

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.

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 mentionneront pas de marques de fabrication (si vous souhaitez des renseignements plus précis, vous pouvez nous contacter en privé !)

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 prépara-

tions, 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 !

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 glisse 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.

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....