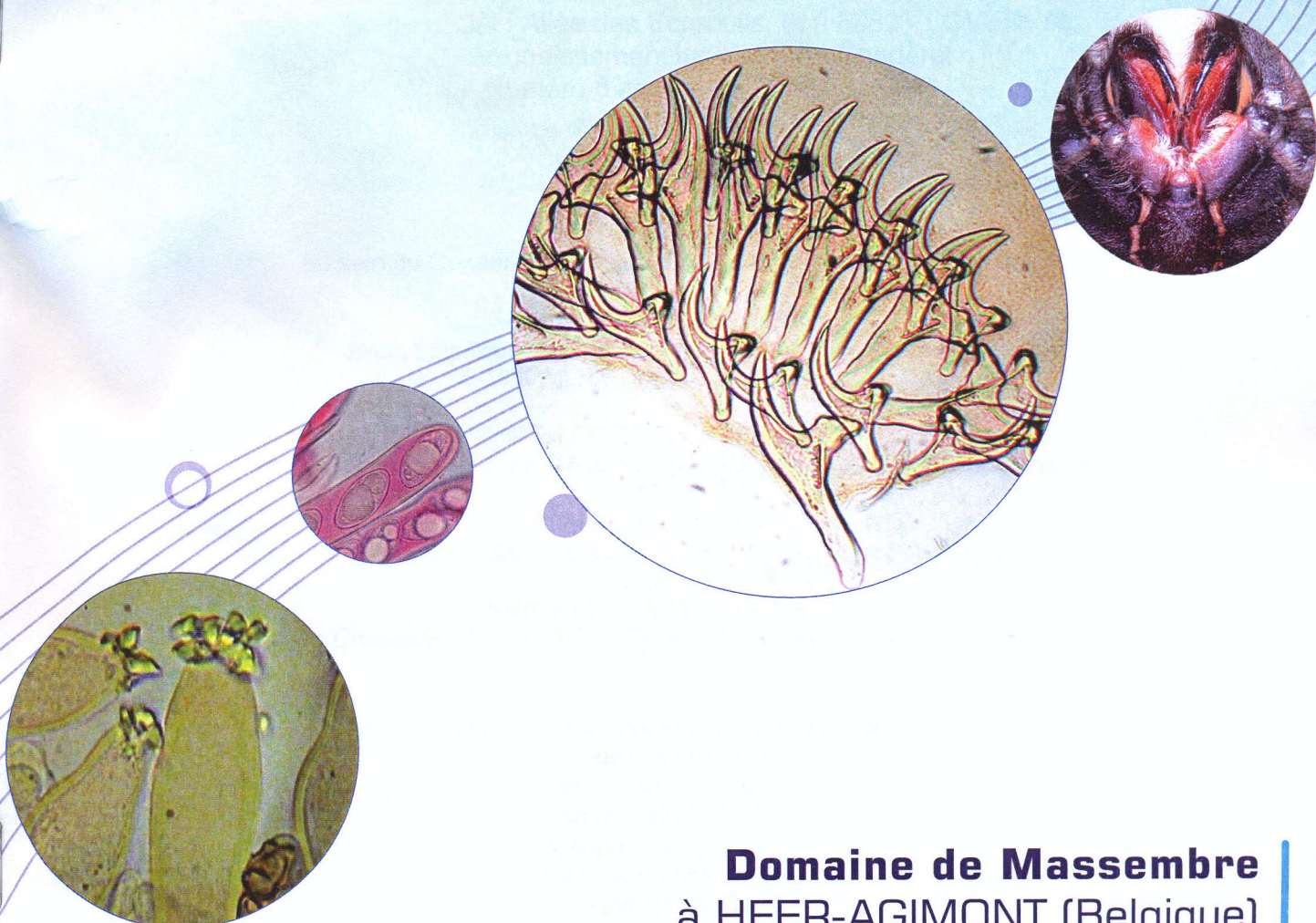


Séminaire de **Microscopie Générale**



Domaine de Massembre
à HEER-AGIMONT (Belgique)

< 24 au 29 mars 2009 >

une organisation de
l'Association des Mycologues
Francophones de Belgique
(A.M.F.B.asbl)

<http://www.amfb.eu>

Photos couverture: M.Lecomte



Association des Mycologues Francophones de Belgique

(A.M.F.B. asbl)

Créée le 13 septembre 2007

Siège social : Allée des Ecureuils, 6, à 6280 - LOVERVAL

Arrondissement judiciaire de Charleroi

Numéro d'entreprise : 892.031.004

<http://www.amfb.eu>

Au sein du Conseil d'Administration, le bureau est composé de :

André FRAITURE, Président

Jardin Botanique National de Belgique, Domaine de Bouchout

B-1860 MEISE fraiture@br.fgov.be

Paul PIROT, vice-président

rue des Peupliers, 10, B-6840 NEUFCHATEAU paul.pirot.mycology@skynet.be

Alfred LOSS, secrétaire

Allée des Ecureuils, 6 - B-6280 LOVERVAL alfred.loss@skynet.be

Marcel LECOMTE, trésorier

Rue Basse Chaussée, 117 B-5022 COGNELEE/NAMUR mlecomte@skynet.be

Les autres membres du conseil d'administration sont :

Jacqueline BERNAUD

Jean-Pierre LEGROS

Camille MERTENS

Joseph PELLICANI

Jean-Marie PIRLOT

Claude QUINTIN

David VALLEE

La cotisation annuelle est à ce jour de 5,00 €.

(12,00 € en cas d'envoi postal)

Nous publions un bulletin annuel.

Je dédie ce travail personnel à notre ami Ruben WALLEYN, qui nous a quitté ce 19 septembre 2008, victime d'une terrible maladie. Il a rejoint le paradis des mycologues où, grâce à son immense connaissance des Lactaires et des Russules, il arbitre peut-être maintenant l'éternel différend entre Blum et Romagnesi.

Nous ne t'oublierons pas, Ruben !

SOMMAIRE :

Pages :

- 1 : préambule
- 2 : photos : *cystides chez Flammulaster ferrugineus* - globules rouges avec noyaux (sang de tortue)
- 3 : Il y a microscope et microscope - le microscope classique en lumière photonique – les oculaires – les objectifs
- 4 : l'ouverture numérique – l'entretien des objectifs – le condenseur (ajustement et centrage)
- 5 : ajustement de l'éclairage de Köhler - photo : globules rouges avec noyaux, sang de grenouille
- 6 : adjonction d'un appareil photo (argentique ou numérique) ou d'une caméra numérique à un microscope – la photographie argentique - la photographie numérique – la caméra numérique
- 8 : photos : grains de pollen de rose trémière (*Althaea rosea*), colorés au vert de méthyle et téléospores de *Puccinia malvacearum* sur *Althaea rosea*
- 9 : photos : puce du chien (*Ctenocephalus canis*) et hypostome de *Ixodes ricinus* (tique du chien, du cerf, du mouton...)
- 10 : le microscope à lumière polarisée – la lumière polarisée
- 12 : photos : *cystides ornées de cristaux chez Inocybe sp.*
- 13 : photos : cristaux de vanilline, observés en polarisation
- 14 : photos : grains d'amidon dans une poire et chez *Solanum sp.* ; grains d'amidon dans une banane
- 15 : le microscope à contraste de phase – principe - mécanisme
- 16 : ajustement des anneaux de phase - photo : asques, ascospores et paraphyses, observés en contraste de phase, chez *Ascocoryne cylichnium*
- 17 : des systèmes de contraste encore plus élaborés : le contraste interférentiel de Nomarski, le contraste Varel, l'éclairage en fond noir
- 18 : photos : *Trypanosoma gambiense* (protozoaire responsable de la maladie du sommeil) vu en fond clair classique et en DIC
- 19 : photo : *Zignema sp.* (algue) photographiée avec un condenseur à fond noir
- 20 : le Plasdic - photo : spores de *Trichophaeopsis paludosa var. tuberculata*
- 21 : le microscope à fluorescence
- 22 : photo : fluorescence endogène de la lignine sur peuplier
- 23 : quel microscope choisir ? – la partie mécanique
- 24 : notre maître achat raisonnable
- 25 : les constituants du microscope - mécanique et optique - oculaires et objectifs
- 26 : la partie optique
- 27 : modus operandi pour la réalisation d'une observation type au microscope photonique à fond clair
- 28 : microscope et premiers accessoires : lames PO et CO – stockage et nettoyage
- 29 : huile à immersion – photo : observation d'une larve de moustique, montage au PVALPh
- 30 : nettoyage des oculaires et des objectifs - la 1^{ère} observation
- 31 : protocole de préparation pour une observation microscopique en mycologie : observation dans l'eau et coloration
- 32 : améliorer la lisibilité et la dissociation – photo : comparaison entre une préparation non lavée et une préparation lavée
- 33 : utilisation du microscope et de réactifs chimiques pour l'étude des champignons techniques d'observation
- 34 : un peu de vocabulaire micro-mycologique ; photo : charançon *sp.*, in vivo
- 35 : les préparations microscopiques par dissociation (Didier Baar) – principes de la dissociation - observation de matériel frais
- 36 : observation de matériel desséché
- 37 : préparation des réactifs : le rouge Congo ammoniacal – le mélange de Cendrier
- 38 : photos : cheilocystides de *Conocybe apalax* – spores de *Rhizocarpon petraeum*
- 39 : les coupes en microscopie : un problème évident et peu facile à solutionner – les coupes à main levée

- 40 : le microtome de Ranvier – le microtome de Génat
- 41 : les petits microtomes de laboratoire - les microtomes pour grands laboratoires spécialisés
- 42 : la coloration des coupes : limites et réalités (généralités) – les différents types de colorations
- 43 : photo : *Saccharomyces cerevisiae*
- 44 : la coloration régressive (généralités) – photos : *Anthodiscus floreatus*, diatomée marine fossile
- 45 : photos de diverses spores de champignons
- 46 : technique complète de préparation d'une coupe à destination définitive - photos : drosophiles sp., mâle et femelles
- 47 : généralités relatives à la fixation - fixateurs coagulants simples
- 48 : fixateurs non coagulants simples - les mélanges fixateurs
- 49 : passons de la théorie à la pratique : étude du contenu cellulaire - étude des parois cellulaires
- 50 : photo : coupe transversale dans tige d'*Equisetum arvense*
- 51 : généralités relatives à l'inclusion – l'inclusion à la paraffine
- 52 : l'inclusion au PEG (polyéthylène glycol)
- 53 : photos : les blocs de PEG et le positionnement sur le support de coupe
- 54 : photos : Le microtome en action : les rubans se forment sur la lame, sont recueillis sur la main ou une feuille de papier ; on voit nettement la coupe au centre de la paraffine
- 55 : généralités relatives à la coloration - les liquides de ramollissement – les réactifs-colorants les colorants proprement dits
- 58 : le collage des spores et des coupes : la solution à beaucoup de problèmes de coloration réalisation d'un frottis de spores
- 59 : les coupes : collage pour coloration - photo : spores de *Xylaria hypoxylon* (frottis)
- 60 : les milieux d'observation à utiliser pour l'examen d'une préparation microscopique – l'indice de réfraction
- 61 : quelques indices de réfraction intéressants – photo : *Mycogone rosea*
- 62 : les types de préparations : les préparations ponctuelles – les préparations semi-définitives
- 63 : les préparations définitives
- 64 : photo : asques et ascospores de *Hydnoria tulasnei*, Ascomycète, Tuberaceae
- 65 : A propos du PVA, de son utilisation, de ses limites et du montage des Arthropodes utilisation pour l'inclusion
- 66 : utilisation pour la conservation définitive – la coloration
- 68 : photo : *Ixodes ricinus* (tique), face ventrale
- 70 : photos : différentes tiques et puces
- 71 : la conservation du matériel frais
- 72 : liste des conservateurs les plus usités
- 73 : photos : détails anatomique de la mouche du vinaigre (*Drosophila sp.*)
- 74 : le traitement des exsiccata – photo : microscopie de *Galerina pumila*, avec spores et cystides
- 76 : photo : aile de mouche domestique, traitée au chloral-phénol de Murray
- 77 : les milieux de culture – photo : culture d'*Aspergillus sp.* sur milieu de Sabouraud
- 78 : photo : culture de *Penicillium sp.* sur milieu mixte gélose-agar
- 79 : photo : culture de *Penicillium sp.* sur malt-agar
- 80 : les moisissures (généralités) – photo : colonies de moisissures sur des supports naturels divers
- 81 : photos : *Penicillium sp.* sur coloquinte - *Trichoderma sp.* sur milieu de Sabouraud
- 82 : les facteurs environnementaux - photo : colonie d'*Aspergillus sp.* sur milieu de Sabouraud + chloramphénicol
- 83 : photo : colonie de *Penicillium sp.* sur milieu de Sabouraud + chloramphénicol (ensemencement au départ d'une orange infectée, et colonie développée en 24 h avec incubation à 25° C)
- 84 : tableau de distribution entre espèces et supports divers - les *Aspergillus*
- 85 : les *Penicillium*
- 86 : les moisissures (microscopie) – préparation de lames - photo : *Gliocladium album*
- 87 : la culture sur lames - photo : conidies et conidiophore - technique de culture sur lame PO
- 88 : les milieux de montage - photo : conidiophore et conidies de *Mucor sp.*
- 89 : photo : conidies d'une moisissure non identifiée, colonisant un champignon
- 90 : les techniques de stress pour les cultures – photo : conidiophore d'un *Aspergillus*, disséminant son contenu
- 91 : préparations définitives de pollens de référence – photo : grain de pollen de *Althaea rosea*
- 92 : mode opératoire de préparation au baume du Canada - photo : détail d'un grain de pollen de *Centaurea montana*
- 93 : photos : grains de pollen de *Pinus sp.*
- 94 : mode opératoire de montage à la glycérine gélatinée - photo : grains de pollen de *Chicorium intybus*
- 95 : photos : cellules d'épiderme d'oignon – coupe transversale dans une chenille mineuse des agrumes
- 96 : applications de la microscopie optique dans l'étude des plantes – technique de préparation

- du matériel biologique en vue d'une observation – photo : coupe transversale dans une tige de *Fraxinus sp*
- 97 : observations de type anatomique ou histologique
- 98 : protocole pour coupes à main levée – photo : coupe transversale dans une tige de *Vitis vinifera*
- 100 : à propos du marquage des objectifs Leitz (Frédéric Bret) – photo : poil de *Hedera helix*
- 101 : photos : belle réaction au Lugol de la zone operculaire chez une pézize.
- 102 : microscope, flash et APN ; balance des blancs
- 104 : résultat final des manipulations
- 105 : des logiciels disponibles en freeware et d'une utilité certaine pour vos travaux divers
PDF Creator – PDF Split & Merge – Photo to Sketch – Micro Cartouche – Combine ZM Redim
- 106 : Piximètre – Power Point Image Extractor – XNView – Skype - photo : zygote de *Sporodinia grandis* (Mucoracée parasite des champignons pourrissants) après mise en culture d'une moisissure trouvée sur *Pleurotus ostreatus*
- 107 : j'aurais voulu vous en parler aussi Photos :
- Les Fougères
 - Les Diatomées
 - La division cellulaire
 - Les tissus animaux (ici, cellules épithéliales de la bouche humaine)
 - Les lichens (ici, *Parmelia conspersa*)
 - Les Algues (ici, *Nostoc sp.*)
 - Les coupes histologiques animales (ici, tête de poisson)
 - Les *Volvox* (algues vivant en colonies)
 - Les Spirogyres (algues avec double réseau hélicoïdal de chloroplastes)
 - Les Acariens parasites des Insectes (ici, d'un bourdon)
 - Les Paramécies (protozoaires Infusoires, à marge frangée de cils)
 - Les Radiolaires (protozoaires à squelette siliceux)
- 109 : bibliographie

Conventions :

- 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, il faut comprendre qu'elles ont été réalisées par M. Lecomte.
- tous les textes non signés sont de Marcel 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 ½ ou au ¼ de mm se confond dans l'uniformité de l'indistinct. L'homme a raisonnablement pressenti cet univers et a cherché durant longtemps à le pénétrer, 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 autodidacte, il n'avait pas de diplôme sinon celui de l'école primaire, mais possédait un sens de l'observation du détail infaillible 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. Maintenant seulement, je me rends compte de la valeur de ce cadeau car mes parents vivaient de manière très modeste, en milieu ouvrier, et cet achat a dû générer pour eux beaucoup de sacrifices et de privations. 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.

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, car des espèces très proches se différencient quasi uniquement par des caractères microscopiques.

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 (si pas les 2/3) 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 révoluer à 5 objectifs plans infinis, apte à satisfaire des exigences élevées, coûte 1.250,00 €) ; un microscope de laboratoire et de recherche, modèle de base portant un label prestigieux, coûte entre 3.500 et 5.000,00 €, selon la marque choisie et les accessoires fournis. Pour des modèles haut de gamme, il n'y a pas de limite de prix... 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 (si on connaît la bonne « filière ») 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.

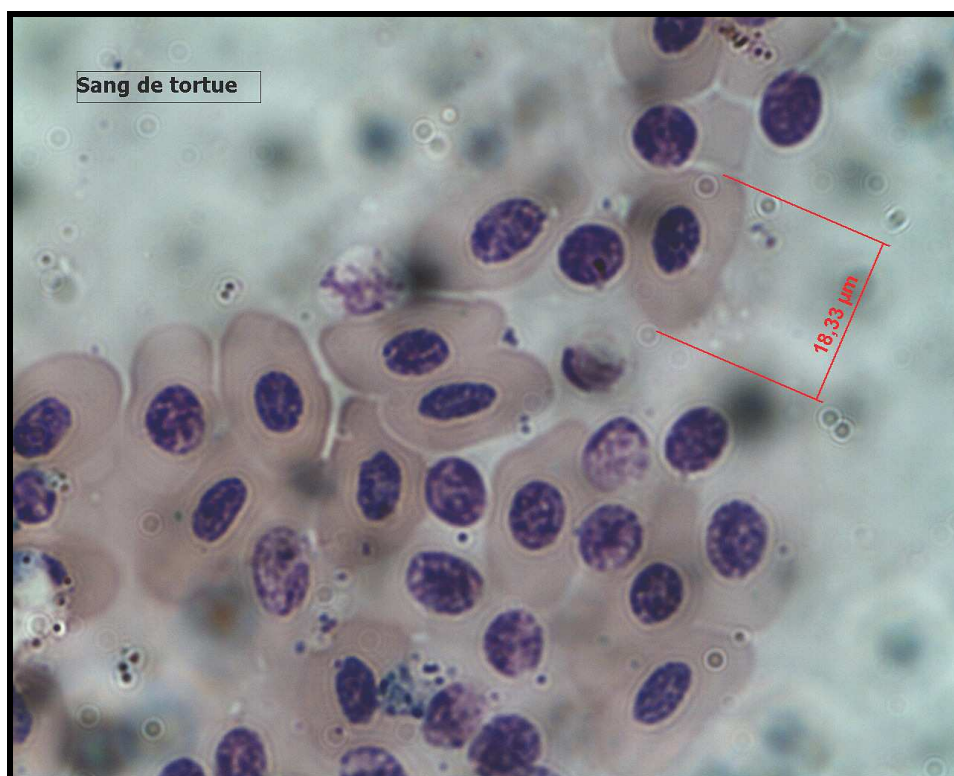
Notre objectif unique et primordial, au travers des pages suivantes, est de vous aider à progresser, en vous faisant partager notre modeste expérience. Nous avons tenté d'effectuer un

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 ont contribué à mes progrès en microscopie, et à Jean LACHAPPELLE (†) pour l'aide apportée dans nos recherches communes.



Flammulaster ferrugineus, photo Daniel Ghyselinck,



Globules rouges avec noyaux (sang de tortue) – x 50 - photo M. Lecomte

Il y a « microscope » et « microscope »

par Marcel LECOMTE

Ce texte informatif est une compilation de divers articles qui sont en consultation libre sur Internet, agrémentés de considérations personnelles.

LE MICROSCOPE CLASSIQUE EN LUMIERE PHOTONIQUE

Rappel de notions de base.

Le grossissement total du microscope est le produit du grossissement de l'objectif multiplié par le grossissement de l'oculaire. Ainsi, un objectif 40x et un oculaire 10x fournissent un grossissement total de 400x.

Cela n'est plus valable lorsqu'on fait intervenir un appareil photo, numérique ou non, sans lentille de compensation ; on obtient alors des grossissements supérieurs peu faciles à quantifier. Il en est de même avec une caméra.

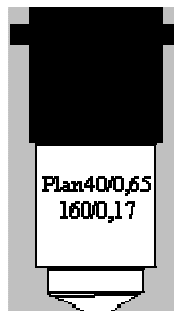
Les oculaires

Il y a plusieurs types d'oculaires qui se distinguent par le degré de correction chromatique, le grossissement et la distance pupillaire. L'oculaire le plus courant est le 10x de type C. Ce type d'oculaire est utilisé avec les objectifs achromatiques. Les oculaires sont aussi disponibles avec d'autres grossissements : 6x, 8x, 12, 5x, 15x, 16x et 20x. Certains oculaires sont construits pour permettre l'examen avec des verres correcteurs. La distance pupillaire, c'est-à-dire la distance à tenir entre la lentille de l'oculaire et la pupille, est plus grande. Ces oculaires sont désagréables pour celui qui ne porte pas de verres correcteurs car la position correcte est difficile à repérer. Une solution à ce problème consiste à placer des bonnettes qui permettent de s'ajuster facilement à la bonne distance de la lentille et de couper la lumière latérale.

Une autre caractéristique des oculaires est le coefficient de champ. Ce coefficient détermine le diamètre du champ observé. Ainsi, un objectif 10x et un oculaire avec un coefficient de champ de 16 donne un champ de 1,6 mm de diamètre (1.600 m μ) ce qui représente une surface d'environ 2 mm². Le diamètre du champ se calcule en divisant le coefficient de champ par le grossissement de l'objectif.

Les objectifs

Les objectifs classiques et courants ont pour l'instant un standard de longueur fixé à 45 mm. Sur chaque objectif, on retrouve des inscriptions qui le décrivent. Voir à ce sujet un article complet à la fin de ce fascicule).



Par exemple, le mot « plan » décrit les qualités optiques de cet objectif.

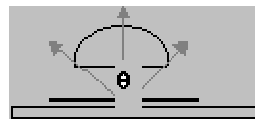
Celui-ci est plan achromatique, c'est-à-dire achromatique (il est corrigé pour le rouge et le bleu **) avec planéité de l'image. Les nombres 40/0,65 indiquent le grossissement « 40x » et l'ouverture numérique « 0,65 ». Le nombre « 160 » donne la longueur du tube du microscope et « 0,17 » est l'épaisseur des lames couvre-objet prévues pour cet objectif. Les objectifs à immersion ont un anneau coloré près de la lentille frontale. La couleur de cet anneau indique le type de liquide à immersion à utiliser. Un cercle noir est pour l'huile tandis que l'anneau orange est pour la glycérine.

(**) : l'aberration chromatique est inhérente à tout système optique ; en effet, le trajet des rayons dans le verre des lentilles est différent selon la longueur d'onde de la lumière utili-

sée ; en lumière blanche, plusieurs images de couleurs différentes seront formées sur des plans différents.

Cela explique que des images observées au travers d'un objectif de qualité médiocre paraissent entourées de plusieurs halos colorés, qui ne correspondent à aucune réalité. Pour améliorer les performances du matériel, les constructeurs utilisent notamment la fluorine plutôt que le verre, pour des objectifs de haute qualité.

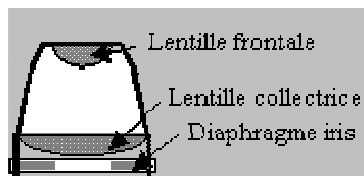
L'ouverture numérique



Pour les férus de mathématiques, l'ouverture numérique d'un objectif est le produit de l'indice de réfraction du milieu entre la lentille frontale et la lamelle par le sinus de la moitié de l'angle d'ouverture. Le grossissement maximum avec une image bien nette peut difficilement dépasser 500 fois l'ouverture numérique. Au-delà de cette limite, on peut voir apparaître des artefacts créés par des images de diffraction. L'air possède un indice de 1,00, tandis que l'huile à immersion affiche un indice de 1,515 ; l'huile permet donc des grossissements 1,5 fois plus grands.

L'entretien des objectifs

La principale manifestation d'un objectif sale ou rayé est une diminution de la netteté de l'image. Dans ces conditions, le champ microscopique est vu avec une impression de brouillard. Il existe



dans le commerce des solutions spécialement conçues pour le nettoyage des objectifs. Nous reparlerons dans un autre chapitre de cette problématique. Il faut cependant essuyer rapidement et complètement le liquide de nettoyage car, ces solutions peuvent à la longue endommager le ciment qui retient la lentille frontale. Certains utilisent un mélange éthanol/éther (50/50) qui a l'avantage de sécher très rapidement. Les rayures de la lentille frontale sont sans solution autre que le remplacement. Une cause fréquente et souvent ignorée de rayure est le frottement de la lentille sur le levier du porte-lame (celui-ci est en général plus épais que la lame). Il faut donc éviter de travailler aux limites du déplacement.

Le condensateur (ou condenseur)

La fonction du condensateur est de concentrer la lumière sur l'objet.

Le champ éclairé par le condensateur doit être uniforme. La position normale du condensateur est presque complètement en haut avec la lentille frontale du condensateur très près de la lame. Nous verrons comment ajuster le condensateur à sa position optimale. Certains condensateurs possèdent une lentille frontale escamotable (lentille de Barlow), destinée à multiplier artificiellement la distance focale. Cette particularité est utile pour l'examen à faible grossissement et l'utilisation d'objectifs à très faible grossissement. Basculer la lentille frontale permet un éclairage plus uniforme aux 2,5x et 10x.

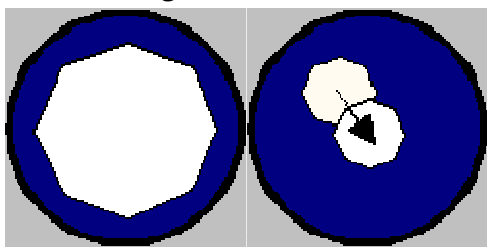
Dans chaque condensateur il y a un diaphragme. Le rôle de ce diaphragme est de sélectionner les rayons lumineux qui vont passer au centre de la lentille collectrice. L'iris du condensateur ne sert pas à ajuster la luminosité ; on se sert du rhéostat de la lampe pour cet ajustement. La fermeture de l'iris augmente la profondeur de champ et le contraste mais diminue la résolution et la luminosité. Un iris trop fermé peut aussi donner des images fantômes.

Les condensateurs classiques ont un n de 1,25 correspondant à celui de l'objectif classique 100x à immersion. Si on veut équiper un microscope avec des objectifs planapochromatiques de très haute qualité, dont le n est de l'ordre de 1,32 à 1,40, il faut également utiliser un condensateur adapté.

Ajustement de l'iris du condensateur

L'iris du condensateur est idéalement positionné lorsqu'il est ouvert de 70 à 80% de l'ouverture numérique de l'objectif. Cet ajustement se fait en retirant l'oculaire et en regardant par le tube le diamètre du champ qui est éclairé.

Le centrage du condensateur



Cette opération se réalise en cinq étapes:

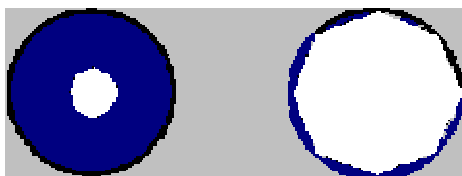
- Enlever le filtre diffuseur (s'il existe)
- Placer une lame sur le microscope et faire la mise au point.
- Fermer complètement le diaphragme de champ.
- Centrer à l'aide des vis de centrage.
- Replacer le filtre diffuseur.

Ajustement de l'éclairage de Köhler.

La zone éclairée par le diaphragme de champ doit correspondre au champ observé. Une zone éclairée plus grande que le champ observé provoque une diminution du contraste.

Cette opération se fait en plusieurs étapes:

- Enlever le filtre diffuseur.
- Placer une lame sur le microscope et faire la mise au point.
- Fermer complètement le diaphragme de champ.
- Descendre ou monter le condensateur pour que l'image de l'hexagone soit nette.
- Centrer si nécessaire à l'aide des vis de centrage.
- Ouvrir le diaphragme de champ pour que les sommets du polygone touchent à la limite du champ.
- Replacer le filtre diffuseur.



Lorsqu'on prospecte différents constructeurs afin de faire l'acquisition d'un microscope, il est important de demander s'il est possible d'adapter par la suite un contraste de phase sur le modèle choisi, car ce n'est pas fréquemment le cas. En effet, il est très possible d'acheter par la suite un kit complet de phase qui comprend en général 4 objectifs, un condensateur et un oculaire d'ajustement. (Voir le chapitre consacré à ce sujet).

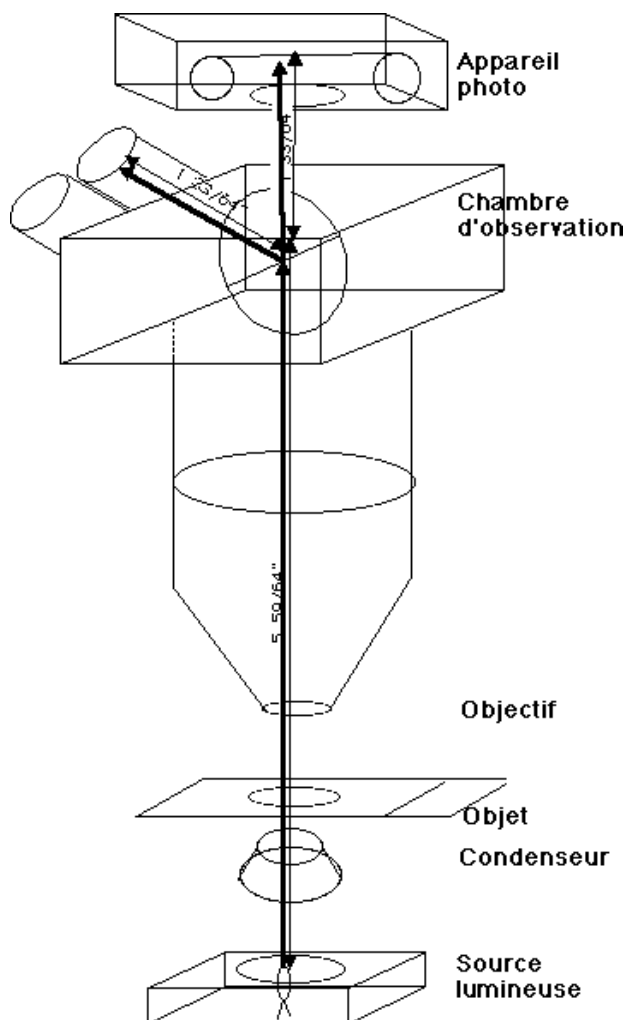


Globules rouges avec noyaux, sang de grenouille – x 63 - photo M. Lecomte

ADJONCTION d'un APPAREIL PHOTO (argentique ou numérique) ou d'une caméra numérique, à un MICROSCOPE

1. La photographie argentique

L'appareil photo est situé dans le prolongement du tube du microscope de telle façon que la mise au point faite avec les oculaires coïncide avec le plan du film ou du capteur. Un miroir dichroïque



permet de voir le champ qui va être photographié. Les conditions idéales sont évidemment réunies si on dispose d'une tête trinoculaire, avec un tube photo dans le prolongement du tube du microscope.

Photos papier noir et blanc : un filtre vert est préconisé et la sensibilité de l'émulsion doit être choisie en fonction des besoins.

Photos couleur : Un filtre bleu est préconisé pour les diapositives afin de compenser la dominante orangée. Un filtre rose est utile pour les tirages papier qui n'ont pas la même émulsion.

Photos en fluorescence : la faible intensité du rayonnement et sa décroissance (phénomène de fading) exigent en photographie classique l'utilisation d'émulsions très sensibles, et de jouer sur les temps de pose et sur le développement.

Il faut bien admettre que les résultats du travail en argentique (papier ou dias) ne sont pas très encourageants et coûtent une fortune, ce qui fait que les utilisateurs actuels de cette technique se comptent sur les doigts d'une main.

Une remarque importante, quelle que soit la technique utilisée : c'est une ineptie de faire figurer sur une photo le réticule du micromètre si on n'y joint

pas la correction à appliquer, générée par l'utilisation d'un zoom et par les lentilles de l'appareil photo. Les indications ne sont exactes (en microns) qu'avec un oculaire 10x, un objectif 100x, par vision au travers des oculaires et après vérification avec une lame étalon spécialement prévue à cet effet. Cela déterminera éventuellement l'application d'un coefficient de correction à toutes les mesures.

1. Une révolution : la photographie numérique : c'est le présent (presque passé déjà) de la photo microscopique.

Deux pistes se dessinent :

- **des appareils compacts (APN)** : les moins coûteux, les moins encombrants et peut-être ceux qui donnent les meilleurs résultats en microscopie (nous pensons notamment à la série des Coolpix 900, 950, 995 et 4500 de Nikon) ; ils ont permis aux passionnés de déployer des trésors d'ingéniosité pour effectuer la liaison entre l'APN et le microscope ; la petitesse de la fenêtre d'observation nous a vite obligés à envisager des systèmes permettant d'observer l'image en direct sur un écran de télévision (en utilisant le canal vi-

déo) ou sur un écran d'ordinateur (en utilisant des boîtiers de connexion télévision) par le biais d'un port USB.

- o Un immense avantage : on peut utiliser des APN (appareils photos numériques) en les adaptant directement sur un des deux oculaires, ce qui rassure les possesseurs de microscopes non trinoculaires.
- **des appareils reflex numériques** : beaucoup plus coûteux et plus encombrants, ils permettent de réaliser de merveilleuses photos de terrain ; par contre, leur utilisation pour la photo de microscopie se révèle beaucoup plus aléatoire. Cela nécessite l'utilisation impérative d'un microscope trinoculaire et d'un adaptateur qui coûte plusieurs centaines d'€, qu'il est impossible de remplacer par du bricolage. À l'usage, il apparaît que les capteurs ont une très grande propension à fixer de minuscules grains de poussière qui apparaissent tôt ou tard sur les photos ; leur nettoyage doit quasi se faire en chambre stérile, même si sur les modèles les plus récents, on trouve maintenant un système automatique de nettoyage. Le risque d'empoussièrement est très élevé lors des manipulations de montage et démontage, lorsque le boîtier est utilisé avec différents types d'objectifs. Cela dit, ce sont des merveilles de technologie.

La très grande sensibilité des capteurs permet de travailler dans des conditions de lumière moins bonnes, voire mauvaises ; mais surtout, on obtient un résultat instantané et on dispose de la possibilité de réaliser un nombre illimité de prises de vues gratuites.

En fluorescence, les APN nous facilitent grandement la vie, car le signal est relativement faible et aucune pellicule argentique ne nous donnera satisfaction. Pour les signaux encore plus faibles, l'acquisition se fait avec des caméras CCD spéciales, réfrigérées, et l'image obtenue est traitée électroniquement afin d'intensifier les couleurs et les contrastes. Les résultats obtenus sont très bons.

3. Un nouveau bouleversement : la caméra numérique, spéciale microscopie

Elle est en train de révolutionner le monde de l'imagerie microscopique. En effet, l'image est perçue directement sur l'écran d'un ordinateur, et en temps réel. Cela permet de parcourir toute une préparation avec un confort d'observation inégalé, qui peut être partagé avec toute une assemblée. La caméra fonctionne en prise continue, et lorsqu'une image est intéressante, il suffit de la fixer avec un programme de capture.

Deux pistes sont exploitées :

- **les caméras de surveillance, à capteur CCD** : Serge Prévost nous a fait découvrir il y a 3 ans, un matériel très intéressant qui permet de réaliser des photos de spores de champignons assez époustouflantes ; cela a nécessité beaucoup d'ingéniosité et d'imagination pour arriver à faire fonctionner le tout. Un avantage : le coût peu élevé de l'ensemble ... si on a de la patience ! Des constructeurs, depuis, ont conçu des caméras CCD spéciales pour la microscopie.
- **les caméras numériques spécialement conçues pour la microscopie, à capteur CMOS en général (le CCD est de moins en moins fabriqué)** : ce sont de véritables merveilles qui génèrent des résultats impressionnants. Même si elles se révèlent encore assez coûteuses pour l'instant, leur utilisation de plus en plus fréquente dans les facultés et dans les laboratoires fait que les prix deviennent accessibles pour des amateurs. Elles se connectent directement sur l'ordinateur par l'intermédiaire d'un port USB, nécessitent un logiciel d'installation et sont gérées par un programme fourni par le fabricant. Ce logiciel est accompagné la plupart du temps par un second logiciel qui permet d'insérer directement dans l'image diverses indications, comme le nom de l'opérateur, la date, l'heure, le sujet de la photo. En outre, il existe la possibilité, moyennant quelques paramétrages et calibrages de base, d'indiquer directement les mesures du sujet en microns, par un simple mouvement de souris.

La gamme proposée va depuis la petite caméra d'oculaire de 1,5 millions de pixels, coûtant un peu plus de 300,00 € à la caméra de 20 millions de pixels coûtant 3 à 4.000,00 €

4. La cerise sur le gâteau :

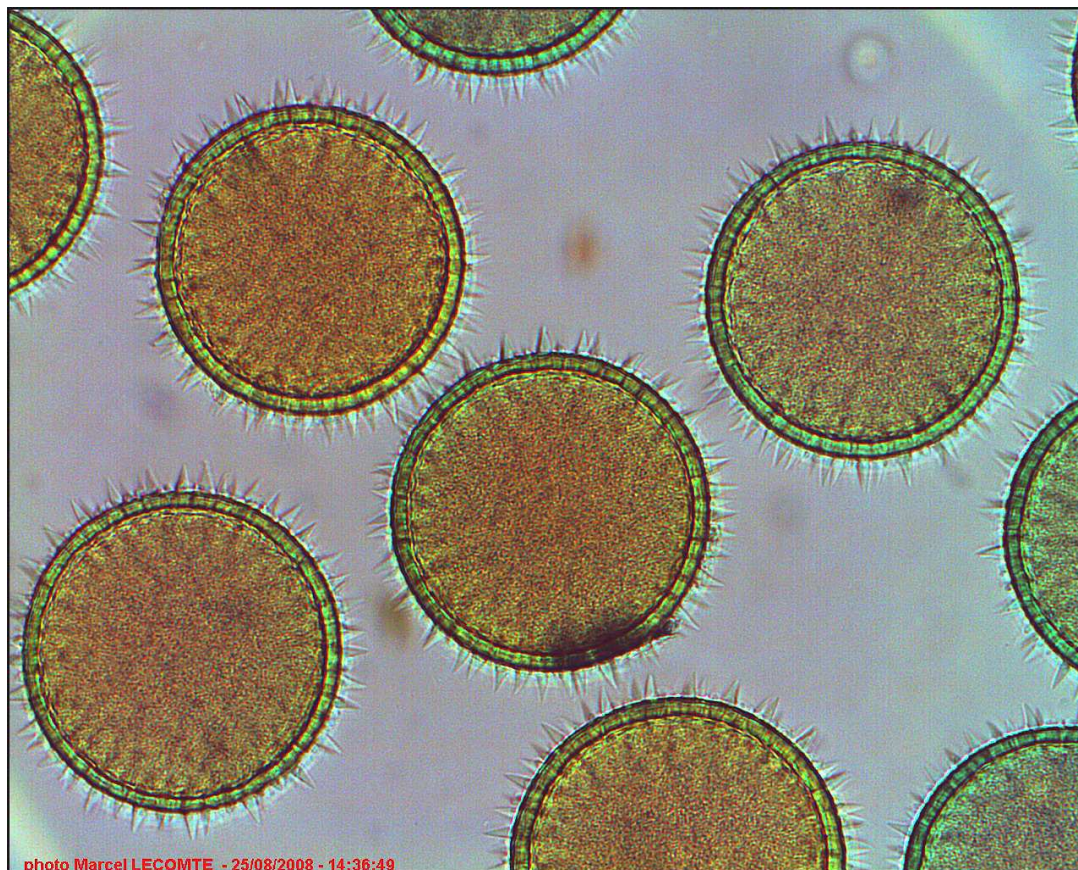
En parallèle à la naissance des images numériques, des logiciels de traitement d'image ont vu le jour, les plus connus étant Photoshop et ACDSee (payants), XnView (gratuit) ... et d'autres. Ils permettent nombre de manipulations au niveau de la photo, concernant la brillance, le contraste, le gamma, les dominantes de couleurs, la saturation, l'amélioration de la netteté ... et divers para-

mètres. Tout cela contribue à réparer des erreurs de manipulation, avec un résultat parfois impressionnant. L'outil de rognage permet en outre de recadrer parfaitement le sujet et d'éliminer les plages ou éléments parasites.

