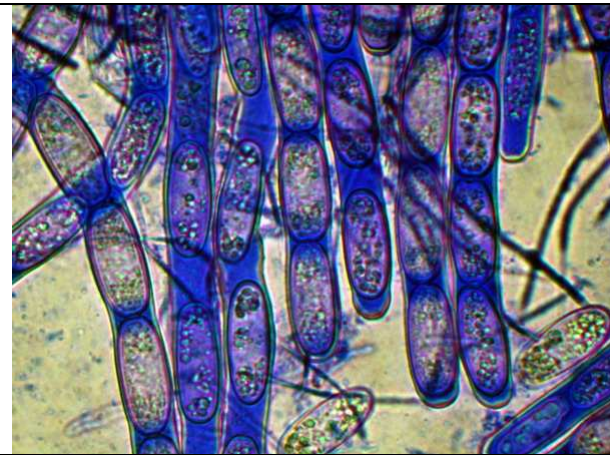
- **le liquide de R. DEAN** : 10 % de glycérine, 89 % d'eau, 1 % d'agent mouillant
- **le liquide de CLEMENCON** (1986) : 20 ml d'ammoniaque concentrée, 1 g de glycérine, 80 ml d'éthanol absolu

Série 2 : les réactifs-colorants réalisent simultanément la coloration et le regonflement du matériel desséché (après ébullition selon la technique simple énoncée ci-dessus).

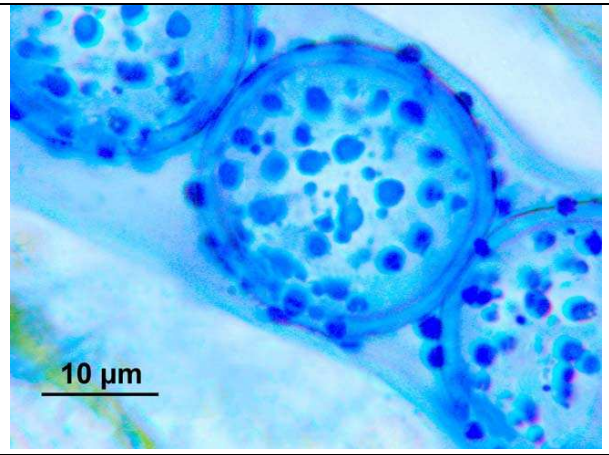
Le bleu coton lactique (avantageusement remplacé par le suivant)

Le bleu coton au lactophénol :

Le bleu de méthyle au lactophénol a la particularité de teinter surtout le contenu cellulaire, ce qui en fait un colorant d'usage général. Néanmoins, il met particulièrement bien en évidence les ornements des spores chez les Ascomycètes (chez *Scutellinia*, par exemple). D'autre part, c'est aussi un réactif microchimique à proprement parler, en ce sens qu'on peut dire de certaines structures qu'elles sont cyanophiles si elles prennent le bleu de méthyle avec une intensité spectaculaire, ce qui est relativement courant.



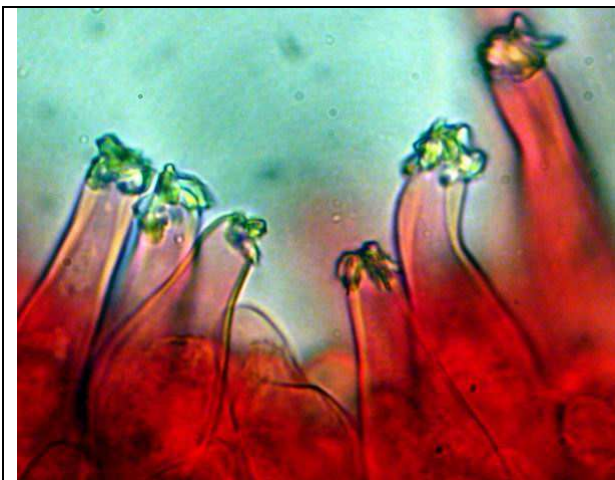
Ascospores chez *Sarcoscypha coccinea*, x63



Ascospores de *Scutellinia paludicola*, x100, photo Jean-Louis Cheype

Le rouge Congo ammoniacal :

C'est un excellent milieu pour toutes les observations courantes. Il a les mêmes qualités regonflantes et ramollissantes que l'ammoniaque, et présente l'avantage supplémentaire de colorer particulièrement la paroi de la plupart des hyphes (facilitant ainsi l'observation des boucles) et des cellules, ce qui augmente le contraste et facilite l'interprétation. Il convient parfaitement lors de la recherche des anses d'anastomose, qu'il met admirablement en évidence.



Macrocystides chez *Inocybe huisjmanii*, x63



Macrocystides chez *Inocybe lacera*, x63

Série 3 : les colorants proprement dits : utilisés pour les colorations ortho ou métachromatiques

Le bleu de crésyl :

Il s'utilise selon plusieurs démarches différentes :

- en solution aqueuse largement diluée, il permet soit une coloration uniforme des vacuoles, ou la mise en évidence de granulations fortement teintées
- en solution aqueuse concentrée, il colore le protoplasme cellulaire en bleu foncé, ainsi que la paroi.

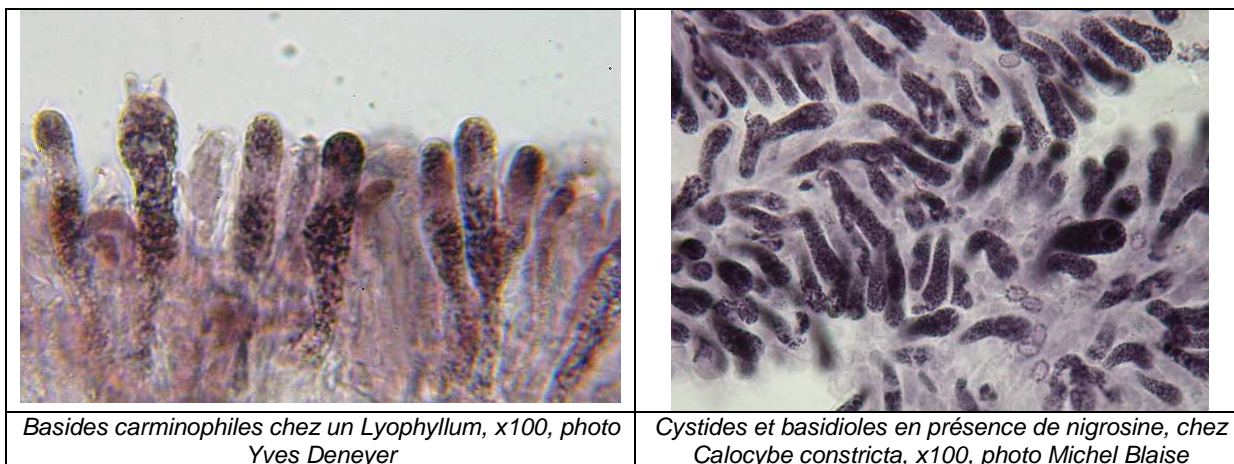
3 cas de figure sont à envisager :

- la membrane cellulaire ne se colore pas
- elle se colore en bleu ou violet
- elle se colore en pourpre ou rouge

R. Kühner l'utilise aussi pour colorer en jaune doré caractéristique les lipides libres (enclaves ou exsudats).

- en solution alcoolique
- en solution alcoolique selon la préparation de Clémenton

Guillaume Eyssartier, lors d'un échange d'idées sur le forum *Mycologia Europaea*, a fait remarquer un détail microscopique important ! Dans la section *Pluteus*, on observe une gangue rugueuse sur les pleurocystides à crochets, qui ressort bien au bleu de Crésyl.



Le carmin acétique : (mieux encore : carmin acétique ferrique)

La coloration des noyaux par le carmin acétique est une caractéristique des genres *Geopora* et *Mycena*. Cette coloration est également possible sur des exsiccata.

Il colore remarquablement les granulations carminophiles des basides des genres *Nyctalis*, *Tephrocybe* et *Lyophyllum*.

La fuchsine de Ziehl : (rouge de Ziehl, karbolfuchsin...)

Elle s'utilise conjointement avec de l'acide chlorhydrique en solution diluée. Elle est très utilisée pour l'étude des russules et particulièrement des hyphes cuticulaires présentant des incrustations dites acidorésistantes. C'est une technique assez élaborée.

L'encre de Chine :

Elle permet d'observer la gélification au niveau de la cuticule.

Le mélange de Giemsa :

Il permet une coloration des noyaux, sans autres colorations parasites.

