

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.

- 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

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 ?

à 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, étaier 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 ?