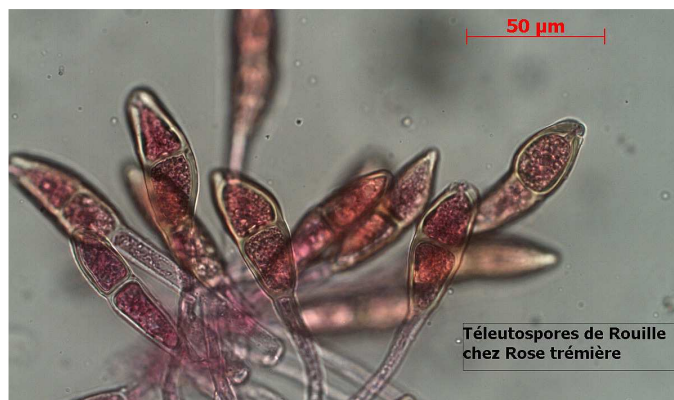
Comme si cela ne suffisait pas, des programmes de superposition d'image se sont développés ; les plus connus sont COMBINE ZM et HELICON FOCUS. Nous savons tous que le gros problème de la microscopie avec des grossissements importants est la maîtrise de la profondeur de champ, et l'impossibilité au grossissement 630 ou 1000x de voir nettement l'entière d'une spore qui fait 10 μm de diamètre.

Qu'à cela tienne ! Il suffit de prendre une série de 5 clichés espacés chacun d'une mise au point de 2 μm , avec la vis micrométrique ... et de laisser faire le programme ; en quelques secondes, il superpose les 5 images et on obtient une spore nette du haut en bas. Miracle de technologie !

Ce genre d'intervention n'est possible qu'avec une caméra et s'avère quasi irréalisable avec un APN, sinon avec un déclencheur à distance (à cause des vibrations).



Grains de pollen de rose trémière (*Althaea rosea*), colorés au vert de méthyle – objectif 40 x - photo M. Lecomte, caméra Deltapix Infinity



Téleutospores de *Puccinia malvacearum* sur *Althaea rosea* – x 25 - photo M. Lecomte



Puce du chien (*Ctenocephalus canis*) – x 25 - photo M. Lecomte, caméra MDCE5A



Hypostome de *Ixodes ricinus* (tique du chien, du cerf, du mouton...) – x 8 - photo M. Lecomte, caméra MDCE5A

LE MICROSCOPE à LUMIERE POLARISEE

Le microscope polarisant, ou microscope polariseur analyseur, est un microscope optique muni de deux filtres polarisants, appelés polariseur et analyseur. Il était utilisé au départ en pétrographie pour l'observation et l'identification des minéraux dans les roches. Le principe de fonctionnement repose sur l'utilisation d'un faisceau de lumière polarisée (par le polariseur). L'échantillon de roche à observer est préparé afin d'obtenir une lame mince, c'est-à-dire que la roche est coupée en un fin bloc collé sur une lame de verre, l'ensemble étant aminci par polissage jusqu'à une épaisseur de 30 $m\mu$ environ.

Il a été « récupéré » par les mycologues, botanistes, entomologistes et biologistes en général.

L'observation des cristaux d'acide oxalique sur les cystides couronnées d'un *Inocybe* constitue un spectacle fabuleux : la préparation brille de mille feux comme la voûte céleste par une nuit sans nuages.

La lumière polarisée

Un rayon lumineux d'une lampe halogène est constitué d'une infinité d'ondes. Chacune de ces ondes est caractérisée par une direction de propagation et une vibration, de longueur d'onde λ , perpendiculaire à la direction. Normalement la vibration des ondes se fait dans toutes les directions avec égale intensité de sorte que la lumière est dite non polarisée.

Certaines substances, douées d'une propriété qu'on appelle « dichroïsme », sont capables de favoriser un plan de vibration de sorte que les ondes de la lumière émergente vibrent toutes dans le même plan. On dit alors que cette lumière est polarisée. La sélection des ondes dans un polariseur se fait en éliminant celles qui vibrent dans la mauvaise direction, par réflexion, réfraction, transmission, dispersion.

Il y a plusieurs façons d'obtenir une source de lumière polarisée. La façon la plus simple et économique est d'utiliser un filtre polaroïd. Celui-ci est formé de molécules toutes orientées dans la même direction et figées dans une matrice plastique. Ce polaroïd est disponible en feuille que l'on peut découper à la taille et à la forme voulue, et également sous forme de filtres circulaires chez les photographes.

Un polariseur laisse passer seulement la lumière qui vibre dans une direction donc, tous les rayons émergents vibrent dans le même plan. Si on place dans le chemin du rayon polarisé un deuxième filtre polarisant qu'on tourne pour que son plan de vibration soit orienté à 90° par rapport au premier, il n'y aura pas de lumière émergente du deuxième filtre. On dit alors que les filtres sont en situation croisée. Dans cet arrangement le premier filtre est le filtre polariseur et le deuxième est appelé l'analyseur.

Certaines substances comme les sucres sont capables de faire tourner le plan de la lumière polarisée. Si on place une solution de sucre entre les filtres croisés d'un polarimètre, on devra tourner l'analyseur d'un certain angle soit à droite (dextrogyre), soit à gauche (lévogyre) pour obtenir de nouveau l'extinction de la lumière.

La microscopie en lumière polarisée

Pour faire de la microscopie en lumière polarisée, il faut donc deux filtres polariseurs. Le premier filtre est placé dans la tête du microscope et le deuxième est placé avant le condensateur soit dans le porte-filtre ou sur l'ouverture de la lampe (cela permet d'utiliser des objectifs classiques). Ce dernier filtre est tourné pour obtenir l'extinction complète de la lumière. Cette configuration permet ainsi l'examen d'éléments capables d'influencer le plan de la lumière polarisée les rendant ainsi visibles dans un fond noir. Les deux filtres peuvent être placés sous le condensateur, mais alors, il faut utiliser un objectif spécialement conçu pour la polarisation.

Biréfringence

Un rayon lumineux qui passe d'une phase à une autre avec un certain angle par rapport à la normale subit une déviation appelée réfraction. Avec un corps transparent, on peut décrire une propriété physique appelée indice de réfraction. L'indice de réfraction est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et la vitesse de la lumière dans l'objet. Pour l'air, ce rapport est très proche de 1,00 tandis que l'eau à un indice de 1,333. L'indice de réfraction d'une solution aqueuse varie avec la densité.

Dans un corps isotrope, l'indice de réfraction est unique quel que soit la direction ; mais avec certaines substances dites anisotropes, l'indice de réfraction n'est pas le même dans toutes les di-

rections. Plusieurs cristaux sont anisotropes c'est-à-dire biréfringents. La manifestation la plus évidente de la double réfringence est le dédoublement d'une image vue au travers un cristal de calcite. Les deux rayons qui sortent d'un corps anisotrope sont appelés le rayon ordinaire et le rayon extraordinaire. Les rayons ordinaire et extraordinaire sont polarisés avec un plan de polarisation qui est normalement à 90° l'un par rapport à l'autre. Entre des polariseurs croisés, le cristal biréfringent est visible.

Utilité

L'examen microscopique en lumière polarisée est une nécessité par exemple pour l'identification des corps ovalaires gras. Ceux-ci contiennent des gouttelettes de gras renfermant des cristaux liquides de cholestérol qui prennent une apparence de croix de Malte en lumière polarisée.

La polarisation peut être aussi utile pour identifier certains cristaux. La biréfringence, forte ou faible avec ou sans dispersion chromatique, est une aide supplémentaire à l'identification.

Il est possible de mesurer l'indice de réfraction d'un cristal avec la lumière polarisée. Les mesures se font en utilisant un filtre jaune proche de la raie D du sodium. Lorsqu'un cristal isotrope est placé dans un milieu qui a un indice de réfraction différent, il se forme autour du cristal un halo appelé ligne de Becke. Lorsqu'on descend l'objectif, ce halo converge vers le cristal si l'indice de réfraction de celui-ci est inférieur au milieu. À l'inverse, si le cristal a un indice supérieur au milieu, le halo s'éloigne du cristal. Il existe des kits de milieu qui offrent un éventail d'indices de réfraction qui s'échelonnent de 1,40 à 2,00. Lorsque le milieu a le même indice que le cristal, celui-ci perd l'effet de halo et devient peu visible. Dans la plupart des minéraux, suivant la direction de polarisation, la lumière n'aura pas la même vitesse.

Lorsqu'un rayon lumineux pénètre dans un cristal, il se dédouble en deux rayons de polarisation différente qui se propagent avec une vitesse différente, c'est la *biréfringence*. On peut aussi décrire ce phénomène comme une rotation de la polarisation. Le filtre analyseur placé après l'échantillon sélectionne à nouveau les rayons lumineux selon leur polarisation ; ainsi, selon la quantité dont a tourné la polarisation (donc selon la nature des cristaux), ceux-ci apparaissent plus ou moins lumineux, voire de couleurs différentes. Certains cristaux sont quasiment isotropes et ne provoquent pas de biréfringence (notamment les cristaux cubiques), et peuvent être facilement distingués des cristaux anisotropes.

À l'aide d'un compteur de points qui déplace la lame mince selon un pas constant à la surface de la platine du microscope, on peut connaître la proportion de chaque minéral dans la roche, et, par là, sa composition minéralogique quantitative.

Le microscope polarisant permet également d'analyser la disposition des minéraux entre eux, de déterminer leur ordre de cristallisation, d'observer leur arrangement selon des plans ou des alignements, de mettre en évidence la structure de la roche.

La cristallographie est la science qui se consacre à l'étude des substances cristallines à l'échelle atomique. L'arrangement spatial des atomes dans la matière est étroitement lié à ses propriétés. L'état cristallin est défini par un caractère périodique et ordonné à l'échelle atomique ou moléculaire. Le cristal est obtenu par translation dans toutes les directions d'une unité de base appelée maille élémentaire. Elle est en rapport avec des disciplines aussi diverses que la physique, la chimie, les mathématiques, la biophysique, la biologie, la médecine, la science des matériaux, la métallurgie ainsi que les sciences de la terre.

Le cristal, d'abord simple objet de curiosité, passionna les collectionneurs avant d'intriguer les savants qui, en étudiant sa structure, ébauchèrent les premières théories sur la constitution intime de la matière. La loi des indices rationnels ou des tronçatures simples fut définie par l'Abbé Haüy en 1774. Par observation du phénomène de clivage de la calcite, il a déterminé les « molécules intégrantes », c'est-à-dire les parallélépipèdes identiques constituant les cristaux et, suite à cela, il a été déduit que chaque face d'un cristal peut être repérée dans l'espace par des nombres entiers.

La matière solide est composée d'atomes, que l'on peut voir comme des boules élémentaires qui s'assemblent. Elles peuvent s'assembler de plusieurs manières : quelques boules s'assemblent pour former une molécule, c'est le cas des gaz, des liquides, des solides moléculaires, des polymères (caoutchoucs, plastiques, papiers, protéines...) : ces matériaux comportent des milliards de molécules semblables. Les boules s'agencent de manière irrégulière ; on a alors de la matière dite « amorphe » ou « vitreuse », comme par exemple le verre, ou encore elles s'entassent de manière ordonnée, c'est alors un cristal.

Le « cristal parfait » est un modèle utilisé pour représenter la structure de la matière cristalline. Ce modèle considère qu'un cristal est un empilement ordonné et infini d'atomes, d'ions ou de molécules.

Le cristal est un solide à structure constituée d'atomes ordonnés dans un réseau périodique et même tripériodique et symétrique. Il a des propriétés de symétrie avec des axes directs et inverses, des miroirs, des plans et des centres de symétrie.

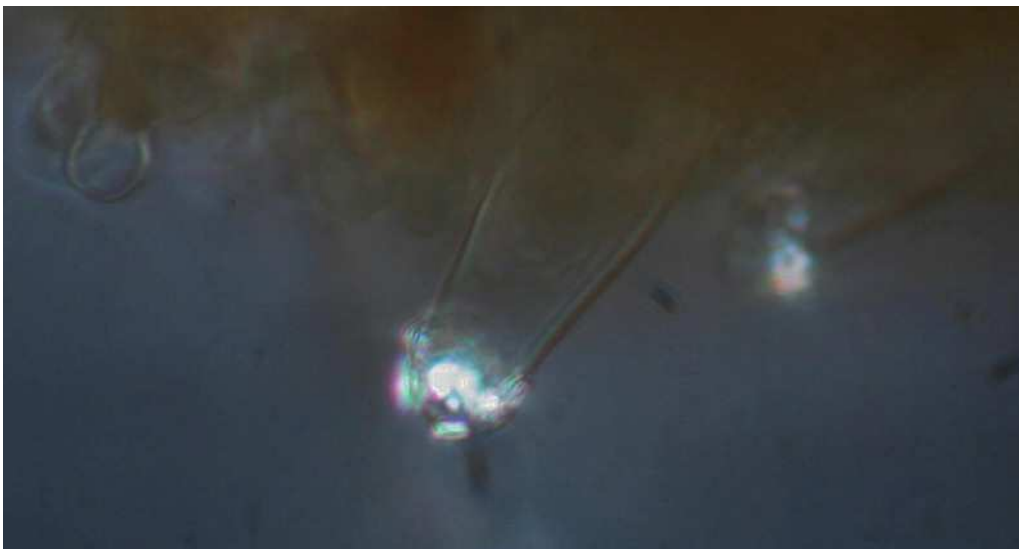
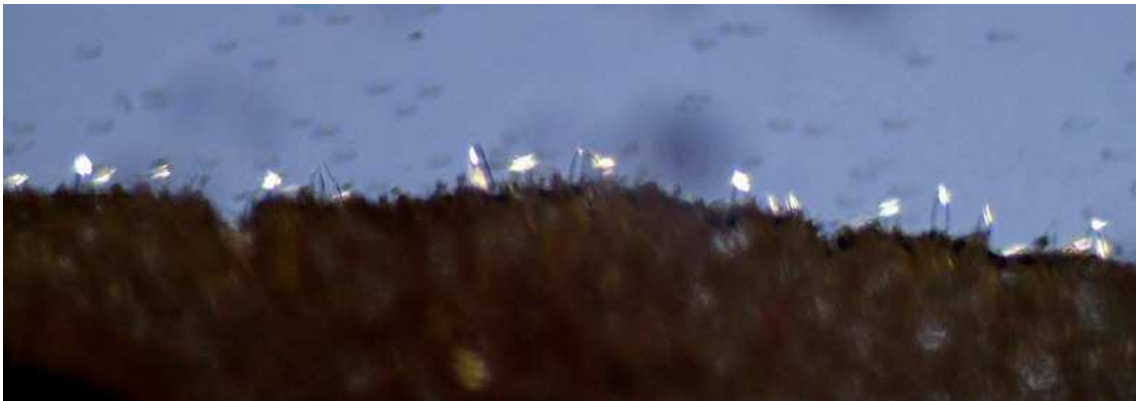
Un cristal peut être isotrope (même indice de réfraction de la lumière dans toutes les directions) ou anisotrope (deux indices différents dans deux directions perpendiculaires).

La maille élémentaire est le plus petit volume cristallin conservant toutes les propriétés physiques, chimiques et géométriques du cristal. Elle est définie par trois vecteurs qui génèrent ainsi six paramètres de mailles : les trois longueurs des vecteurs a , b , c et trois angles α , β , γ .

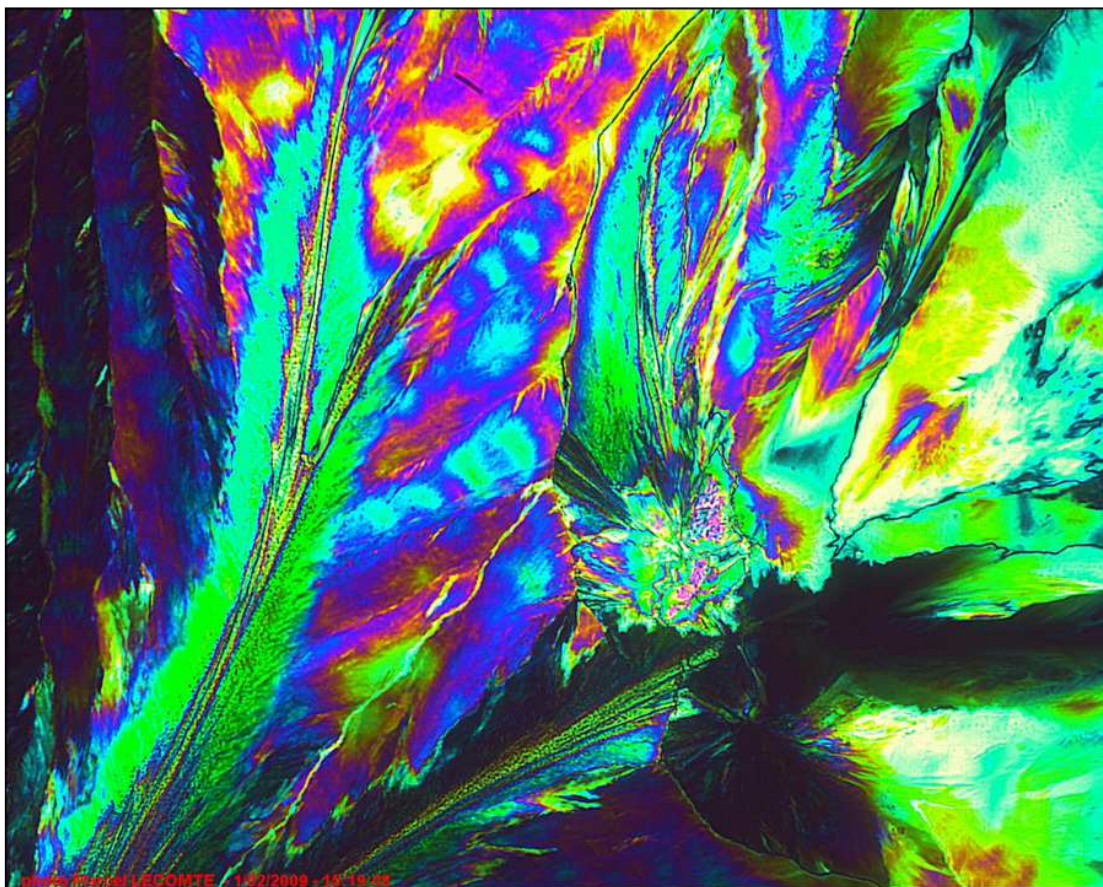
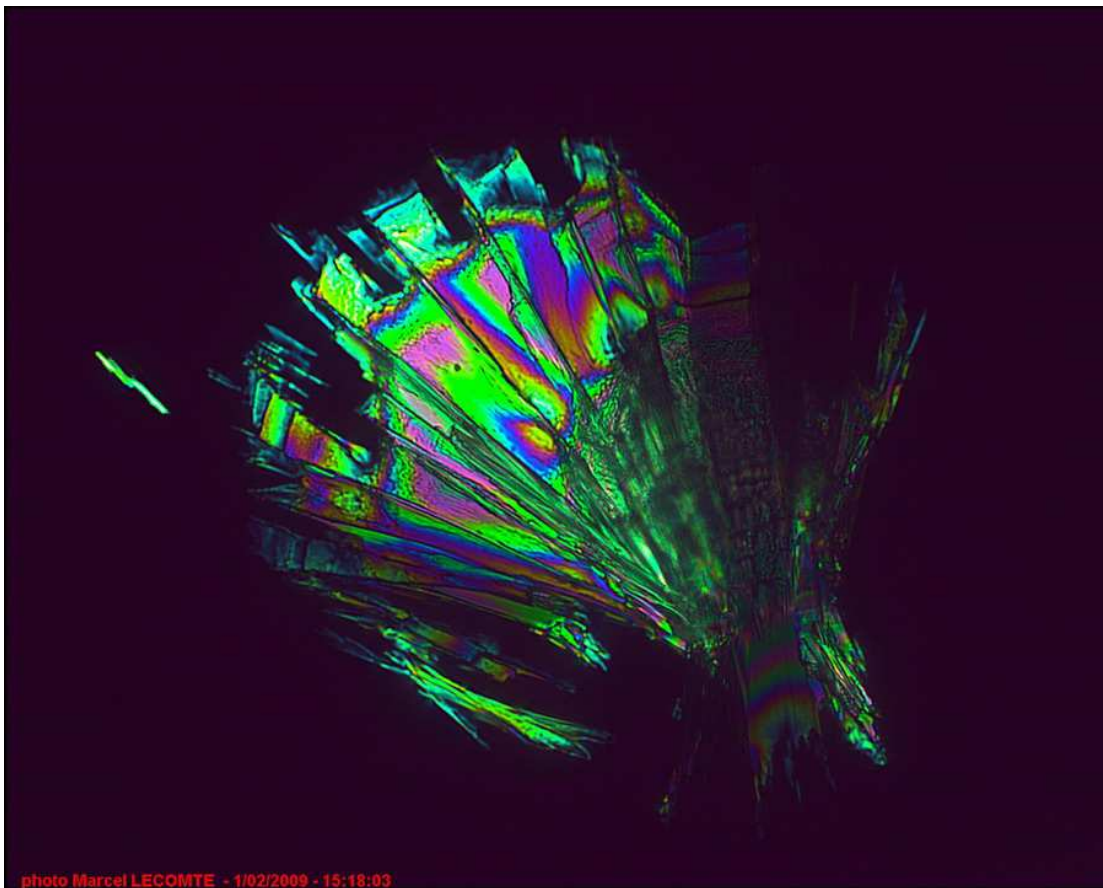
Un réseau est un ensemble de points ou « nœuds » en trois dimensions qui présente la propriété suivante : lorsque l'on se translate dans l'espace selon certains vecteurs, on retrouve exactement le même environnement. Il y a donc une périodicité spatiale. Cela permet de définir sept systèmes réticulaires de base : cubique, hexagonal, rhomboédrique, quadratique (ou tétragonal), orthorhombique, monoclinique et triclinique.

Leur analyse donne des informations sur des substances cristallines organiques et inorganiques (distance entre atomes, agencement spatial des atomes, identification de phases cristallines, taille des cristallites).

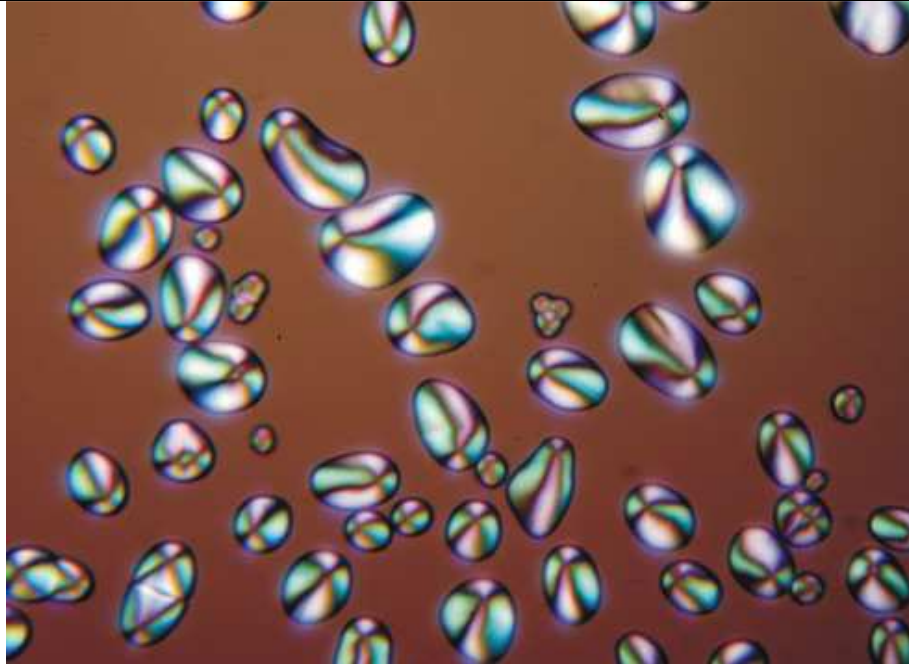
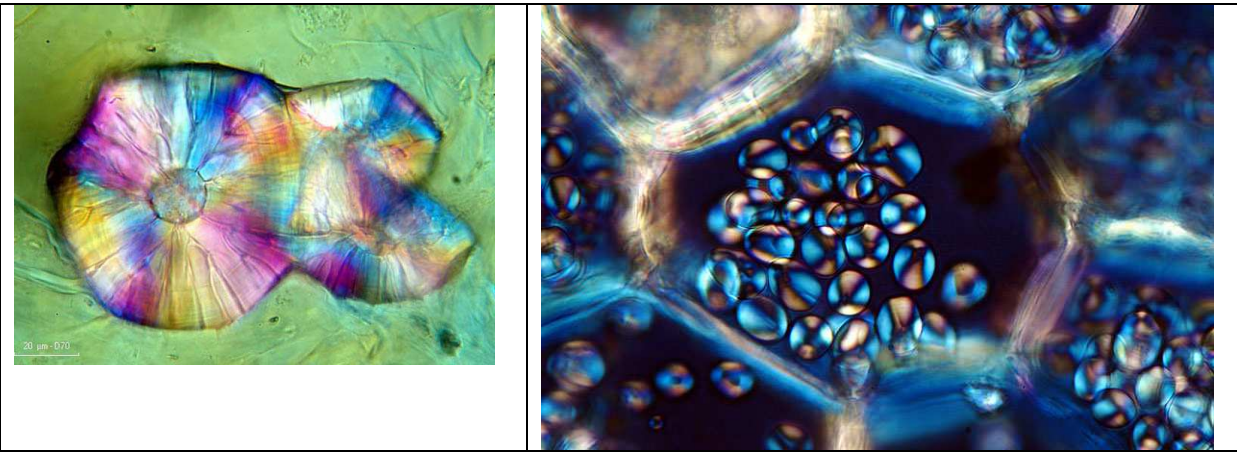
L'avènement du microscope polarisant, tant pour les minéraux transparents que, bientôt après, pour les minéraux opaques est une véritable révolution, qui ne peut être comparée qu'à celle que constituera, un siècle plus tard, l'avènement de la microsonde électronique. Entre temps, le microscope polarisant deviendra, grâce, d'une part, aux travaux de théoriciens comme F-E. Mallard, d'autre part aux perfectionnements techniques tels l'adjonction de compensateurs pour la mesure précise des biréfringences (Brewster 1830, J. Babinet 1849), de lentille dite de E. Bertrand (ou Bertrand-Amici) en 1878 ou, surtout, 13 ans après, de la **platine universelle multiaxe par le russe E.S. Fedorov (qui permet de travailler en 3 dimensions), un véritable instrument d'analyse permettant, non seulement la détermination des diverses espèces minérales, mais aussi l'estimation de leur composition.**



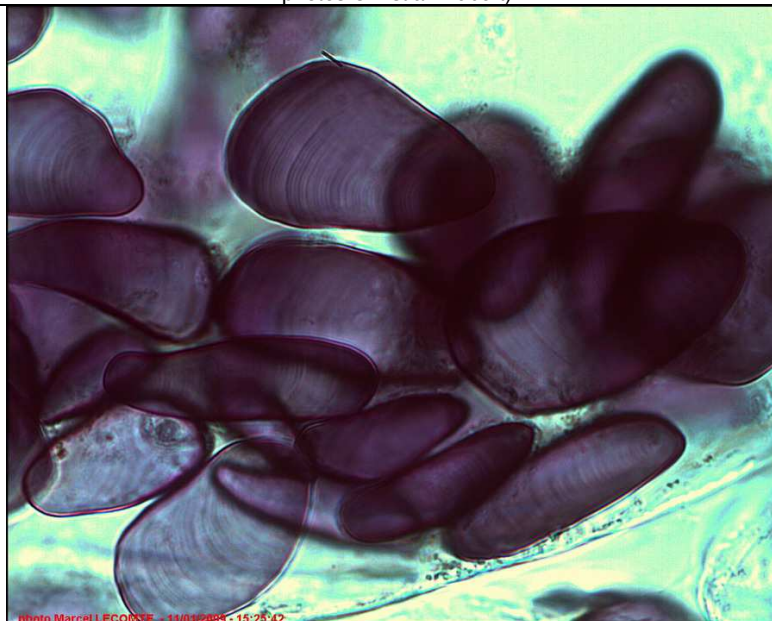
Cystides ornées de cristaux chez *Inocybe sp.*, – photos Guy Auderset – objectifs x5 et x40



Cristaux de vanilline, observés en polarisation - x 40 Pol - photos Marcel Lecomte



Grains d'amidon dans une poire (photo 1) et chez *Solanum sp.*, observés en lumière polarisée
photos Christian Aubert)

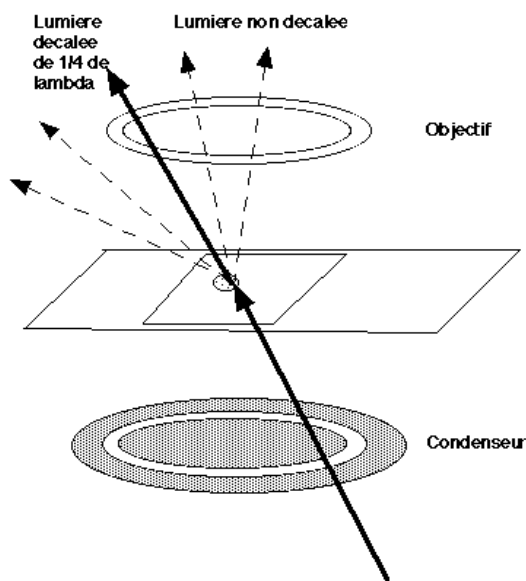


Grains d'amidon dans une banane, observés en fond clair, avec réaction amyloïde au réactif de Melzer – 40x Neofluar
photo Marcel Lecomte

LE MICROSCOPE À CONTRASTE DE PHASE

Le phénomène de contraste de phase a été découvert en 1934 par Fritz Zernike (1888-1966), mathématicien et physicien hollandais, qui reçut pour cela le prix Nobel en 1953.

La microscopie en lumière ordinaire nous montre les différences de teintes de gris ou de couleur entre un objet et son milieu. Un objet incolore et transparent d'indice de réfraction n , observé dans un milieu incolore et transparent d'indice de réfraction n , est à peu près invisible sauf si le bord de l'objet produit une diffraction importante. Dans ces conditions, un rayon lumineux qui traverse l'objet suit un chemin différent de celui qui traverse uniquement le milieu on dit alors que l'objet a une différence de phase.



Un microscope à contraste de phase (ou en contraste de phase) est un microscope optique qui transforme en niveaux de gris les différences d'indices de réfraction entre deux structures. Il visualise ainsi des structures transparentes quand leur indice de réfraction diffère de celui de leur voisinage, permettant ainsi de voir des objets autrement invisibles.

Imaginé par le Hollandais Frits Zernike, il permet d'étudier des cellules vivantes, sans devoir leur infliger une coloration (et donc de les conserver vivantes).

Le système optique est composé de deux anneaux dits de phase. Un de ces anneaux est placé dans l'objectif tandis que l'autre est dans le condensateur. Le diamètre des anneaux varie avec le grossissement de sorte que le condensateur à contraste de phase a plusieurs anneaux qui correspondent aux différents objectifs Ph. Quand le bord d'une

structure produit une diffraction suffisante, la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Les anneaux filtrent ces rayons déphasés et il en résulte sur l'image un contraste accentué de la structure.

Le microscope à contraste interférentiel (mis au point par Nomarski et d'autres auteurs) repose sur un principe différent mais produit le même type d'image et a le même domaine d'utilisation. Un premier système optique dédouble le faisceau lumineux avant qu'il ne traverse l'objet et un second fait interférer les deux, produisant un contraste artificiel très marqué là où les rayons sont déphasés.

Principe

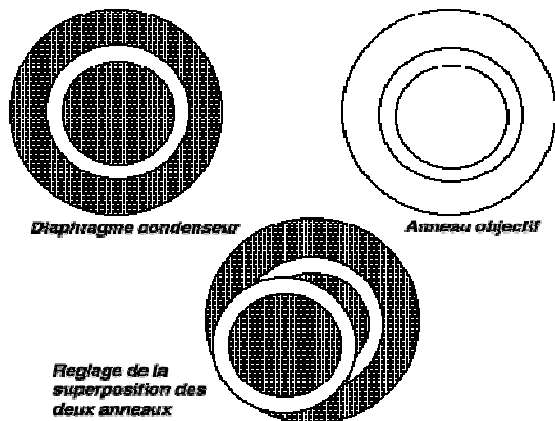
La microscopie d'absorption usuelle repose sur les colorants (variation d'amplitude), mais il existe également des contrastes de densité entre les différents milieux traversés par la lumière (variation de phase).

Mécanisme

La récupération des rayonnements diffractés va donner une image qui reflète les différents indices des milieux traversés. Pour ce faire, l'objet est éclairé par un anneau de lumière (diaphragme spécial du condensateur) ; la lumière transmise est également sélectionnée par un anneau situé dans l'objectif utilisé (les deux anneaux doivent être de même taille et se superposer dans le système optique, leur coïncidence fait l'objet d'un réglage pour un objectif donné). L'image observée est donc due uniquement à la différence d'amplitude du rayonnement diffracté.

La lumière qui traverse les deux anneaux est décalée de $1/4$ de longueur d'onde par rapport à la lumière diffractée par l'objet reprise par l'objectif.

Ajustement des anneaux de phase



Pour que l'image obtenue soit optimale, il faut ajuster la convergence des anneaux. L'opération est relativement simple.

- Régler l'éclairage de Köhler avec le diaphragme de champ.
 - Sélectionner un objectif Phase de faible grossissement.
 - Sélectionner l'anneau de condensateur spécifique.
 - Retirer un des oculaires et le remplacer par le télescope (viseur) d'ajustement qui est fourni avec le kit.
 - Ajuster le télescope pour avoir une image nette de l'anneau de l'objectif.
- Avec les vis d'ajustement du condensateur superposer les anneaux.
 - Remettre l'oculaire en place.

Normalement, il n'est pas nécessaire d'ajuster tous les objectifs.



Asques, ascospores et paraphyses, observés en contraste de phase, chez *Ascospora cylindrica* – x 40 Phase
photo M. Lecomte

Des systèmes de CONTRASTE encore plus élaborés

Le contraste interférentiel de Nomarski (ou D.I.C. = Differential Interference Contrast)

Il a été inventé par Georges Nomarski (1919-1997), un théoricien et physicien polonais qui a émigré en France après la 2^{ème} guerre mondiale. Il faut lui associer W.H. Wollaston (1766-1828) qui est à l'origine de l'invention du prisme qui porte son nom et qui est d'une importance fondamentale en interférométrie et contraste différentiel.

Le principe du DIC est le suivant : la lumière passe au travers des éléments suivants : un polariseur → un 1^{er} prisme de Wollaston → le condensateur → l'objet → un objectif spécial DIC → un 2^{ème} prisme de Wollaston → un analyseur → oculaires.

Il ne peut pas être installé sur n'importe quel microscope, n'est fabriqué que par des constructeurs prestigieux et s'avère d'un coût très élevé pour un particulier.

Comparaison entre PHACO et DIC

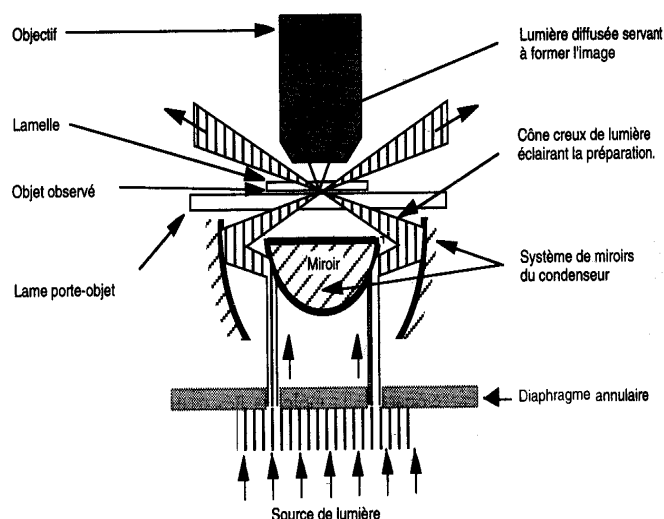
<i>Caractéristique</i>	<i>Phaco</i>	<i>DIC</i>
Perte de lumière en épifluorescence	28 %	73 %
Résolution latérale	Limitée par l'anneau du condensateur	Supérieure
Résolution axiale	Faible	Supérieure
Ouverture d'illumination	10 % du N de l'objectif	Variable
Effets d'azimut	Non	Oui
Halos	Oui	Non
Echantillons colorés	Pas utile	Utile
Echantillons biréfringents	Utile	Pas utile
Lames, couvre-objets ou boîtes biréfringents	Oui	Non
Coût	Moyen	Elevé

Le contraste Varel (ou contraste de relief variable)

Il s'agit d'une technique de contraste où le concepteur a mélangé le contraste de phase avec un éclairage incliné unilatéral, ce qui génère un pseudo-relief. Il a été développé pour permettre l'observation de cellules vivantes, non colorées, directement dans leur milieu de culture ou de vie (éprouvette ou autre récipient adapté, possédant une paroi incurvée). Il s'agit d'une technique peu coûteuse pour obtenir des images de matériel vivant, et permettant la micromanipulation.

Cela nécessite un objectif spécial dans lequel il y a à la fois un anneau de phase et un anneau Varel.