Le rouge Soudan au bleu coton lactophénol, ou le rouge huile O :

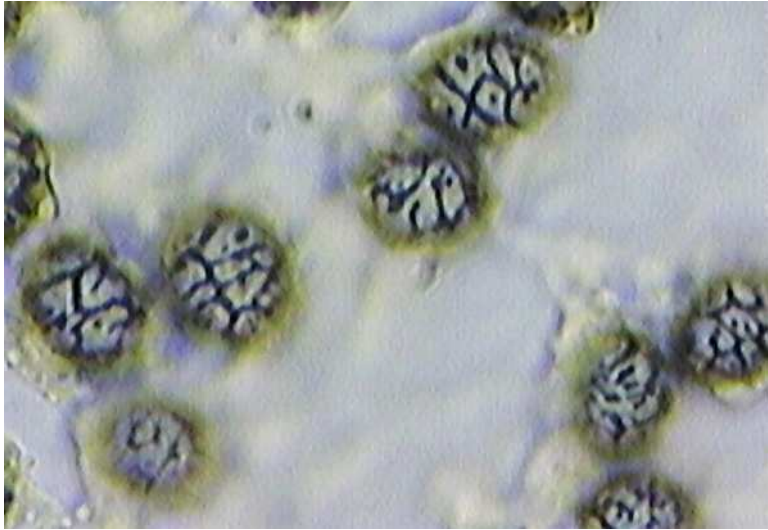
Il est utilisé également pour mettre en évidence la présence de résidus lipidiques.

Le réactif de Melzer :

Il contient 3 éléments : l'iode, l'iodure de potassium et le chloral.

Il permet de mettre en évidence le **caractère amyloïde** (Melzer +) des asques, des spores ou des hyphes de certains genres. Il colore en sombre (brun, gris sombre, bleu, gris bleu, noir) les composés glucidiques de la membrane et (ou) les ornements de certaines spores d'espèces leucosporées ou les parois cellulaires. Cette

réaction est semblable à celle qui a lieu en présence d'amidon, même si les champignons n'en renferment pas.



réaction amyloïde de l'ornementation sporale de Lactarius serifluus – obj. 100x planapo, n =1,

PRATIQUE :

- déposer simplement une goutte sur la lame de verre et y placer l'élément à observer !
- on peut vérifier le caractère amyloïde de manière macroscopique en déposant simplement une goutte de Melzer directement sur les lames, à

condition qu'elles soient bien mûres : les couleurs mentionnées ci-dessus apparaîtront !

INTERPRETATION :

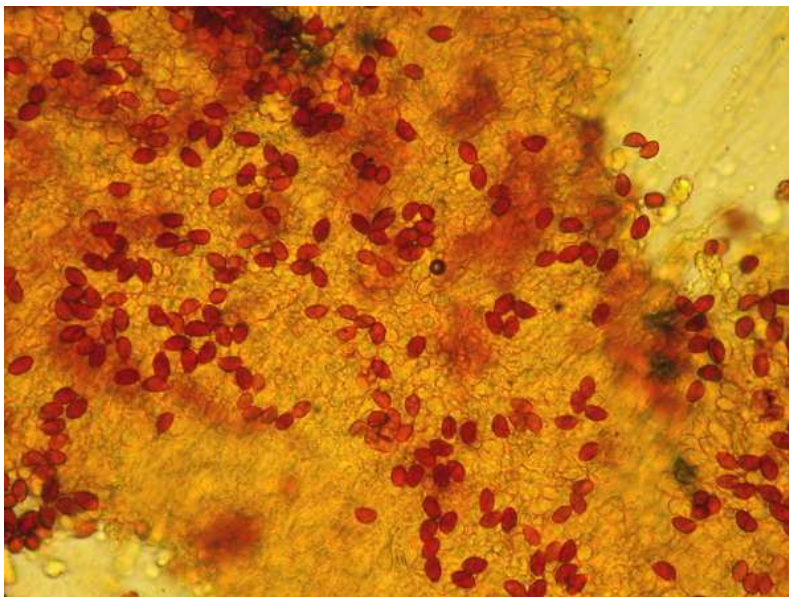
- aucune coloration d'éléments constitutants n'apparaît → non amyloïde : un élément non amyloïde (Melzer -) aura un aspect jaunâtre ou hyalin.
- une coloration sombre de certains éléments apparaît → amyloïde

Champ d'APPLICATION :

Il est utilisé dans de nombreux genres, aussi bien chez les Basidiomycètes que chez les Ascomycètes, ainsi que chez de nombreux Aphylophorales.

SONT AMYLOIDES, notamment :

- les spores des genres Amanita & Mycena
- les spores des genres Melanoleuca, Russula et Lactarius
- les hyphes du genre Boletus

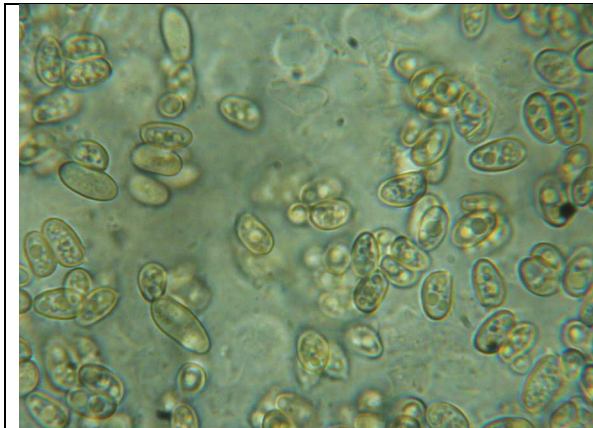


Réaction dextrinoïde des spores de Hebeloma sinapizans – obj. 100x plan infini, à immersion, n =1,35

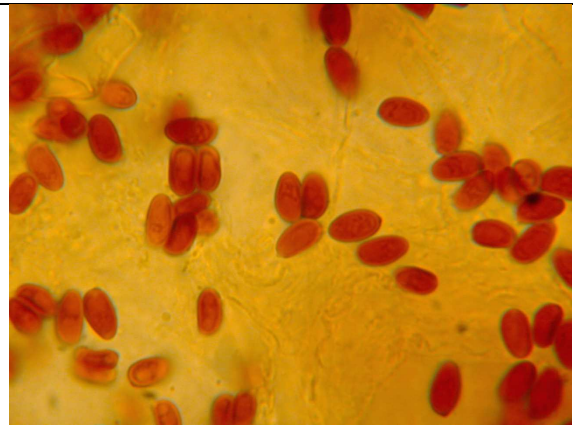
Autres utilisations :

- il intervient lors de la détermination des Ascomycètes, dont le sommet des asques (que ce soit un opercule ou un pore) peut être amyloïde ou non, et lors de l'identification des mycènes, dont la chair est souvent dextrinoïde, mais pas toujours.
- chez les lépiotes *sensu*

lato, afin de savoir si les spores sont **dextrinoïdes** ou pas (les hyphes ou les spores deviennent brun vineux à rouge brun – on parle parfois de pseudo-amyloïdes).



Spores de *Lepiota xanthophylla* observées dans l'eau, x100



Spores de *Lepiota xanthophylla* observées dans le réactif de Melzer (spores dextrinoïdes), x100

Le réactif de Lugol :

Le Lugol est un Melzer sans hydrate de chloral, et avec des proportions en iode et iodure de potassium un peu différentes ; on l'utilise pour les observations macroscopiques surtout, et notamment chez les Cortinaires, à défaut de TL4.