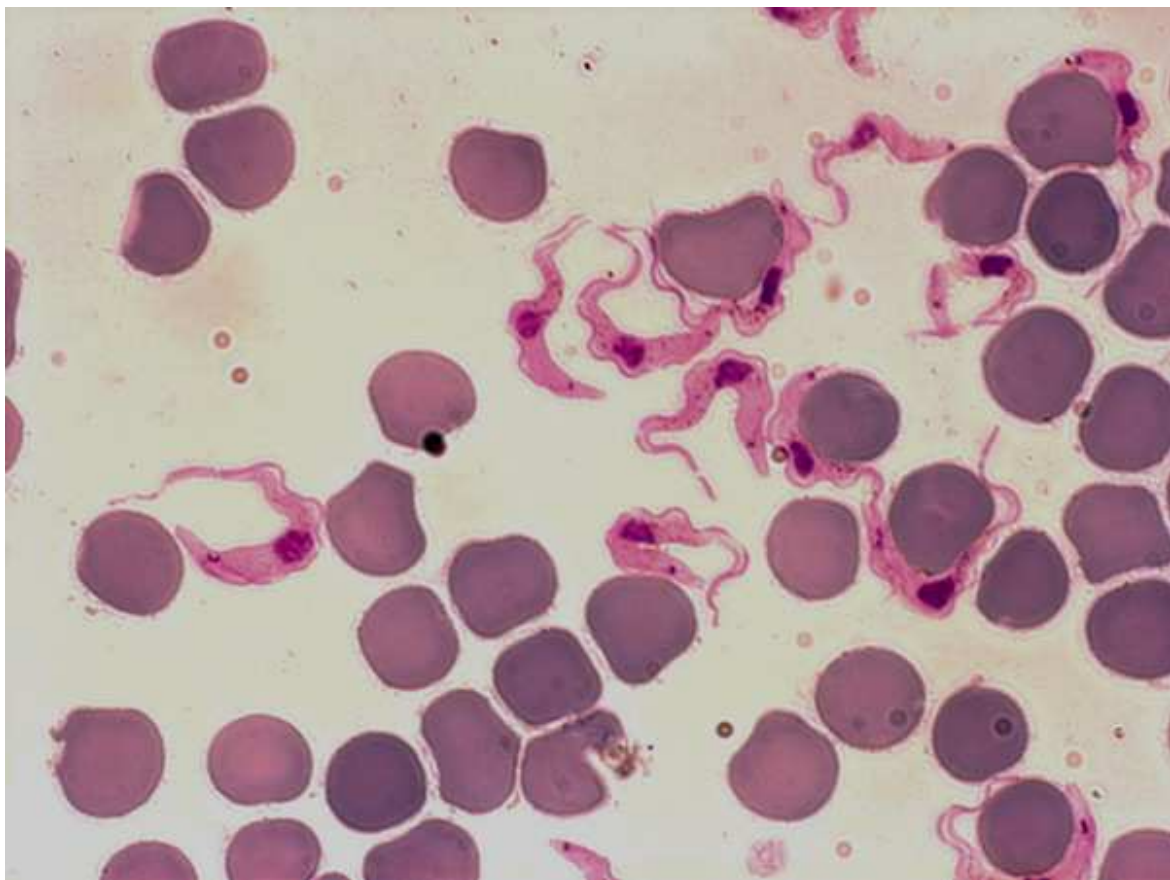
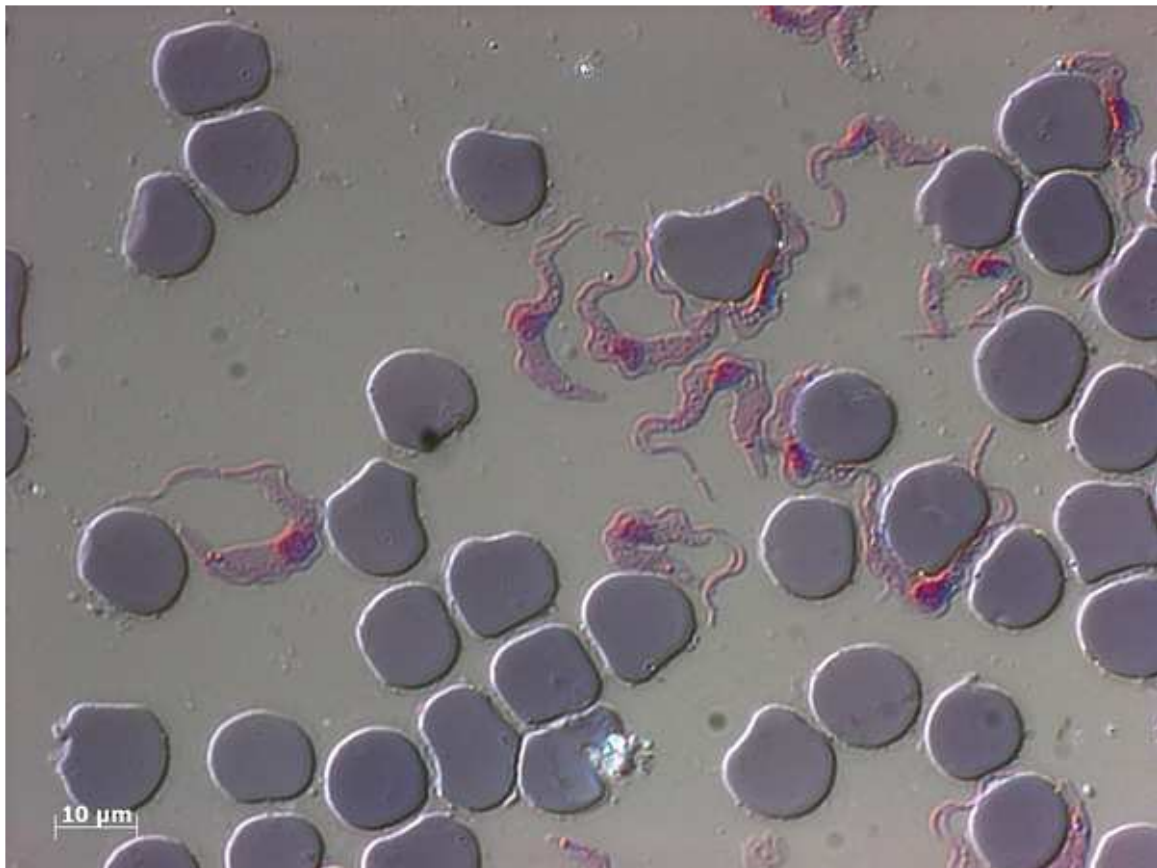
Le fond noir (ou éclairage en fond noir)



A l'opposé d'un microscope à fond clair, dans le microscope photonique à fond noir, les rayons lumineux provenant du condensateur ne pénètrent pas directement dans l'objectif. Ce dernier type de microscope possède donc un système d'éclairage particulier.

Dans ce type de microscopie, le fond de la préparation ne diffuse pas la lumière, il apparaît noir ; l'indice de réfraction est constant.

À l'inverse, les zones de la préparation qui diffusent la lumière d'éclairage apparaissent lumineuses ("claires") sur ce fond noir ; ces zones sont à l'origine de brusques

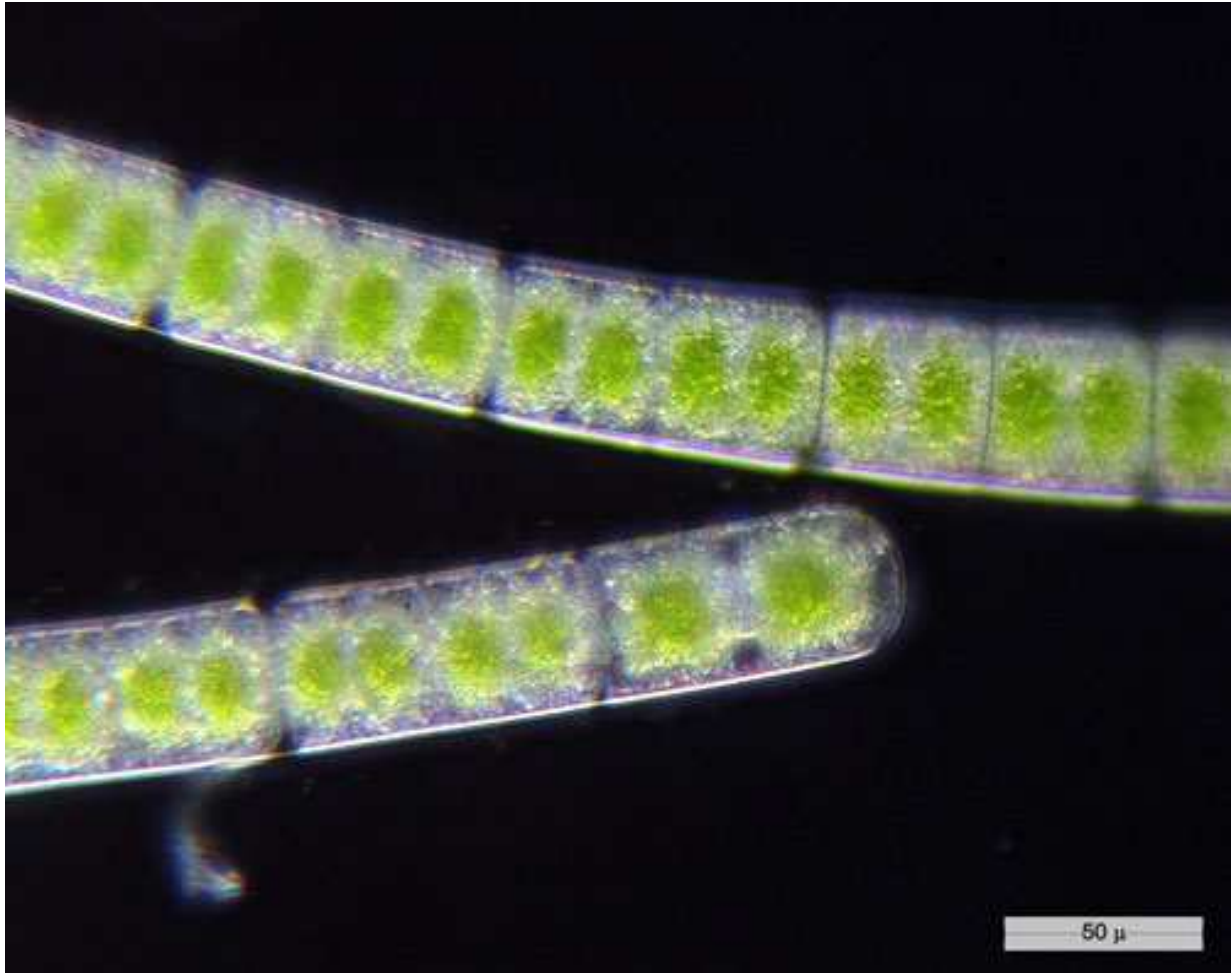


Trypanosoma gambiense (protozoaire responsable de la maladie du sommeil) vu en DIC (photo du dessus) et en fond clair classique – photos Guy Auseret

différences d'indice de réfraction (en microscopie à fond clair, elles seraient à peine visibles). De telles variations d'indice existent au niveau des enveloppes bactériennes et chez les cellules eucaryotes autour des flagelles, du noyau, des vacuoles....

Le microscope à fond noir s'utilise pour l'observation d'objets dont les structures présentent d'importantes variations d'indice de réfraction et qui, faute de contraste, ne sont que peu ou pas visibles en fond clair.

Certains microscopes à fond clair permettent, en changeant de condenseur, une observation en fond noir.



Zignema sp. (algue) photographiée avec un condenseur à fond noir — photo Christian Aubert

(...) "Un condenseur pour fond noir comprend un diaphragme annulaire qui laisse passer un cylindre creux de lumière transformé par un système de miroirs en cône creux qui converge sur la préparation. Les rayons directs ne pénètrent pas dans l'objectif. Seule une partie de la lumière diffusée par la préparation pourra pénétrer dans l'objectif et servira à former l'image."(...)

"La microscopie à fond noir convient très bien pour des observations à l'état frais et permet de faire de la microcinématographie. Elle n'est pas utilisée pour l'observation d'objets colorés (frottis ou coupes colorés), mais son emploi est très apprécié pour l'observation :

- d'objets plats à structure régulière comme les diatomées, les radiolaires...
- de formations linéaires comme les flagelles, les fibres, les bactéries, certains cristaux...
- d'objets punctiformes ou linéaires dont la taille est à la limite ou même en dessous de la limite de séparation du microscope. Ils apparaîtront comme de petits points ou traits très lumineux. L'exemple type est l'observation de l'agent de la syphilis, la bactérie *Treponema pallidum*" (...)

Dessin et textes (...) : Extrait de "La microscopie" de J-P Pér, Ed Nathan université

Le PlasDIC

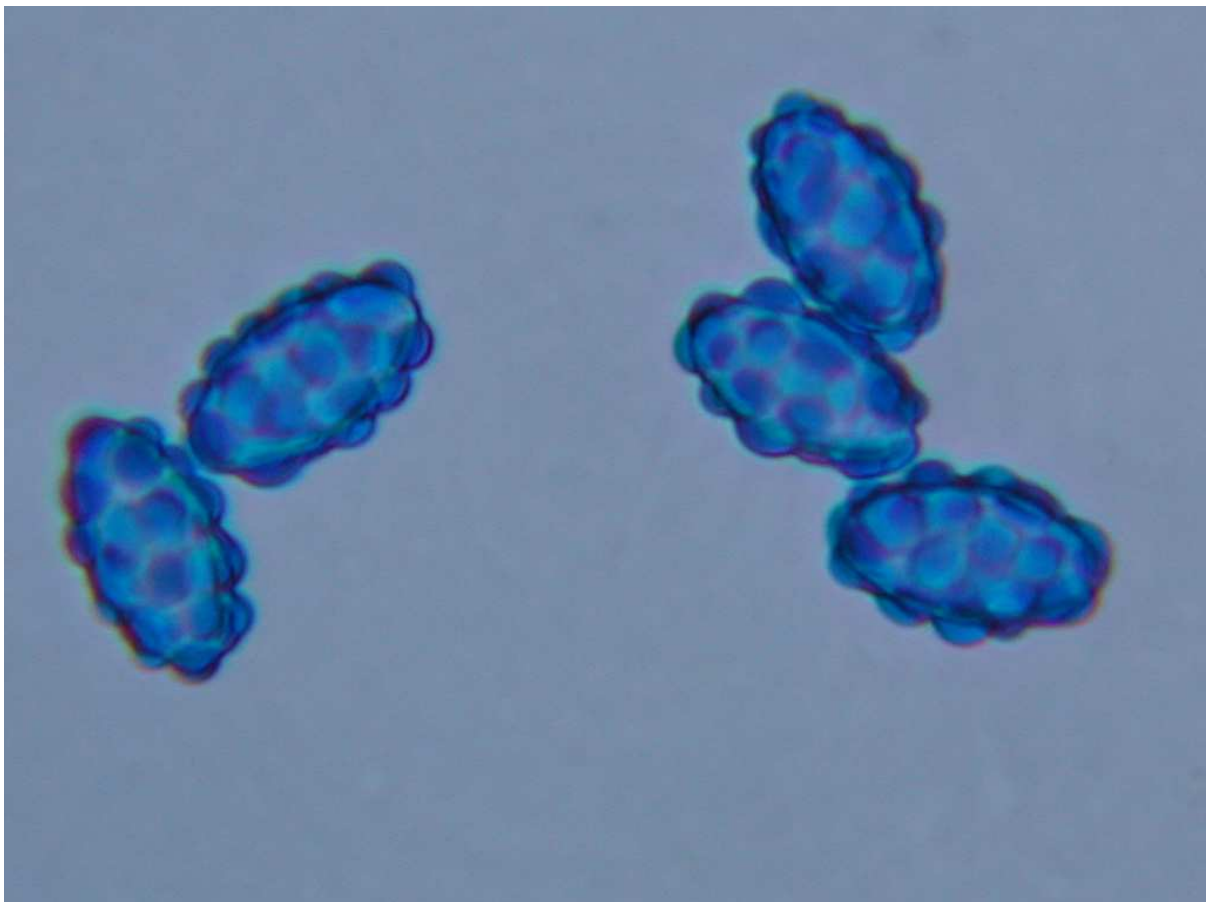
Le procédé PlasDIC ne nécessite pas de condenseur spécifique, ni de prisme côté condenseur, à l'inverse du DIC. Il est facile à mettre en œuvre et est nettement moins coûteux que le DIC. PlasDIC désigne le premier procédé de contraste interférentiel différentiel qui permette d'utiliser des boîtes en plastique (boîtes de Pétri par exemple).

Nouvelle variante du contraste interférentiel différentiel selon Nomarski, ce contraste de relief novateur de Carl Zeiss est idéal pour l'examen de cellules vivantes. Le nouveau procédé permet notamment de mieux évaluer les cellules épaisses, les agrégats cellulaires et les amas cellulaires denses. Grâce à la reproduction brillante de couches de cellules épaisses, il complète au mieux les informations d'image recueillies par d'autres méthodes d'analyse et met en évidence plus clairement les caractéristiques cellulaires spécifiques de la croissance et des interactions cellulaires.

La grande profondeur de champ obtenue fournit suffisamment d'informations pour disposer d'une vue d'ensemble optimale et pour commander les micromanipulateurs de manière sûre et efficace. La micro-injection intracytoplasmique est grandement facilitée.



A gauche, des cellules d'embryon humain ; à droite, un ovocyte : le tout est vivant et observé en PlasDIC (images Zeiss)



Spores de *Trichophaeopsis paludosa* var. *tuberculata* – x 100 - photo Yves Deneyer

LE MICROSCOPE à FLUORESCENCE

La **microscopie en fluorescence (ou à fluorescence)** est une technique de microscopie optique qui tire profit du phénomène de fluorescence pour observer divers composés. Elle fait désormais partie des méthodes de recherche classiques en biologie.

Stokes (au milieu 19e siècle) fit l'observation que le minéral **fluorspar** produit de la lumière visible lorsque la lumière ultraviolette est dirigée contre lui. Il inventa alors le mot "fluorescence". Il observa que la lumière de fluorescence était toujours de longueur d'onde plus grande que celle de la lumière d'excitation.

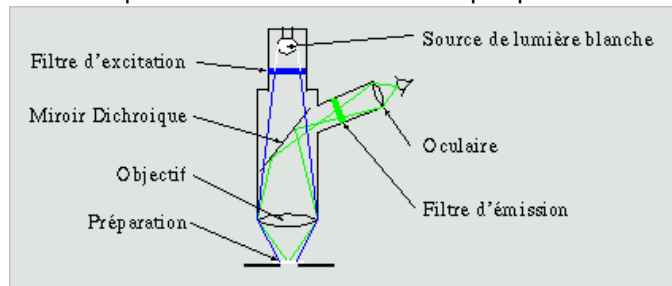
L'émission de lumière a lieu durant l'illumination (excitation) d'un chromophore qui absorbe cette lumière. Lorsqu'un échantillon vivant ou non-vivant, inorganique ou organique absorbe et ensuite rayonne la lumière, on parle de *photoluminescence*.

La **fluorescence** est définie comme l'émission de lumière qui a lieu uniquement durant l'absorption de la lumière d'excitation.

Principe de l'épifluorescence :

Une lampe à arc (au mercure ou au xénon) émet de la lumière blanche → passage dans un filtre d'excitation (490 nm p.ex.) → réflexion à angle droit par un miroir dichroïque (510 nm p.ex.) → passage dans l'objectif spécial fluorescence → excitation de l'échantillon → retour vers l'objectif et le miroir dichroïque → passage dans un filtre d'émission (>520 nm p.ex.) → détecteur → oculaires.
D'autres sources lumineuses sont possibles : lasers ou leds.

Un microscope à fluorescence est un microscope photonique équipé de deux lampes, une lampe ordinaire pour une observation classique par transmission et une lampe à arc pour la fluorescence. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission (ou d'arrêt) permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité.



La fluorescence observée peut avoir plusieurs origines :

- Fluorescence naturelle d'une substance située dans la cellule, exemple : la chlorophylle fluoresce naturellement en rouge.
- Utilisation d'une substance fluorescente se fixant spécifiquement sur une structure. Il s'agit là d'un test de type cytochimique, exemple : le DAPI (Di Aminido Phenyl Indo) se fixe spécifiquement sur l'ADN et fluoresce en bleu.
- Utilisation d'une substance non spécifique fluorescente naturellement, comme la rhodamine et la fluorescéine. Cette substance est fixée sur un anticorps spécifique d'un antigène. La spécificité est due à l'anticorps. La fluorescence observée permet de localiser l'antigène.
- Traceurs de lignage cellulaire en biologie du développement : la rhodamine, la fluorescéine, le Texas Red ou autre est fixé sur une molécule de dextran. Le tout est microinjecté dans une cellule et les cellules filles seront marquées au cours du développement embryonnaire.
- Intégration d'une séquence codant pour une protéine naturellement fluorescente dans le "gène" codant pour une protéine. La protéine recherchée devient naturellement fluorescente et les observations peuvent se réaliser "in vivo".

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise.

En fluorescence on distingue deux types d'objets : les premiers émettent de la lumière fluorescente par eux-mêmes, on parle de fluorescence primaire ou autofluorescence (chlorophylle, huile, collagène, vitamine A qui a une fluorescence verte...), les autres doivent être combinés à une substance fluorescente pour émettre de la fluorescence ; on parle donc de fluorescence secondaire.

En microscopie de fluorescence, on peut donc visualiser directement des substances fluorescentes.

Pour des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes, il est nécessaire de les marquer par des substances appelées fluorochromes, comme par exemple le DAPI qui marque l'ADN et fluoresce en bleu. On utilisera également l'orange d'acridine (qui réagit avec l'ADN et met en évidence les noyaux), et l'auramine phéniquée pour la coloration des mycobactéries (tuberculose, lèpre - (coloration de Degommier)).

Certains marqueurs génétiques comme la protéine fluorescente verte, (en anglais *Green Fluorescent Protein* ou GFP) sont aussi très utilisés en biologie. Dans ce cas, le fluorochrome est une protéine produite directement par la cellule elle-même et ne nécessite pas l'ajout de substrat. La fluorescence peut alors être visualisée directement dans les cellules vivantes.

De nombreuses techniques de marquage peuvent être utilisées ; nous retiendrons le marquage simple, qui se fait par affinité entre un fluorochrome et la molécule à marquer.

On peut exciter les substances fluorescentes par une excitation monophotonique. On utilise pour cela une lumière d'excitation dont la longueur d'onde excite directement le fluorophore. Donc, la fluorescence émise peut provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau d'excitation. L'élément clé de ce microscope confocal est alors représenté par une "fenêtre" (un iris confocal) placée devant le détecteur qui élimine la fluorescence provenant des régions non focales. L'observation de signaux de fluorescence repose sur cinq éléments :

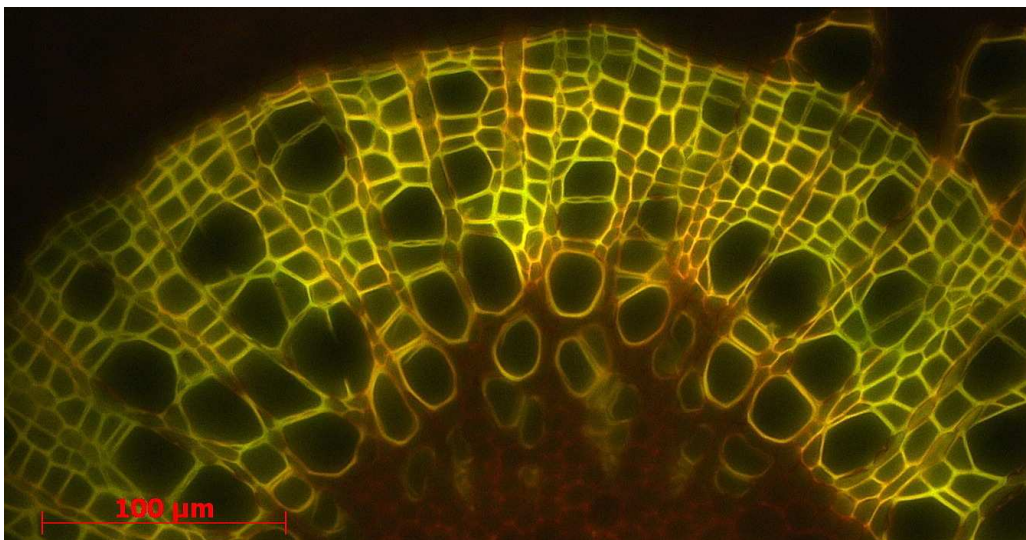
- une source de lumière pour l'excitation,
- un fluorophore,
- des filtres pour séparer les photons d'émission des photons d'excitation,
- un sténopé (iris confocal),
- un détecteur pour transformer le signal lumineux des photons en signal électrique.

Les techniques de fluorescence peuvent être utilisées avec différents types de microscope :

- un microscope optique classique. Il est également courant de faire passer la lumière excitatrice par l'objectif et non pas par dessous le spécimen. On parle alors de **microscopie à épifluorescence**. Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission. Les fluorochromes les plus classiques sont la rhodamine et ses dérivés, la fluorescéine et ses dérivés et le DAPI. Ils émettent respectivement dans le rouge, le vert et le bleu.
- un microscope confocal à balayage laser. Cette association est la plus courante. Le microscope confocal atteint une résolution bien meilleure que le microscope optique classique, et permet de réaliser des images en trois dimensions de l'objet.

Comme toute technique de microscopie optique classique, la microscopie en fluorescence est limitée par la diffraction de la lumière. Le pouvoir de résolution est donc de 200 nm (*) environ (voir microscope optique).

(*) le nanomètre vaut 1 milliardième de mm, soit 1 millième de micron



Fluorescence endogène de la lignine sur peuplier – x20 - photo Guy Auderset

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, il faut se tourner 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.
- 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 trouve des oculaires 10x ainsi que les objectifs suivants : 4x, 10x, 20x, 40x et 100x à immersion, ce qui donne des grossissements de l'ordre de 40, 100, 200, 400 et 1.000x. Nous pensons qu'un révoluer à 5 objectifs offre les meilleures possibilités.

- Pratiquement, nous avons pu constater que l'annonce de grossissements de l'ordre de 1.600x à 2.000x (par l'apport d'oculaires 16x ou 20x) n'est qu'un appât publicitaire ; en effet, il faut savoir que les limites optiques d'un objectif répondent à des lois physiques bien délimitées : le maximum de grossissement possible d'un objectif est égal à son $N \times 1000$. Les objectifs courants 100x ont un $N = 1,25$: donc, ils seront efficaces jusqu'à 1.250x au grand maximum. Au delà, l'image sera de très mauvaise qualité, sans plus aucune profondeur de champ et avec une mauvaise définition.
- Le meilleur des objectifs planapochromatiques a un $N = 1,4$: il coûte une fortune, et sera quand même limité à 1.400x.
- Zeiss a mis au point un zoom optique très complexe et très coûteux, qui se place sur le tube trinoculaire, entre l'image et le capteur (APN ou caméra), et qui permet de faire varier le grossissement entre 0,25x et 2x, solution idéale pour bien cadrer le sujet.

- Ils ne sont jamais fournis d'origine, car nettement plus coûteux que des objectifs de série, mais il nous paraît très précieux de posséder un objectif 50x ou 63x, qui constituent un palier intéressant entre 20 ou 40x et 100x. Ils sont quasi toujours à immersion et n'existent pas en série achromatique.

- 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.
 - Nous adressons une mention très spéciale aux **objectifs planfluorine ou néofluar**, qui se révèlent excellents pour la photographie.
 - 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 30 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. L'utilisation de leds est en train de se généraliser chez les fabricants.

- 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.
- Lorsqu'on prospecte différents constructeurs afin de faire l'acquisition d'un microscope, il est important de demander s'il est possible d'adapter par la suite un contraste de phase et un système de polarisation sur le modèle choisi, car ce n'est pas nécessairement le cas. En effet, il est très possible d'acheter par la suite un kit complet de phase qui comprend en général 4 objectifs, un condensateur et un oculaire d'ajustement, ainsi qu'un kit de polarisation.

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 !

NOTRE MAITRE ACHAT personnel, capable de répondre à un budget raisonnable, serait constitué de la sorte :

- Statif ergonomique, lourd et bien stable
- Tête trinoculaire
- Éclairage halogène de 20 ou 30 W
- Révolver pouvant accueillir 5 objectifs
- Condenseur avec glissière de phase 40x
- Adaptateur pour polarisation
- Oculaires 10x grand champ de 22
- Objectifs plans infinis répartis comme suit :
 - Objectif 10x (le moins utilisé mais à posséder en réserve pour intervertir éventuellement avec le suivant)
 - Objectif 20x
 - Objectif 40x polarisant
 - Objectif 40x contraste de phase
 - Objectif 50x – 0,95 à immersion
 - Objectif 100x – 1,25

Le prix de cet ensemble, où il n'y a pas de composants inutiles, peut se trouver pour un montant qui n'excéderait pas 1.850 à 2.000,00 €

Si vous voulez disposer de matériel « haut de gamme », remplacez alors :

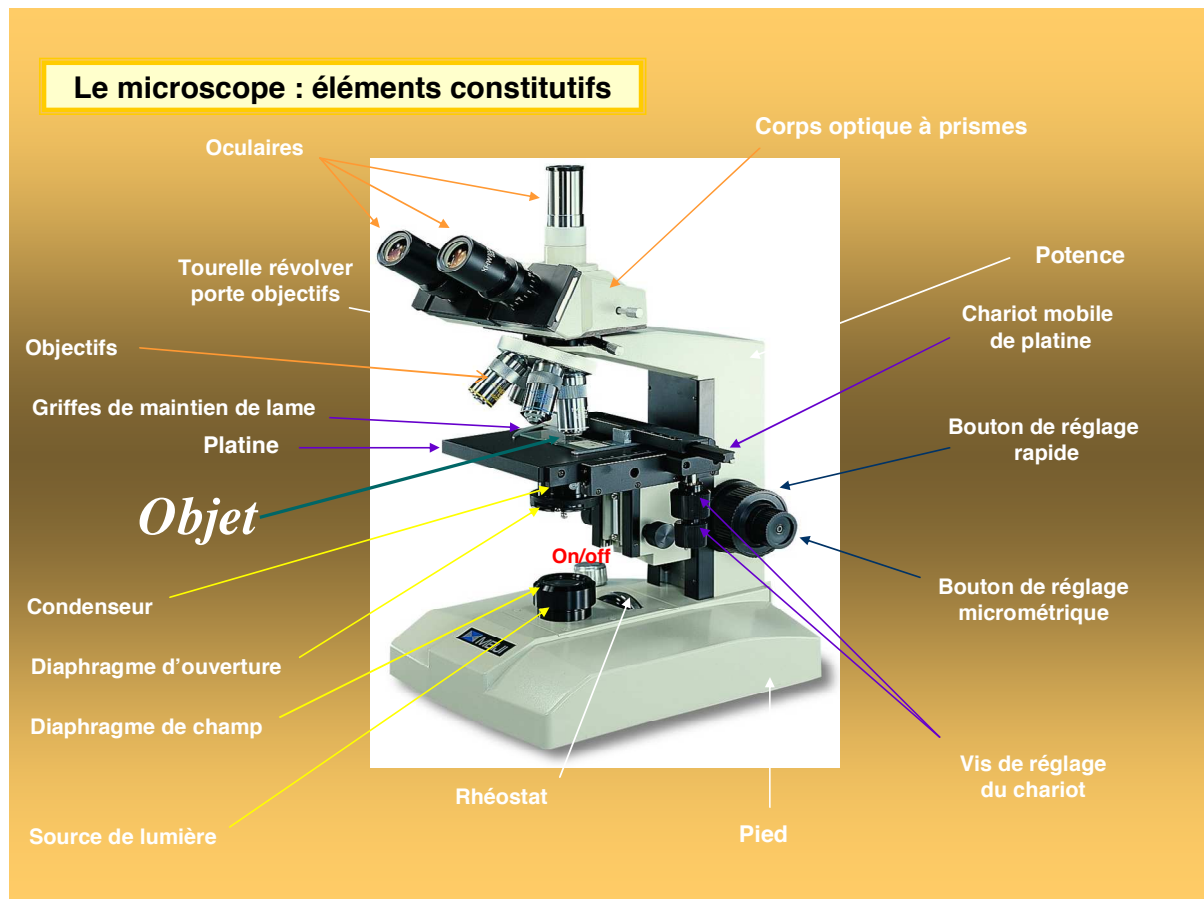
- L'objectif 50x – 0,95 à immersion par un objectif fluorine 63x – 1,15 à immersion
- L'objectif 100x – 1,25 plan normal par un objectif planapochromatique 100x – 1,3 ou 1,4

L'ensemble vous reviendrait alors à +/- 2.950,00 €

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).

Image didactique réalisée par Philippe Dufour



1. LA PARTIE MECANIQUE comprend :

- le statif (pied + potence)
- le tube porte oculaire
- 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-objet (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 pratiques pour les porteurs de lunettes) avec ajustement de dioptrie (+/- 5) pour chaque œil

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: 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 l'épaisseur de 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 le diaphragme de champ (dans le socle) et à demi le diaphragme d'ouverture (dans le condenseur)
3. 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)
4. positionner la préparation sur la platine
5. régler l'écartement interpupillaire (on ne doit voir qu'une seule image, unique et circulaire)
6. régler les dioptries des oculaires
7. mettre au point avec l'objectif x10 par exemple
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)

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

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

- 1/ modèle simple à coins droits et bords bruts (attention aux coupures)
- 2/ modèle simple à coins droits et bords rodés
- 3/ modèle simple à coins arrondis et bords rodés
- 4/ modèle à coins rodés et à bande dépolie, permettant l'écriture
- 5/ modèles à coins droits ou rodés et à bande d'écriture diversement colorée, permettant l'écriture
- 6/ modèle avec une cuvette centrale : très pratique pour l'observation d'êtres vivants dans une goutte d'eau, pour la conservation de sporées ou pour le montage de larves dont l'épaisseur relative constitue un problème
- 7/ modèles avec 2 ou 3 cuvettes
- 8/ ... il existe d'autres modèles possédant des applications très précises.

Notre préférence va vers les modèles 3 et 5, car le risque de coupure est éliminé et le second permet de noter directement des préparations qu'on souhaite garder définitivement, en pratiquant un classement basé sur la couleur de la bande d'écriture

Les lames CO offrent plusieurs formats :

- 18 x 18 mm - 20 x 20 mm - 20 x 40 mm
- circulaire, de diamètre 12, 15, 18, 20, 22

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 :

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 : nous avons utilisé jusqu'à la mi-2008 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.

Mais Joseph Pellicani, un ami Liégeois, nous a fait découvrir un produit remarquable utilisé au départ comme agent détergent pour le nettoyage des véhicules et surtout des parties souillées de

graisse et autres taches incrustées (sur jantes et chromes) ; ce produit est composé de 40 % d'acide phosphorique et se révèle d'une efficacité redoutable pour éliminer l'huile d'immersion.

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, ce qui nous a amené finalement à les jeter systématiquement.

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 plusieurs sortes :

- **d'origine naturelle** (huile de cèdre par exemple) : nous la déconseillons fortement car elle sèche rapidement, et finit pas former une croûte sur la lentille de l'objectif ; son utilisation est vraiment tombée en désuétude car elle présente plus d'inconvénients que d'avantages.
- **d'origine synthétique** (c'est celle que nous préférons) ; il faut cependant savoir qu'elle existe en plusieurs qualités
 - l'huile à immersion courante, pour les objectifs classiques qui garnissent les microscopes de routine : elle est assez fluide et possède un indice de réfraction (N) de +/- 1,50
 - l'huile à immersion spéciale (Nacht, Zeiss) pour objectifs avec lentilles de grande surface, qu'on trouve sur des microscopes « haut de gamme » qui est nettement plus sirupeuse et possède un N allant jusqu'à 1,55
- **Une découverte : le GLYCEROL**, qui est une glycérine hautement raffinée et purifiée, qui présente un N de l'ordre de 1,7, ce qui est extraordinaire ; un avantage qui n'est pas négligeable du tout : cela se nettoie très facilement à l'eau



Observation d'une larve de moustique, montage au PVALPh – x 10 - photo M. Lecomte

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 !

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 revolver dans le même sens.**

La première observation :

- 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 l'objectif 10x 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.
- 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 allez passer à l'immersion : déplacer légèrement le revolver porte objectifs de manière à ce que la préparation se trouve entre les objectifs 40x (63x) 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 !

Ce qui va suivre nous paraît d'une importance capitale !
RETENEZ CE PRINCIPE DE BASE :
Quelle que soit la qualité et le prix de votre microscope ...
Quelle que soit la qualité de votre matériel photo ou de votre caméra ...
LA QUALITE DE VOTRE OBSERVATION OU DE VOTRE IMAGE dépendra
uniquement de LA QUALITE DE VOTRE PREPARATION !

Pour arriver à une image d'excellente qualité, il est essentiel de :
LAVER LA PREPARATION, afin d'obtenir un contraste maximal entre la
pièce colorée et le milieu d'observation.
CHERCHER LES CONDITIONS d'ECLAIRAGE OPTIMALES en utilisant les
diaphragmes de champ et d'ouverture.

PROTOCOLE de préparation pour une observation microscopique en mycologie.

Par André FEVRIER & Marcel LECOMTE

Ce modus operandi ne constitue évidemment pas une solution universelle, mais il est le résultat d'un travail méticuleux et précis, généré par l'idée de pouvoir réaliser les meilleures prises de vues possibles, au départ d'un appareil photo numérique ou d'une caméra.

CONSEILS

- **Toujours commencer par une observation dans l'eau** : c'est la seule manière d'observer certains éléments qui vont disparaître sous l'action de produits basiques ou acides (et notamment des pigments pariétaux, intra ou extra cellulaires, ou des cristaux)
- Avant tout prélèvement, **l'usage de la loupe binoculaire** au grossissement de 20 ou 40x **nous paraît essentiel** pour vérifier la présence de certains éléments, notamment les diverses formes de cystides, qui sont situées à des endroits très précis. Les repérer permet d'effectuer un prélèvement efficace.
- **L'observation des spores doit se faire sur une sporée**, surtout si elle génère des mesures.

MODE OPERATOIRE

1^{ère} étape : observer dans l'eau

- Prélever soigneusement un morceau de petite taille (la qualité de l'observation et de l'image sont inversement proportionnelles à la taille de la pièce).
- Déposer une petite goutte d'eau à l'aide d'une pipette de Pasteur.
- Poser la lame CO en biais pour éviter au maximum les bulles d'air.
- Eliminer l'éventuel surplus débordant à l'aide de papier absorbant afin de ne pas risquer un mélange avec l'huile à immersion.
- Observer d'abord sans dissocier.
- Dissociation éventuelle à l'aide d'un objet non métallique et observation.

2^{ème} étape : coloration au rouge Congo SDS (ou n'importe quel autre colorant)

La démonstration qui va suivre est réalisée sur un spécimen de champignon, mais elle est applicable in extenso à tout objet soumis à préparation et coloration. Il s'agit d'une technique personnelle qui va à l'encontre de ce qui est souvent enseigné ... le résultat vous laissera seuls juges !

- Prélever un grand morceau de lame de champignon d'environ 1 cm de long et 2 à 5 mm de large, en repérant bien l'arête fertile et le déposer dans le colorant.
- Préparer une lame PO et y déposer une goutte de rouge Congo SDS s'il s'agit de matériel frais.
- Déposer une goutte de colorant et laisser agir 1 à 2 minutes.
- Eliminer le colorant avec du papier absorbant ; comme la pièce colorée est de grande taille, vous ne risquez pas de la coller sur le papier si vous la touchez.


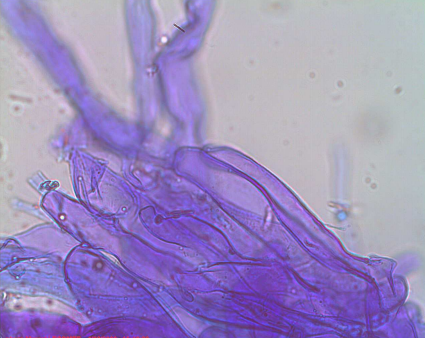
- Déposer une grosse goutte d'eau bidistillée à l'aide d'une pipette de Pasteur, pour rincer le colorant (nous conseillons l'usage de cette eau par purisme, afin d'éviter tout précipité ou virerement de couleur éventuels).
- Eliminer l'eau de rinçage avec du papier absorbant.
- Tailler la pièce colorée à bonne mesure, c'est-à-dire un morceau de 2 x 2 mm maximum, à l'aide d'une lame de rasoir (conserver précieusement le reste de la pièce dans un verre de montre rempli d'eau afin de pouvoir l'utiliser par la suite).
- Déposer une petite goutte d'eau bidistillée à l'aide d'une pipette de Pasteur (il est possible d'utiliser de l'eau normale, mais elle peut générer des réactions chimiques et des précipités).
- Poser la lame CO en biais pour éviter au maximum les bulles d'air.
- Eliminer l'éventuel surplus débordant à l'aide de papier absorbant afin de ne pas risquer un mélange avec l'huile à immersion.
- Réaliser une première observation sans dissocier, si vous voulez observer l'arête de la lame et trouver des spores encore fixées sur les stérigmates ; dans le cas présent, la préparation aura une certaine épaisseur, ce qui engendre de mauvaises conditions de travail.
- Dissocier fermement à l'aide d'une gomme ou d'un manche plastique : l'observation va être de grande qualité, avec un contraste exceptionnel.
- N'oubliez pas de CHERCHER LES CONDITIONS d'ECLAIRAGE OPTIMALES en utilisant les diaphragmes de champ et d'ouverture : c'est la seconde clé de la réussite.

3^{ème} étape : améliorer la lisibilité de la préparation (c'est nécessaire quand on constate que la préparation est encombrée de spores qui roulent et se déplacent, alors qu'on s'intéresse aux basides et aux cystides).

- Prélever un petit morceau dans la pièce colorée et garder soigneusement le surplus dans un verre de montre.
- Déposer une grosse goutte d'ammoniaque pure (désagréable au nez) ou mieux encore d'alcool dénaturé à 95 % : vous allez voir les spores quitter la préparation comme par magie ; cette technique est indispensable quand on veut observer le capillitium chez les Myxomycètes).
- Eliminer le liquide avec du papier absorbant.
- Si c'est nécessaire, répéter l'opération une seconde fois.
- Déposer une petite goutte d'eau bidistillée à l'aide d'une pipette de Pasteur.
- Poser la lame CO en biais pour éviter au maximum les bulles d'air.
- Eliminer l'éventuel surplus débordant à l'aide de papier absorbant afin de ne pas risquer un mélange avec l'huile à immersion.
- Observer d'abord sans dissocier.
- Dissociation éventuelle à l'aide d'un objet non métallique et observation.

4^{ème} étape : améliorer la dissociation

- Prélever un petit morceau dans la pièce colorée et garder soigneusement le surplus dans un verre de montre.
- Déposer une goutte de potasse à 5 %.
- Eliminer le liquide avec du papier absorbant.
- Si c'est nécessaire, répéter l'opération une seconde fois.
- Poser la lame CO en biais pour éviter au maximum les bulles d'air.
- Eliminer l'éventuel surplus débordant à l'aide de papier absorbant afin de ne pas risquer un mélange avec l'huile à immersion.
- Dissociation énergique à l'aide d'un objet non métallique et observation.

	
<p>Préparation non lavée, empâtée et assombrie par le bleu d'aniline</p>	<p>La même préparation, lavée avant observation : elle est beaucoup plus contrastée et claire - photos Marcel Lecomte</p>

**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 d'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 excréments 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.
- 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 liquides plus visqueux limitent sensiblement ou totalement les mouvements et empêchent le dessèchement de 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 difficilement 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.

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 lactophénole (excellent également)
 - lactophénole
 - acide lactique
 - ammoniaque concentré

Les milieux d'observation cités ci-dessus sont placés selon un ordre dégressif de préférence personnelle, mais les produits contenant du phénole dégagent une odeur très désagréable, qui peut s'avérer toxique à la longue (personnellement, je travaille sous hotte pour des manipulations fréquentes).

- 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 lactophénole pour le pileipellis
- réactif de Melzer ou sulfovanilline pour les laticifères
- rouge Congo ammoniacal pour les sphérocytes

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 piléique)
- LAMPROcystides : utilisé pour des grosses cystides
- LEPTOcystides : utilisé pour des petites cystides
- GLOEOcystides : 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*...



Charançon sp. , in vivo – loupe binoculaire - photo Jean-Louis Badin

Les préparations microscopiques par dissociation.

Didier Baar ⁽¹⁾

1. Principes de la dissociation.

Les préparations extemporanées sont, de beaucoup, les plus utilisées en mycologie générale. Ces préparations sont destinées à des observations de courte durée, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas, dans l'ensemble, être conservées. Les applications mycologiques les plus répandues de préparations extemporanées sont les techniques de dissociation. Ces techniques sont principalement utiles lors de la détermination d'une récolte (en suivant une clé dichotomique, par exemple). Elles ont l'avantage d'être relativement simples et rapides à réaliser.

Dissocier un tissu, c'est l'écraser progressivement de manière à en isoler les cellules afin de pouvoir les observer plus aisément. Pratiquement, cette technique ne conserve ni la structure des tissus traités, ni les rapports des articles ⁽²⁾ entre eux. Elle permet donc uniquement l'étude d'articles isolés, tels les basides ⁽³⁾, les cystides ⁽⁴⁾ ou les asques ⁽⁵⁾. La dissociation est de ce fait réservée à un usage exclusivement cytologique et ne pourra en aucun cas être utilisée à des fins histologiques.

2. La technique de dissociation.

2.1. Observation de matériel frais.

- Déposer une goutte de rouge Congo ammoniacal sur une lame porte-objets.
- Prélever sur le carpophore un fragment aussi réduit que possible en s'aidant pour ce faire des instruments usuels : ciseaux, scalpel, pincettes et aiguilles à dissection.
- Transférer cet échantillon sur la lame, dans la goutte de colorant.
- Couvrir délicatement la préparation avec la lamelle.
- Chauffer l'angle d'un fer à luter dans la flamme non fumeuse d'un brûleur à gaz ou à alcool puis l'amener au contact d'un bloc de paraffine.
- Déposer à l'aide de cet instrument une goutte de paraffine en fusion sur deux coins adjacents de la lamelle, de manière à la maintenir en place sur la lame. La paraffine doit fumer mais ne peut grésiller, pour bien s'étaler.
- Appliquer délicatement sur la lamelle, au-dessus de l'objet, de petits coups répétés avec le manche d'un scalpel, jusqu'à obtention de la dissociation désirée.
- Observer au microscope et, au besoin, retirer la préparation afin de poursuivre la dissociation.

Il est préférable de réaliser toute préparation microscopique sur un carré de bristol noir. Cette précaution évite la perte des lames et des lamelles, amortit les chocs lors de la dissociation, et maintient la propreté du verre. Le prélèvement se fera très facilement sur une plaque de verre propre, plutôt que sur tout autre support.

D'autres réactifs que le rouge Congo ammoniacal peuvent évidemment être employés, mais on s'expose alors généralement soit à des résultats moins satisfaisants, soit à une dissociation difficile. L'ammoniaque présente dans le colorant ramollit et gonfle les tissus, tandis que le rouge

⁽¹⁾ Didier Baar, décédé accidentellement le 14 octobre 2001, à l'âge de 23 ans.

⁽²⁾ **Articles.** Les champignons, comme les plantes, présentent deux types principaux de cellules: des cellules constitutives et des cellules reproductrices. Chez les champignons, on a donné aux premières le nom d'hyphes et aux dernières le nom de spores.

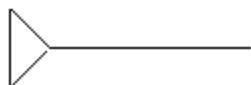
⁽³⁾ **Basides.** Ce terme désigne les articles fertiles caractéristiques des Basidiomycètes. Les spores (généralement par quatre) se forment à l'extérieur de la baside à laquelle elles sont reliées par une sorte de petit pédoncule appelé stérigmate. Les basides, avec les cystides, forment l'hyménium du champignon.

⁽⁴⁾ **Cystides.** L'hyménium, qui est la couche fertile des champignons, présente chez les Basidiomycètes, intercalés entre les basides, des articles stériles souvent remarquables qui sont appelés les « cystides ».

⁽⁵⁾ **Asques.** Terme désignant les articles fertiles caractéristiques des Ascomycètes. Les spores, au contraire de celles des Basidiomycètes, se développent à l'intérieur des asques, généralement au nombre de huit.

Congo est un colorant qui se fixe bien sur les champignons. Il faut toujours déposer la goutte de réactif avant l'échantillon afin d'éviter la contamination du réactif par les spores.

Le fer à luter utilisé est en fait un agitateur à extrémité triangulaire, vendu sous le nom de triangle Drigalski, et composé d'une tige de métal courbée trois fois.



Le fait de maintenir la lamelle sur la lame à l'aide de paraffine a plusieurs effets intéressants. Cette technique empêche le couvre-objets de se déplacer et limite l'écoulement du réactif pendant la dissociation, ainsi que les mouvements gênants du liquide durant l'observation. Le colorant ne peut pas dépasser les limites de la lamelle avant utilisation de la paraffine car celle-ci n'adhère pas correctement sur les surfaces humides.

Il est donc nécessaire de veiller à ne pas déposer une goutte trop importante de colorant sur la lame avant d'y placer l'échantillon à dissocier. La taille de la goutte est fonction de celle de l'échantillon. Plus celui-ci est épais, plus la goutte doit être importante.

Il est généralement conseillé dans la littérature, pour les dissociations, d'utiliser des objets relativement mous afin d'éviter le bris de la lamelle. Un morceau de polystyrène expansé tenu à la main ou un marteau à dissocier (gomme plantée à l'extrémité d'une aiguille à disséquer) sont les instruments les plus répandus. L'utilisation de tels ustensiles, bien que protégeant la lamelle, est à déconseiller, car la dissociation est alors très longue. Un objet dur manié avec délicatesse est beaucoup plus efficace. Il faut cependant éviter absolument d'observer avec un objectif à immersion une préparation dont la lamelle est altérée, car celle-ci risquerait de rayer la lentille frontale de l'objectif. De plus, le contact des réactifs est dangereux pour ces objectifs.

D'autres techniques de dissociation sont proposées dans la littérature : certains conseillent d'appuyer simplement sur la lamelle avec l'ongle, d'autres préconisent de procéder à une dilacération aux aiguilles avant la dissociation proprement dite. Ces techniques donnent généralement des résultats moins satisfaisants, ou sont plus difficiles et plus coûteuses (comme la dissociation ultrasonique) à mettre en œuvre.

2.2. Observation de matériel desséché.

La dissociation d'un exsiccatum ⁽¹⁾ est légèrement plus complexe que celle d'un exemplaire frais, car il faut regonfler et ramollir le matériel sec avant de le dissocier. Elle est cependant tout aussi efficace.

- Réaliser le prélèvement de l'échantillon comme décrit plus haut, puis le déposer dans le mélange de Cendrier contenu dans une boîte de Pétri fermée. Laisser les tissus se regonfler durant 5 min.
- Transférer, au centre d'une lame porte-objets, le fragment régénéré et absorber le plus gros du liquide autour des tissus à l'aide du coin roulé en mèche d'un linge fin, propre et sec (mouchoir en papier blanc, non parfumé).
- Couvrir le fragment d'une goutte de rouge Congo ammoniacal, puis d'une lamelle. La suite des opérations se déroule exactement comme décrit plus haut.

Les constituants du mélange de Cendrier étant diversement volatiles, il est absolument indispensable de le remplacer régulièrement (toutes les heures au moins), et de refermer la boîte de Pétri directement après utilisation. Comme pour les dissociations de matériel frais, il peut être nécessaire d'utiliser un autre réactif que le rouge Congo ammoniacal. Une incompatibilité chimique (sans danger pour le manipulateur !) avec le mélange de Cendrier est alors possible. Il faudra dans un tel cas se contenter de dissocier le fragment sans le régénérer au préalable.

Il est d'usage, en mycologie, de dissocier directement le fragment à observer dans le rouge Congo ammoniacal, sans passer par le mélange de Cendrier. C'est certainement une erreur car, bien que les deux réactifs aient en commun un bon pouvoir regonflant, le mélange de Cendrier ramollit et éclaircit mieux les tissus que le rouge Congo ammoniacal. Celui-ci reste cependant ⁽¹⁾ indispensable pour la dissociation et l'observation car, en colorant les tissus, il augmente le contraste et améliore ainsi la netteté de l'image. Une observation dans le mélange de Cendrier est de toute façon exclue car celui-ci s'étale sur la lame porte-objets plutôt que de rester sous la

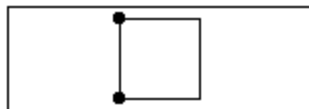
Exsiccatum. Le séchage des champignons est le moyen de conservation le plus employé en mycologie. Les caractères macroscopiques ne sont pas respectés, mais les particularités microscopiques, elles, le sont parfaitement. Un exemplaire sec est appelé un « exsiccatum ».

⁽²⁾ **C.I.** Numéro du Color Index. En règle générale, on ne doit jamais utiliser un colorant pour lequel on ne connaît pas cette référence.

⁽³⁾ **Ammoniaque.** C'est une solution d'ammoniac (qui est gazeux à la température ambiante) dans l'eau. L'ammoniaque concentrée du commerce correspond généralement à des teneurs de 20 à 30% de NH₃ (g).

lamelle. De plus, contenant de l'éther, il s'évapore très rapidement, ce qui contraint l'observateur à le remplacer continuellement.

Voici l'aspect final général d'une préparation extemporanée par dissociation. Les points noirs représentent les gouttes de paraffine.



3. Préparation des réactifs.

Ces produits doivent être stockés dans des flacons hermétiques en verre brun, avec ou sans compte-gouttes, à la température du laboratoire.

3.1. Le rouge Congo ammoniacal.

Mélanger dans un erlenmeyer:

- | | |
|--|------|
| . Rouge Congo (C.I. (2) 22 120) | 0,1g |
| . Ammoniaque (3) concentrée (25% NH ₃) | 9,9g |

Chauffer le mélange au bain marie à 80° C jusqu'à ce qu'il atteigne la température de 35° C, en agitant continuellement avec un thermomètre. Ne jamais dépasser 40° C, sous peine de voir bouillir l'ammoniaque dont la concentration diminuerait alors sensiblement. Une fois les 35° C atteints, retirer l'erlenmeyer du bain marie et le refroidir rapidement sous un courant d'eau très froide, jusqu'à ce que sa température redescende aux environs de 20° C. Filtrer le mélange dans un entonnoir couvert d'un verre de montre et passé au travers d'un bouchon percé obturant un erlenmeyer propre, de manière à ce que le moins possible de vapeurs s'échappent du liquide, qui sera ensuite transféré dans un flacon hermétique de verre brun dont la capacité est comprise entre 50 et 100ml. Il est très important de bien respecter ces conditions de stockage !

La préparation de ce produit est très pénible en raison de l'ammoniac qui se dégage du liquide lors du chauffage. Ce gaz n'est ni toxique ni inflammable mais seulement irritant. Opérer sous hotte aspirante dans la mesure du possible, sinon au moins dans un local bien aéré.

Ce produit se conserve relativement peu de temps car le colorant retourne vite à l'état de poudre à l'intérieur du flacon. Si tel est le cas au moment de l'emploi, il est indispensable de « régénérer » le colorant. Pour ce faire, desserrer légèrement le capuchon, qui doit néanmoins rester bien fixé sur le flacon (il doit y avoir une légère odeur d'ammoniac aux alentours du bouchon). Plonger ensuite le flacon dans un bain marie à 50° (l'eau du bain doit arriver un peu plus haut que le niveau du liquide intérieur), en agitant continuellement, jusqu'à ce que le colorant commence à peine à bouillir. Le retirer aussitôt du bain et le refroidir rapidement sous un courant d'eau très froide jusqu'à ce que sa température redescende à 20° C environ.

Le liquide devrait être redevenu à peu près limpide. Contrôler régulièrement sa qualité en inspirant prudemment les vapeurs 20 cm au-dessus du goulot. L'odeur d'ammoniac doit être insupportable... Si ce n'est pas le cas, alors il faut remplacer le colorant.

3.2. Le mélange de Cendrier.

Mélanger dans un erlenmeyer en ajoutant dans l'ordre les réactifs:

- | | |
|---------------------|--------|
| . Ethanol à 95° | 55ml |
| . Eau distillée | 50ml |
| . Acétate d'éthyle | 25ml |
| . Ether diéthylique | 25ml |
| . Acide acétique | 0,25ml |

Tenir compte du fait que l'éther s'évapore très rapidement !

4. Bibliographie (1).

DE IZARRA, Z.: Introduction à l'étude microscopique des champignons. Société mycologique du Poitou.

LOCQUIN, M. ET LANGERON, M.: Manuel de microscopie. Masson, 1978.

MARCHAL, N.: Initiation à la microbiologie. Dunod, 1992.

(1) Cet article, revu et augmenté, a été tiré d'un travail beaucoup plus important qui a permis à l'auteur de remporter le prix Jacques Kets 1996 de la Société Royale de Zoologie d'Anvers: « *Observation microscopique des Macromycètes.* ». Vous pouvez le consulter intégralement sur mon site : <http://www.champignons-passion.be>



Cheilocystides de *Conocybe apalax*, photo Roberto Fernandez



LES COUPES en microscopie :

un problème évident et peu facile à solutionner !

Tout microscopiste débutant ou confirmé 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 ; 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.

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 !



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 PolyEthylène 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.



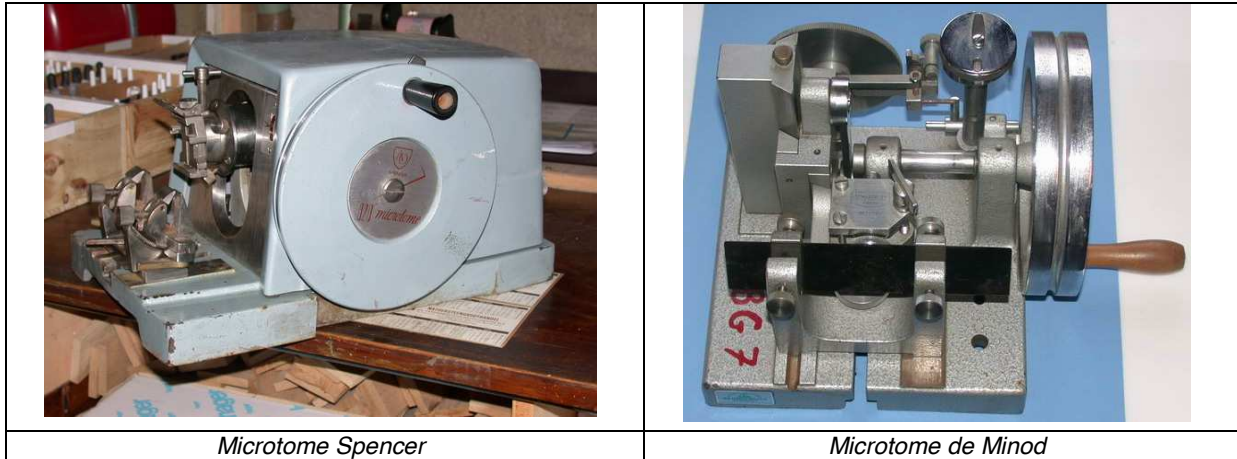
Son prix, avec les modifications effectuées par un spécialiste, est de l'ordre de 400,00 Euro, et se révèle très (trop) élevé à nos yeux ! Il vaut mieux alors chercher un ancien microtome de laboratoire d'occasion... avec de la patience, on finit par trouver !

4. Les « petits » microtomes de laboratoire

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

Le microtome de Minod 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 1.600,00 Euro ; pour un rotatif, compter 3.000,00 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....

Photo extraite du catalogue Euromex



La COLORATION des coupes : limites et réalités !

GENERALITES

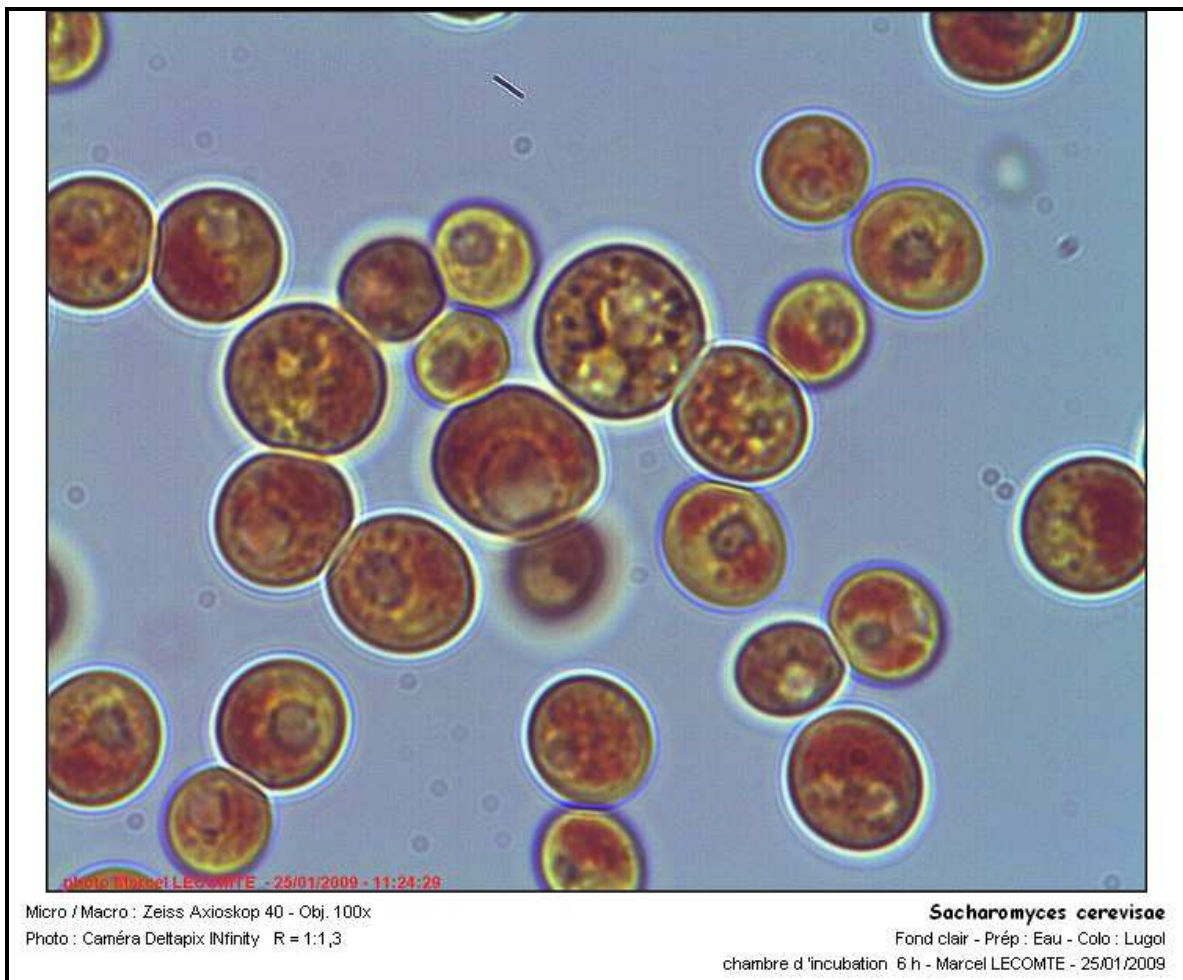
Il suffit de consulter un manuel de technique microscopique pour se rendre compte que la théorie de la coloration joue un très grand rôle en histologie ou en cytologie. Mais comme l'abondance est aussi néfaste que la disette, le débutant se trouve submergé par une quantité incroyable de recettes, où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

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 rencontrez dans les livres que vous serez amenés à consulter tôt ou tard !

- ❖ **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.
 - ❖ **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 de l'ordre de 1/1.000 à 1/10.000ème).
 - ❖ **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.
- ✚ 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.
 - ✚ 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 substance 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.
 - ✚ 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.
 - ✚ 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.
 - ✚ 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.
 - ✚ On parlera de **COLORATIONS COMBINEES** 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.
- ✚ 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.
- ✚ 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 (généralités)

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 ».*

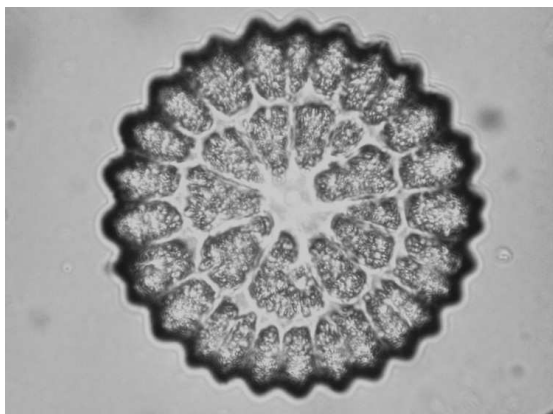
Pratiquement, l'application du principe est souvent moins aisée !

- 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.

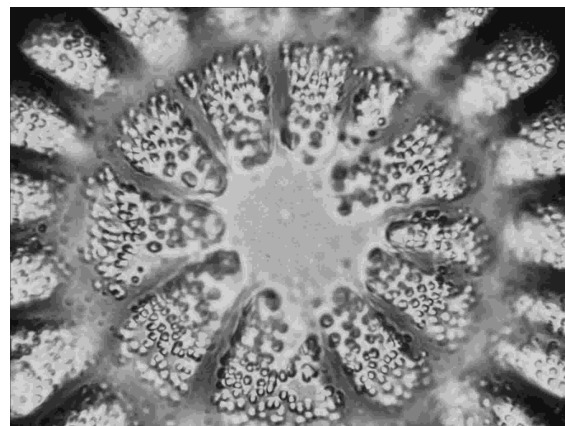
Mode opératoire :

- **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 !

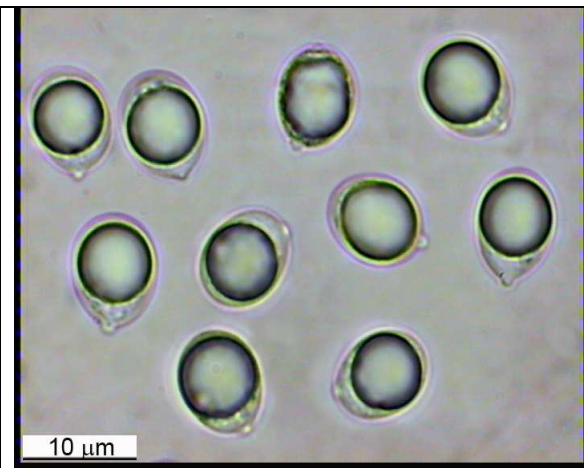


Micro: ORTHOPLAN - Obj: 50 x OK+1,00x
Photo: imc560 R = 1,3,4

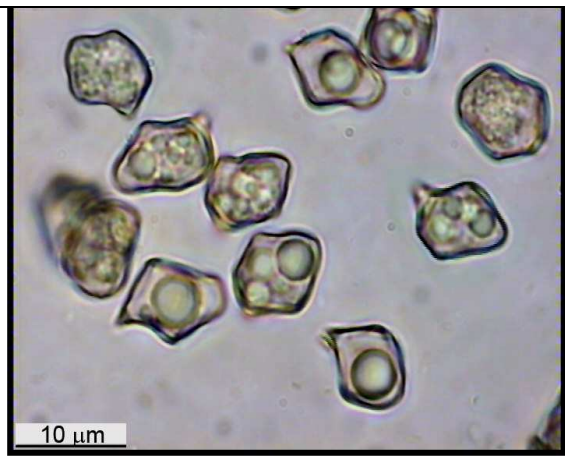


ANTHODISCUS FLOREATUS OAMARU
Fond Clair - Prép: Stryax préparation de DOMINIQUE PRADES - Col: Aucune
Mer - PEYNICHOU JEAN - 19/10/2008

Anthodiscus floreatus, (ensemble et détail) - photos Jean Peynichou



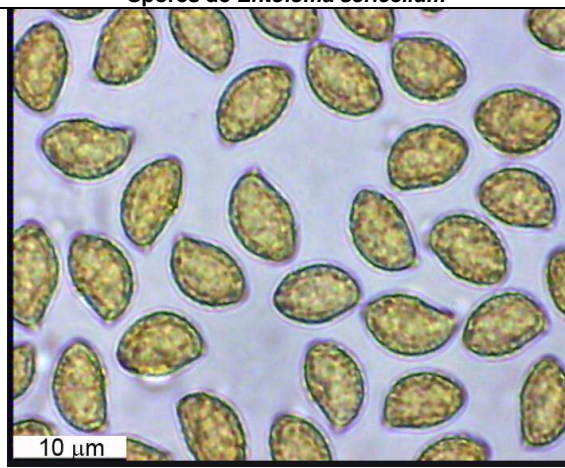
Spores de *Clavulina rugosa*



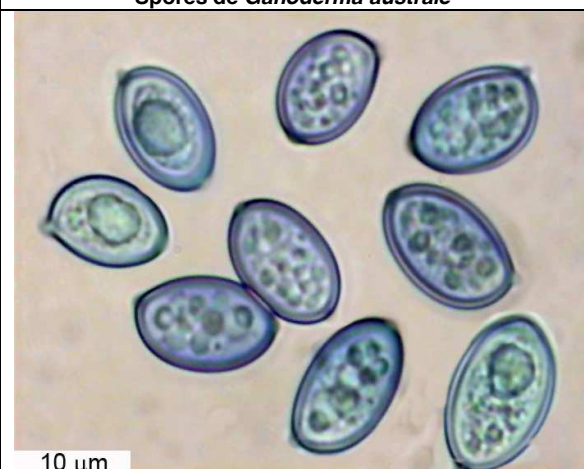
Spores de *Entoloma sericellum*



Spores de *Ganoderma australe*



Spores de *Gymnopilus spectabilis*



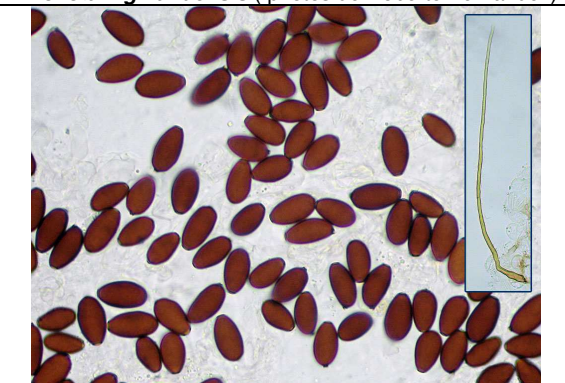
Spores de *Macrolepiota rickenii*



Pholiota highlandensis (photos de Roberto Fernandez)



Ganoderma adspersum (photo Daniel Ghyselinck)



Coprinus auricomus (photo Daniel Ghyselinck)

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.

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.

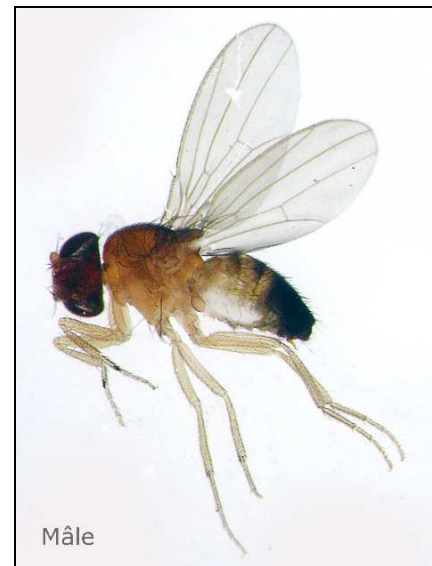
Cette réflexion nous entraîne naturellement à envisager des préparations dites « **définitives** », susceptibles d'être réexaminées après un laps de temps plus ou moins long, de l'ordre de plusieurs années. Pour information, nous utilisons encore actuellement des préparations réalisées en 1967, lors d'études universitaires, ... et elles n'ont quasiment pas vieilli !

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.



Drosophiles sp., mâle et femelles (photos Michel Blaise)

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.

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 de 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

1/. Les fixateurs coagulants simples

Nous en retiendrons trois :

1/ 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 désydratant puissant, comme le sodium, et relève d'un laboratoire) → aussi, oublions le !

2/ 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).

3/ 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.

2/. Les fixateurs non coagulants simples (ils sont nettement plus efficaces

que les fixateurs coagulants)

Nous en retiendrons deux :

1/ 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 (phénol), le thymol, le violet de gentiane (ou cristal violet), le rose Bengale, le xylol (xylène), le benzol (benzène), le toluol (toluène) et d'autres encore.

La courte liste précédente prive d'ingrédients presque toutes les formules traditionnelles des réactifs pour la microscopie comprenant des fixateurs, des colorants, des agents éclaircissants 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.

2/ 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 !

3/. 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 = AFA** (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, sur notre site !

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

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.

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 elles sont très fines. 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 cellulósique ; 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 (ligneeuse ou cellulosique)



2. Généralités relatives à L'INCLUSION

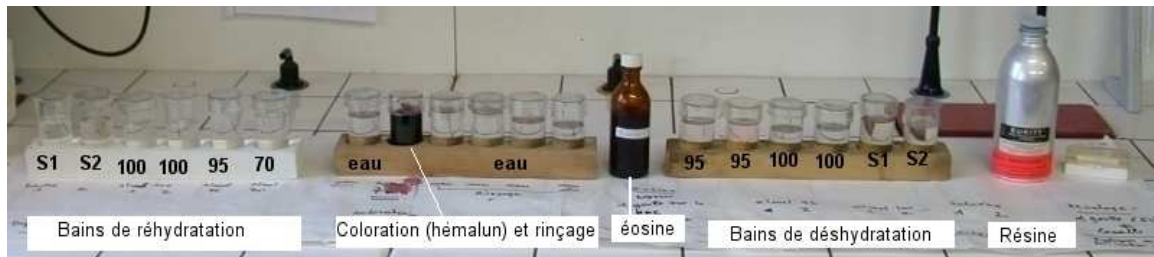
Il s'agit d'enfermer l'objet qui servira à effectuer des coupes très fines, dans une masse « plastique », qui va la pénétrer dans les moindres recoins de chaque cellule. Cet objet a pu être coloré en masse au préalable, ou il sera coloré sur coupes après l'inclusion.

L'avantage de cette technique, c'est qu'on peut ensuite réaliser facilement des coupes très fines au microtome et choisir sans restriction le sens de coupe (surtout si on a réfléchi au sens de coupe lors de l'inclusion).

La plus utilisée, et depuis très longtemps, est l'inclusion à la paraffine. Mais sa mise en œuvre est longue et lourde, nécessite l'utilisation de produits dangereux qu'il vaut mieux utiliser sous une hotte, surtout s'il ne s'agit que de réaliser quelques coupes.

La paraffine est un mélange d'hydrocarbures solides saturés résultant de la distillation du pétrole ; son nom (*Parum affinis*) indique ses faibles possibilités d'affinité chimique. Elle est insoluble dans l'eau, très peu dans l'alcool (1 %), peu dans l'acétone (2,5 %), et nettement plus dans le toluène (10 %), le chloroforme (11 %), le xylol (12 %). Pour imprégner un objet de paraffine, il faut donc d'abord le déshydrater à l'alcool (pour chasser l'eau) puis l'imprégner d'un solvant de la paraffine afin de chasser l'alcool.

Si elle s'avère obligatoire pour du tissu animal ou végétal, 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 deux types d'inclusion, à base d'alcool polyvinylique (PVA) pour l'un (mais il n'est valable que pour l'inclusion de pièces très petites et minces), et de polyéthylène glycol (PEG) pour le second, qui semblent beaucoup plus simples d'emploi !

Pour le PVA, nous utilisons une solution très concentrée, de 35 à 39 g/litre d'eau, qui est proche du seuil de saturation situé à 40 g/L. Cela permet d'obtenir des blocs d'inclusion plus épais qu'un simple film.

Le PEG est un produit semblable à la paraffine, avec un point de fusion du même type. Il en existe une multitude de formes, mais nous utilisons le PEG 4000 ou 20000. Il présente un inconvénient majeur, que nous n'avons pas encore pu contourner : les coupes sont très friables et le PEG durci se transforme en poussière.

Technique opératoire de l'inclusion à la paraffine :

1^{ère} étape : la DESHYDRATATION par un alcool :

Utiliser des petits tubes de Borrel afin d'économiser au maximum les produits !

- Après fixation, l'objet a été lavé soigneusement.
- Les pièces fixées sont lavées rapidement dans 2 bains d'alcool à 90° (éthanol).
- Les plonger ensuite dans l'alcool absolu (3 bains).
- En comptant ½ heure par bain, cela fait 2 h ½.
- Pour contrôler la bonne déshydratation, verser du xylol dans le tube : il doit rester limpide ! S'il se trouble un tant soit peu, il faut à nouveau plonger dans l'éthanol absolu.

Quelques conseils !

ATTENTION à la dilution de l'alcool : elle se pratique selon les indications de la table de Gay-Lussac et n'a rien à voir avec une proportionnelle ! Exemple : pour faire de l'alcool à 70° avec de l'alcool à 90°, il faut ajouter 31,05 ml d'eau distillée à 100 ml d'alcool à 90°....

En raison du coût de l'éthanol absolu, on peut utiliser d'autres alcools pour les 3 derniers bains :

- l'alcool méthylique (ou méthanol)
- l'alcool amylique (qui sera éliminé par le toluène)
- l'alcool butylique

2^{ème} étape : l' **IMPREGNATION** par un solvant de la paraffine (éclaircissement) :

Cette opération consiste à chasser l'alcool qui imprègne l'objet déshydraté, à l'aide d'un solvant de la paraffine.

Les plus utilisés sont le benzol et le toluène (les plus volatiles et les moins chers), l'essence de bois de cèdre et le xylol (ce dernier est cher et durcit très fort les objets).