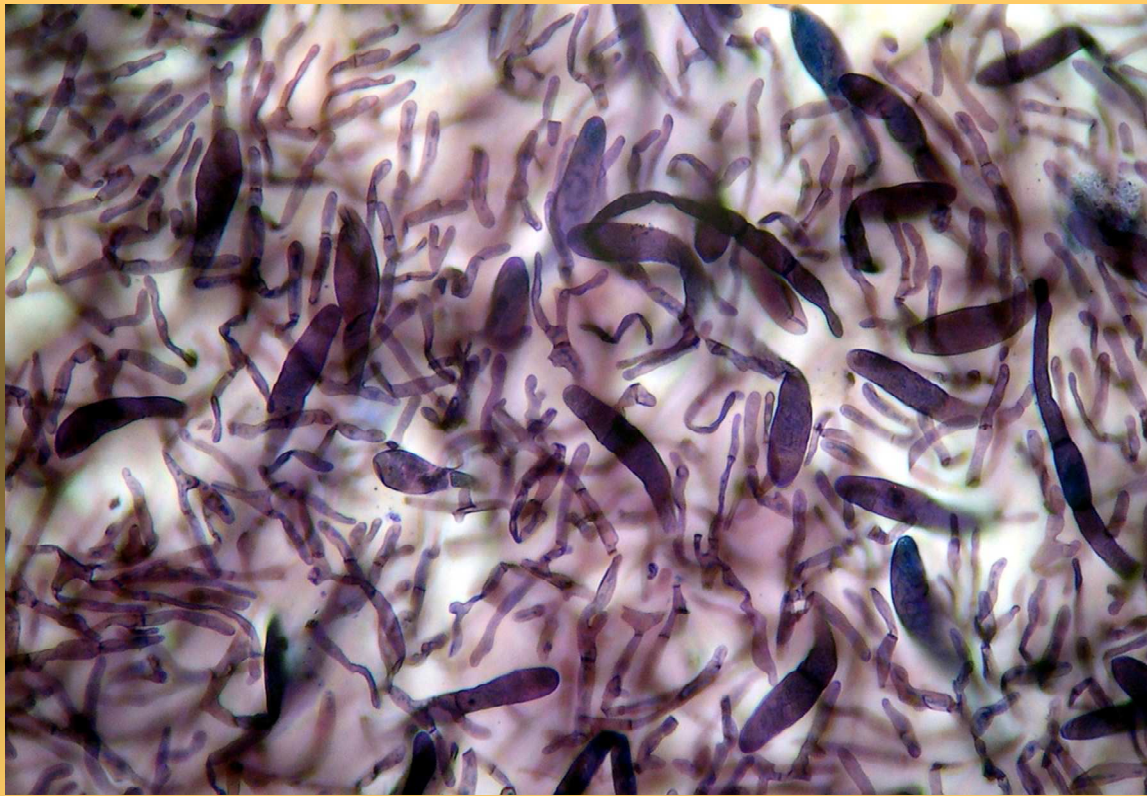
Bouchon apical de Rosellinia réagissant au Lugol - photo Christian LECHAT

Les réactifs sulfoaldéhydiques (abréviation : S.A.)

Ils colorent le contenu des cystides et des laticifères de certaines Russulacées et de Lentinellus ; certaines réactions colorées sont caractéristiques sur la chair et la cuticule de nombre d'espèces.

- **le sulfo-formol** : (S.F.) colore en brun sombre le contenu des cystides et laticifères
- **la sulfo-vanilline** : (S.V.) colore en bleu noir ou en gris le contenu des cystides et laticifères ; observation des caulocystides : elles sont bleu mauve foncé si SV+
- **le sulfo-benzaldéhyde** : (S.B.A.) : excellente qualité de réaction
- **le sulfo-pipéronal** : (S.P.) : à peine meilleur que le précédent (le noircissement des cystides de russules paraît plus prononcé) mais très difficile à trouver (distribution interdite au public).





Dermatocystides d'une russule traitées au sulfobenzaldéhyde

Cuticule de russule, avec réaction SBA+, x100, - photo Dany Joubert

Je vous livre ci-dessous des explications aimablement fournies par Pierre-Arthur MOREAU (mycologue professionnel et Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Lille), lors d'un échange de courrier :

« «Le principe est toujours le même : ces réactifs se combinent avec les corps huileux présents dans les laticifères et les cystides, qui apparaissent en noir ou en violet ("dits "SA+", ou plus spécifiquement "SBA+", "SV+", etc.). La différence entre ces réactifs est une différence de sensibilité : les réactions au sulfopipéronal sont les plus visibles, elles sont encore bien visibles dans le SBA, elles sont plus faibles et parfois douteuses dans la sulfovanilline.

Pour les russules on utilise généralement le SBA, qui a un bon rapport qualité/prix (le pipéronal coûte terriblement cher).

Le principe : mélanger avec un agitateur, sur la lame de verre, 1 goutte d'acide sulfurique et 1 goutte de benzaldéhyde (ou dissoudre quelques cristaux de vanilline dans 1 goutte d'acide sulfurique). Placer la coupe (scalp, le plus fin possible, ou lamelle pour les cystides hyméniales) directement dans ce mélange, et observer après 1 minute.

Il existe du sulfobenzaldéhyde « prêt à l'emploi », mais c'est un mélange instable qui s'altère très vite. Il vaut mieux le préparer selon les besoins.

Les laticifères de la chair des lactaires sont quasi toujours SA+ (à notre connaissance). On peut expérimenter en faisant une coupe à l'intérieur de la chair. Mais sur les surfaces, c'est moins constant et souvent localisé à l'intérieur des cystides, ...s'il y en a.....

Le sulfopipéronal est cité par Boidin et Marchand comme le plus sensible des réactifs sulfoaldéhydiques. Mais pour autant que nous ayons pu le remarquer, le sulfoben-

zaldéhyde fournit exactement les mêmes informations (le noircissement des cystides de russules est plus prononcé avec le pipéronal !). ... » »



Préparation au rouge Congo, montrant des asques avec les spores en formation, des asques contenant 8 ascospores, des asques vides ouverts par un opercule, et des paraphyses, x40 – photo Didier Baar



Ascospores de *Sarcoscypha coccinea* colorées au rouge Congo, x100 – photo Françoise Draye



Ascospores de Sarcoscypha coccinea traitées au réactif de Melzer, x100 – photo Françoise Draye

As-

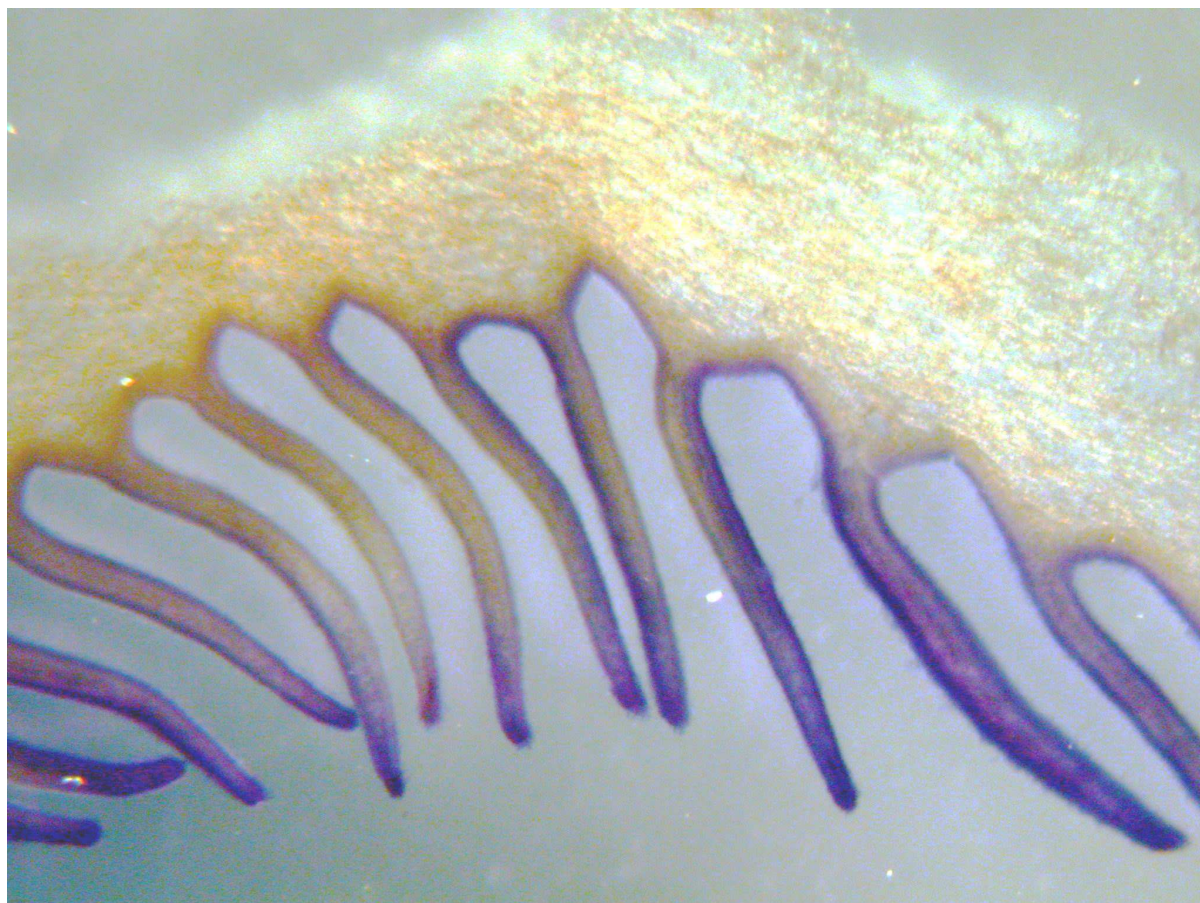


COS-

Ascospores de Sarcoscypha coccinea colorées avec un mélange de rouge Congo, de phloxine B alcoolique et de rouge O pour lipides, x100 – photo Françoise Draye

LES COUPES en microscopie : **un problème évident et peu facile à solutionner !**

Tout microscopiste classique se trouve rapidement confronté à un problème de taille dans ses activités. En effet le principe même du microscope implique qu'on puisse observer les sujets volumineux et solides par transparence, alors qu'ils sont quasi toujours opaques. La seule manière d'y arriver consiste à découper l'objet en tranches tellement fines qu'elles en deviennent translucides ou transparentes.