- verser assez de toluène pour recouvrir la pièce à imprégner
- l'alcool, suite aux différences de densité, va passer au-dessus du toluène (ne pas agiter durant toute l'opération) et la pièce doit rester au bout du compte dans un bain de toluène pur, surmonté par l'alcool éliminé (enlever d'abord celui-ci avec une pipette avant de sortir l'objet du tube...)
- effectuer l'opération en 3 bains successifs de 30 minutes
- l'objet traité devient translucide à transparent
- la réussite de l'inclusion va dépendre de la rigueur de cette opération d'élimination de l'alcool absolu



3^{ème} étape : l' **IMPREGNATION** dans un bain de paraffine chaude : (voir les détails ci-dessous)

4^{ème} étape : l' **INCLUSION** définitive : (voir les détails ci-dessous)

L' INCLUSION (tableau comparatif)	
Dans le PEG (PolyEthylène Glycol)	Dans la PARAFFINE
<p>1. Les pièces ont été rincées 3 fois dans l'eau distillée, puis égouttées.</p>	1a. Laver et placer dans l'alcool à 96°
	1b. Répéter les bains d'alcool de 3 à 9 fois, selon la taille de l'objet à déshydrater.
	1c. Terminer par un bain de trichloréthylène, qui est préférable à l'éthanol absolu.
	On peut aussi déshydrater au dioxane ou à l'acétone : ces deux produits présentent même des avantages incontestables, MAIS ils se révèlent dangereux à l'utilisation si on ne dispose pas d'un laboratoire équipé.
<p>N B : toutes ces opérations sont effectuées sur une période de 24 heures !</p>	
<p>A partir d'ici, tout le travail s'effectue sur plaque chauffante ! Nous utilisons à cet effet une plaque chauffante de laboratoire (qui a l'avantage d'être munie d'un thermostat) ou, à défaut, une plaque chauffante de cafetière électrique de 750 W).</p>	
<p>2. Faire fondre du PEG 4000 pur dans une coupelle en pyrex (on obtient un liquide complètement transparent) : le point de fusion est à 54-58° C.</p>	<p>2. Préparer un mélange de trichloréthylène (25%) et de paraffine (75%) et maintenir légèrement au-dessus du point de fusion (+/- 55 °)</p>
<p>3. Y laisser les pièces durant 6 heures afin de permettre une bonne imprégnation.</p>	<p>3. Y laisser les pièces au moins 24 heures, jusqu'à élimination complète du solvant.</p>
<p>4. Faire fondre du PEG 20000 pur dans une autre coupelle en pyrex (le point de fusion est à 58-63° C.) et y placer les pièces durant 1 heure en les sortant directement de l'autre bain.</p>	<p>4. Transférer ensuite dans 1 bain de paraffine pure, bien fondue, durant le même laps de temps au moins.</p>
<p>IMPORTANT : la pince qui sert à passer d'un bain à l'autre doit être bien chaude également l'objet doit être bien immergé dans le liquide d'inclusion</p>	

<p>5. Verser le PEG 20000 bien chaud dans un moule (les bacs à glaçons en PVC conviennent parfaitement) et y placer la pièce en prenant bien soin de l'orienter pour les futures coupes (c'est assez facile car le liquide est transparent à chaud).</p>	<p>5. Verser la paraffine chaude dans un moule, y placer les pièces, et les orienter.</p>
<p>6. Refroidir le moule à l'air puis à l'eau (le PEG prend une coloration beige jaunâtre) ATTENTION ! très peu de temps en contact avec l'eau, qui est le solvant du PEG.</p>	<p>6. Refroidir le moule à l'air puis à l'eau.</p>
<p>Ces opérations (2 → 6) seront effectuées en 7 heures !</p>	<p>Ces opérations (4 →7) vont demander au moins 48 heures !</p>
<p>7. Démouler et essayer les blocs avec soin</p>	<p>7. Démouler.</p>



Un bloc de PEG qui vient d'être démoulé



Le bloc de PEG est fixé sur le mandrin de support du microtome



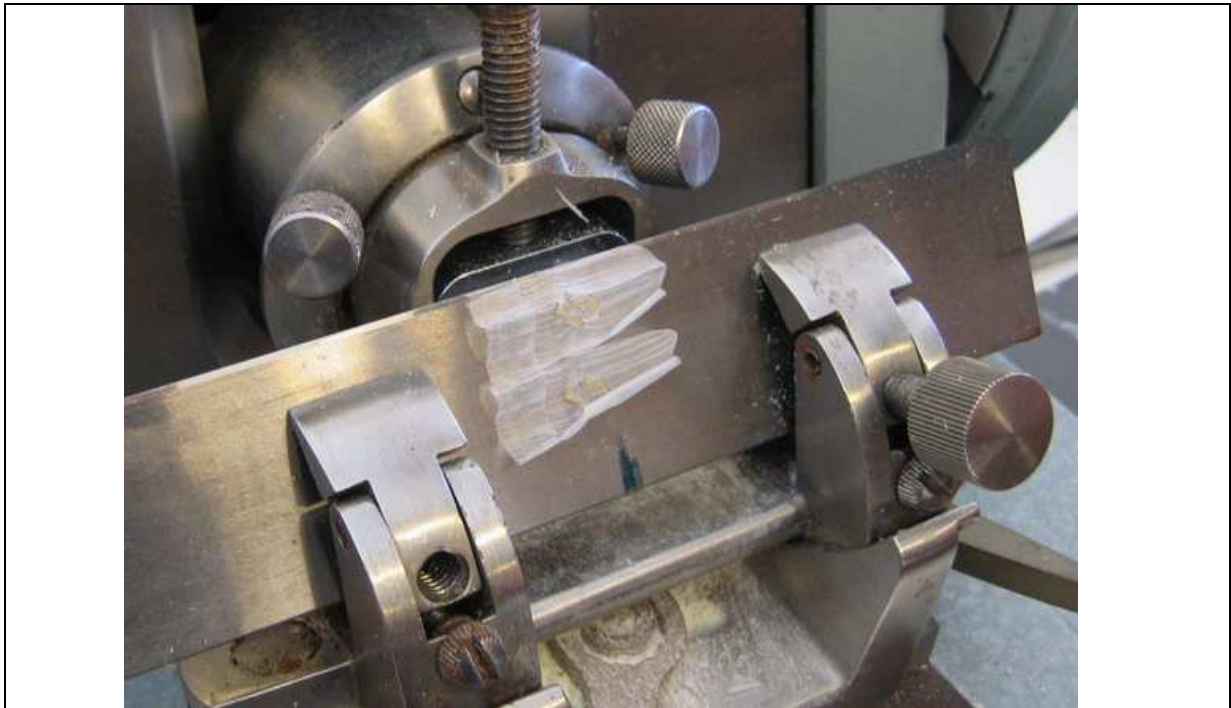
Des éléments inclus dans un bloc de PVA



Le bloc de PEG est fixé sur le mandrin de support du microtome



On aperçoit nettement la pièce qui est incluse dans le bloc de PEG, de même que le couteau du microtome à manivelle, qui est en train d'entamer ce même bloc

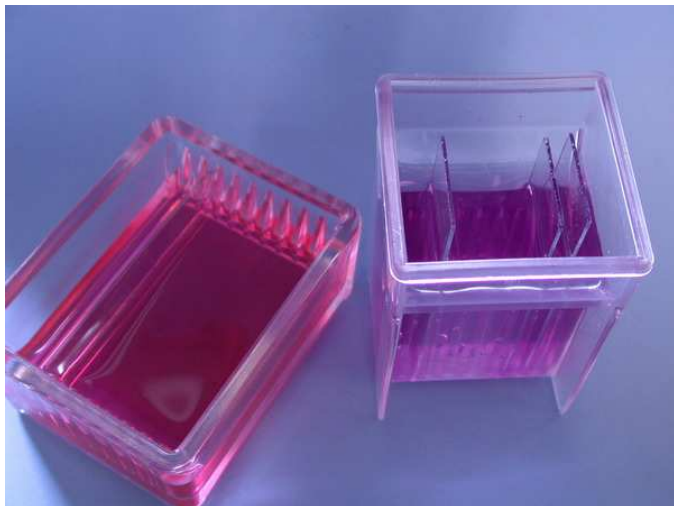


Le microtome en action : les rubans se forment sur la lame, sont recueillis sur la main ou une feuille de papier ; on voit nettement la coupe au centre de la paraffine

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 principales applications.



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 du Cercle des Mycologues du Luxembourg Belge.

Cuves à coloration pouvant accueillir 10 lames à la fois

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 (SDS)
- **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 ornementations 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.

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.

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 figures 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 Cléménçon

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*, *Tephroclybe* et *Lyophyllum*.

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

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 :

Ils sont utilisés 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 ou gris sombre, bleu profond, 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.

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 nombreuses Aphylophorales.

SONT AMYLOIDES, notamment :

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

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 (noté J+) 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).

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.

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 des laticifères
- ❖ **la sulfo-vanilline** : (S.V.) colore en bleu noir ou en gris le contenu des cystides et des 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).

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

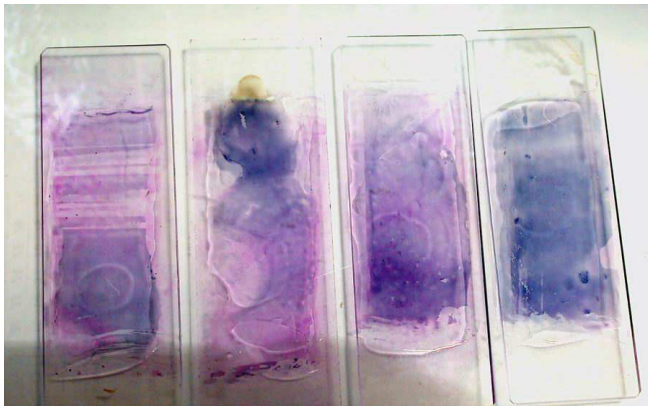
LE COLLAGE des spores et des coupes :

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 ?

→ 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 une solution de salicylate de sodium (1 g pour 5 cc 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 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 ?



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 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 !

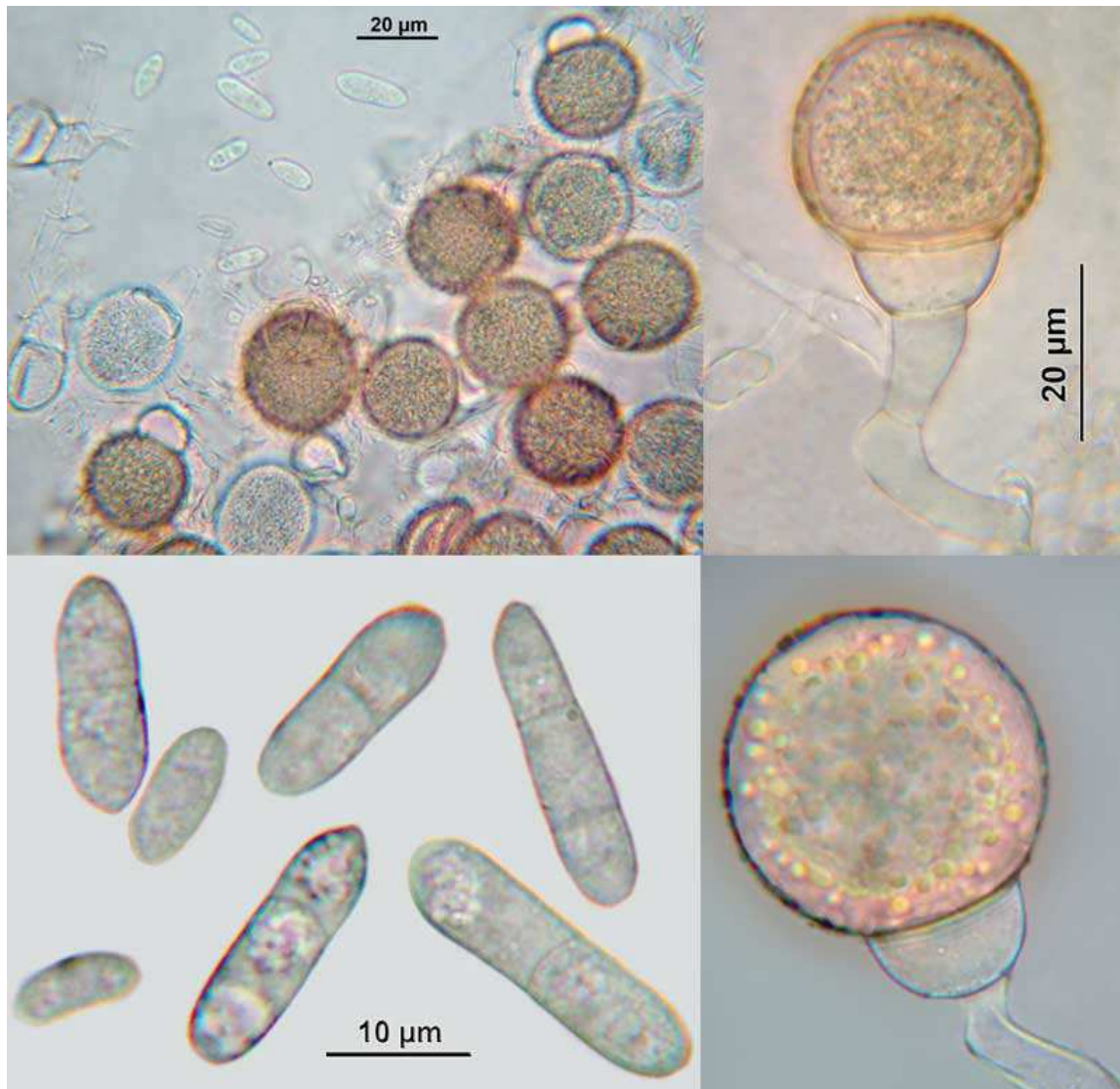
Cela signifie en clair que le n d'un objectif devra être le plus élevé possible, de même que celui du milieu d'observation utilisé.

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.



Mycogone rosea, photos Jean-Louis Cheype

LES TYPES DE PREPARATIONS

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).

4. CHLORAL LACTOPHENOL

5. GLYCERINE ou GLYCEROL

Ce sont deux 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, si non 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 lactophénohé**

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

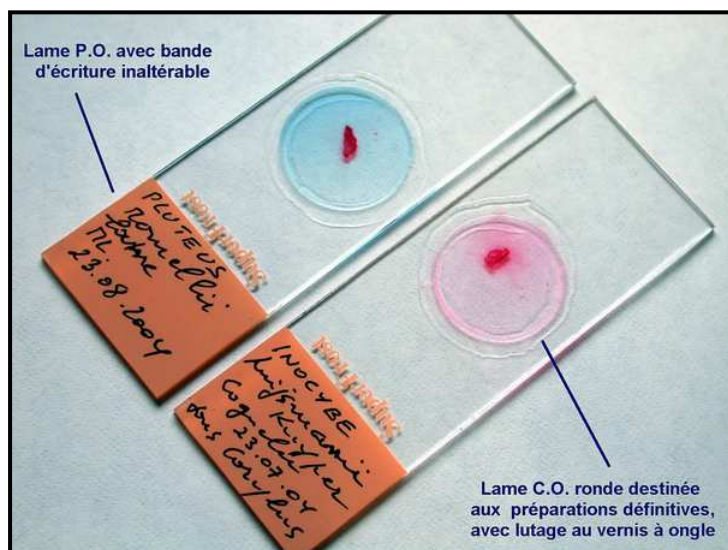
Ces bulles constituent d'ailleurs le problème majeur dans ce type de préparation, et la pose de la lame couvre-objet notamment, demande beaucoup de soin.

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, EUKITT ou NEO-ENTELLAN

Ce sont des milieux de montage « modernes » qui sont couramment utilisés dans les laboratoires et par les préparateurs professionnels. Ils ont leurs avantages et leurs inconvénients, le plus important étant que les bulles d'air ne disparaissent jamais.

3. AQUATEX

Ce produit très récent possède un immense avantage à nos yeux car son solvant est l'eau, ce qui résout les problèmes inhérents à l'emploi du baume du Canada. Il polymérise de manière remarquable et il n'est même pas nécessaire de luter après son utilisation. Depuis quelques mois, nous l'utilisons très fréquemment pour tous les montages fragiles, notamment en mycologie.

4. CONSERVATEUR de HOYER

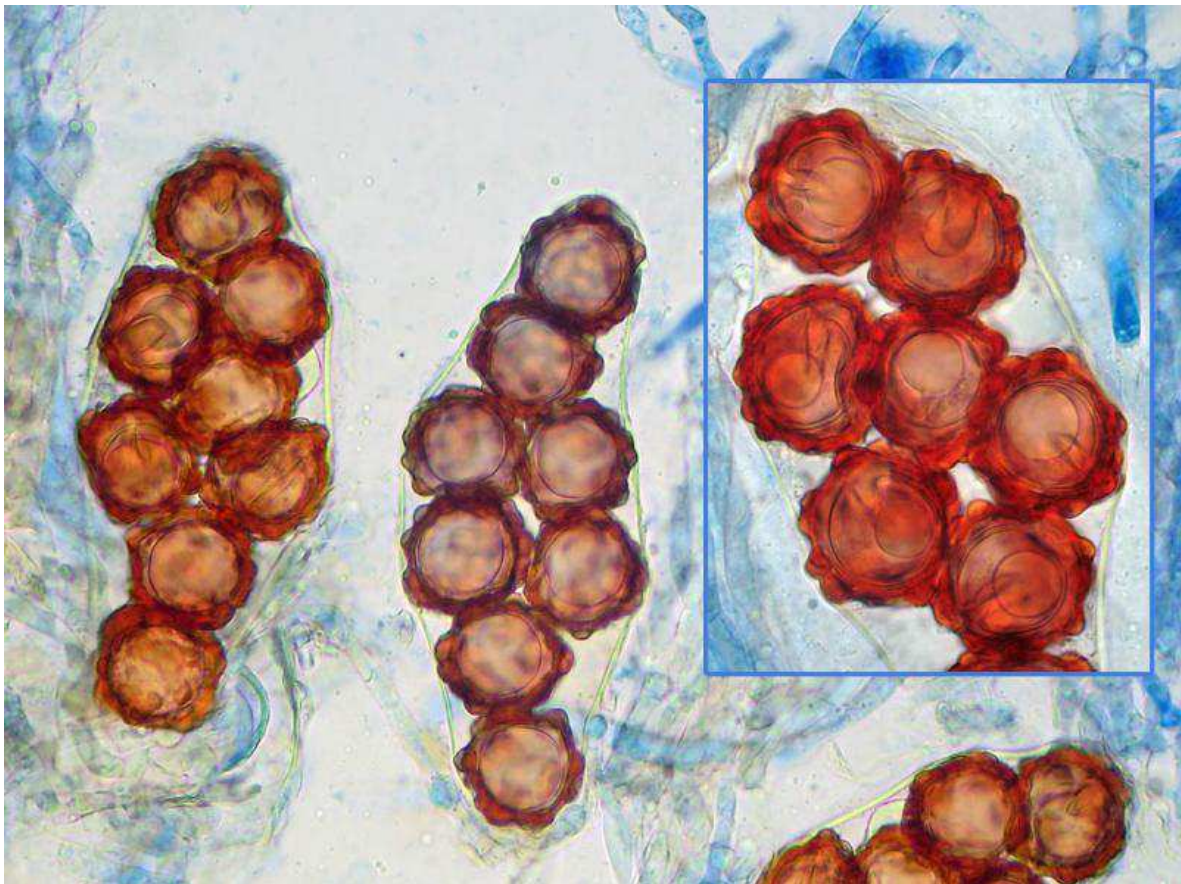
Bon produit à base de gomme arabique, et dont le solvant est l'eau ; il convient donc très bien pour la mycologie !

Attention, il décolore presque immédiatement la Fuchsine de Ziehl.

5. MERCKOGLASS

Ce produit de montage remarquable remplace tout simplement la lame couvre-objet lorsqu'on réalise des frottis. Il remplace avantageusement des lames CO 24 x 40 mm par exemple, qui sont très difficiles à poser sans bulles d'air. Après quelques essais, le tour de main est acquis et on se laisse tenter par les frottis de pollens, de spores ou autres humeurs physiologiques.

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...



Asques et ascospores de *Hydnoria tulasnei*, Ascomycète, Tuberaceae, photo Daniel Ghyselink

A propos du PVA (Alcool polyvinylique), de son utilisation, de ses limites, et du montage des Arthropodes

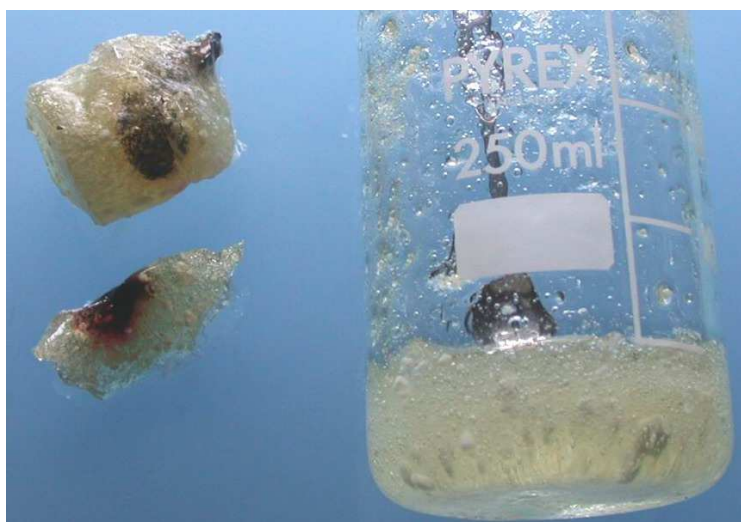
Texte inédit (correspondance personnelle), reçu de Paul LEROY, le 30/09/2002

UTILISATION pour l'INCLUSION

Je dois apporter ici une précision. Le PVA ne coagule pas en masse comme par exemple la paraffine ou la gélatine où, quel que soit l'état, le volume reste le même. La solution de PVA à 15%, placée dans un moule rempli à ras bord, ne donnera pas un bloc de même volume. Après évaporation de l'eau, il ne restera qu'une mince pellicule de produit solide sur les bords et le fond du récipient. L'objet sera quand même inclus dans cette gangue qui aura plus ou moins l'épaisseur d'un « Bristol ». Peut-être qu'une solution plus concentrée aurait plus d'épaisseur (*1), mais je n'ai pas essayé.

Pour pratiquer des coupes sur cette inclusion à l'aide d'un microtome à main du type « Rancier », je ne vois pas d'autre solution que de l'insérer dans la moelle de sureau. Mais avec cette méthode, je doute fort de la minceur des coupes.

J'ai essayé dans le passé d'utiliser cet appareil, mais je l'ai vite abandonné car le résultat fut décevant. Désormais je ne fais plus que des coupes à main levée, qui sont beaucoup plus fines et tranchées dans le sens que je choisis.



Ne réalisant généralement que des coupes de Pyrénomycètes, je pratique directement sur le support et de préférence sur du matériel sec. Toutefois, lorsqu'il s'agit de périthèces très petits ou peu ancrés sur le support, donc difficiles à couper, alors j'utilise le PVA.

Voici ma méthode !

S'il s'agit de matériel frais, je le place directement dans la solution. Pour les exsiccata, je les mets à regonfler dans l'eau nature pendant une ou deux heures. Pour l'inclusion, je n'utilise pas de récipients creux ; je mets quelques gouttes de PVA sur une lame porte-objet, j'y place les ascomes et je laisse durcir hors poussière. Il faut au minimum deux jours pour que la résine soit solide. Quand c'est sec, la pellicule se détache assez facilement du support, un peu comme une pelure. Je la place alors sur un plastique dur pour trancher car sur le verre il faudrait changer de lame de rasoir à chaque coupe.

Pour obtenir des coupes minces et bien tranchées, n'utiliser que des lames neuves. Que ce soit du matériel inclus ou non, je pratique toujours sous la loupe binoculaire.

Les lames de Basidiomycètes, les petits Discomycètes entiers, et des fragments de grosses espèces peuvent aussi être inclus de cette manière. Qu'ils soient fixés ou non, il est préférable de les laisser séjourner 24 ou 48 heures dans un tube contenant du PVA et qui sera fermé. Ceci est indispensable afin qu'ils s'imprègnent bien de produit sans que celui-ci durcisse. Après ce délai, mettre sur une lame comme décrit plus haut.

La réalisation de coupes à l'aide de PVA est une méthode empirique, mise au point par un amateur pour des amateurs. Il serait bien sûr plus simple d'inclure dans la paraffine et utiliser un microtome rotatif. Seulement, les cellules de champignons sont tellement fragiles, hormis les spores qui sont très résistantes, qu'elles sortent méconnaissables du traitement de déparaffinage.

Le seul appareil permettant la réalisation de coupes minces et régulières, avec les champignons charnus et aussi les Pyrénomycètes, est le microtome à congélation. Pour l'inclusion, pas de PVA ; la solution généralement employée est le sirop d'Apathy, très soluble dans l'eau. Hélas ! Cet outil n'est pas à la portée des amateurs que nous sommes.

Utilisation pour la conservation définitive

Le PVALPh (Alcool Polyvinylique Lacto Phénolé) présente des avantages certains pour la réalisation de ces montages. Toutefois, je ne considère pas le lutage comme un problème important, c'est même un sujet mineur. D'ailleurs, en ce qui me concerne, je lute toujours les préparations faites avec ce milieu.

Par contre, s'il est intéressant pour le montage d'objets divers, à condition que ceux-ci ne soient pas trop épais, c'est surtout parce qu'il supprime l'emploi de solvants hydrocarbures. Avec les milieux contenant ces solvants, comme du baume du Canada ou d'autres, la déshydratation est impérative.

Comme déjà signalé pour le déparaffinage, les cellules des champignons sont très déformées par les alcools forts et le xylène nécessaires à la déshydratation. C'est donc pour cette raison que le PVALPh est apprécié en mycologie, puisque le solvant est l'eau. (*2)

Il n'est évidemment pas question de déshydratation à l'alcool absolu. C'est tout à fait déconseillé, d'abord parce qu'il y a incompatibilité avec le PVA, celui-ci étant peu ou pas soluble dans l'alcool. Ensuite, l'alcool va brutalement retirer l'eau des cellules, entraînant leur « ratatinement » et le PVALPh n'y pénétrera pas pour les regonfler. Les pièces ainsi montées seront toutes noires vues sous le microscope puisque remplies d'air.

Pour tous les montages, quel que soit le milieu, les pièces en attente doivent toujours être baignées dans un liquide. Quand il s'agit de montage en milieu aqueux, les pièces seront prélevées dans le bain de préparation où elles séjournent. Ce bain peut être de l'eau nature, de l'eau additionnée d'acide lactique, du lactophénol de Amann, et, pour les milieux contenant de la glycérine, de l'eau glycinée.

Pour les Arthropodes ou larves diverses conservés dans l'alcool à 60-70°, les faire séjourner dans l'un ou l'autre de ces bains avant montage. Et je répète encore une fois : pas d'alcools forts avec le PVALPh même si les Arthropodes supportent ce traitement sans dommage.

Il n'y a aucun inconvénient à ce que l'objet contienne de l'eau ici, puisque le milieu dans lequel on l'installe en contient lui-même une forte proportion.

La hantise de l'opérateur est la présence de bulles dans la préparation mais surtout d'air à l'intérieur de l'objet. Il est donc important d'opérer avec le maximum de précautions pour éviter ce désagrément. Il faut savoir que l'air ainsi emprisonné ne disparaîtra pas spontanément. Cela vaut pour tous les milieux de montage excepté le baume du Canada où l'air disparaît progressivement, mais encore faut-il qu'il n'y en ait pas trop et cela dépend aussi de certaines conditions de préparation de l'objet. Nous verrons tout cela un peu plus loin dans la note consacrée aux méthodes de montage selon les milieux.

La coloration

La mauvaise tenue des colorants et même leur disparition totale ne dépend pas obligatoirement de la fixation. Toutes les pièces colorées, animales ou végétales, même fixées et mordancées, se décolorent toujours progressivement, même parfois totalement, lorsqu'elles sont montées dans un milieu contenant du phénol : c'est lui le responsable du phénomène.

Avec le PVALPh, c'est inévitable puisque c'est un des composants dans une assez forte proportion. Même les pièces fortement colorées au bleu coton lactique, carmin acétique, fuchsine acide, etc, finissent par s'atténuer. La seule manière de conserver la coloration des pièces, est de colorer le milieu lui-même. Seulement, ce n'est pas très varié car, à part le bleu coton, je ne vois pas quel colorant pourrait être compatible pour la coloration en masse. Sinon, le bleu coton et le bleu de méthyle poudre se mélangent très bien et dans les mêmes proportions que pour le bleu lactique : 0,5 %.

Le même problème de décoloration progressive, quel que soit le colorant, se retrouve avec les milieux glycélinés sans acide (gélatine glycélinée, PVA glycéliné) s'ils ont été aseptisés au phénol. Il faudrait donc trouver un autre antiseptique, ou plutôt antifongique, qui n'ait pas cet inconvénient. N'importe comment, il n'est pas envisageable de ne pas protéger ces milieux car ils sont d'une très grande sensibilité aux champignons surtout. (*3)

Malgré cela, avec quelques astuces, j'arrive à conserver certaines colorations.

Avant d'aborder la méthode de montage, je vais citer quelques milieux et tout d'abord ceux qui sont solubles dans les hydrocarbures. Il en existe sûrement un certain nombre, mais je ne parlerai que de ceux que j'ai utilisés et qui sont au nombre de trois :

- le baume du Canada (résine naturelle extraite du sapin baumier)
- des résines de synthèse : Eukitt et Entellan (*4)

Ces deux dernières sont des marques commerciales et sans doute peu différentes de composition. Les qualités et les défauts sont identiques.

Personnellement et pour diverses raisons, dont les larges marges de tolérance d'utilisation, je préfère le baume du Canada. Il permet de monter des objets relativement épais et le fait qu'il « digère » spontanément les bulles d'air n'est pas le moindre des avantages.

Le reproche mineur qu'on puisse lui faire est d'être lent à sécher et de prendre une couleur ambrée au fil du temps. S'il durcit assez rapidement sur les bords (quelques jours à quelques semaines selon l'épaisseur), au centre de la préparation, il restera « pâteux » pendant plusieurs années.

Ceci n'est pas vraiment un inconvénient puisqu'au bout de quelques semaines, on peut le manipuler sans risques. Je dirais même que c'est plutôt un avantage pour plusieurs raisons, nous le verrons plus loin. Quant au jaunissement, il n'altère en rien la qualité.

Le grand avantage des autres produits est la prise rapide : au bout de 24 heures, les montages sont solides. Ces résines sont incolores, d'une bonne qualité optique, et ne jaunissent pas avec le temps.

Par contre, elles se comportent mal avec les pièces épaisses. Ce sont certainement les plus employées dans les laboratoires pour la conservation des frottis, étalement de sang et coupes histologiques très minces. Avec ces milieux, attention aux bulles : elle ne se résorbent pas, même les plus petites. Une fois incluses, c'est définitif et elles risquent même de s'amplifier au séchage. Je suppose que c'est la prise rapide du produit qui provoque les retraits et les vides sous la lamelle dans le cas d'objets épais, et aussi la non résorption des bulles.

Avec le baume du Canada, ces incidents sont bénins et on les répare facilement même s'ils se sont produits longtemps après le montage. Il en va différemment avec l'Eukitt et l'Entellan. C'est justement là que le séchage rapide devient un inconvénient.

Pour combler les vides, il faudra d'abord « ramollir » au xylène avant de déposer une goutte de résine sur le bord de la lamelle. Malgré les précautions prises lors de l'opération, il est très rare que la résine pénètre sans enfermer une grosse bulle ou plusieurs petites. Les tentatives pour les expulser sont généralement vaines ou très dommageables pour la lamelle et l'objet.

À cause de ces désagréments, j'emploie donc rarement ces résines et seulement pour de très petits arthropodes. Aucun de ces trois milieux n'est miscible à l'eau. Les solvants sont le xylène ou le toluène, aussi le benzène, mais il vaut mieux éviter ce dernier. Les pièces à monter dans ces milieux devront être parfaitement déshydratées. Ils sont tous nocifs à cause du solvant et, pour la même raison, inflammables. Ne les employer qu'en prenant les précautions indispensables. Surtout ne pas fumer car il y a risque d'incendie et d'intoxication.

Les milieux aqueux n'ont pas ces inconvénients, sauf le PVALPh qui est toxique par inhalation. Là aussi, il est préférable d'éviter la cigarette ou le contact avec les doigts souillés.

Ces milieux sont aussi assez nombreux. Le plus ancien est certainement la glycérine gélatinée, qui a toujours ses adeptes. Le conservateur de HOYER est lui aussi couramment employé, ainsi que la gomme au chloral qui est de composition presque égale, hormis le chloral qui est en quantité bien moindre. Ces produits sans acide permettent la coloration au Rouge Congo.

Et pour terminer, mais la liste n'est pas exhaustive, le PVALPh et dérivés du PVA. A cause de l'acide, le PVALPh est incompatible avec le rouge Congo, mais il est aussi déconseillé pour le montage des petits crustacés et tous les objets contenant de l'oxalate de calcium. Non seulement ça le fait disparaître, mais s'il est assez abondant, il y a dégagement de gaz, donc production de microbulles.

Même si ces produits sont incontestablement très pratiques et les montages qui en résultent très convenables, le baume du Canada est à mon avis supérieur quant à la netteté.

On trouve dans le commerce du baume du Canada au xylol, prêt à l'emploi. Personnellement, je ne le trouve pas de très bonne qualité car trop fluide (le xylol coûte moins cher que le baume). Je préfère le baume sirupeux que je dilue à ma convenance. Toutefois, ce produit est très cher et on ne le trouve que chez les grands distributeurs. Sous cette forme, il ne contient pas de xylol car il est prévu à d'autres fins que les montages microscopiques ; il a la consistance et l'aspect du miel liquide.

Passons maintenant à la préparation des objets et ensuite à la manière de les monter.

Je ne m'attarderai pas sur la préparation des champignons, car le sujet a déjà été abordé dans d'autres publications. D'autant plus que pour eux, il n'y en a pratiquement pas puisque seul le montage en milieu aqueux est envisagé. (*2)

En revanche, les Arthropodes ne peuvent être montés à l'état brut.

S'ils sont d'une certaine taille, ainsi que les hématophages gorgés de sang, **ils doivent être vidés**. Le moyen le plus efficace est le traitement à la potasse à 10 % ou 30%. La solution à 10 % a un effet lent ; on peut l'activer par chauffage, mais je n'y suis pas favorable. Personnellement, j'emploie toujours la solution à 30% et là, il faut respecter la durée du séjour, car une durée trop longue fragilise la pièce. La potasse fait aussi disparaître les pigments, surtout internes, car ceux de la cuticule, généralement bruns à noirs, sont plus ou moins éclaircis mais non éliminés.



Ixodes ricinus (tique), face ventrale – préparation définitive – préparation Paul Leroy, photo Marcel Lecomte, x4

La pièce, une fois vidée, devra impérativement passer dans un bain acidifié pour arrêter l'effet de la potasse. Ensuite, rincer à l'eau pour éliminer l'acide.

Voici ma méthode avec laquelle j'obtiens de très bons résultats.

Une fois la bestiole vidée et désacidifiée, je l'installe sur une lame dans une goutte d'eau, sans quoi elle colle à la lame et le risque est de casser les appendices ou de la déchirer. À l'aide d'aiguilles très fines, j'agence tout ce qui doit être mis en évidence et je recouvre d'une lamelle. Celle-ci sera maintenue par deux petits compresseurs de ma fabrication, assez serrés pour bien aplatir la pièce sans l'éclater. Le tout sera immergé dans un bac d'alcool à 90 ou 95 ° (j'utilise pour cela l'alcool à brûler), pendant 24 heures. Ce bain va durcir l'objet qui restera rigide après enlèvement de la lamelle.

Avant le montage, il faudra affiner la déshydratation. Les alcools forts contiennent un peu d'eau et même l'alcool absolu, après débouchage, n'est plus parfaitement anhydre. Si le montage n'intervient pas sitôt cette opération, on peut laisser séjourner les pièces dans des alcools forts ou le xylène après déshydratation. Cette méthode s'adresse aux objets à monter dans le baume du Canada ou les résines de synthèse.

Avec les bestioles vidées, pas de problème : le baume pénètre bien les téguments. En revanche, certaines, petites à très petites, peuvent être montées sans être vidées ; idem pour d'autres, parce qu'elles ne peuvent être traitées à la potasse, (les vers en particulier, Nématodes et Plathelminthes). N'empêche, il est indispensable de les aplatir tout en leur donnant de la rigidité.

Donc, Vers ou Arthropodes non vidés, le séjour dans l'alcool va les durcir mais aussi rendre la cuticule imperméable au baume et ça c'est un problème. Lorsque l'objet sera placé dans la goutte de baume, le xylène, très fluide, va en sortir et le baume environnant n'y pénétrera pas car trop épais. On se retrouve alors avec une pièce vide et donc toute noire sous le microscope. Pour y remédier, toutes les pièces non vidées et durcies à l'alcool seront, à la sortie du xylène, placées dans un récipient contenant du baume très fluide (presque du xylène pur).

Ce récipient doit être peu profond afin de pouvoir reprendre facilement les pièces sans risque de les abîmer. Ne pas boucher hermétiquement. Laisser dans ce bain plusieurs jours : le baume fluide doit les imprégner progressivement et s'épaissir suite à l'évaporation du solvant. S'il s'épaissit trop vite et que les pièces ne sont pas parfaitement imprégnées, rajouter du xylène et prolonger le bain. Lors du montage, le baume du bain et celui où la pièce sera installée ayant plus ou moins la même consistance, le phénomène ne se reproduira pas. Éviter toutefois d'appuyer sur la lame à l'aplomb de l'objet, le baume risquant de sortir sous la pression. Pour maintenir la planéité de la lamelle, installer sur les bords deux compresseurs peu serrés.

Le vidage des Arthropodes est une opération assez délicate : toujours opérer avec précaution pour ne pas retrouver une guenille informe. À mes débuts, je procédais par pression de l'index, mais ne voyant pas ce que je faisais, le résultat n'était pas toujours concluant, plutôt en dessous de la moyenne.

Étant donné que ce sont les échecs qui instruisent, j'ai vite compris que je devais procéder autrement.

J'ai donc fabriqué différents outils adaptés à ce type d'intervention mais aussi utilisé des instruments non destinés à cet usage, les petits pinceaux à aquarelle p. ex. Le numéro deux convient parfaitement.

Les outils doivent être de petite taille afin de travailler sous la loupe binoculaire. La plupart sont façonnés avec de la baguette de verre de 3mm de diamètre, étirée à la flamme, la petite boule terminale allant de 1/2 à 2 mm de diamètre. D'autres le sont avec du plastique plus ou moins souple et résistant aux solvants durs, également étiré à la flamme. Ensuite, je les façonne en petites spatules étroites, de tailles différentes selon l'usage qu'il en sera fait.

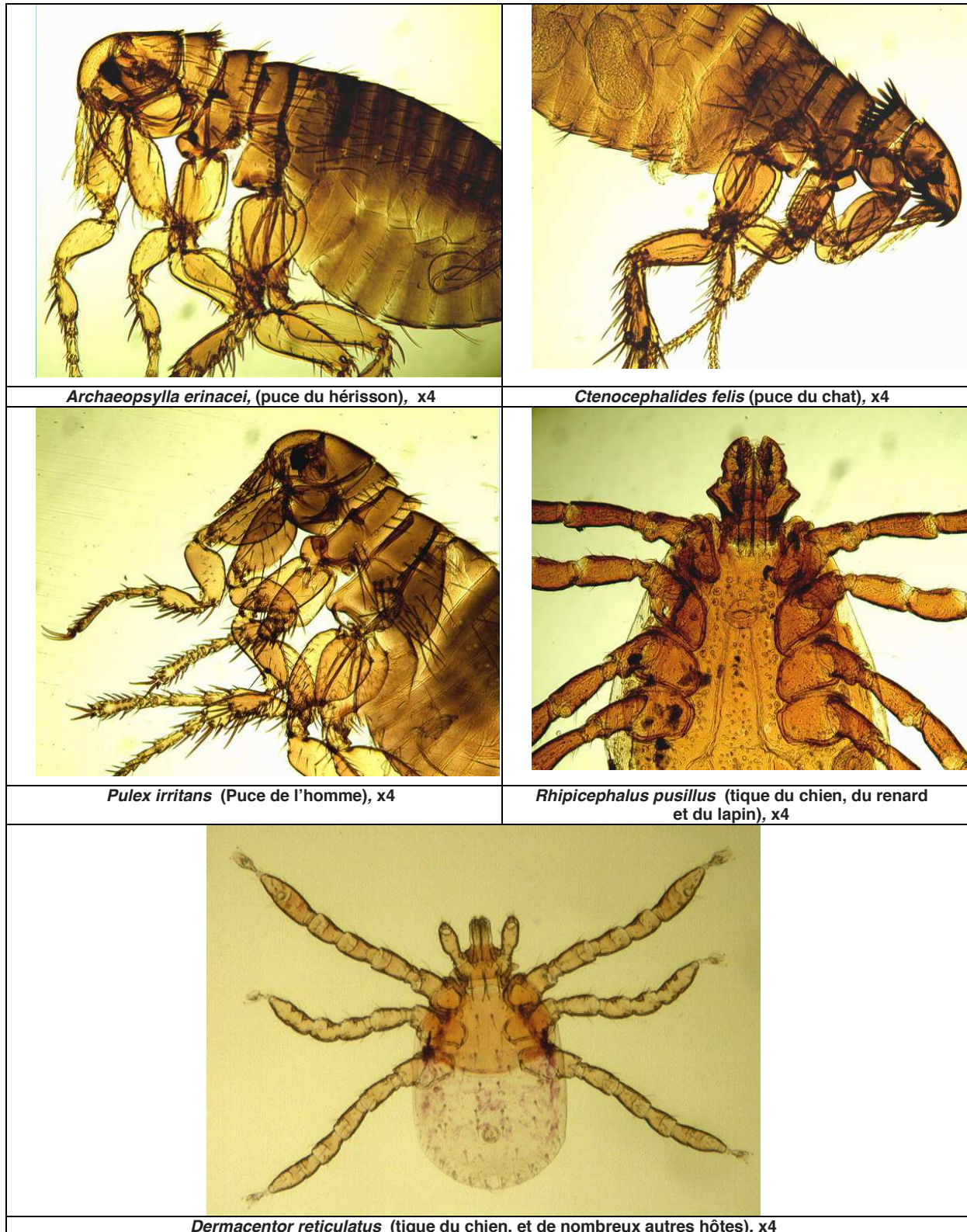
Addenda par Marcel LECOMTE :

(*1) *Nous avons expérimenté depuis cette correspondance avec Paul LEROY, une solution beaucoup plus concentrée, de 35 à 39 g/litre d'eau, qui est proche du seuil de saturation situé à 40 g/L. Cela permet d'obtenir des blocs d'inclusion plus épais.*

(*2) *Depuis 2002, la situation a bien évolué, et dans le sens de la facilité, car les Laboratoires Merck (VWR International) commercialisent un nouveau produit de montage qui polymérise remarquablement bien mais dont le solvant est l'eau, donc plus de déformation des pièces fragiles : AQUATEX.*

(*3) Nous envisageons d'y inclure des antibiotiques à spectre large, comme ceux utilisés dans les milieux de culture (comme le milieu de Sabouraud), mais à dose plus forte ; comme par exemple le chloramphénicol, l'amoxicilline ou la streptomycine.