Coupe radiale dans un chapeau de lactaire, réalisée au microtome de Minot, avec coloration au bleu de crésyl alcoolique – montage à l'histolaque, x20

Ce problème existe depuis que le microscope existe et nombre de chercheurs se sont penchés sur ce problème et ont apporté des solutions relativement simples puis devenant de plus en plus lourdes et techniques, qui ont cette caractéristique commune : plus la coupe devient fine, plus le matériel est coûteux et devient inaccessible à des particuliers. Nous allons évoquer ces diverses solutions en développant celles que nous pouvons espérer pratiquer.

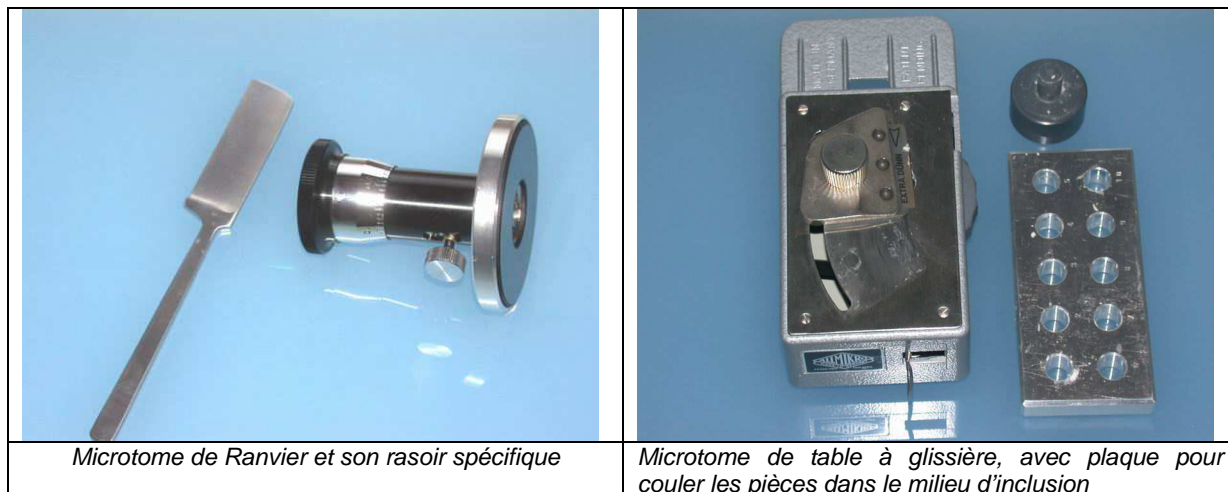
Rappelons que les mesures en microscopie s'expriment en millièmes de millimètre ! Un millimètre se partage en 1.000 microns (abréviation : μ ou mieux μm).

Quelques mesures de référence.

- Une coupe de plus de 30 μm est quasi toujours illisible
- Une coupe valable se situe entre 10 et 20 μm maximum

- Une très bonne coupe se situe entre 5 et 10 μm
- En microscopie optique, les coupes « professionnelles », réalisées par des laboratoires spécialisés, sont de l'ordre de 1 à 4 μm
- Pour la microscopie électronique, les coupes mesurent moins de 1 μm d'épaisseur

Passons maintenant en revue les moyens qui restent à notre disposition, dans le cadre d'activités de loisir. Les prix indiqués seront donnés à titre indicatif et nous ne mentionnerons pas de marques de fabrication.



Microtome de Ranvier et son rasoir spécifique

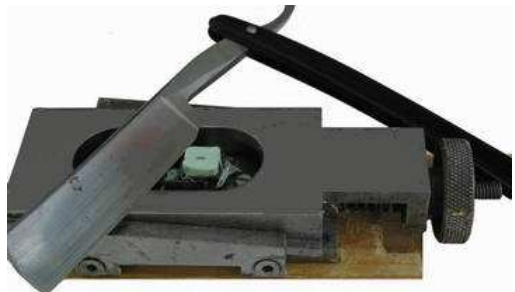
Microtome de table à glissière, avec plaque pour couler les pièces dans le milieu d'inclusion

1. LES COUPES à main levée

Elles sont régulièrement utilisées en histologie végétale, et souvent en mycologie pour des observations ponctuelles ; sauf cas particulier, les tissus animaux se révèlent trop mous et sont intraitables de cette manière.

Avec un peu de dextérité et l'aide appréciable d'une loupe binoculaire, on arrive, par le procédé de la coupe en biseau, à obtenir des portions de coupes valables, mais toujours de très petite taille, et rarement utilisables s'il s'agit de monter des préparations définitives.

Assez curieusement, la littérature est très pauvre en techniques diverses appliquées à la mycologie. Les mycologues réalisent quantités de coupes et préparations, y consacrent un temps considérable, mais ne semblent pas se préoccuper d'en garder des traces sous forme de préparations définitives ou semi-définitives. Il y a là un vaste champ d'exploration et d'expérimentation !



Remarquable microtome artisanal réalisé par Georges Fannechère (France)

L'utilisation de fines lames pour rasoirs mécaniques (faciles à trouver dans le commerce et très bon marché) est courante ; cependant, nous leur préférons les rasoirs de laboratoire à manche, plus lourds et plus rigides, qui ont une lame plane d'un côté et évidée de l'autre.

Quelques astuces :

- Utiliser l'ongle du pouce comme guide de coupe
- Effectuer 5 à 10 coupes de manière à pouvoir en isoler une ou deux valables

- Tirer le rasoir d'un bout à l'autre de la lame (utiliser la plus grande longueur possible du tranchant) : ne pas appuyer perpendiculairement et surtout ne pas effectuer de va-et-vient de coupe
- Mouiller la lame avec de l'eau alcoolisée à 10 % : les coupes sont beaucoup plus faciles à manipuler et ne s'enroulent pas (l'enroulement est provoqué par l'échauffement généré par la coupe sur la face en contact avec la lame) !

2. Le microtome de RANVIER (ou microtome à main)

Il améliore sensiblement les résultats obtenus par la méthode de la main levée, car il permet des coupes plus fines (avec un peu d'expérience) mais surtout donne avec facilité des coupes plus grandes et beaucoup plus régulières.

Cet outil est composé d'un cylindre surmonté d'une large plate-forme de coupe évidée en son centre. A l'autre bout se trouve une vis micrométrique qui va actionner un piston faisant monter l'objet à couper dans le cylindre. Cet objet est maintenu en place par une mâchoire actionnée par une vis.

Si l'objet est de petite taille, nous allons l'inclure dans du PEG, du PVA, de la paraffine, ou l'enfermer entre deux lames de moelle de sureau ou de polystyrène extrudé (afin de rigidifier l'ensemble).

Le rasoir va couper tout ce qui dépasse de la plate-forme ; les limites de l'appareil sont simples : la finesse de la lame utilisée et la précision de la vis micrométrique. Avec l'habitude, nous arrivons à réaliser des coupes de 15 à 20 μm , surtout après inclusion dans le PolyÉthylène Glycol.

Un modèle très bien usiné, fabriqué par une firme batave, donne d'excellents résultats ! Il coûte environ 125,00 Euro.

3. Le microtome de GENAT (ou microtome « de table »)

Nous considérons que c'est un avantage par rapport au précédent, car il est fixé sur un bord de table par une pince et libère ainsi les deux mains.

Le dispositif de coupe est une lame pour rasoir mécanique, solidement fixée sur une partie mobile qui coulisse sur le plateau du microtome, en un mouvement latéral très bien étudié. Une large molette permet de faire monter un cylindre qui renferme le dispositif de serrage et la pièce à couper.

Nous avons fait l'acquisition d'un modèle de marque allemande, dont l'utilisation s'est révélée quelque peu décevante au niveau du dispositif de serrage. Nous avons pris contact avec un tourneur spécialisé qui l'a modifié et « amélioré » selon nos indications, de manière à pouvoir utiliser des cylindres de paraffine ou de PEG. Grâce à cela, nous effectuons des coupes de l'ordre de 10 à 15 μm . Un dispositif astucieux permet de placer une lame porte objet en attente et d'y faire glisser directement la coupe par une « veine » d'eau alcoolisée.

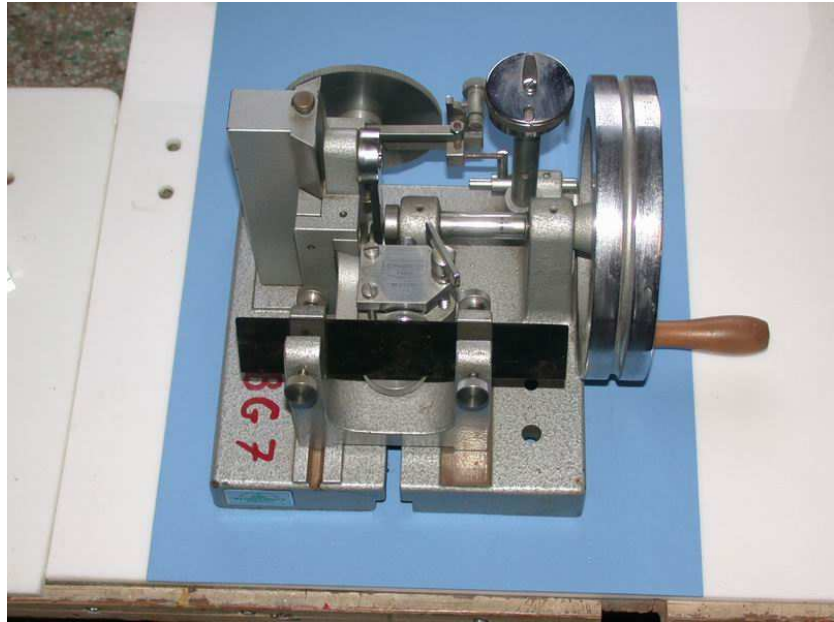
Son prix, avec les modifications effectuées par un spécialiste, est de l'ordre de 400,00 Euro, et se révèle très (trop) élevé à nos yeux ! Il vaut mieux alors chercher un ancien microtome de laboratoire d'occasion... avec de la patience, on finit par trouver !

4. Les « petits » microtomes de laboratoire

Nous allons parler ici de 2 modèles que nous connaissons bien et que nous utilisons :

Le microtome de Minot et le Microtome modèle 820 de American Optical Company. Ils permettent la réalisation de coupes en série, d'une finesse de l'ordre de 2 à 5 μm . Ce sont des modèles anciens, très simples, et mécaniques (actionnés par une manivelle).

Nous avons prospecté le marché spécialisé dans les appareils de conception moderne, plus élaborés que deux modèles évoqués ci-dessus : ils sont rotatifs ou à rampe (à glissière). Le microtome à glissière le moins cher répertorié lors de nos recherches, coûte 2.000,00 Euro ; pour un rotatif, compter 2.200,00 Euro.... ces arguments financiers constituent évidemment de sérieux obstacles et ne relèvent plus d'un simple loisir.



La difficulté ne s'arrête pas là, même si la dépense ne constitue pas un problème pour d'aucuns ! En effet, la coupe de tissus avec ces microtomes, implique obligatoirement l'inclusion dans de la paraffine, du collodion, du PVA (Alcool PolyVinylque) ou du PEG (PolyEthylène Glycol), ce qui entraîne nombre de manipulations plus ou moins longues et l'utilisation de divers produits chimiques, qui risquent d'en décourager plus d'un !

5. Les microtomes pour grands laboratoires spécialisés

Ce sont ceux qui sont utilisés notamment dans les services d'Anatomie Pathologique (AnaPath).

Nous entrons là dans le domaine du rêve, avec des coupes de 1 à 2 μm réalisées à l'aide de :

- microtomes à énergie électrique
- microtomes à congélation
- microtomes utilisant des couteaux en diamant, réalisant des coupes de moins d'1 μm destinées à la microscopie électronique
- des unités entièrement automatisées et informatisées, qui effectuent toutes les opérations successives : inclusion, coupe, coloration.... sans intervention humaine. Les résultats sont extraordinaires, mais selon un utilisateur de nos amis, cela enlève tout le charme des manipulations et des anciennes préparations manuelles....

LE COLLAGE des spores et des coupes :

la solution à beaucoup de problèmes de coloration !

N'oublions pas que notre objectif final consiste à réaliser des préparations à destination définitive. Quoi de plus précieux qu'une excellente préparation qu'on va pouvoir conserver quasi indéfiniment et consulter facilement, après classement ! S'il ne s'agit par contre que de générer des préparations ponctuelles et sans avenir, ces conseils et cette pratique ne sont pas d'application !

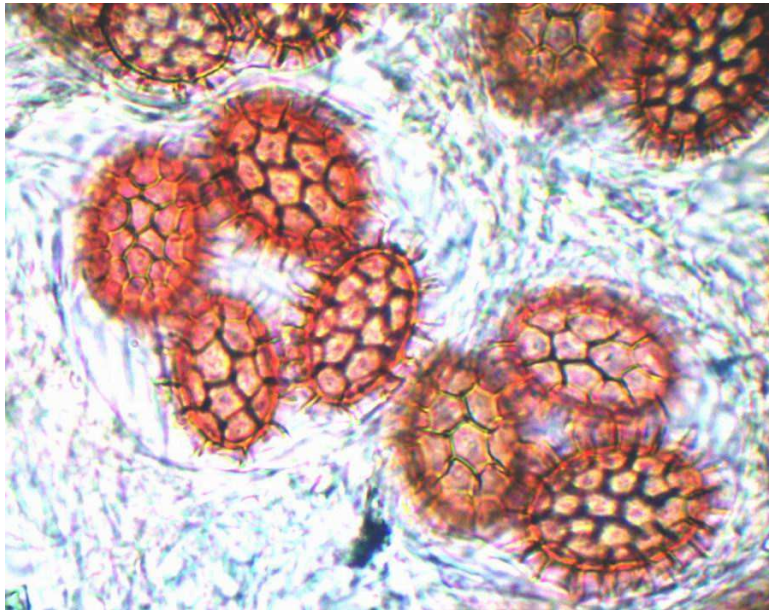
A. LES SPORES : REALISATION d'un FROTTIS

Ce frottis a pour but d'étaler les spores en une couche uniforme et régulière sur la lame porte objet : cela nous semble correspondre à la technique la plus simple et la plus pratique pour les colorer ! Ce modus operandi est dérivé de la préparation d'un frottis sanguin.



Spores d'*Ascobolus furfuraceus*, obj. 63x à immersion $n = 1,40$ – observation dans l'eau

- Préparer une lame porte objet propre et mouillable (nous vous conseillons pour cela d'en garder en permanence quelques-unes plongées dans un mélange composé de 90 cc d'alcool (éthanol ou méthanol) à 90° et 10 cc d'acide chlorhydrique ou nitrique) ; juste avant utilisation, retirer du bain alcoolique acidifié, laver à l'eau courante, et utiliser sans essuyer (une face en tous cas).
- Déposer sur la lame dégraissée une goutte d'eau distillée (ou encore mieux d'eau albumineuse **) à environ 1,5 cm du bord gauche ou droit.
- Prélever un peu de la sporée avec une pointe d'aiguille
- Placer les spores en suspension dans la gouttelette d'eau et bien les incorporer, sans étaler la goutte
- placer le bord d'une deuxième lame porte-objet (rodée) à 45° en contact d'abord avec la goutte d'eau, puis ensuite avec la lame de support
- la goutte doit se répartir le long du bord de cette lame inclinée
- Abaisser légèrement la deuxième lame puis, d'un mouvement régulier, étaler la goutte en tirant la deuxième lame tout au long de la première tout en exerçant une légère pression
- Laisser sécher à l'air libre durant 3 à 5 minutes (ne PAS chauffer) ; on peut activer le séchage du frottis par agitation à l'air ambiant



Spores de *Tuber maculatum* colorées au rouge Congo – mesures : 28-45 x 20-35 μm – x63 à immersion -

A ce stade, on peut vérifier au microscope (objectif x40) la régularité du frottis. S'il est trop épais, on aura un empilement de spores ; pour la microphotographie, il vaut mieux s'obliger à un frottis moins dense.

Résultats possibles :

1. le frottis est trop mince et trop long
2. le frottis est correct
3. le frottis est trop court (goutte d'eau probablement pas assez volumineuse)
4. le frottis est trop épais : recommencer !

Pour la microphotographie les frottis 1, 2 et 3 peuvent convenir...

Comment préparer l'eau albumineuse ?

→ albumine de MEYER...

- 1/ Prélever un blanc d'œuf (en prenant soin d'éliminer directement les chalazes) et le dilacérer soigneusement avec des ciseaux
- 2/ Peser l'albumen et y ajouter le même poids de glycérine pure
- 3/ Ajouter un solution de salicylate de sodium (1 g pour 5cc d'eau distillée)
- 4/ Mélanger longuement tous les ingrédients au fouet (ou sur l'agitateur magnétique) et conserver ce liquide de base au frigidaire
- 5/ Mélanger 1 cm³ de la solution albumineuse mère avec 20 cc d'eau distillée
- 6/ Filtrer éventuellement (couvrir l'entonnoir pour éviter les poussières) et conserver au froid en flacon soigneusement bouché

B. LES COUPES : COLLAGE POUR COLORATION

Cette technique a pour but de permettre la coloration de coupes en série, en usant de cuvettes à coloration, et de permettre le rinçage et (ou) la régression contrôlée à volonté ... voire aussi d'autres colorations complémentaires !