(*4) Nous utilisons également le Néo-Entellan, l'Histolaque et le Merckoglas (ce dernier est conçu spécialement pour tous les frottis et notamment de spores ou de grains de pollen)



La conservation de matériel frais

Par Marcel LECOMTE

La mode actuelle, en mycologie notamment, consiste à utiliser la dessiccation comme méthode de conservation à longue durée : on parle alors d'exsiccatum (exsiccata au pluriel). Et il est vrai qu'il est possible de consulter à l'heure actuelle dans les herbiers de certains musées, des exemplaires qui sont âgés de plus d'un siècle.



Un tiroir de mon herbier personnel consacré aux lactaires.

Cependant, nous avons le sentiment que ce type de conservation présente quelques inconvénients à côté de nombre d'avantages. Et il s'avère qu'il peut être intéressant de conserver des spécimens qui n'ont pas été desséchés, notamment pour réaliser des coupes ou observer certaines structures fines et délicates qui peuvent disparaître lors de la dessiccation.

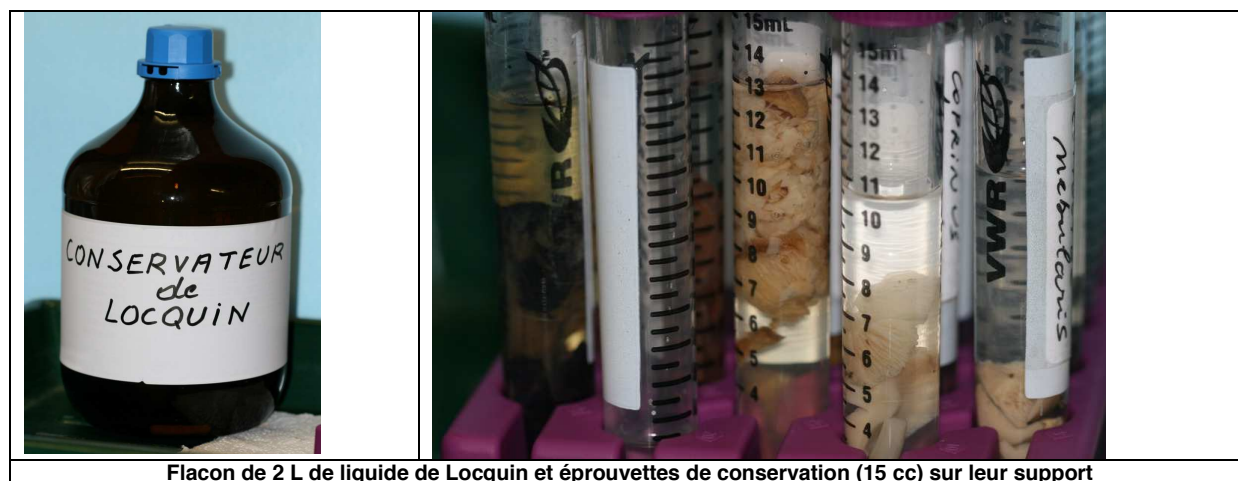
Il apparaît comme une évidence qu'il va falloir utiliser des liquides de conservation sinon le matériel frais est détruit en quelques jours par les larves d'insectes et les moisissures.

Quelles seront les qualités d'un bon conservateur :

- produit peu coûteux
- formule qui va altérer le moins possible les formes et les couleurs
- composition qui va bloquer au maximum la diffusion des pigments, qu'ils soient solubles dans l'eau ou dans l'alcool
- un conservateur universel constitue une chimère dans un monde aussi vaste et varié que les champignons

Des spécialistes comme Marcel LOCQUIN et Maurice LANGERON se sont penchés sur le problème et nous vous livrons ci-dessous toute une série de conservateurs issus de leur expérience et de leurs publications, ainsi que des formules d'autres microscopistes célèbres.

Nom	Composition	commentaires
Formol à 5 %	5 cc de formol pur dans 100 cc d'eau	A l'inconvénient de durcir les tissus et est toxique à l'usage prolongé ; excellent pour les Phanérogames (plantes à fleurs et à graines) mais décolore les algues
Alcool dénaturé à 80 %	Se trouve tel quel dans le commerce ; 85 % d'éthanol auquel on a ajouté 15 % de méthanol pour rendre le mélange impropre à la consommation	Le plus utilisé, mais peu intéressant si présence de pigments alcoolosolubles
Liquide d'Amann	95 cc d'eau + 50 cc de lactophénol + 2 g de chlorure de cuivre + 2 g d'acétate de cuivre	Conserve la coloration verte générée par la chlorophylle
Alcool glyciné	50 cc de glycérine + 50 cc de méthanol à 90° + 50 cc de formol	Peu intéressant si présence de pigments alcoolosolubles
Liquide de Lutz	100 cc d'eau + 50 cc d'éthanol à 90° + 4,5 g de sulfate de cuivre	Peu intéressant si présence de pigments alcoolosolubles
Eau phéniquée	(Ethanol à 90° saturé de phénol pur) ; 1 g de cette solution dans 100 cc d'eau	Peu intéressant si présence de pigments hydrosolubles
Liquide de Malençon	100 cc éthanol à 95° + 10 cc formol + 5 cc acide acétique glacial + 20 cc eau	Un inconvénient : il faut le renouveler après 24 h
Liquide de Sémichon	80 cc eau + 10 cc formol + 10 cc d'une solution aqueuse à 4 % d'acétate de cuivre	Conserve la coloration verte générée par la chlorophylle
Liquide de Locquin	100 cc éthanol à 80° + 10 cc formol + 5 cc acide acétique + 10 g de saccharose pur	Conserve assez bien les couleurs des champignons ; pour pratiquer des coupes au sortir de ce liquide, passer par l'éthanol à 95 %
Liquide acétomercurique	1 L eau + 5 cc acide acétique + 1 g d'acétate de mercure	Peu intéressant si présence de pigments hydrosolubles
Liquide plombique	1 L eau + 125 cc éthanol à 90° + 1 g acétate de plomb	Peu intéressant si présence de pigments hydrosolubles
Liquide mercurioplombique	1 L eau + 10 cc acide acétique + 5 g acétate de plomb + 0,5 g d'acétate de mercure	Peu intéressant si présence de pigments hydrosolubles



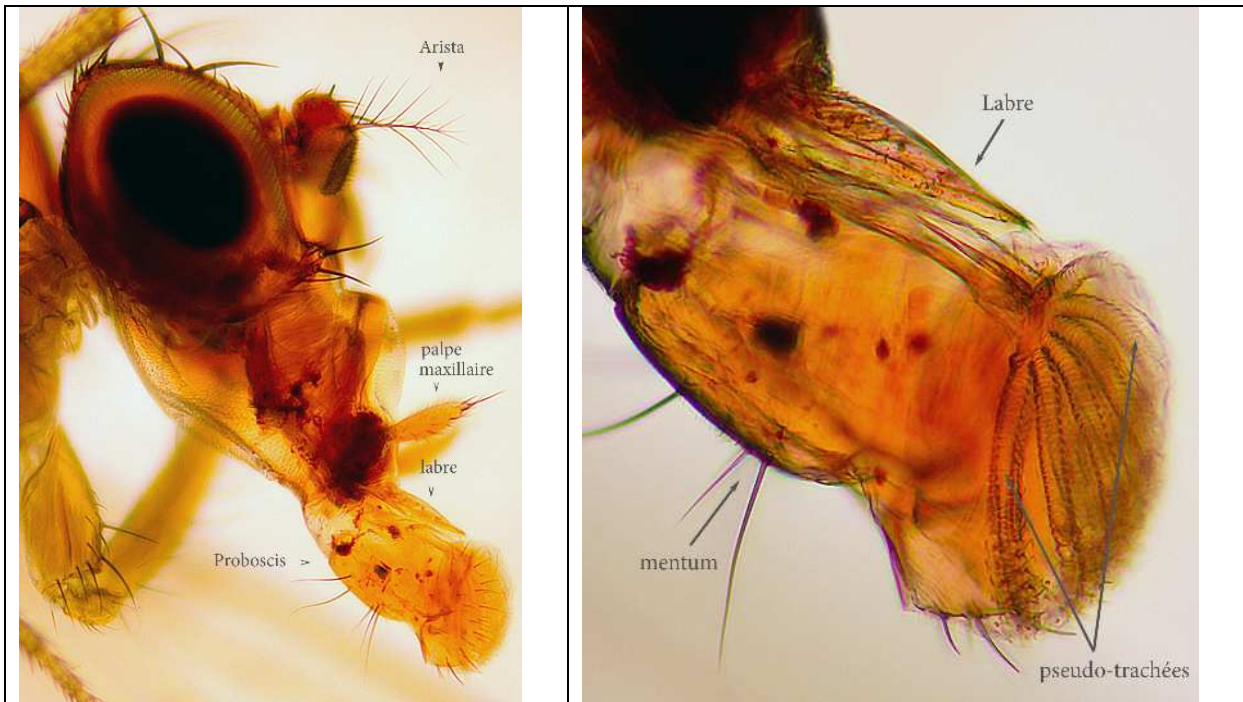
Flacon de 2 L de liquide de Locquin et éprouvettes de conservation (15 cc) sur leur support

Notre préférence va au liquide de Locquin qui conserve assez bien les couleurs et qui est d'une préparation accessible à tout un chacun ; nous avons entrepris une collection en milieu liquide depuis plus de deux ans avec un succès très encourageant.

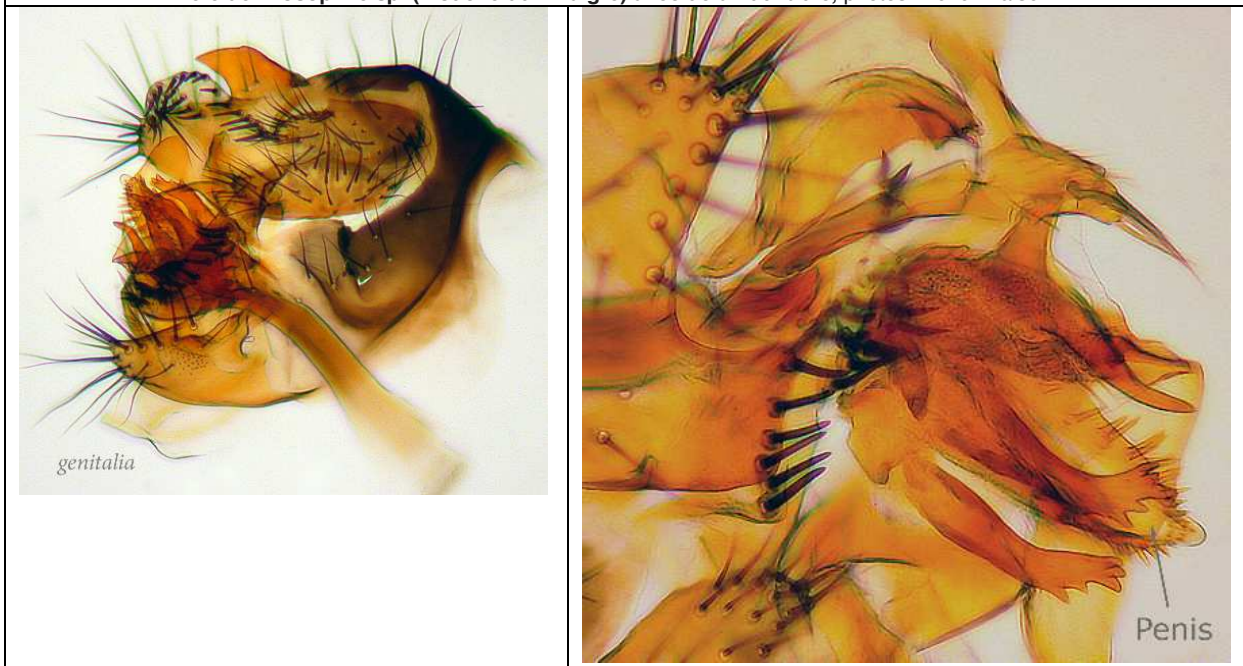
Nous réalisons évidemment des essais avec les autres liquides de conservation mentionnés ci-dessus, mais il faut savoir que la préparation de certains d'entre-eux s'avère difficile si on ne possède pas le matériel de laboratoire nécessaire ; de plus, la plupart des composants sont inaccessibles à un particulier, sont vendus en conditionnements importants et ne sont délivrés qu'aux laboratoires et aux professionnels ; en outre, certains composants comme le formol, le phénol, le mercure et le plomb sont considérés actuellement comme hautement toxiques et déconseillés à l'utilisation non ponctuelle.

Bibliographie :

FLORE MYCOLOGIQUE, Vol. III, Cortinariales, A. LOCQUIN, 1977
 MANUEL DE MICROSCOPIE, de Locquin & Langeron
 PRECIS DE MICROSCOPIE, de M. Langeron



Tête de *Drosophile* sp. (mouche du vinaigre) avec détail du labre, photos Michel Blaise



Armature génitale de *Drosophile* sp. (mouche du vinaigre) avec détail du pénis, photos Michel Blaise

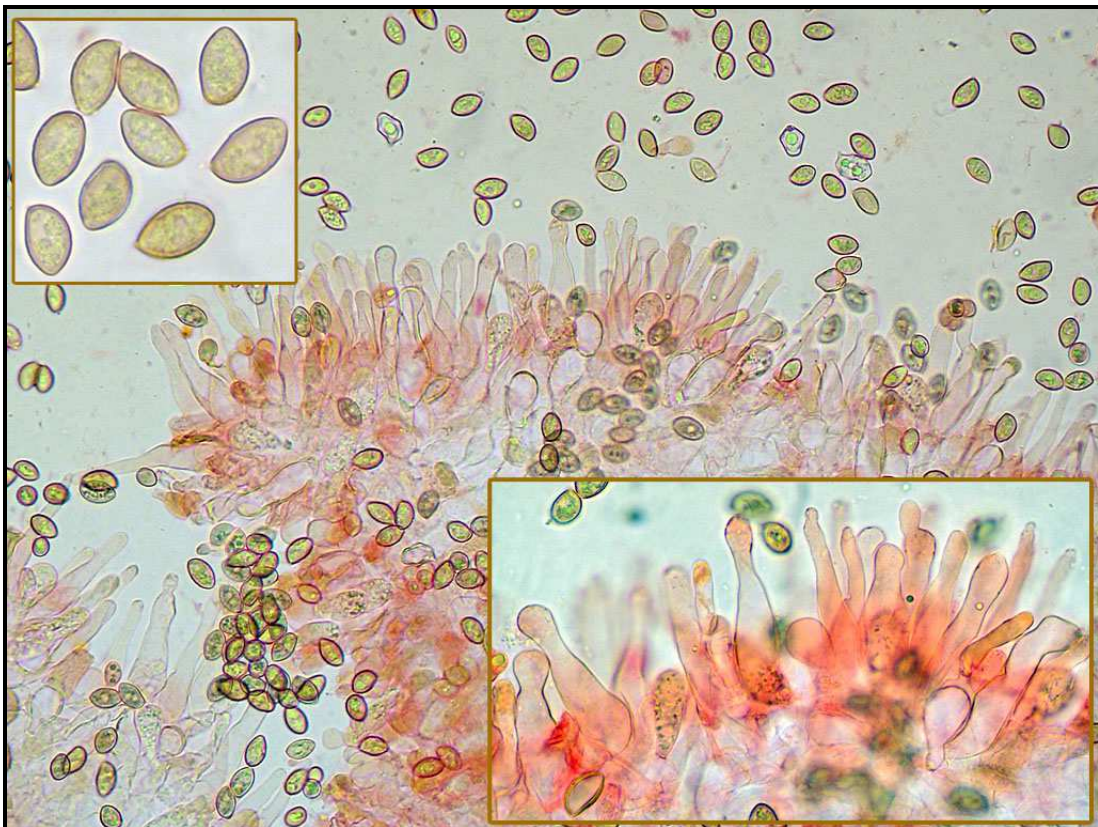
Le traitement des exsiccata

Par Marcel LECOMTE

Depuis très longtemps, les herbiers mycologiques sont constitués de spécimens séchés appelés exsiccata. Et cela permet, à l'heure actuelle, de consulter, dans les herbiers de certains musées (à condition quand même d'avoir « pignon sur rue »), des exemplaires qui sont âgés de plusieurs dizaines d'années, voire même séculaires.

Quelles seront les qualités d'un bon exsiccatum ?

- La dessiccation doit être complète, sous peine de voir le spécimen attaqué par les moisissures (surtout s'il est conservé dans un sachet plastique hermétique).
- L'exemplaire doit être conservé dans un endroit sec, protégé chimiquement contre les insectes mycophages et destructeurs de collections (boules anti-mites ou paradichlorobenzène, ou thymol dans la boîte ou l'armoire). Nous conseillons de ne pas garder la collection dans la pièce de travail, car ces produits sont (très) toxiques lors d'expositions prolongées.
- L'exemplaire doit être identifié par un numéro unique, et être accompagné de notes précises (nom, auteur, biotope, caractéristiques discriminatives) inscrites directement sur le contenant pour éviter les confusions lors de manipulations.
- Il est intéressant, à notre avis, de tenir en parallèle un registre des exsiccata où on peut encore consigner des renseignements supplémentaires (c'est assez facile maintenant que nous disposons de l'outil informatique, surtout quand il s'agit d'effectuer des tris).



Microscopie de *Galerina pumila*, avec spores et cystides, photo Daniel Ghyselincq

Un exsiccatum, lorsqu'il est sorti de son enveloppe, est inutilisable comme tel : il est cassant et très dur et ne permet aucune manipulation microscopique. Il va donc falloir le ramollir afin de le rendre malléable.

Deux méthodes s'offrent à nous :

- **La méthode naturelle** qui est utilisée en entomologie : il suffit de placer le spécimen dans un espace restreint et fermé (boîte PVC) en compagnie de feuilles hachées de *Prunus laurocerasus* (arbuste d'ornementation utilisé pour former des haies et appelé laurier-cerise) ; l'humidité naturelle va ramollir le spécimen en 48 ou 72 heures, et l'acide cyanhydrique qui se trouve dans les feuilles joue un rôle aseptique contre les moisissures. Inconvénient : cela demande beaucoup de temps et échappe à toute spontanéité !
- **Le forçage chimique** qui va ramollir et « regonfler » le spécimen en quelques minutes. Voici, dans le tableau ci-dessous, quelques produits utilisables :

Nom	Composition	commentaires
Les alcalis à 5 % (soude et potasse)	5 cc de soude ou de potasse dans 100 cc d'eau ; peut s'utiliser à chaud ou à froid	Attention ! les alcalis (surtout à chaud) peuvent précipiter ou dissoudre certaines substances
ammoniaque à 50 % voire 10 %	50 cc d'ammoniaque avec 50 cc d'eau ; la solution à 10 % sera utilisée pour des exemplaires très fragiles	Assez agressif pour le nez ; ne pas chauffer
Lactophénol	22 g phénol aqueux à 3 % + 40 g de glycérine + 20 g d'acide lactique + 9 g d'eau bidistillée	Chauffer à 60° sinon apparition de bulles dans la préparation
Chloral-lactophénol	20 g hydrate de chloral + 10 g phénol en cristaux + 40 g acide lactique	Supérieur au précédent et utilisable à froid
Mélange de Cendrier	100 cc éthanol à 95° + 10 cc eau + 50 cc acétate d'éthyle + 50 cc éther sulfurique + 0,5 cc acide acétique glacial	Superbe composition qui regonfle, ramollit et éclaircit
Lactochloral	50 % acide lactique + 50 % hydrate de chloral	Permet d'obtenir un gonflement maximum
Ramollisseur de Cléménçon	20 cc ammoniaque pure + 80 cc éthanol à 95° + 1 g glycérine	A utiliser uniquement avant du rouge Congo ammoniacal comme colorant
Liquide de Dean	90 cc eau bidistillée + 1 g Sodium Dodécyl Sulfate + 10 cc glycérine	Intéressant par sa facilité de préparation, surtout si on remplace le SDS par un liquide de vaisselle concentré
Ramollisseur GDS de Cléménçon	100 cc eau bidistillée + 50 Diméthyl Sulfoxyde + 50 g glycérine + 2 g hydroxyde de sodium pur	A utiliser uniquement avant du rouge Congo SDS comme colorant
Rouge Congo ammoniacal	1 g rouge Congo + 100 cc d'ammoniaque pure	Convient pour ramollir et colorer directement des pièces microscopiques (fragment de lame par exemple)
Traitement spécial pour les Insectes et autres Arthropodes, ainsi que les tissus kératineux		
Chloral-phénol de Murray	50 g phénol en cristaux + 50 g hydrate de chloral pur fondus à chaleur douce	Excellent ramollisseur et surtout éclaircissant de la chitine et de la kératine
<p>Ce traitement est assez long, mais donne des résultats spectaculaires :</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fixation des pièces ➤ Déshydratation ➤ Bain de 12 h dans le mélange suivant : (1/3 alcool absolu + 1/3 chloroforme + 1/3 acide acétique glacial) saturé de chlorure de mercure ➤ Laisser dans le chloral-phénol durant 7 jours ➤ Laver au xylol ➤ Inclure dans le baume du Canada 		

Lorsqu'il s'agit simplement de ramollir sans éclaircir, afin d'effectuer des observations dans l'eau, notre préférence va vers l'ammoniaque et le chloral lactophénol.

Pour éclaircir des sujets fortement lignifiés et colorés, nous utilisons du chloral lactophénol additionné de salicylate de sodium (ce mélange constitue l'éclaircissant le plus puissant que nous connaissions) → très intéressant pour travailler sur des Polypores.

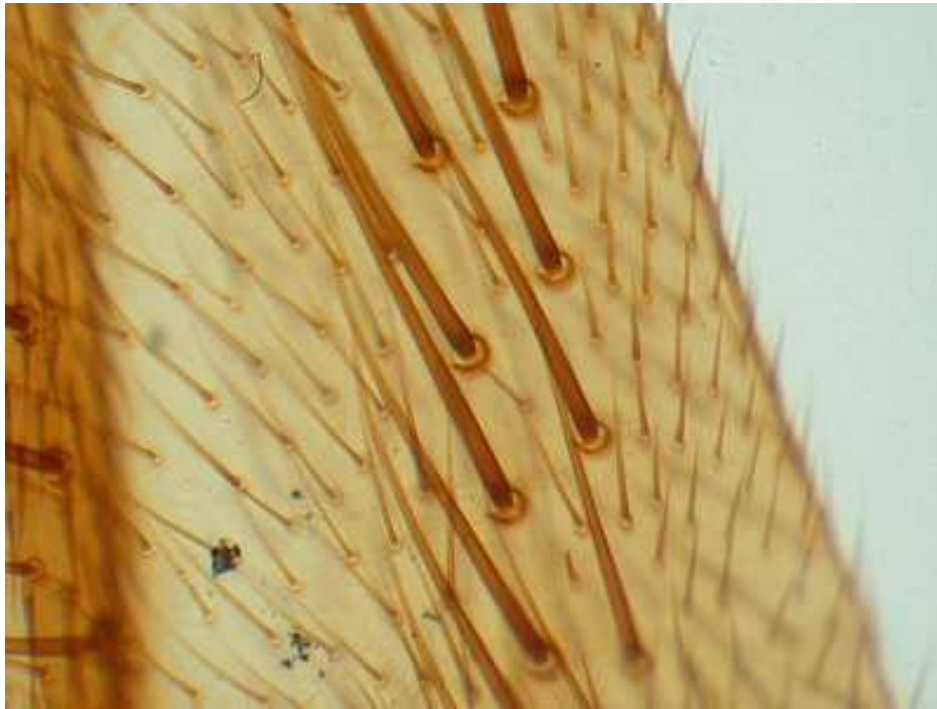
Lorsque nous souhaitons appliquer une coloration pour faciliter l'observation (ce qui est très souvent le cas en mycologie), nous utilisons :

- **Le ramollisseur de Cléménçon** : il permet d'utiliser, après rinçage, du rouge Congo ammoniacal

- **Le ramollisseur GDS de Cléménçon** : il permet d'utiliser, après rinçage, du rouge Congo aqueux SDS (nous accordons notre nette préférence à ce dernier, car la coloration obtenue avec le RC SDS est de bien meilleure qualité que celle générée par le Congo ammoniacal ; c'est dû à la présence du SDS qui « dégraisse » tous les éléments, et facilite la pénétration du colorant).

Mode opératoire :

- Utiliser un flacon fermant hermétiquement pour limiter l'évaporation des solvants.
- Y placer un volume de ramollisseur égal à 5, voire 10x le volume du sujet (si pièce de 1 cm³, verser 5 à 10 cc de ramollisseur).
- Utiliser un flacon par espèce, sous peine d'avoir des éléments polluants et notamment des spores.
- Bien veiller à ne pas mélanger les exsiccata, à replacer le solde éventuel dans son contenant et à identifier le flacon de ramollissage.
- Selon sa taille, la pièce va séjourner de 3 à 24 h dans le ramollisseur.
- Sortir la pièce du liquide et la placer dans un verre à montre.
- Rincer abondamment à l'eau, à l'aide d'une pissette.
- Eponger avec du papier essuie-tout.
- Prélever le morceau à observer et le colorer selon les techniques habituelles (nous insistons sur l'importance du rinçage après coloration, afin d'obtenir des images bien contrastées).
- Il nous paraît déconseillé d'utiliser plusieurs fois le même liquide de ramollissage pour des problèmes de pollution du milieu.



Aile de mouche domestique, traitée au chloral-phénol de Murray, photo Marcel Lecomte

Deux cas particuliers :

a/ Votre préparation est particulièrement encombrée par les spores qui couvrent les hyphes, basides et cystides.

b/ Vous souhaitez mettre en évidence le capillitium d'un Myxomycète et éliminer les spores qui masquent tout.

→ Faire passer par capillarité entre lame et lamelle couvre-objet (déposer la goutte d'un côté, pencher légèrement la préparation et placer un papier buvard ou un film absorbant à l'opposé) d'abord une goutte d'alcool à 70° et ensuite une goutte d'ammoniaque à 50 % : on voit apparaître des remous importants qui chassent les spores vers l'extérieur de la lame.

Bibliographie :

MANUEL DE MICROSCOPIE, de Locquin & Langeron

PRECIS DE MICROSCOPIE, de M. Langeron

OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES MACROMYCETES, par Didier Baar

LES MILIEUX DE CULTURE

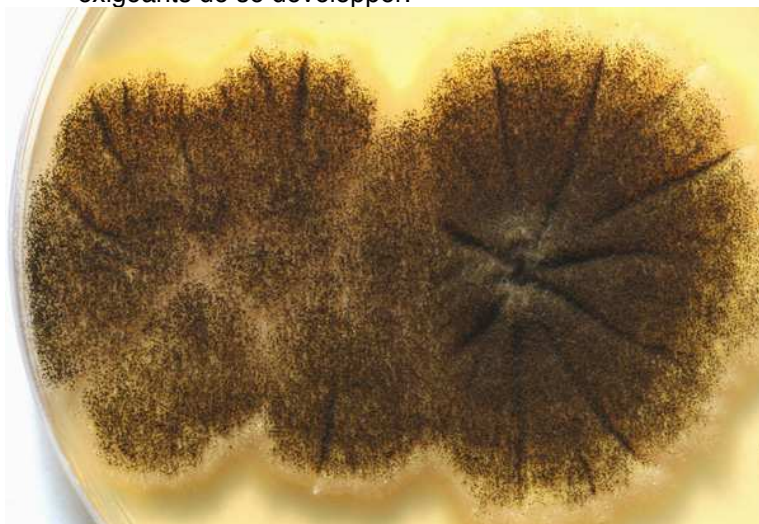
Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures, afin d'en effectuer l'étude et d'obtenir des souches pures. En principe, les cellules trouvent dans ce milieu les composants indispensables pour leur multiplication en grand nombre, rapidement, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un genre bactérien ou une famille. Ainsi, selon le but de la culture, il est possible de placer les micro-organismes dans des conditions optimales, ou tout à fait défavorables.

Il se compose d'une base (agar-agar, eau, minéraux...) ainsi que d'un indicateur coloré de pH ou de réaction d'oxydo-réduction pour permettre de formuler des hypothèses sur le genre.

Il existe aussi des bouillons de culture qui possèdent la même fonction, mais ne contiennent pas d'agar-agar, ils sont donc totalement liquides.

Un milieu minimum est un milieu comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne ou fongique, sous une forme utilisable par des organismes n'ayant pas d'exigence particulière.

- Composition d'un milieu minimum :
 - Une source de carbone et d'énergie, généralement le glucose.
 - Une source de potassium et de phosphore : K_2HPO_4
 - Une source d'azote et de soufre : $(NH_4)_2SO_4$
 - Une source de magnésium : $MgCl_2$
 - Une source de calcium : $CaCl_2$
 - Une source de fer : on emploie le citrate de fer (le citrate a pour rôle de maintenir le fer en solution)
 - Une source d'oligo-éléments : sels de Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti
 - Une source d'eau, indispensable à toute forme de vie : on utilise l'eau distillée (*stérile*)
 - Un tampon pH : il permet de maintenir un pH correct voire optimum: KH_2PO_4 par exemple
- En l'absence de l'un de ces composants, les êtres vivants ne se développent pas, car ils ne peuvent synthétiser ces produits.
- C'est l'adjonction de facteur(s) de croissance approprié(s) qui permet à des organismes exigeants de se développer.



Un milieu ordinaire permet la culture de spécimens qui n'ont pas d'exigences nutritives particulières. La composition de ces milieux est simple et sans effet de sélection. Un exemple de milieu ordinaire est la *gélose nutritive*.

Culture d'*Aspergillus sp.* sur milieu de Sabouraud

Il existe une quantité énorme de milieux de culture directement prêts à l'usage (on peut

en trouver plusieurs centaines dans le catalogue des grandes firmes distributrices de produits de laboratoire). Ces cultures sont réalisées dans des boîtes de Pétri stérilisées. Il nous paraît préférable d'utiliser des boîtes prêtes à l'emploi, car le risque de contamination est grand en cas de préparation personnelle du milieu.

Pour se forger une idée à propos des milieux de culture spécifiques, consulter le lien suivant et les fiches techniques (manuel) :

<http://www.oxid.com/fr/index.asp?mpage=ipns&initial=S&c=FR>

AGAR AGAR

C'est un produit gélifiant obtenu à partir d'algues rouges appelées Rhodophycées (*Sphaerococcus euchema*, *Gelidium*, *Gracilaria*, *Gelidiella*, *Pterocladia*). C'est un galactane (polymère de galactose) qui se trouve dans la paroi cellulaire de ces algues.

Par dessiccation (*) de ces organismes, on obtient un mucilage qui est pulvérisé et appelé alors « agar-agar », utilisé essentiellement pour gélifier les milieux de culture adaptés aux micro-organismes (bactéries, moisissures, graines d'orchidées ...).

Pratiquement sans couleur ni goût, il est également utilisé comme liant alimentaire (répertorié sous le code E406) dans certaines pâtisseries, des flans, des gelées de fruits, des confitures où il remplace la gélatine animale. Il a l'avantage d'être acalorique, mais doit être utilisé à doses modérées sous peine de provoquer des problèmes gastro-intestinaux.

(*) Les algues sont coupées, bouillies et filtrées. Le filtrat est mélangé à une solution aqueuse d'alcool éthylique afin d'obtenir un précipité qui est ensuite passé au dessiccateur.



Culture de *Penicillium sp.* sur milieu mixte gélose-agar

GELOSE

C'est une substance nutritive favorisant ou inhibant (*selon sa composition*) la prolifération et le développement des bactéries. Il s'agit donc du milieu de culture des bactéries. Elle est utilisée dans les laboratoires pour déterminer le niveau d'efficacité de nouveaux antibiotiques, tester la résistance bactérienne vis-à-vis de produits déjà connus, ou plus simplement, pour isoler ou cultiver des bactéries.

La gélose se différencie du bouillon, la plupart du temps du bouillon de bœuf, par sa solidité, due, dans sa composition, à la présence d'agar-agar à raison de 20 g/L environ.

Selon son contenu, une gélose peut favoriser la croissance de certaines bactéries aux dépens des autres ; c'est ce qu'on appelle la *sélectivité*. De plus, certaines géloses sont *différentielles*, c'est-à-dire que l'aspect des colonies bactériennes qui s'y forment peut permettre, jusqu'à un certain point, de déduire de quel type de bactérie il s'agit.

Voici quelques géloses courantes dans les laboratoires de microbiologie.

- Gélose au sang
- Gélose de Mac Conkey
- Gélose chocolat

Agar à l'extrait de malt

Utilisé pour la mise en évidence, l'isolement et la numération des champignons, spécialement des levures et moisissures, dans divers produits à analyser, ainsi que pour l'entretien des souches notamment celles destinées à la détermination des vitamines. Il s'agit d'un milieu ambré, légèrement opalescent.



En milieu acide, l'extrait de malt riche en glucides apporte tous les éléments nutritifs nécessaires au métabolisme des levures et des moisissures. En outre, l'acidité du milieu inhibe le développement de la plupart des germes contaminants.

Culture de *Penicillium* sp. sur malt-agar

Préparation :

Au départ des composants : 1 L d'eau – 15 g d'Agar-Agar – 3 g de peptone de farine de soja – 30 g d'extrait de malt – ajuster le pH à 4,5 par addition d'une solution stérile d'acide lactique à 10 %.

Au départ du milieu complet desséché : 1 L d'eau – 45,5 g de poudre – dissoudre à ébullition – stériliser à 120° durant 15 minutes – ajuster le pH.

S'il s'agit d'expérimentations épisodiques, il nous paraît préférable d'utiliser

des boîtes prêtes à l'emploi (environ 1,5 € la pièce).

Mode opératoire : inoculer l'échantillon en surface – Incuber durant 3 à 5 jours à la lumière, à la température de 20 à 25°C.

Agar de Sabouraud à 4 % de glucose

Utilisé pour la culture des dermatophytes. Il est également approprié pour le test de sensibilité des champignons. La croissance optimale des champignons est assurée dans ce milieu par sa teneur relativement élevée en hydrates de carbone : 4 %. Il ne comporte aucun agent inhibiteur sélectif à l'égard de la flore secondaire indésirable. On a cependant ajusté le pH à 5,6 pour ralentir la croissance des bactéries se multipliant plus rapidement. L'addition de chloramphénicol permet d'inhiber *Actinomyces bovis* et *Nocardia asteroides* et permet la mise en évidence de certaines levures. Il s'agit d'un milieu limpide et ambré.

Préparation au départ des composants : 1 L d'eau – 17 g d'agar-agar – 10 g de peptone de farine de soja – 40 g de glucose – 50 mg de chloramphénicol - ajuster le pH à 5,6 +/- 0,2 par addition d'une solution stérile d'acide lactique à 10 %.

Au départ du milieu complet desséché : 1 L d'eau – 42 g de poudre – dissoudre à ébullition – stériliser à 120° durant 15 minutes – ajuster le pH.

S'il s'agit d'expérimentations épisodiques, il nous paraît préférable d'utiliser des boîtes prêtes à l'emploi (environ 1,5 € la pièce).

Souches test et qualité de croissance :

Trichophyton mentagrophytes Bonne

Trichophyton rubrum Moyenne/bonne

Microsporum gallinae Bonne

Trichophyton ajelloi Bonne

Microsporum canis Bonne

Geotrichum candidum Bonne

Candida albicans Bonne

Aspergillus niger Bonne

Penicillium commune Moyenne/bonne

LES MOISSURES (généralités)

D'après un texte de base (1997) de M.F. ROQUEBERT, professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle, à Paris.

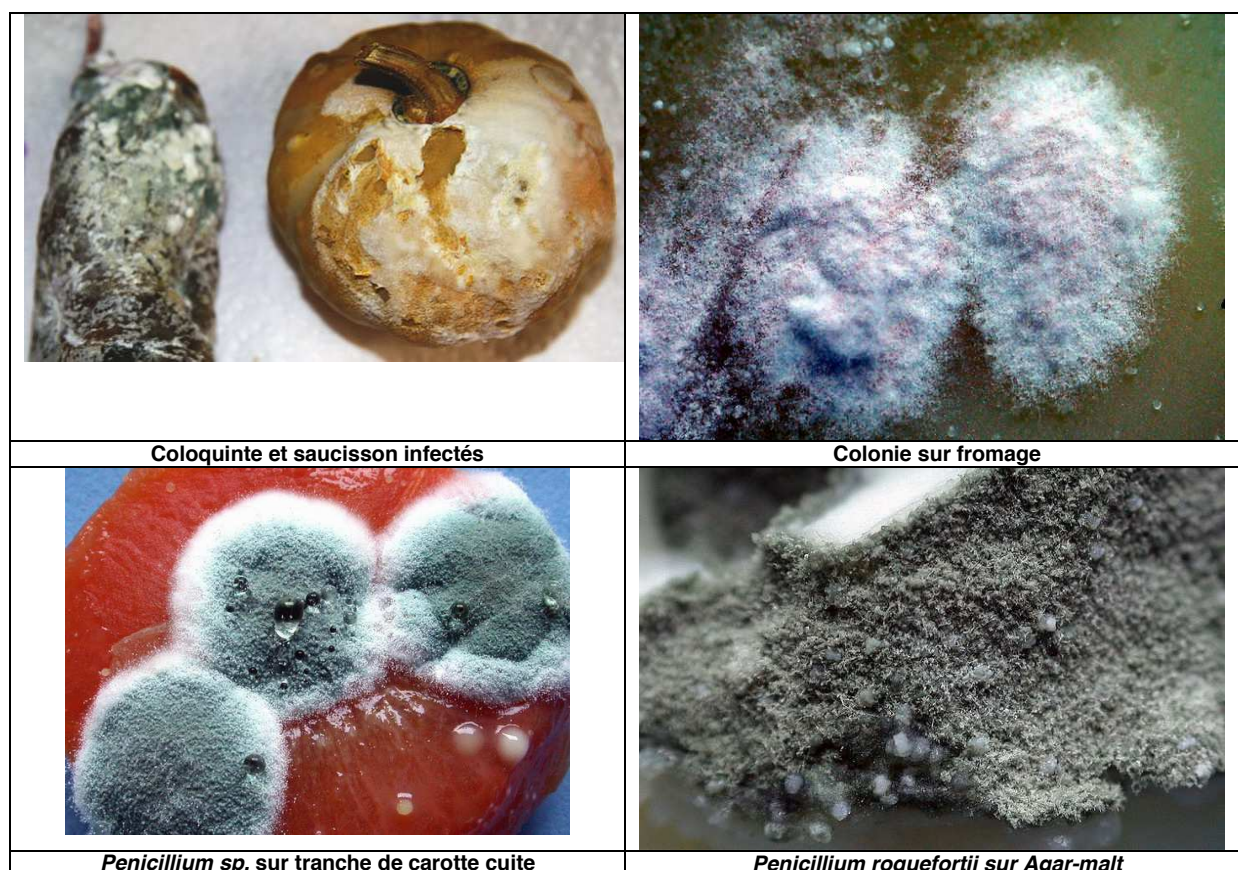
Note du rédacteur : en parcourant toute ma documentation disponible, nous avons pu constater que le mot « spore » est utilisé par les auteurs indifféremment du mode de reproduction, sexuée ou non. En mycologie, on parle de « conidies » pour la reproduction asexuée et de « spores » pour la reproduction sexuée.

L'utilisation du terme "moisissures" n'a pas de réelle signification systématique ; l'usage courant englobe là-dedans tous les champignons microscopiques (présents partout dans la nature) qui intéressent l'économie et l'environnement humains, de façon bénéfique ou néfaste.

Ce sont des champignons, et ils ont fondamentalement les caractères de ces organismes. Mais il faut savoir que sous cette forme, on a toujours à faire à un anamorphe, c'est-à-dire un stade de développement qui ne se reproduit que de manière asexuée (simple mitose correspondant à un clonage naturel), par des conidies. La forme téléomorphe est très souvent un Ascomycète, se reproduisant de manière sexuée par des ascospores (méiose avec conjugaison des patrimoines génétiques).

Ce sont des **Eucaryotes** avec des noyaux typiques entourés d'une membrane et contenant des chromosomes. Ce caractère les différencie des bactéries qui sont des **Procaryotes** avec un chromosome libre à l'intérieur de la cellule.

Les moisissures sont **hétérotrophes** car elles ne peuvent pas, comme les plantes vertes, synthétiser la matière organique à partir du gaz carbonique atmosphérique. Elles doivent donc puiser dans le milieu ambiant l'eau, les substances nutritives et les éléments minéraux nécessaires à la synthèse de leur propre matière. Elles les absorbent à travers la paroi de leur appareil végétatif. On dit qu'elles sont **absorbotrophes**.



Toutes les moisissures sont **saprophytes ou saprotrophes**, et se développent sur et au détriment de matériaux inertes très variés (papier, bois, plâtre, aliments divers, fruits, légumes...). Elles jouent un rôle fondamental dans le recyclage et la décomposition de la matière organique. Dans une habitation, elles se développeront plus particulièrement au niveau de traces d'humidité (fuite au niveau d'une canalisation, condensation, choc thermique, pièce mal ventilée ...) avec une prédilection pour le

papier, le bois, les colles cellulosiques ou le plâtre. Certaines peuvent être "opportunistes", c'est-à-dire que, bien que naturellement saprophytes, elles peuvent dans certains cas se comporter en parasites, se développer sur des organismes vivants animaux ou végétaux dont les défenses sont affaiblies, les tuer et finalement passer à un développement saprophyte.

Le développement normal d'une moisissure comprend une phase végétative de croissance et de nutrition, et, presque simultanément, une phase reproductive au cours de laquelle se forment des spores qui assurent la dispersion. La germination des spores est à l'origine de la forme végétative.

L'appareil végétatif, qui permet la croissance et le développement, est composé de filaments appelés hyphes dont l'ensemble constitue un réseau : le mycélium. Celui-ci est parfois visible sous forme de petites tâches colorées à la surface de substrats moisissés. Il va à la recherche de ses aliments, dégrade le support par émission d'enzymes et d'acides, en transforme les composants à l'intérieur de la cellule et rejette les déchets à l'extérieur, ou les stocke. La dégradation du substrat peut être infime ou considérable, selon l'adaptation spécifique du champignon, la durée et les conditions de son développement. Cette activité de dégradation est cause de la détérioration des supports.

La colonisation du substrat est donc réalisée par extension et ramification des hyphes. L'accroissement de celles-ci

s'effectue par le sommet (on parle d'une croissance apicale), où s'effectue l'essentiel des réactions de synthèse et de dégradation du métabolisme dit "primaire", indispensable à la construction de la cellule du champignon. Les régions apicales des hyphes sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules cytoplasmiques contenant les enzymes et les précurseurs de synthèses de nouveaux polymères.

Les produits du métabolisme "secondaire" non indispensables au fonctionnement de la cellule, sont plutôt stockés en région subapicale. Les métabolites secondaires les plus connus sont les pigments, les antibiotiques, les mycotoxines.

Les hyphes sont appliquées sur le substrat ou parfois immergées dans celui-ci. Elles absorbent, à travers leur paroi, l'eau, les substances nutritives et les ions qui y sont contenus. Cette fonction implique une perméabilité pariétale qui diminue de l'apex vers les zones plus âgées. Dans les zones actives, il y a en permanence des échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

Au point de vue structural, les hyphes sont des sortes de tuyaux contenant le cytoplasme, les noyaux et autres organites cellulaires. Elles sont généralement cloisonnées. Dans les parties jeunes du mycélium, les cloisons sont percées de pores qui permettent le passage du contenu cellulaire d'un compartiment à l'autre. Dans les parties les plus âgées, les cloisons sont fermées, isolant les parties en voie de dégénérescence des parties actives.

Bien qu'elles soient relativement peu exigeantes, un certain nombre de facteurs, nutritifs et environnementaux, doivent être réunis pour que les moisissures se développent.

Penicillium sp. sur coloquinte, photo André Février



Trichoderma sp. sur milieu de Sabouraud

Les principaux facteurs de développement sont :

➤ **Les éléments nutritifs**

Les plus importants sont le Carbone et l'Azote, utilisés sous forme de composés organiques, et des ions minéraux (Potassium, Phosphore, Magnésium ...) en quantités très faibles.

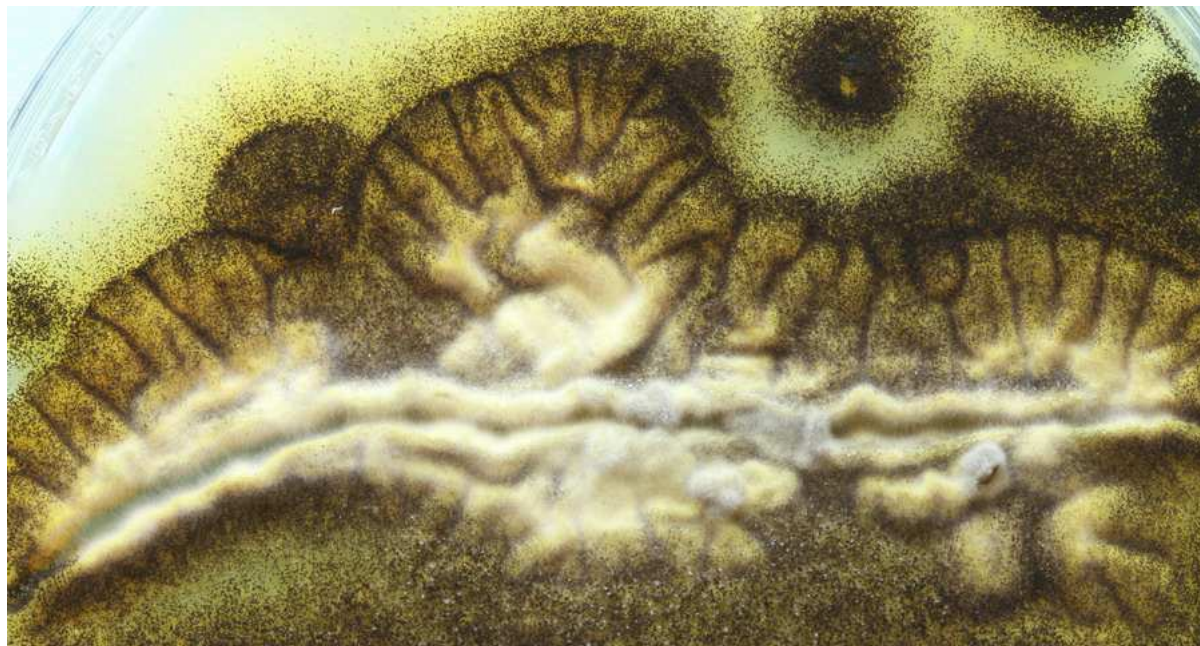
Certains produits, comme les acides aminés par exemple, peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation tandis que d'autres tels que l'ami-

don, la cellulose, les protéines, doivent être transformés préalablement par le champignon avant d'être absorbés. Cette transformation nécessite, de la part de la moisissure, un équipement enzymatique adapté, souvent caractéristique des espèces. Un *Trichoderma* par exemple dégradera la cellulose tandis qu'un *Scopulariopsis* sera plus actif sur un support de nature protéique. De toute façon, les quantités nécessaires et suffisantes au développement des moisissures sont extrêmement faibles.

➤ **Les facteurs de l'environnement**

À la différence des substances nutritives qui sont toujours beaucoup plus abondantes que ne le nécessite le développement des moisissures, les facteurs physiques de l'environnement (humidité, température, oxygène...) constituent un élément déterminant pour son initiation.

Parmi ceux-ci, le plus important est **l'humidité**.



Colonie d'*Aspergillus sp.* sur milieu de Sabouraud + chloramphénicol – photo Marcel Lecomte

Tout le monde sait que les moisissures apparaissent après un accroissement accidentel de l'humidité. En effet, la quantité d'eau disponible dans le substrat et l'ambiance environnante est très importante pour initier leur développement. Il y a échange permanent entre l'environnement et le support jusqu'à atteindre un point d'équilibre à la surface de ce dernier où pourra se développer la moisissure (pour les aliments, cette valeur est définie comme l'activité de l'eau ; elle est approximativement inverse de l'humidité relative).

L'humidité relative minimum pour que commencent à se développer certaines moisissures peu nombreuses, dites xérophiles, est de 65-70 % (*Eurotium -Aspergillus* du groupe *glaucus*). Au fur et à mesure que l'humidité augmente, s'installent ensuite des moisissures différentes, de plus en plus nombreuses vers 80-90%. Ainsi selon l'espèce identifiée sur un substrat on peut approximativement définir l'évolution de l'humidité relative de celui-ci. La seule façon d'éviter le développement de contaminants fongiques est donc bien de maintenir une hygrométrie faible dans l'environnement.

Après un certain temps de développement, les moisissures comme tous les champignons et autres êtres vivants, doivent se reproduire, puis se propager pour aller coloniser d'autres substrats.

Elles se multiplient par des **spores** ou des **conidies**, minuscules particules vivantes (3-5 μm pour la plupart) d'origine sexuée et/ou asexuée. Ce sont des cellules déshydratées, au métabolisme réduit, entourées de parois protectrices épaisses qui les isolent du milieu ambiant. Elles sont produites en très grand nombre. Elles peuvent survivre très longtemps, de plusieurs mois à plusieurs années. C'est sous cette forme qu'elles sont dispersées puis se déposent sur des supports nouveaux. Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables (augmentation de l'humidité principalement), elles germent, comme des graines, et génèrent du mycélium qui reformera, à son tour, des spores.

De simples petits fragments de mycélium peuvent également se régénérer et redonner une colonie.

Les spores se forment à partir du mycélium selon des processus plus ou moins différenciés mais en tous cas très variés. Elles peuvent être solitaires, groupées en chaînes ou en têtes, portées à la surface du mycélium ou contenues dans des enveloppes cellulaires. L'identification des moisissures repose principalement sur leur mode de formation et de groupement sur le mycélium.

Les moisissures sont agressives et dégradantes seulement sous leur forme mycélienne c'est-à-dire lorsqu'elles se développent parce que les conditions environnementales sont favorables. Sous la forme de spores-conidies, elles peuvent se disperser très largement et contaminer, mais sont inertes aussi longtemps que l'environnement ne permet pas leur développement.

Il y a donc lieu de bien séparer les phénomènes de **contamination** par des spores qui ne causent pas de dégâts immédiats mais constituent un grand danger potentiel, de la **dégradation** qui est la phase active due à du mycélium en expansion.



Colonie de *Penicillium* sp. sur milieu de Sabouraud + chloramphénicol
(ensemencement au départ d'une orange infectée, et colonie développée en 24 h avec incubation à 25° C)

En effet, nous avons vu que les moisissures doivent puiser dans le substrat les aliments nécessaires à leur développement. Pour accomplir cette tâche, elles transforment et prédigèrent les aliments complexes qui les entourent, en éléments plus simples, assimilables et transférables à travers leur paroi. Cette digestion s'effectue par production et émission d'enzymes (cellulases, ligninases, pectinases, ...) ou d'acides. Mais ce mécanisme de digestion, bénéfique pour la cellule fongique est néfaste pour le support, qu'il s'agisse d'un papier dont la cellulose sera dégradée, d'un objet en bois dont la lignine sera décomposée ou d'un aliment qui sera avarié ou chargé en toxines.

En progressant, le mycélium peut ainsi altérer de grandes quantités de matériaux. Sans atteindre un niveau de dégradation profonde qui nécessite un long temps de croissance, le simple développement d'une petite colonie superficielle peut, selon la nature du support, causer une altération.

Les spores sont donc formées par le mycélium en grand nombre. Le moindre petit choc, frôlement, ou courant d'air les détache et les emporte. L'ambiance extérieure comme celle des locaux d'habitation, contient toujours des spores en suspension, en quantité plus ou moins grande selon la saison, la présence d'objets ou de murs moisissés, par exemple, qui émettent des spores. Les principales espèces rencontrées dans l'ambiance appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*.

Cependant, des travaux récents menés dans des bibliothèques et réserves d'objets d'art montrent que les espèces présentes dans l'ambiance ne correspondent pas toujours à celles qui sont sur les objets.

Le mode de dispersion et de transfert des spores n'est pas le même pour toutes les espèces. Certaines spores, appelées gloéospores ont une paroi épaisse, sont de consistance humide, et restent collées entre elles par un mucus (*Acremonium* sp., *Exophiala* sp., ...) ; de ce fait, elles forment des amas plus lourds difficilement transportables par l'air. Elles seront véhiculées au niveau des substrats, par contact, par des insectes, par l'eau mais rarement par l'air (*Acremonium* sp., *Exophiala* sp., *Chaetomium* sp.) (Heineman et al., 1994). D'autres espèces par contre ont des spores à parois sèches (xérospores), facilement dissociables et légères. Elles pourront être en suspension dans l'air et aisément dispersées par les courants d'air. C'est le cas des *Penicillium* et *Cladosporium* que l'on trouve en grand nombre dans l'environnement

Voici pour exemple un tableau regroupant les espèces les plus courantes et leur support.

Espèces identifiées	Atmosphère	Papiers	Peintures	Cuir	Bois peint
<i>Aspergillus niger</i>	*	*			
<i>A. penicillioides</i>	*	*	*	*	*
<i>A. versicolor</i>	*				
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	***	*		*	
<i>P. brevicompactum</i>	*	*			
<i>P. chrysogenum</i>	***	*			*
<i>P. expansum</i>	*	*			
<i>P. glabrum</i>	***				
<i>P. spinulosum</i>	*		*		
<i>P. viridicatum</i>	*	*			
<i>Chaetomium globosum</i>		*			

LES GENRES les plus CONNUS :

Les ***Aspergillus*** forment une colonie qui se présente sous forme duveteuse. Le thalle, hyalin, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule. Ils ont une répartition mondiale et se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. Ils sont présents dans l'environnement humain, notamment dans les plantes, les fruits, la poussière, l'air. On trouve de 1 à 20 spores par mètre cube. Nous en inhalons entre 10 à 30 spores par jour.



On répertorie près de 200 espèces, dont une vingtaine sont impliquées dans des pathologies humaines. Le génome d'*Aspergillus fumigatus* a été séquencé. Sa taille est de 30 Mb, il possède 11 000 gènes, dont 50% sans fonction connue ni homologie dans les banques de données publiques.

Les *Aspergillus* sont très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des biotechnologies, notamment pour la fermentation, la production d'enzymes, la production d'acides organiques, et la production d'antimicrobiens.

Certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être pathogènes pour l'Homme (*Aspergillus fumigatus*, qui peut produire un grand nombre de composés plus ou moins toxiques), les animaux et les plantes. Les mycoses provoqués par *Aspergillus* sont appelées des aspergillose. Certaines espèces peuvent aussi produire des mycotoxines comme les aflatoxines (*Aspergillus flavus*) ou l'ochratoxine (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*).

Certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être pathogènes pour l'Homme (*Aspergillus fumigatus*, qui peut produire un grand nombre de composés plus ou moins toxiques), les animaux et les plantes. Les mycoses provoqués par *Aspergillus* sont appelées des aspergillose. Certaines espèces peuvent aussi produire des mycotoxines comme les aflatoxines (*Aspergillus flavus*) ou l'ochratoxine (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*).

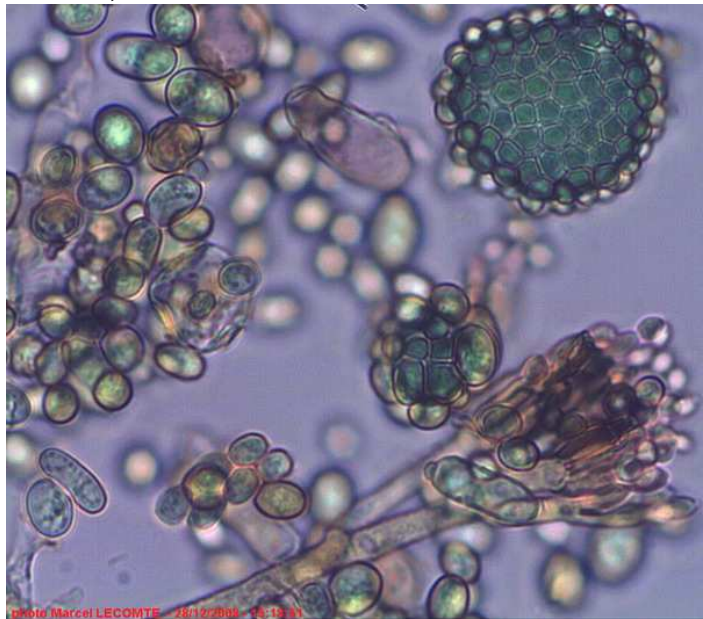
- *Aspergillus niger* est largement répandu (fruits et légumes moisissés, fourrage, produits laitiers). Il est très utilisé dans l'industrie agro-alimentaire pour la production de divers acides. Cette espèce peut être pathogène (aspergillose du conduit auditif, production d'ochratoxine).
- *Aspergillus flavus* colonise toutes sortes de matières organiques en décomposition, sur les denrées alimentaires. Il élabore divers antibiotiques et des composés très toxiques et carcinogènes comme les aflatoxines.
- *Aspergillus flavus* var. *oryzae* (Ahlb.) Kurtzman & al. est très utilisé comme agent de fermentation dans la fabrication du kōji, le moût d'amorçage du saké japonais et du miso.
- *Aspergillus fumigatus* est très fréquent sur les matières organiques humides en décomposition, le compost, le sol, l'air... Il élabore divers métabolites dont plusieurs sont très toxiques (gliotoxine). C'est un agent d'aspergillose aviaire et humaine (représentant 80 à 90% des as-

pergilloses humaines). Responsable d'aspergillose broncho-pulmonaire, d'asthme aspergillaire, d'aspergillomes, d'aspergilloses profondes.

- *Aspergillus glaucus* très fréquent dans l'environnement, notamment dans le sol, sur les substances végétales ou animales en décomposition. Cet *Aspergillus* peut être retrouvé à la surface des confitures, sur les cuirs de chaussures ou les vêtements ayant séjourné dans des placards humides.
- *Aspergillus nidulans*, très fréquent dans le sol, sur divers substrat végétaux, dans l'air. Il peut provoquer des atteintes respiratoires (asthme, aspergillose bronchopulmonaire).
- *Aspergillus ochraceus* très largement répandu, dans le sol, sur les végétaux en décomposition. Cette espèce est phytopathogène (pourriture des pommes et des poires). Elle est responsable d'intoxication mortelle d'animaux d'élevage (ochratoxines). Elle peut aussi attaquer des vers à soie, elle est rarement pathogène pour l'homme.
- *Aspergillus terreus* habite le sol et contribue à la décomposition de la matière organique en raison de ses activités cellulolytique, lipolytique et amylolytique. Fréquent sur les céréales ensilées, la paille, les fourrages et autres substrats végétaux.
- *Aspergillus versicolor* très répandu dans le sol, les végétaux en décomposition, les céréales; il peut être responsable d'onyxis et d'aspergillose pulmonaire.
- *Aspergillus kawachii* sert à la fabrication du Shōchū, un alcool distillé de fécule de patate.
- *Aspergillus awamori* est utilisé dans la fabrication du Shōchū de millet d'Okinawa.

Les **Penicillium** possèdent un conidiophore ramifié évoquant la forme d'un pinceau. Les conidies sont disposées en longues chaînes. Le thalle est vert ou blanc. Ce genre comprend près de 250 espèces. La plupart sont très communs dans l'environnement et peuvent être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les graines, les céréales,...

Diverses espèces sont cultivées au niveau industriel pour la fabrication de fromages (*Penicillium roquefortii*, *Penicillium camembertii*), pour la production de métabolites : les antibiotiques de type pénicillines (*Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*), l'acide gluconique (*Penicillium purpurogenum*), la griséofulvine (*Penicillium griseofulvum*). Certaines espèces peuvent en outre produire de dangereuses mycotoxines.



- *Penicillium chrysogenum* est une espèce très commune dans les sols, sur les matières organiques et les denrées alimentaires. Cette espèce peut provoquer la détérioration des textiles, des papiers et des produits alimentaires. Cette espèce est aussi utilisée pour la fabrication industrielle de la pénicilline.
- *Penicillium notatum* synthétise la pénicilline, premier antibiotique découvert par le Britannique Alexander Fleming le 3 septembre 1928.
- *Penicillium camembertii* est utilisé en fromagerie pour la fabrication de fromages à pâte molle et croûte fleurie tels que le brie, le camembert, quelques fromages de chèvres.
- *Penicillium roquefortii* intervient dans l'affinage des fromages à pâte persillée du type roquefort, fourme d'Ambert, bleu d'Auvergne.
- *Penicillium griseofulvum* est largement répandu dans le sol et les matières en décomposition, et peut produire une mycotoxine dangereuse : la patuline (ou clavacine).
- *Penicillium expansum* est un agent de pourriture des fruits (pommes et poires) et peut de plus produire la patuline. Cette espèce peut contaminer les jus de fruits et compotes.
- *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* sont des agents de pourritures « vertes » et « bleues » des agrumes.
- *Penicillium marneffei* est une espèce pathogène pour l'homme en Asie du Sud-Est (Vietnam, Chine du Sud, Thaïlande), redoutable chez les patients séropositifs au VIH.

LES MOISSURES (microscopie)

Ce chapitre est une traduction personnelle de textes issus du site de David Malloch, Department of Botany, University of Toronto, 1997. Voir le lien suivant :

<http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>

L'auteur nous a donné l'autorisation de traduire ces pages et de les exploiter dans le cadre d'une publication de l'A.M.F.B. (Association des Mycologues Francophones de Belgique), par l'intermédiaire de Christian Lechat.

Nous utilisons les abréviations suivantes : lame porte-objet = lame PO ; lame couvre-objet = lame CO

LES MOISSURES SOUS LE MICROSCOPE

Il y a beaucoup de bons textes sur la théorie et l'utilisation du microscope et je vais considérer que le lecteur a un peu de connaissances en microscopie, ou qu'il peut les acquérir. Mon objectif principal ici est de vous initier aux techniques particulières nécessaires pour l'examen microscopique des moisissures.

Préparation de lames

La plupart des débutants trouvent les moisissures difficiles à préparer pour l'examen microscopique. Souvent, les préparations semblent contenir seulement des spores ou du mycélium, et les structures qui peuvent servir à faire la différence au départ des illustrations disponibles, ne sont non identifiables. La plupart de ces problèmes peuvent être surmontés avec un peu de pratique et, avec le temps, deviendront insignifiants.

Gliocladium album, photo avec caméra de surveillance Sony, objectif 63x, Marcel Lecomte



La première règle à se rappeler dans l'étude des moisissures est qu'il faut examiner du matériel jeune, en pleine croissance. Les parties les plus vieilles de colonies ou de moisissures recueillies sur un milieu naturel seront souvent partiellement décomposées et tellement couvertes de spores qu'elles en seront méconnaissables. La meilleure façon de commencer est d'examiner la croissance de la marge de la colonie où les spores sont activement produites. Cela exige parfois deux ou trois tentatives avant que le secteur de sporulation actif ne soit localisé, mais quand c'est le cas, on y trouvera toutes les caractéristiques de production de spores néces-

saires pour l'identification. Si la colonie a été dans une boîte de Pétri avec d'autres moisissures pendant plusieurs semaines et ne s'étend plus activement, elle ne fournira pas du bon matériel pour l'examen.

Pour réaliser une bonne préparation microscopique d'une colonie de moisissures, commencez par placer une petite goutte de milieu de montage sur une lame PO de microscope. Les différentes sortes de milieux de montage microscopiques seront exposées séparément ; au commencement, utilisez de l'eau.

En utilisant une aiguille de dissection stérilisée ou une aiguille d'inoculation, on enlève un petit morceau (pas plus de 2 mm²) de la partie de la colonie près de la marge, en prenant avec cela une couche très mince de la surface de l'agar.

Si la colonie est épaisse et laineuse, il n'est pas nécessaire de prendre l'agar, mais dans un type plus étranglé ou plus compact, c'est essentiel. Placez le morceau de colonie dans le milieu de montage et, avec une deuxième aiguille, faites en sorte que les filaments sont bien étendus. Un support qui n'a

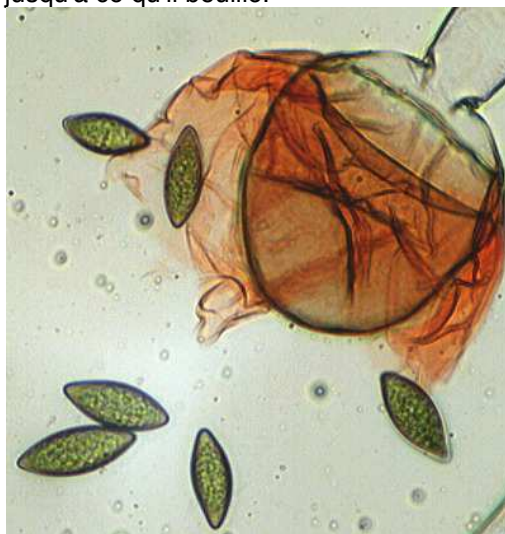
pas été « arrangé » apparaîtra comme un morceau opaque apportant de médiocres informations. Placez une lame couvre-objet sur le milieu de montage, en présentant la lame de biais afin que les bulles d'air puissent s'échapper.

Les bulles d'air restantes peuvent être enlevées du support en le chauffant doucement sur une lampe à alcool. Si le chauffage est appliqué trop vigoureusement, les lames PO et CO risquent de se casser, en projetant des éclaboussures partout, ce qui peut s'avérer dangereux ; donc il est essentiel de chauffer seulement jusqu'à un frémissement du milieu, pas jusqu'à ce qu'il bouille.

Conidies et conidiophore, objectif 63x, Marcel Lecomte

Une technique intéressante utilisée par certains mycologues pour préparer des montages microscopiques consiste à coller la moisissure sur un petit morceau de papier adhésif. La bande est appuyée légèrement contre la colonie pour qu'un peu d'hyphes et de spores y adhèrent. Placer alors le film, côté collant en haut sur la lame PO et déposer une goutte de milieu de montage, puis couvrir avec une lame CO.

Cette technique n'est pas limitée aux colonies en boîtes de Pétri ; cela fonctionne tout aussi bien sur des colonies naturelles poussant dans la plupart des habitats. La technique de la bande de papier collant est généralement utilisée pour échantillonner des moisissures dans des environnements d'intérieur.



Cultures sur lames

La plupart des moisissures rapporteront de bons résultats si les spécimens sont préparés comme décrit ci-dessus, mais quelques-unes présentent des difficultés supplémentaires. Les plus problématiques sont celles qui ont tendance à se désagréger aussitôt qu'elles sont montées. Les espèces des genres *Cladosporium*, *Monilia* et *Alternaria* ont des spores attachées en chaînes très fragiles qui peuvent tomber en morceaux au plus léger mouvement d'air.

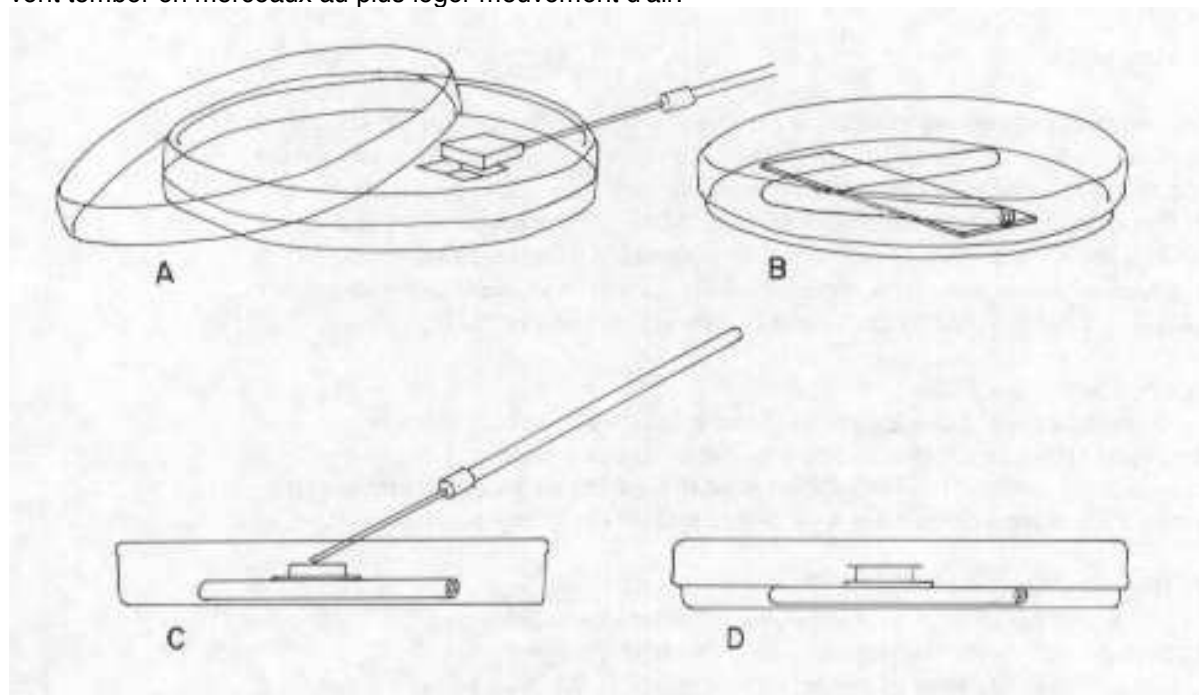


Figure 13 : Technique de culture sur lame PO. Un bloc d'agar stérile est coupé d'une boîte de Pétri (A) et est placé sur une lame PO stérile reposant sur un tube de verre plié en V dans une autre boîte de Pétri stérile (B). Quelques spores d'un champignon sont inoculées aux coins du bloc d'agar stérile (C) puis on couvre le bloc avec une lame CO (D) pour l'incubation. Un disque de papier filtre humidifié maintient l'humidité pour la chambre de culture.

Les lames préparées de ces moisissures révèlent invariablement seulement des spores libres et un réseau d'hyphes. Pour contourner ce problème, il est utile de créer des cultures sur lames (voir fig. 13 ci-dessus). Les cultures sur lame sont réalisées en utilisant une boîte de Pétri comme chambre

d'incubation ; on y place un morceau en V de tuyau de verre qui repose sur plusieurs couches de papier filtre humidifié.

Un bloc stérile d'agar d'environ 1 cm² et de quelques mm d'épaisseur (3 à 5) est posé sur une lame PO stérilisée à la flamme ; cette lame est alors déposée dans la boîte de Pétri sur le tuyau. Le champignon est inoculé près des quatre coins du bloc d'agar et la boîte est fermée par un couvercle stérile. Après quelques jours, la lame PO peut être placée sur le microscope et les structures de la moisissure sont observées dans leur état de croissance naturel. Plus tard, si on le désire, le bloc d'agar peut être enlevé de la lame PO et CO, et on réalise deux lames conventionnelles avec ces deux éléments. Si on leur permet de sécher avant que ce ne soit fait, les structures de la moisissure vont moins probablement se casser.



Conidiophore et conidies de *Mucor sp.*, montage dans PVA fuchsine acide, x63, Marcel Lecomte

MILIEUX DE MONTAGE

L'utilisation de l'eau comme milieu de montage est facile et souvent suffisante pour obtenir des préparations satisfaisantes. Mais les montages à l'eau se dessèchent rapidement, et ne permettent pas à des structures particulières d'être vues mieux que d'autres. Pour surmonter ces problèmes, beaucoup de milieux de montage différents ont été inventés. Bien que la préparation et l'utilisation de milieux de montage soient une matière spécialisée et plutôt personnelle, il y en a quelques-uns qui font partie de la routine dans la plupart des laboratoires parce qu'ils offrent

des avantages distincts et bien connus. Voici quelques formules et des commentaires à leur propos.

Eau + agent mouillant

Eau distillée	100 cc
SDS	1 à 2 g
Ou produit de vaisselle	5 à 10 gouttes
Ou agent mouillant utilisé en photographie	5 à 10 gouttes

Plusieurs agents mouillants photographiques peuvent être utilisés, comme Kodak Photo-flux ou Edwal Kwik-Wet. Ce milieu de montage a l'avantage d'empêcher des bulles d'air de se fixer à beaucoup de structures du champignon. Je l'utilise parfois à la place de l'eau pour réaliser des montages de moisissures particulièrement sèches.

Potasse et phloxine

Solution 1	
Eau distillée	100 cc
Phloxine B	0,025 g
Solution 2	
Eau distillée	100 cc
potasse	10 g

Les deux solutions sont gardées dans des bouteilles compte-gouttes séparées. Une goutte de chacune est déposée sur une lame PO et on mélange avec une aiguille juste avant utilisation.

C'est un milieu colorant habituellement utilisé pour les Basidiomycètes et d'autres champignons qui présentent des tissus compacts et difficiles à dissocier. Les hyphes des moisissures prennent une couleur rose brillante et sont ainsi plus facilement visibles que dans l'eau. Il est préférable d'éliminer autant de liquide que possible d'en-dessous de la lame CO pour que la couleur de fond soit beaucoup plus neutre afin d'améliorer le contraste (utiliser un morceau de papier absorbant).

Lacto-fuchsine

Acide lactique	100 cc
Fuchsine acide	0,1 g

La lacto-fuchsine ne séchera pas sous la lame CO pendant plusieurs semaines, ce qui est très pratique et utile si une préparation doit être conservée pendant quelque temps. Le non séchage peut être prolongé encore plus longtemps en lutant les bords de la préparation avec du vernis à ongles clair. La lacto-fuchsine est un colorant puissant qui est particulièrement utile pour les montages d'anamorphes et autres structures.

Solution de Melzer

Hydrate de chloral	50 g
Eau distillée	100 cc
Iodure de K	5 g
Iode	2,5 g

Conidies d'une moisissure non identifiée, colonisant un champignon, observation dans l'eau, x100, Marcel Lecomte

Ce milieu d'observation est utilisé largement dans la mycologie. Certains mouchoirs en papier y deviennent bleus à noirâtre et sont dits « amyloïdes » ; d'autres se teintent de rouge et sont appelés « dextrinoïdes ». C'est un bon milieu d'observation qui « purifie » le matériel quelque peu et donne une résolution particulièrement brillante avec un microscope. Pour la bonne résolution et la couleur des photographies au microscope, je prépare la solution de Melzer sans l'iode, ce qui génère une solution très claire. AVER-



TISSEMENT : l'hydrate de chloral doit être manipulé avec précaution car il est toxique. De plus, il peut être inscrit au registre des substances contrôlées dans quelques juridictions, exigeant une autorisation spéciale pour l'achat et la possession.

Milieu de montage préféré

Acétate de K	6 g
Eau distillée	300 cc
Glycérine	120 cc
Ethanol	180 cc
Encre bleue (bleu d'aniline)	0,1 à 0,2 %

Un milieu de montage très bon, polyvalent qui ne sèche pas sur la lame pendant plusieurs semaines. Comme avec la lacto-fuchsine, il peut être luté avec du vernis à ongles pour en faire une préparation semi-définitive. L'encre bleue ne fait pas partie de la formule originale, mais est utile comme colorant pour les parois de certaines moisissures. D'autres teintures peuvent être utilisées également.

Certains milieux de montage, comme le lactophénol, sont largement utilisés dans des laboratoires mycologiques, mais sont très toxiques et n'offrent aucun avantage particulier sur ceux qui sont présentés ci-dessus.

Si des lecteurs sont intéressés par de nouveaux milieux de montage, je suggère ceux qui sont répertoriés sous "des méthodes" dans le Dictionnaire d'Ainsworth des Moisissures (1971) ou Dring (1971). Une astuce finale pour réaliser de bons montages. Beaucoup de moisissures sont difficiles à "mouiller", même quand un agent mouillant est utilisé. Pour celles-ci, je suggère de les mettre dans une goutte d'alcool éthylique à 95 % pendant quelques secondes et ensuite, avant que l'alcool ne soit complètement desséché, d'ajouter une goutte du milieu de montage choisi. Cela donne souvent des miracles avec les moisissures les plus sèches.

LES TECHNIQUES DE STRESS POUR LES CULTURES

Les moisissures sont capables de résister aux agressions environnementales, mais finalement, quand le stress est suffisamment important, elles seront tuées. Mais toutes les moisissures n'ont cependant pas le même seuil de tolérance au stress, cependant et nous pouvons tirer avantage de cette propriété en soumettant un matériel à juste assez de stress pour tuer quelques moisissures, mais pas d'autres. L'application de telles techniques a révélé un autre fait intéressant : certaines moisissures ne germeront pas si elles n'ont pas été soumises à des conditions qui en tuent beaucoup d'autres.

J'ai déjà mentionné un tel groupe dans ma discussion du peuplement d'excréments ou des moisissures coprophiles qui produisent des spores de produits alimentaires qui ne germeront pas tant qu'elles ne sont pas soumises à la rigueur des sucs digestifs d'animaux. D'autres moisissures produisent des spores qui germent seulement après avoir été exposées au feu ou la congélation.