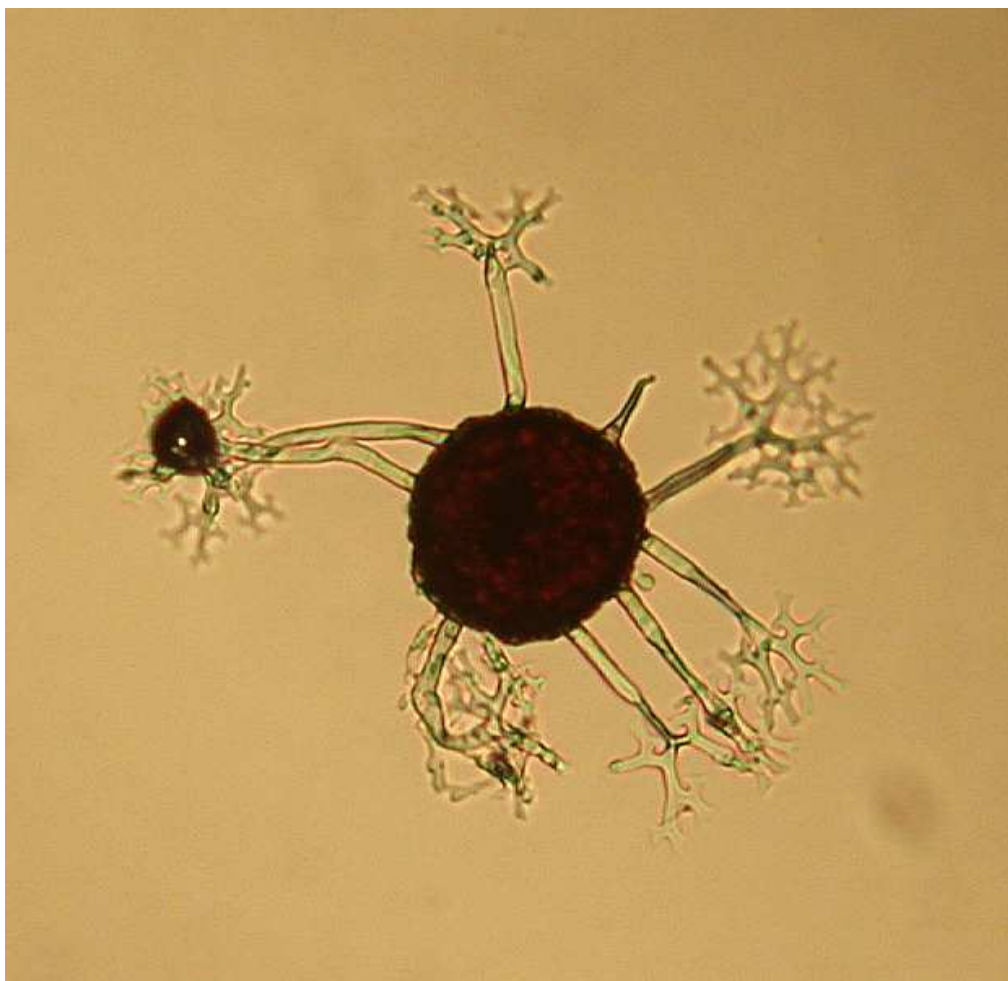
- Préparer une lame porte objet propre et mouillable, et utiliser sans essuyer.
- Déposer sur la lame dégraissée une goutte d'eau albumineuse à environ 1,5 cm du bord.
- Placer le bord d'une deuxième lame porte-objet (rodée) à 45° en contact d'abord avec la goutte d'eau, puis ensuite avec la lame de support
- La goutte doit se répartir le long du bord de cette lame inclinée
- Abaisser légèrement la deuxième lame, puis, d'un mouvement régulier, étaler la goutte en tirant la deuxième lame tout au long de la première tout en exerçant une légère pression

- Placer la coupe sur le frottis obtenu et contrôler à la loupe binoculaire le parfait étalement
- Pencher légèrement la lame pour évacuer l'éventuel surplus de liquide
- Laisser sécher à l'air libre durant 3 à 5 minutes (ne PAS chauffer) ; on peut activer le séchage par agitation à l'air ambiant

Après séchage, il sera possible de plonger dans des bains de coloration et de rincer, sans voir la coupe se détacher du support.

Faut-il préciser que toutes ces opérations demandent une délicatesse certaine ?

Spore de Discina perlata – 100x à immersion



Cléistothèce avec fulcres chez M. alphitoides (Oidium)

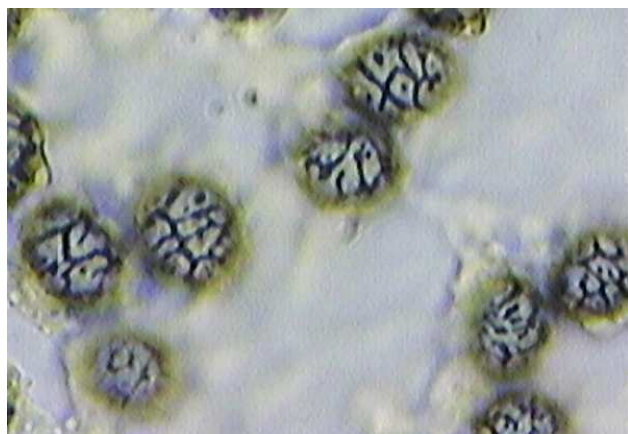
Les Milieux d'Observation à utiliser pour l'examen d'une préparation microscopique

Les méthodes d'examen de matériel à l'état frais donnent la plupart du temps des renseignements incomplets, du fait que **les éléments constitutifs d'une cellule vivante possèdent pratiquement tous le même indice de réfraction**, ce qui empêche de distinguer avec netteté les détails du noyau ou du cytoplasme.

La seule manière de pallier à la similitude de réfringence, sera d'imposer des différences artificielles de coloration. Ce n'est pas si simple que cela, car l'application d'un colorant est soumise à certaines conditions très précises et est quasi toujours létale (voir la fiche technique traitant des colorations, sur notre site **).

Mais il faut savoir également que la qualité de l'observation sera grandement améliorée, selon le milieu dans lequel on va placer l'élément à examiner.

Une notion très importante à maîtriser : l'INDICE de REFRACTION



L'indice de réfraction est une indication numérique (représentée par n) qui sert à exprimer le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et la vitesse de la lumière dans le milieu de propagation. Plus explicitement, il correspond au facteur de proportionnalité existant entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction. L'indice de réfraction est un nombre sans unité où le vide ($n = 1$) est posé comme ayant la plus faible

indice de réfraction.

Le coin du physicien ! (texte déconseillé aux personnes sensibles ...)

Lorsque la lumière rencontre la matière, elle ne peut plus se propager à la vitesse $c \sim 300.000 \text{ km.s}^{-1}$. Ceci vient du fait que la lumière possède un champ électrique oscillant à une fréquence ω , tandis que la matière contient des électrons liés aux noyaux avec une énergie d'excitation caractéristique $\Delta E = \hbar \times \omega_0$. Si $\omega \sim \omega_0$, les électrons peuvent escalader leur échelle d'énergie donnant lieu au [phénomène d'absorption](#). La lumière est ici complètement stoppée et utilise toute son énergie pour faire transiter les électrons entre les deux niveaux ayant le bon espacement.

Si $\omega \neq \omega_0$, les électrons ne peuvent pas sauter mais voient quand même le champ électrique oscillant de l'onde lumineuse. Comme toute charge q en présence d'un champ électrique E subit une force $f = q \times E$, l'électron va se mettre à osciller autour du noyau avec la même fréquence ω que l'onde incidente. Or les équations de Maxwell montrent que toute charge électrique q oscillant à la fréquence ω sur une distance L , rayonne de l'énergie avec un taux moyen $\langle R \rangle$.

La variation en fonction de la puissance 4 de la fréquence de l'onde lumineuse est facile à comprendre si l'on se rappelle que l'énergie est proportionnelle au carré du champ électrique E et que la force f que subit l'électron est fonction de son accélération $\gamma = d^2x/dt^2$. Pour un mouvement oscillant $x = L \times \cos \omega t$ induit par le champ électrique $E = E_0 \times \cos \omega t$, on a une énergie qui varie comme $(q \times L \times \omega^2)^2$ en accord avec la relation précédente.

La lumière va donc être réémise avec la même fréquence ω mais peut changer de direction et de vitesse en fonction de la force qui unit les électrons aux noyaux (caractérisée par une fréquence naturelle d'oscillation ω_0). L'indice de réfraction n mesure le ralentissement de la lumière suite à l'interaction avec les électrons de la matière.

(Explication trouvée sur le site des chimistes de l'Université Louis Pasteur (ULP) de Strasbourg)

Il ressort de tout cela que l'observation est améliorée lorsque le n du milieu traversé par les rayons lumineux est le plus élevé possible !

Cela signifie en clair que le n d'un objectif devra être le plus élevé possible, de même que celui du milieu d'observation utilisé.

Quelques indices de réfractions intéressants pour la microscopie :

air	1,0003	glycérine gélatinée	1,47
éthanol	1,329	chloral lactophéno	1,49
eau bidistillée	1,333	histolaque	+/- 1,5
ammoniaque	+/- 1,3	gomme arabique (milieu de Hoyer)	1,512
PVA (Alcool PolyVinylque)	1,382	baume du Canada au xylène	1,526
PVA lactophéno	1,4	huile d'immersion synthétique	1,53
glycérine	1,46	glycérol de laboratoire	1,7
verre de microscopie	1,46	glycérine iodo-mercurique	1,8

Cela signifie qu'une observation réalisée avec un objet posé sur une lame de verre (où il n'y a donc que de l'air entre l'objet et l'objectif) sera médiocre.

Par contre, si on travaille à l'immersion (1,53), avec un objectif de 1,40, un couvre-objet (1,46) et du glycérol (1,7) pour baigner l'objet, la qualité d'observation sera énormément améliorée et on se trouvera au maximum des possibilités optiques du microscope.

Deux grands cas de figure vont se dégager :

1. **l'observation est ponctuelle**, sans aucune volonté de conservation
2. l'observation s'avère intéressante et il peut naître de cela une **volonté de conservation de cette préparation**. Nous allons parler alors de
 - **préparation semi-définitive**
 - **préparation définitive**

A. LES PREPARATIONS PONCTUELLES

Nous partons du principe que nous utilisons toujours une lame porte-objet et une lame couvre-objet !

Ne pas oublier de rincer les préparations après coloration ! Sauf cas particuliers (observation de spores notamment ou objet coloré naturellement), il est impératif de rincer soigneusement la préparation avant de poser le milieu d'observation ! Cela permet d'augmenter le contraste notamment lorsqu'on souhaite réaliser des photos.

1. EAU DISTILLEE

C'est le milieu le plus simple et le moins coûteux, qui autorise des erreurs de manipulation et donne des résultats corrects

2. ETHANOL ou alcool éthylique

Nous ne l'utilisons guère en mycologie, car son grand pouvoir déshydratant va déformer les pièces non rigides en les desséchant

3. AMMONIAQUE

S'avère intéressant lorsqu'il s'agit d'observer des pièces provenant d'exsiccata, sur lesquelles il va jouer en même temps un rôle regonflant ; ou aussi, lorsqu'il joue un rôle décisif dans l'observation de caractères précis (chrysocystides)

Téléospores de Puccinia rubi-idae (Urédinale = rouille) sur framboisier – x40 – montage dans le PVA –



4. CHLORAL LACTOPHENOL

5. GLYCERINE ou GLYCEROL

Ce sont des milieux à consistance beaucoup moins fluide, conseillés pour une observation optimale et la réalisation de photos. Ils ne conviennent pas pour réaliser de bonnes dissociations (il vaut mieux alors « éclater » la pièce sous l'eau, éponger délicatement avec un papier absorbant puis poser le milieu choisi).

Lorsqu'on comptabilise le temps passé à tenter de réaliser une préparation correcte, on peut déplorer qu'après examen, elle finisse à la poubelle... Cette réflexion nous entraîne naturellement à envisager des préparations susceptibles d'être réexaminées après un laps de temps plus ou moins long, de l'ordre de plusieurs années.

B. LES PREPARATIONS SEMI-DEFINITIVES

Elles pourront se conserver durant plusieurs semaines, plusieurs mois, voire 2 ou 3 années, sinon plus !

Elles impliquent de pratiquer une opération qui s'appelle le **LUTAGE**, qui consiste à poser autour de la lame couvre-objet un enduit durcissant (vernis à ongle, paraffine, PolyÉthylèneGlycol ou PEG), qui va rendre le milieu étanche, inaccessible à l'air, et donc l'empêcher de se dessécher ; sa fonction secondaire sera également

d'empêcher la lame couvre-objet de se déplacer lors d'éventuelles manipulations (nettoyage).

1. **CHLORAL LACTOPHENOL**
2. **GLYCERINE ou GLYCEROL**
3. **GLYCERINE GELATINEE**
4. **GLYCERINE IODO-MERCURIQUE**
5. **PVA coloré iodo-ioduré**
6. **PVA LACTOPHENOLE**

Il s'agit surtout d'une question de choix personnel (en fonction de la facilité de manipulation) et de disponibilité de produit.

La glycérine gélatinée, par exemple, demande à être travaillée à chaud et génère très facilement des bulles d'air, néfastes à une bonne préparation.

Ces bulles constituent d'ailleurs le problème majeur dans ce type de préparation, et la pose de la lame couvre-objet notamment, demande beaucoup de soin.

C. LES PREPARATIONS DEFINITIVES

Elles pourront se conserver durant de nombreuses années !

Pour information, nous utilisons encore actuellement des préparations réalisées en 1967, lors d'études universitaires, ... et elles n'ont pour ainsi dire pas vieilli ! Le baume du Canada a simplement un peu jauni.

Même si cela ne s'avère pas indispensable, nous conseillons vivement le lutage.

Attention ! Certains conservateurs exigent d'être posés sur des objets parfaitement déshydratés, ce qui implique des manipulations parfois longues quand on manque d'habitude.

1. BAUME DU CANADA

Sans doute le meilleur des conservateurs, mais il implique une déshydratation totale, ce qui est très souvent incompatible avec les pièces molles des champignons (sauf les spores). Par contre, il présente un avantage énorme : étant très avide d'oxygène, il absorbe les éventuelles bulles d'air qui se seraient formées malgré les précautions prises lors des manipulations.

2. HISTOLAQUE

Ce produit moderne est fabriqué pour les laboratoires et son solvant est l'eau, ce qui résout les problèmes inhérents à l'emploi du baume du Canada.

3. CONSERVATEUR de HOYER

Bon produit à base de gomme arabique, et dont le solvant est l'eau ; il convient donc très bien pour la mycologie !

Attention, il décolore presque immédiatement la Fuchsine de Ziehl.

L'utilisation d'un milieu d'observation possédant le meilleur indice de réfraction soit-il ne peut à lui seul garantir les résultats espérés ; elle doit être associée à la mise en oeuvre très rigoureuse du mode opératoire, à des manipulations soigneuses, et à un réglage fin du microscope...

A propos du marquage des objectifs Leitz ou Zeiss, qui posent souvent des problèmes d'interprétation.

Compilation réalisée par Frédéric Bret

Voici une liste non exhaustive d'abréviations utilisées (elles peuvent être étendues à nombre d'autres marques célèbres).

Objectifs en principe pour tubes de 170mm.

PL : plan (aberrations de planéité corrigées)

FL : fluotar pour fluorescence en général avec un plus grand NA et meilleure luminosité

A : Apertur – Ouverture numérique

Apo : Apochromat – Apochromatique

FI : Fluoritsystem – Lentille en **fluorite**, objectif semi-apochromatique

Ne pas confondre avec :

Flu : Fluoreszenz – Objectif pour la lumière UV, lentille en Quartz en général.

Glyz. Ou **Glyc** : Glyzerinimmersion – Objectif à immersion dans la glycérine.

H : Heiztischobjektiv – Objectif pour utilisation avec une platine chauffante.

HD : Hellfeld-Dunkelfeld – Objectif pour fond clair ou fond noir. En réflexion (Épiscopie).

Iris : Irisblende – Diaphragme réglable

L : Langern Arbeitsabstand – Objectif à grande distance de travail (entre la lentille frontale et l'objet examiné)

NPL : Normalfeld/Planobjektiv – Objectif plan, champ de 24 mm maximum, utilisable en fluorescence.

PL : Planobjektiv - Objectif plan, champ de 28 mm maximum (Avec oculaire adapté : GW tubes de diamètre 30mm)

Oel ou **Öl** ou anneau noir : Objectif à immersion dans l'huile

P : Polarisation – Objectif pour polarisation, sans contrainte mécanique sur les lentilles.

(P) :Polarisation – Objectif pouvant être utilisé pour la polarisation dans certaines limites.

Phaco : Phasenkontrast – Pour contraste de phase selon Zernicke

Pv : Phasenkontrast – Pour contraste de phase selon Heine

Q : Quarzglas -- Objectif pour la lumière UV (Fluorescence), lentilles en Quartz

R : StrahlungResistent – Rayonnement atténué (réflexion secondaire gênante en épiscopie)

UM ou **UMK** : Universal-Drehtische - Pour platine rotative, et polarisation, comporte un diaphragme réglable.

UO : Ultropak-Objektiv : Pour épiscopie, pas de pas de vis RMS mais une glissière. Nécessite un porte objectif adapté.

W : Wasserimmersion - Objectif à immersion dans l'eau.

ICR : interferential contrast reflexion

ICT : interferential contrast transmission

IK : interferenzial Kontrast ou DIK

NPL : Neo plan, ou semi plan. Plan sur 22,4 mm de champ

NPL : plan sur un champ de 20 mm

NPL : Normalfeld/Planobjektiv – Objectif plan, champ de 24 mm maximum, utilisable en fluorescence

PHAKO : phasenKontrast

HI = Homogeneous Immersion, c'est à dire immersion à l'huile dans pratiquement tous les cas.

A cela on peut ajouter les indications classiques :

Longueur du tube : **160 mm**, **170 mm**, **215 mm**, **infini...**

Epaisseur du couvre objet (CO) :

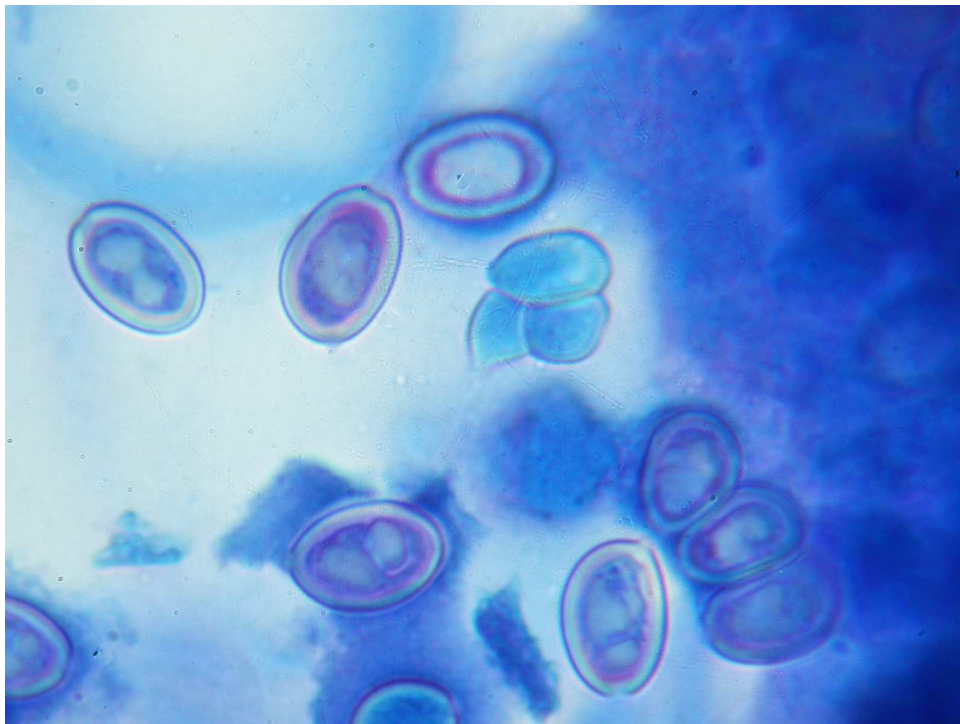
0 : Pas de CO

- : Utilisation avec ou sans CO

0.17 : Utilisation optimale avec un CO de 0,17mm

n : indice de réfraction

Référence : "Abbildende und beleuchtende Optik des Mikroskops" doc. Leitz années 70



Coloration orthochromatique de l'endospore chez Macrolepiota procera, dans le bleu de crésyl

BIBLIOGRAPHIE :

- BAILENGER J.** COPROLOGIE PARASITAIRE ET FONCTIONNELLE Bordeaux Drouillard 1973
373 pages format 27x21,5
- BAILENGER J.** Atlas de travaux pratiques de PARASITOLOGIE HUMAINE Bordeaux 1952
75 pages format 21,5x27,5
- BETTON Gérard** PHOTOGRAPHIE AU MICROSCOPE
Paris De Francia 1969
174 pages format 18x13,5
- BRUMPT E.** TRAVAUX PRATIQUES DE PARASITOLOGIE
Paris Masson 1951
317 pages format 20x13,5
- BRUMPT E.** PRECIS DE PARASITOLOGIE (2 volumes)
Paris Masson 1936
2138 pages format 20,5x15,5
- BULLIARD & CHAMPY** ABREGE d' HISTOLOGIE
Paris Masson 1947
366 pages format 20x14
- CHAMPY Ch.** PRECIS d'HISTOLOGIE GENERALE
Paris Baillière 1947 volume 1
406 pages format 19x13,5
- CHAMPY Ch.** PRECIS d'HISTOLOGIE GENERALE
Paris Baillière 1948 volume 2
406 pages format 19x13,5
- COUJARD & COUJARD** ATLAS de travaux pratiques d'HISTOLOGIE ANIMALE
Paris Vigot 1941
118 pages format 19x27
- DAUFRESNE Alexandre** GUIDE PRATIQUE DE MICROSCOPIE AGRICOLE
- DEFLANDRE G.** MICROSCOPIE PRATIQUE
Paris Lechevalier 1947
441 pages format 16x12
- DOP & GAUTIE** MANUEL DE TECHNIQUE BOTANIQUE, HISTOLOGIE ET MICRO
Paris Lamarre 1930
594 pages format 21,5x15,5
- GANTER & JOLLES** HISTOCHIMIE NORMALE ET PATHOLOGIQUE tome 1
Paris Gauthier Villars 1969
923 pages format 27,5x19,5
- GANTER & JOLLES** HISTOCHIMIE NORMALE ET PATHOLOGIQUE tome 2
Paris Gauthier Villars 1970
1093 pages format 27,5x19,5
- GIROD Paul** MANIPULATIONS DE BOTANIQUE
Paris Baillière 1895
170 pages format 24,5x16,5
- JAHIER J.** TECHNIQUES DE CYTOGENETIQUE VEGETALE
Paris INRA 1992
183 pages format 24,5x16,5
- LANGERON M.** PRECIS DE MICROSCOPIE
Paris Masson 1942
1340 pages format 20x16

- LARPENT-GOURGAUD** MANUEL PRATIQUE DE MICROBIOLOGIE
Paris Hermann 1985
230 pages format 22x15
- LOCQUIN & LANGERON** MANUEL DE MICROSCOPIE
Paris Masson 1978
352 pages format 24,5x18,5
- MAGA Y.A.** 150 exercices d'histologie France
Pradel 2003
78 pages format 18x13,5
- MARSAN Colette** PRECIS DE TECHNIQUES CYTOLOGIQUES
France Bioformation 2006
117 pages format 29,5x21
- MARTOJA & MARTOJA** INTIATION AUX TECHNIQUES de l'HISTOLOGIE ANI-
MALE
Paris Masson 1967
345 pages format 21,5x16,5
- MONTEL Pierre** TOUTE LA PHOTOGRAPHIE
Paris Larousse 1974
365 pages format 23x17
- PERELLI V.** MACROPHOTOGRAPHIE ET MICROPHOTOGRAPHIE
Milan P. Fotografico 1964
531 pages format 20,5x14,5
- POIRIER & RIBADEAU** ATLAS d'HISTOLOGIE (travaux pratiques)
Paris Masson 1979
128 pages format 21x13,5
- POLICARD A.** PRECIS d' HISTOLOGIE PHYSIOLOGIQUE
Paris Doin 1934
895 pages format 21,5x15
- SEGUY Eugène** LE MICROSCOPE, Emploi et Applications, 2 volumes
Paris Lechevalier 1951
1200 pages format 16x12
- SEGUY Eugène** INITIATION à la MICROSCOPIE
Paris Masson 1954
251 pages format 13,5x18,5
- SPERANZA & CALZONI** ATLAS DE LA STRUCTURE DES PLANTES
Paris Belin 2005
224 pages format 24x17
- STREET H.E.** PLANT TISSUE AND CELL CULTURE
London Blackwell 1977
614 pages format 24x16,5
- WASTIAUX Gérard** PRECIS DE MICROSCOPIE
France Bioformation 2006
67 pages format 29,5x21
- WASTIAUX Gérard** LA MICROSCOPIE OPTIQUE MODERNE
France Paris 1994
269 pages format 24x15,5