Pour explorer ces adaptations intéressantes, nous devons seulement prélever un échantillon de sol, des excréments, le bois, etc, et le soumettre à une certaine sorte de traitement qui va tuer la plupart des moisissures. Nous pouvons cuire l'échantillon dans un autoclave ou à la vapeur (sans pression), le tremper dans l'alcool, des acides, des bases, ou d'autres produits chimiques, ou alternativement le geler et le dégeler pendant plusieurs semaines. Presque n'importe quel traitement radical rapportera quelques "holdouts" fongiques qui ne pourraient pas apparaître autrement. Après le traitement, la substance peut être traitée de manière normale, comme en boîte de Pétri, ou en chambres moites. Le docteur B. Scott (Scott 1968) a décrit une méthode de ce type pour isoler des espèces d'*Eupenicillium* (un ascomycète) du sol. Environ 2 grammes de sol ont été ajoutés à 18 ml d'eau stérile et chauffés dans un bain d'eau à 80°C pendant 30 minutes. Après la sortie du bain, la suspension de sol a été traitée suivant une technique de dilution qui sera décrite par la suite.



observation dans l'eau, x40, Marcel Lecomte

Conidiophore d'un *Aspergillus*, disséminant son contenu,

Un exercice pratique, assez facile à réaliser :

Matériel nécessaire :

Boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre - Agar Agar - Eau distillée

Un antibiotique à spectre large : streptomycine, amoxicilline ou chloramphénicol (très efficace pour les milieux de culture en mycologie, en association avec la gentamicine) ; ces antibiotiques ont pour but d'empêcher la croissance des bactéries.

Préparation :

Mélanger 20 g d'agar agar dans un récipient, avec 1 litre d'eau distillée et ½ g d'antibiotique et porter à ébullition durant quelques minutes ; répartir ensuite dans une douzaine de boîtes de Pétri.

Application :

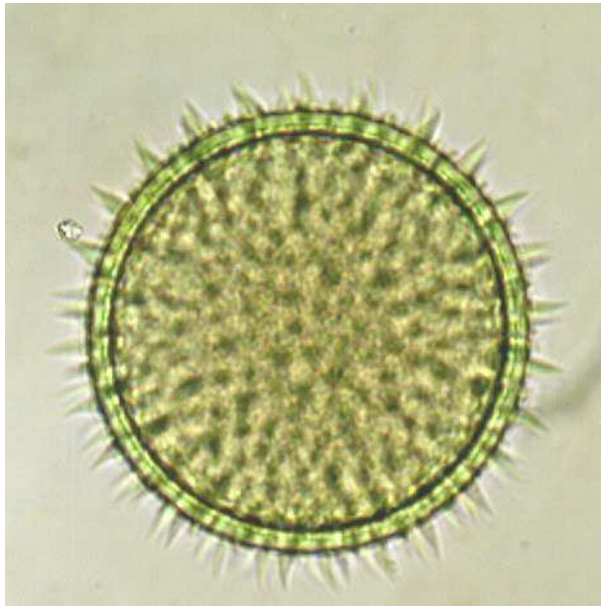
Envisageons d'effectuer une prospection générale au niveau de l'air d'une maison par exemple ! Il suffit de poser une boîte de Pétri ouverte durant 24 h sur un meuble ou un appui de fenêtre, dans chaque pièce de la maison, dans le frigidaire, la buanderie ... Ensuite, fermer les boîtes de Pétri et les placer dans un incubateur à 25° C durant quelques heures ... Voici un exemple de ce que vous obtiendrez ! L'incubateur n'est pas nécessaire, mais la croissance sera nettement plus lente à température plus froide et variable.



Préparations définitives de pollens de référence.

Il s'agit d'un exercice de préparation assez facile à conduire à bon terme, et qui donne des résultats spectaculaires et motivants.

Nous tenons cependant à préciser immédiatement que ce mode opératoire ne concerne dans un premier temps que des colorations de masse permettant simplement de "voir" nettement le grain de pollen, qui très souvent est hyalin et peu visible sans marquage par coloration. La pratique du métier ardu d'instituteur nous a appris à partir du simple pour aller vers le compliqué, en essayant d'entraîner un maximum d'élèves vers le but à atteindre, en ne laissant si possible personne à la traîne. C'est là toute la difficulté de l'initiation !



Grain de pollen de *Althaea rosea*, coloré au vert de méthyle acétique, x40, Marcel Lecomte

C'est le premier pas pour quelqu'un qui aborde un nouveau sujet en microscopie ... le second consiste à aller plus loin lorsqu'on maîtrise le sujet !

Aller plus loin, c'est effectivement mettre en évidence des détails de structure externe ou interne, donc pratiquer des colorations sélectives, suivies de régression ou précédées de mordantage, appliquer des doubles colorations, utiliser des colorants métachromatiques Pour ne citer que ceux-là !

Mais là, nous passons à un autre niveau qui implique de posséder des connaissances pour le moins rudimentaires de chimie minérale et organique et aussi de bonnes connaissances de biologie végétale ; en effet, avant de tenter de colorer sélectivement ou de mettre en évidence les

colpus, sporopollénine, intine, exine, endextine, extectine et autre apertures il faut d'abord savoir ce que c'est et à quoi cela correspond ou sert !

Cette fois, nous sommes devant le second obstacle à franchir et il est beaucoup moins facile à aborder... Comme disait l'oncle Paul, c'est une autre histoire que nous vous raconterons une prochaine fois !

La constitution de lames référentielles implique la parfaite connaissance de la plante récoltée et nous avons le sentiment que chaque préparation doit être accompagnée d'une photo numérique ou argentique, ou encore d'un scan pour lever toute ambiguïté ou problème futur de détermination. Cela peut conduire également à la constitution d'un herbier.

N'oublions pas cependant que certaines plantes relèvent d'un plan de protection et que leur cueillette est en principe interdite : il n'est rien mentionné pour le prélèvement du pollen !

Question (idiote aux yeux de certains) : **Qu'est-ce qu'un grain de pollen ?**

C'est l'élément sexuel mâle de la fécondation chez les plantes phanérogames (c'est-à-dire les plantes dont les organes de fructification sont apparents, qui portent des fleurs à un moment donné de leur développement et qui se reproduisent par graines). Le pollen est produit par les anthères.

Comme la fécondation est confiée à des agents extérieurs comme le vent ou les insectes par exemple, la quantité de grains est parfois phénoménale et est appelée, dans certaines régions « pluie de soufre ».

Le grain de pollen se dépose sur le stigmate du pistil et il émet alors un tube pollinique qui va aller jusqu'à l'ovule.

La taille d'un grain de pollen varie de 2,5 μm chez le *Myosotis* à 200 μm chez certaines Cucurbitacées, comme la courge.

Chez certaines personnes, le pollen peut provoquer des réactions allergiques graves se manifestant par le rhume des foins ou un asthme pollinique.

Chez les Algues, les Champignons, les Mousses, les Prêles et les Fougères, on parlera de spores.

Pour les pollens d'origine inconnue, il faut se référer à une palynothèque. Pour ceux qui sont intéressés, il est possible de consulter le remarquable site conçu par Michel VEROLLET, qui est palynologue et où il vous présente sa passion : <http://perso.wanadoo.fr/pollens/>

Vous y trouverez notamment des informations sur les capteurs, sur les allergies ainsi que les bulletins de répartition des pollens de différentes régions de France. Notons également la présence de liens vers deux clés de détermination très efficaces, conçues par l'Académie de Bordeaux et de Montpellier.

Détail d'un grain de pollen de *Centaurea montana*, grossi plus de 2000x, photo Michel Blaise

EN PRATIQUE :

Il est préférable d'acquérir le « tour de main » en travaillant sur des grains de pollen faciles à récolter et spectaculaires à regarder : nous vous conseillons de vous tourner vers la Rose Trémière (*Althaea rosea*, - Malvacée), intéressante par la taille des grains. On pourrait aussi se diriger vers la famille des Cucurbitacées (Potiron, Courge, etc...) à grains énormes également, ou encore, dans les plantes ornementales, choisir *Hibiscus syriacus* (Le Ketmie de Syrie)..



Nous avons récolté du pollen, nous connaissons la plante : il ne reste plus qu'à œuvrer !

Suite à l'information transmise par un ami, modérateur d'un forum de microscopie, nous nous sommes dirigés vers la méthode de WODEHOUSE (1935), qui nous paraît la plus simple, et que nous avons un peu adaptée à nos préférences, car nous n'aimons pas la glycérine gélatinée qui implique de devoir chauffer les lames....

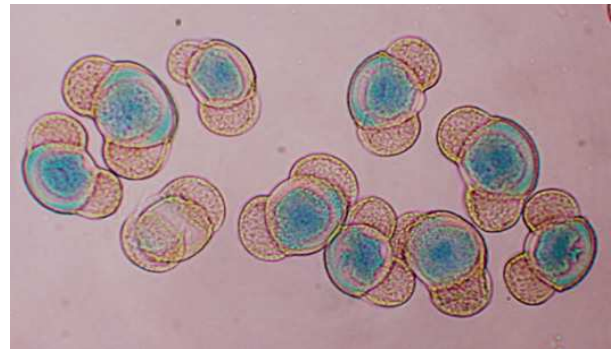
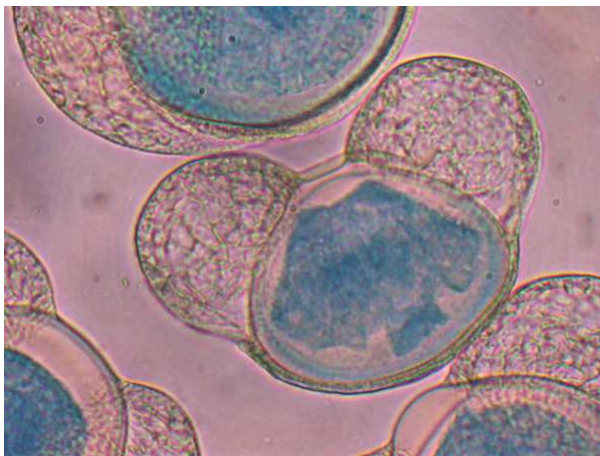
modus operandi :

- récolter le pollen
- le réunir en petit tas au centre de la lame de verre avec une lame de rasoir (ne pas oublier de bien nettoyer cette lame après l'opération, sous peine de polluer la lame suivante avec des grains parasites)
- déposer délicatement une goutte d'éthanol à 95° sur le tas de pollen
 - oublions l'alcool absolu, 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
 - ne pas placer la goutte en contact direct avec le pollen, qui risque de rentrer dans la pipette et polluer ainsi tout le flacon
 - si vous placez trop d'alcool sur le pollen, il va se répartir sur toute la lame et vous en perdrez une bonne partie
 - ce traitement est appliqué afin de nettoyer l'enveloppe du grain de la couche huileuse qui masque les détails ornementaux et empêcherait le colorant de pénétrer
- nous répétons 2 fois l'opération afin de bien déshydrater
- nettoyer les précipités ou cristaux formés à l'extérieur de la goutte (sous forme d'auréole)
 - utiliser pour cela un bâtonnet pour oreilles (coton tige) ou un bout d'essuie-tout imbibés légèrement de méthanol
- déposer délicatement une goutte de colorant (voir liste ci-dessous) et laisser agir durant 2 à 5 minutes
 - mêmes précautions que pour l'alcool, sous peine de trop étaler le pollen
- déshydrater 3 fois de suite à l'alcool à 95°

→ en profiter pour étaler la goutte en carré et enlever avec un essuie-tout les traces d'humidité que l'alcool a générées sur le pourtour de la zone

- poser 2 gouttes de Baume du Canada (c'est à cause de lui que je prends tellement de soin à déshydrater)
- poser la lame couvre-objet avec les précautions d'usage, afin d'éviter au maximum les bulles d'air
→ il faut cependant savoir qu'avec le Baume du Canada, les petites bulles d'air disparaissent assez rapidement, car celui-ci est très avide d'oxygène
- luter au vernis à ongles transparent
- poser la (les) étiquette(s) d'identification et les vernir également
→ il est impératif d'indiquer sur la préparation le nom de la plante et éventuellement la date de préparation ainsi que le colorant utilisé (nous utilisons de petites étiquettes autocollantes, aux dimensions de la largeur de la lame porte-objet)

Vous êtes maintenant le réalisateur et l'heureux possesseur d'une préparation définitive qui risque de vous survivre (des préparations que nous avons réalisées en 1969, au Baume du Canada, sont toujours impeccables)



Grains de pollen de *Pinus sp.*, montage au PVA bleu d'aniline, photo Marcel Lecomte

Les colorants à utiliser :

Nous en avons expérimenté toute une série, sans aucuns déboires ; tout cela fonctionne à merveille et constitue un régal pour les yeux.

- la **Safranine formolée de Sémichon** (elle colore en rouge +/- foncé)
- la **Phloxine B alcoolique** (elle colore en mauve violet)
- le **Rouge Congo SDS** (il colore en rouge clair et met remarquablement en évidence le revêtement cuticulaire) ; SDS signifie Sodium Dodécyl Sulfate ; cette formule a été mise au point par CLE-MECON, un mycologue célèbre.
- le **Vert d'iode** (il colore en vert tendre)
- le **Vert de Méthyle** (il colore en vert plus nettement émeraude)
- l' **Eosine aqueuse à 2 %** (elle colore en rouge clair)
- le **Rouge neutre** (il colore en rose rouge)
- la **Fuchsine phéniquée de Ziehl**, préparée à base de fuchsine basique (elle colore en bleu violet et peut être régressée avec de l'acide chlorhydrique à 5 %)

TRES IMPORTANT (voire même ESSENTIEL) :

Il n'y a pas de miracle : l'utilisation de colorants en microscopie implique des dosages précis, (nous utilisons une balance électronique au 1/10 de gramme près) avec des dilutions, selon les colorants, de l'ordre de 1:100 (1 g de colorant pour 100 cc d'eau distillée ou d'alcool, ou autre solvant ou mélange de solvants), 1:200, 1:500, 1:1.000, voire 1:10.000 ...

Le non respect de ces dosages (c'est à dire la technique de l' "à peu près") génère des surcolorations désagréables et décourageantes, et les résultats ne sont pas constants !

Dans la 1^{ère} partie de cet exposé, figure la phrase suivante :

« Suite à l'information transmise par un ami, modérateur d'un forum de microscopie, nous nous sommes dirigé vers la méthode de WODEHOUSE (1935), qui nous paraît la plus simple, et que nous avons un peu adaptée à nos préférences, car nous n'aimons pas la glycérine gélatinée qui implique de devoir chauffer les lames.... »

Nous avons été amené à revoir notre position, car le heureux (ou malheureux) hasard a fait que nous avons beaucoup expérimenté sur des grains de pollen prélevés sur la Rose Trémière (*Althaea rosea*). Une conclusion trop hâtive, nous avait amené à déclarer que l'usage de l'alcool à 95° pour déshydrater les préparations était sans incidence sur les grains ; si c'est le cas effectivement pour la plante mentionnée ci-dessus, et nombre d'autres d'ailleurs, nous avons eu grand tort d'élever ce principe en règle générale. Chez certaines plantes, le sporoderme du grain de pollen est mince et souple et peut se déformer considérablement sous l'effet de la dessiccation (comme chez le maïs (*Zea mays* L.) par exemple).

Grains de pollen de *Chicorium intybus*, contraste de phase, 63x, photo Marcel Le-comte



Il faut savoir qu'un grain de pollen présente 2 parties essentielles :
 +++ une partie centrale vivante, qui renferme les éléments sexuels mâles destinés à la reproduction
 +++ une membrane complexe dont l'ensemble constitue le **sporoderme**, qui est lui-même composé de 2 couches :

+ **l'intine**, qui ne survit pas au contenu cellulaire.

+ **l'exine**, qui est un des matériaux les plus résistants du monde organique (elle résiste aux agents corrosifs) et qui se compose de deux couches superposées: **l'endexine** et **l'extectine**. Cette enveloppe doit sa remarquable capacité de conservation à une substance singulière : **la sporopolénine**.

Par obligation (puisque eau et Baume du Canada ne font pas bon ménage...), nous avons donc dû nous tourner vers la glycérine gélatinée, comme milieu de montage !

Un rapide bricolage nous a permis de récupérer la plaque chauffante d'une ancienne cafetière électrique et nous voici paré pour explorer d'autres horizons.

Modus operandi :

- récolter le pollen
- le réunir en petit tas au centre de la lame de verre
- déposer délicatement une goutte d'éthanol à 95° sur le tas de pollen
- nous répétons 2 fois l'opération afin de bien dégraisser le sporoderme (vérifier au microscope si l'ornementation est bien visible, car pour certains pollens – Passiflore -, il est nécessaire de dégraisser jusqu'à 5 fois...)
- nettoyer les précipités ou cristaux formés à l'extérieur de la goutte (sous forme d'auréole)
- déposer délicatement une goutte de colorant (voir liste ci-dessous) et laisser agir durant 2 à 5 minutes
- rincer la préparation à l'eau (afin d'éliminer le surplus de colorant)
- poser une certaine quantité de gélatine glycinée (nous la conservons dans un petit flacon compte-gouttes en PVC, ce qui permet de la prélever facilement en pressant le contenant)
- poser la lame durant quelques secondes (10 à 20 selon la puissance calorifique) sur la plaque chauffante.

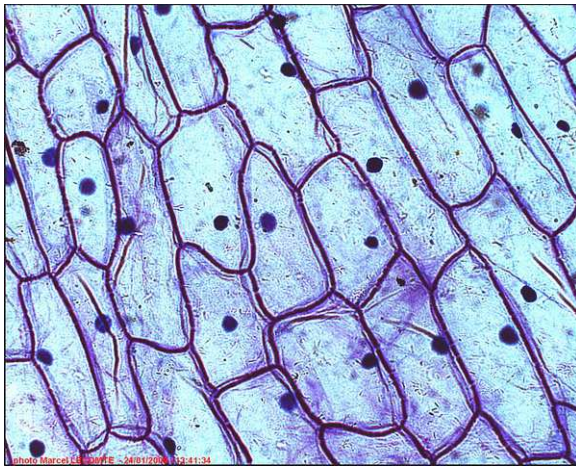
- ne pas laisser bouillonner : dès que la goutte s'étale, retirer de la source de chaleur, afin d'éviter la formation de bulles.
- poser la lame couvre-objet avec les précautions d'usage, afin d'éviter au maximum les bulles d'air
- luter au vernis à ongles transparent
- poser la (les) étiquette(s) d'identification et les vernir également

Nous qualifierons cette préparation de semi-définitive, car elle va se conserver nettement moins longtemps qu'avec le Baume du Canada utilisé comme milieu de montage. Cependant, si vous avez pris la peine d'incorporer quelques gouttes de phénol lors de la préparation de la glycérine gélifiée, vous aurez éliminé une des sources de problèmes (pollution éventuelle par des algues ou des moisissures). La seconde étant le dessèchement, auquel on remédie en soignant particulièrement le lutage de la préparation.

Les colorants à utiliser :

Après plusieurs centaines d'essais de colorations, notre préférence va aux suivants, dans le cas de ce milieu de montage particulier :

- la **Safranine formolée de Sémichon**
- le **Vert de Méthyle**
- l' **Eosine aqueuse à 2 %**



Cellules d'épiderme d'oignon, coloration bleu de méthylène, 40x et 100x, photo Marcel Lecomte

Applications de la microscopie optique dans l'étude des plantes

Par Guy Auderset

Technique de préparation du matériel biologique en vue d'une observation

Observation de matériel à l'état frais

Cette technique est adoptée surtout pour les examens de matériel de faibles dimensions : plancton, algues, cultures cellulaires, bactéries, certains champignons, spores etc. Bien évidemment, le matériel doit être translucide et laisser passer une bonne partie de la lumière de la source d'éclairage.

Elle fait appel à une lame porte-objet standard, un milieu liquide (milieu de culture ou eau) et une lamelle qui recouvre le matériel. Cette dernière est quasi obligatoire : pour protéger l'objectif tout d'abord, puis pour exploiter au mieux les capacités de résolution de l'objectif qui, sauf exception (pas de 0,17 gravé sur la monture) sont calculées avec la présence de l'épaisseur de la lamelle.

En cas d'observation d'organes plus volumineux, feuilles, fragments de tige ou racine par exemple, on peut procéder à une dilacération modérée des tissus ou des coupes à main levée au moyen d'une lame de rasoir, avant l'observation qui se fera entre lame et lamelle.

Dans ce type d'observation, le fond clair est pratiqué en diaphragmant assez fortement le condenseur pour augmenter le contraste du matériel vivant non coloré, ou bien, l'observation peut se faire en contraste de phase ce qui améliore fortement l'observation des structures.

!!! Le microscope et sa source dégagent de la chaleur. En cas d'observation prolongée d'une préparation «à l'état frais» contrôler qu'elle ne se dessèche pas. Rajouter un peu de liquide sur un bord de la lamelle si nécessaire.



Coupe transversale dans une tige de *Fraxinus sp.*, - photo de l'auteur

Observation de matériel fixé

La **fixation** consiste à tuer le matériel destiné à l'observation tout en préservant le mieux possible les structures cellulaires et tissulaires. Elle consiste à plonger les fragments de tissus dans un mé-

lange de produits, le fixateur, dont les composants vont agir sur les structures cellulaires en les stabilisant : ex. le formol (ou d'autres aldéhydes) stabilise les protéines en créant des ponts artificiels entre les secteurs des chaînes de protéines. L'acide acétique stabilise (coagule) l'ADN et permet une bonne visualisation des chromosomes, etc. Aucun fixateur n'est parfait et on doit le choisir en fonction des besoins de l'observation. La liste est nombreuse...

En histologie végétale, le fixateur courant donnant un résultat acceptable est le **FAA** ou **AFA** (Formol, Alcool, Acide acétique). On l'utilise en routine pour les coupes de matériel enrobé dans la paraffine (histologie).

Observation de petit matériel

Le matériel de faible dimension évoqué ci-dessus peut aussi bien être observé de la même manière après avoir été fixé (= préservé), par exemple sur le terrain, avant d'être ramené au laboratoire. Le fixateur usuel standard est le formol à 4-5 %.

!!! Attention aux vapeurs toxiques du formol : laver le matériel dans de l'eau avant l'observation.

Observations de type anatomique & histologique

Le but est de réaliser des coupes dans le matériel afin d'en étudier la structure.

Les modalités sont diverses et vont nécessiter un choix en fonction du matériel à étudier :

- **Matériel « dur »**, généralement fortement lignifié comme des tiges, des racines de 2-3^e année ou plus : la présence de fortes quantités de lignine/subérine empêche la confection de coupes histologiques et met le rasoir (fort cher) du microtome en mauvais état.

Il existe, en cas de besoin absolu, des techniques de dissolution de la lignine, techniques lourdes et utilisation de produit dangereux (acide fluorhydrique).

Devant la nécessité de couper ce type de matériel, la bonne vieille méthode des TP s'impose : **coupe à main levée**, traitement à l'eau de javel et coloration carmin/vert d'iode donnent des résultats très satisfaisants. Un peu de patience et de persévérance sont indispensables !

- **Matériel « mou »** : c'est à dire peu lignifié : organes jeunes, vitroplants, pièces florales, feuilles, embryons, ... : la technique usuelle est celle de la **paraffine**.

Description : le matériel fixé est déshydraté puis imprégné à chaud avec de la paraffine maintenue à l'étuve (60° C). Après refroidissement, les blocs de paraffine, dans lesquels sont inclus les échantillons biologiques, sont débités en coupes au moyen d'un microtome. Ces coupes sont ensuite collées sur des lames porte-objet et, après séchage, colorées avec des solutions de colorant(s) déterminées pour la mise en évidence de structures cellulaires ou tissulaires.

Cette méthode nécessite beaucoup de soins et de temps mais présente de nombreux avantages : les coupes obtenues sont minces, généralement 10 microns d'épaisseur. Elles permettent une bonne observation des structures cellulaires. Un choix de colorant approprié permet de mettre en évidence des structures particulières. Enfin, le matériel débité en coupes successives autorise une reconstitution spatiale du matériel observé.

Inconvénient : certaines colorations faciles à utiliser sur les coupes à main levée sont plus difficiles à pratiquer sur des coupes à la paraffine.

Pour info : il existe une technique comparable à la méthode paraffine : elle utilise une résine époxy qui nécessite un microtome particulier et un couteau de diamant : les coupes obtenues (dites semi-fines) ont une épaisseur de 1-2 microns et, en utilisant un fixateur « parfait » utilisé en microscopie électronique, cela donne les plus belles images que l'on puisse observer en microscopie optique.

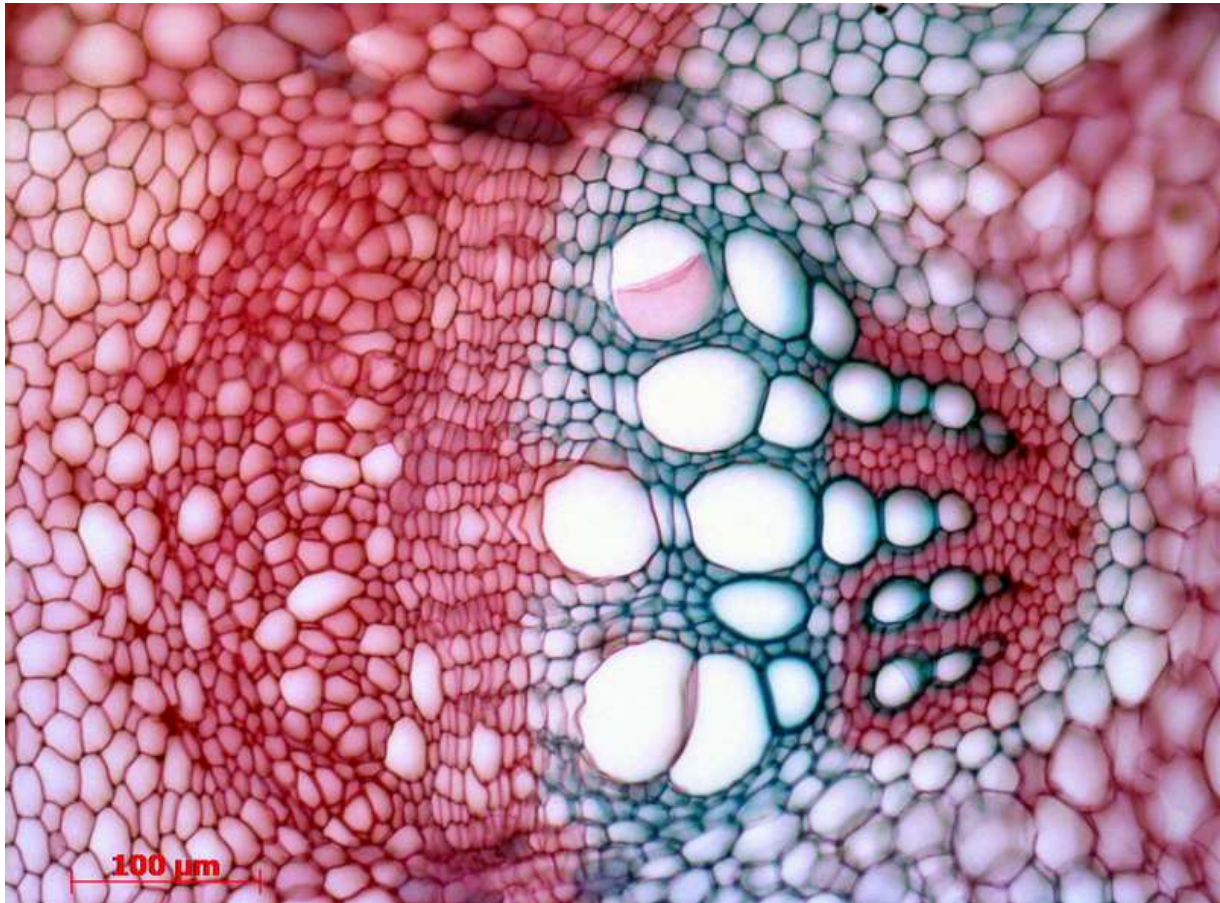
Protocole pour coupes à main levée

Cas d'utilisation : matériel trop dur pour être coupé par la méthode paraffine : tiges ou racines lignifiées par exemple.

Avantage : rapidité de la méthode : avec un peu de dextérité, les résultats sont obtenus en 30 à 60 minutes. On peut couper soit des tissus prélevés directement sur la plante ou, ce qui est mieux, des tissus fixés au préalable par le FAA.

But de la méthode : observation uniquement des parois cellulaires dont les composantes (lignine, cellulose, subérine) sont révélées par coloration spécifique. La nature et la structure des parois renseignent sur la nature des tissus observés.

Inconvénient : aucune information sur le contenu cellulaire (noyaux, organelles, cytoplasme) qui sont détruits pendant la préparation.



Coupe transversale dans une tige de *Vitis vinifera* - photo de l'auteur

Méthode :

1. Coupe :

On pratique des coupes à main levée au moyen d'une lame de rasoir type Gillette, perpendiculairement à l'axe de l'organe. Les coupes utilisables doivent être les plus fines possible...ce qui n'est pas évident : en faire plusieurs dizaines et choisir sous la loupe celles qui paraissent les plus fines, voire même des coupes partielles, les meilleures. Les organes plus ou moins durs se coupent plus facilement que les organes mous. Dans ce cas, il peut être utile d'envelopper l'objet dans de la moelle de sureau ou de tournesol qui maintiendra l'objet pendant la coupe.

2. « Vidage » :

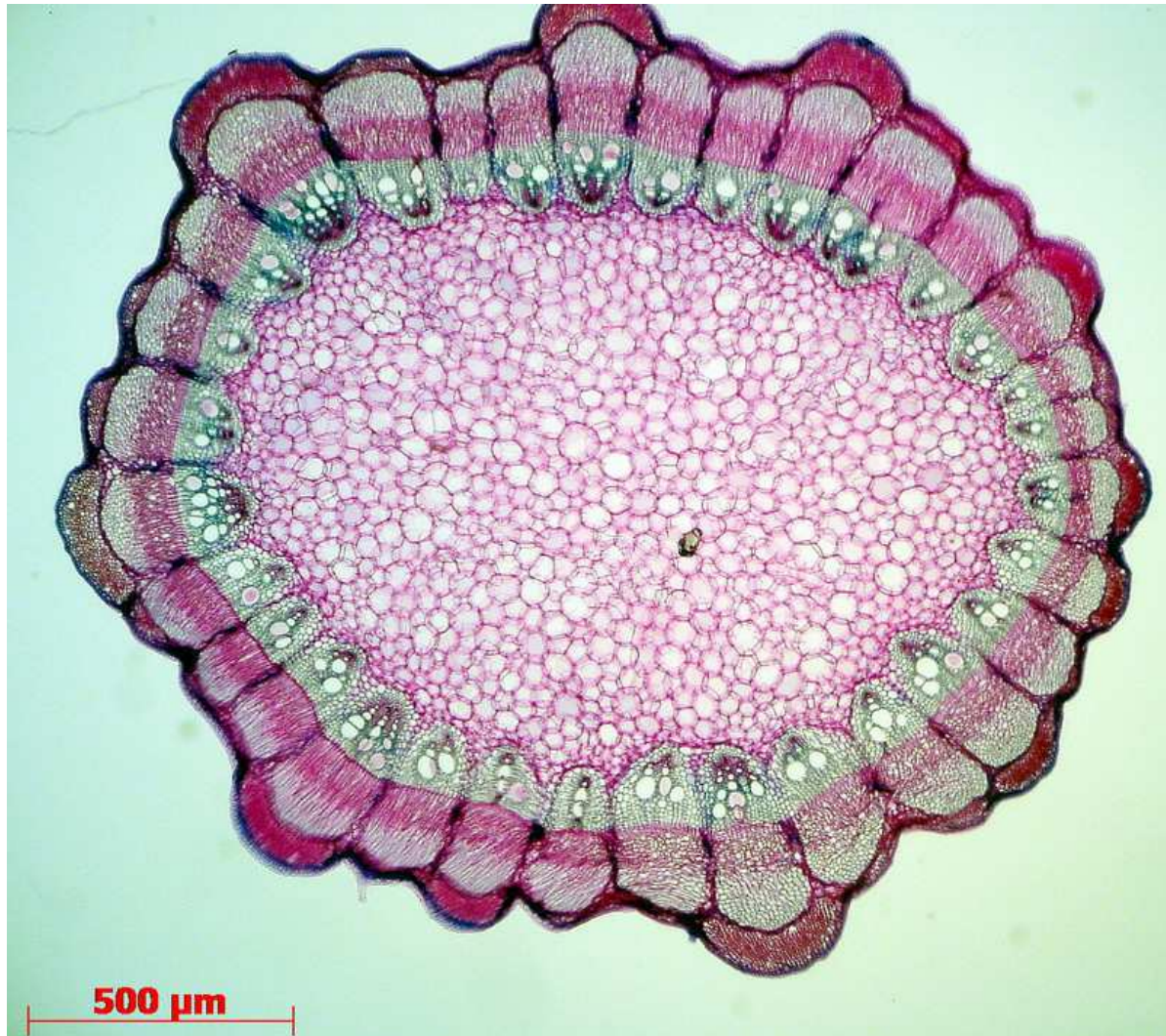
Les coupes fines sélectionnées sont transportées au moyen d'une pince fine dans un verre de montre contenant de l'eau de javel, pendant 5 à 10 minutes. Cette opération détruit tout ce qui n'est pas de nature pariétale et en facilitera l'observation.

Enlever l'eau de javel au moyen d'une pipette et la remplacer par de l'eau distillée. Répéter au moins trois fois cette opération : le lavage doit être parfait, la moindre trace d'eau de javel compromet la coloration. Terminer par un bain de 5 minutes d'eau acétique (1%).

3. Coloration :

Enlever l'eau acétique et la remplacer par une solution aqueuse à 1% de vert d'iode ou de vert de méthyle pendant 3-5 minutes (coloration de la lignine et de la subérine). Enlever le colorant au moyen d'une pipette (*attention : on ne voit pas bien les coupes !*) et le remplacer par de l'alcool à 95 % et ceci plusieurs fois (différenciation = on enlève l'excès de colorant).

Remettre les coupes dans de l'eau distillée puis la remplacer par la solution de carmin aluné pendant 10 minutes. Laver en changeant plusieurs fois l'eau, jusqu'à ce que les coupes ne libèrent plus de colorant.



Coupe transversale dans une tige de *Vitis vinifera* - photo de l'auteur

Pour une observation momentanée, les monter dans de l'eau ou de la glycérine entre lame et lamelle ; pour les conserver un peu plus longtemps, quelques mois, les monter à chaud dans de la gélatine glycinée. Pour une conservation à longue durée, les déshydrater et les monter dans une résine de type Entellan.

Résultats : cellulose et pectines : rose-rouge
lignine et subérine : vert nuancé

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 : Achromat – Achromatique

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



Poil de *Hedera helix* (lierre), photo Henri Robert, 2007

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**...

Épaisseur du couvre objet (CO) :

0 : Pas de CO

- : Utilisation avec ou sans CO

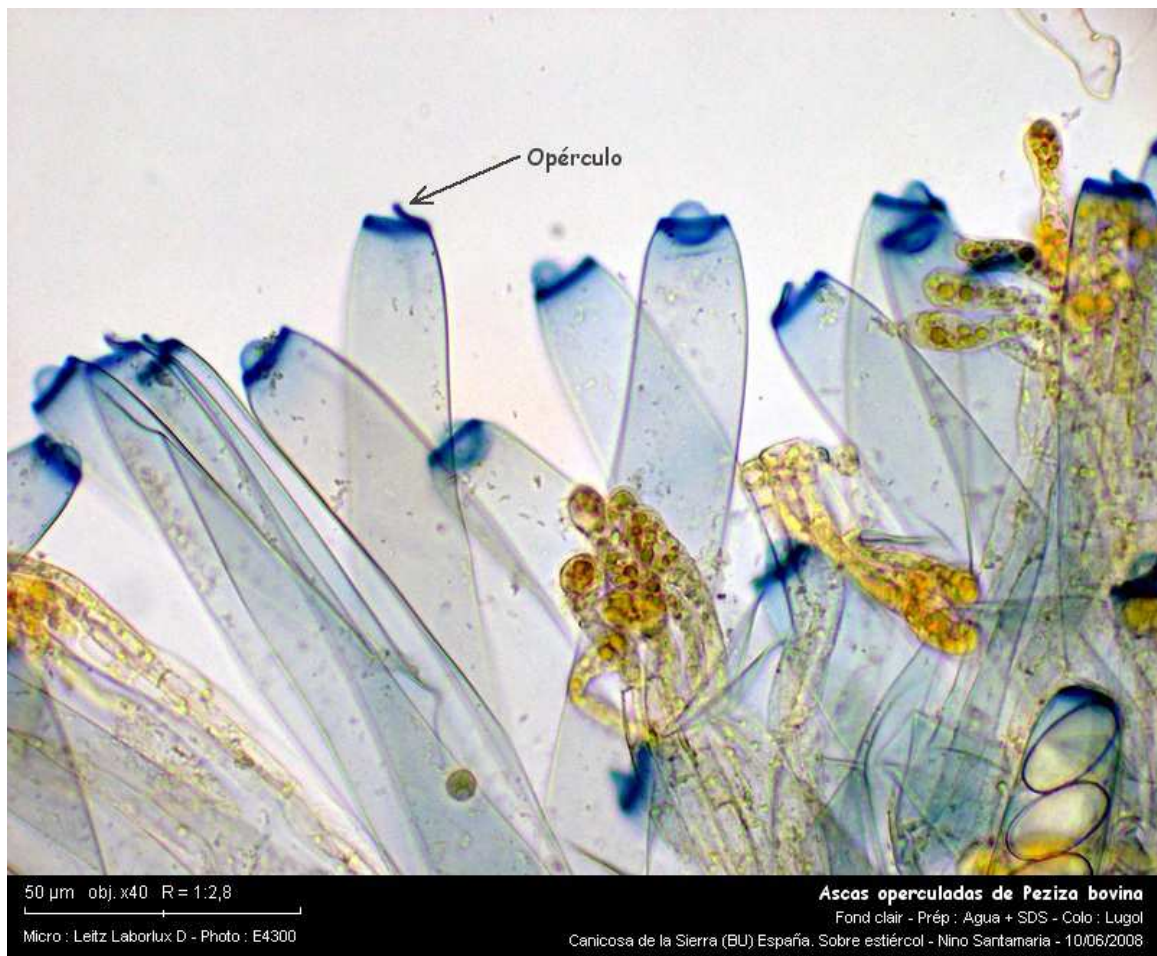
0.17 : Utilisation optimale avec un CO de 0,17mm

n : indice de réfraction

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

Belle réaction au Lugol de la zone operculaire chez une Pézize.

Photo de Nino Santamaria – mise en page de la photo avec le logiciel Micro-Cartouche.



MICROSCOPE, FLASH & APN

Balance des blancs

par Pierre Girodet

Dans la quasi totalité des appareils photo numérique (APN) de grande diffusion la balance des blancs est automatique, avec parfois un réglage très limité. Cet automatisme présente de grands avantages pour les photos traditionnelles, mais rend certaines photos, prises au microscope, totalement inexploitable, en particulier la photo d'un petit objet blanc sur un fond noir, l'APN ne retenant qu'une valeur moyenne de l'ensemble, ce qui conduit à une image très surexposée de l'objet blanc.

Comment court-circuiter cette balance des blancs ?

J'ai résolu cette difficulté en utilisant un petit flash auxiliaire et en réglant l'APN sur une vitesse lente. En déclenchant le flash pendant l'ouverture de l'obturateur électronique la balance des blancs n'a pas le temps de s'établir et si la puissance du flash est bien réglée l'objet blanc montre tous ses détails.

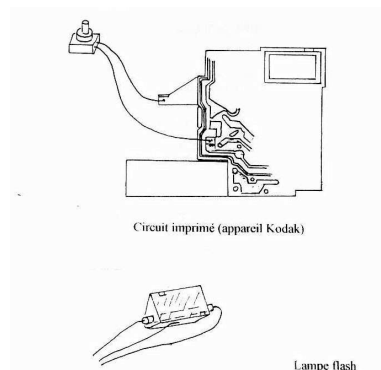
Le petit flash auxiliaire

Celui que j'utilise est celui décrit dans le numéro 1 de Microgazette, page 12. Il a l'avantage de ne rien coûter et d'être suffisamment puissant – même trop – pour toutes les utilisations possibles.

Voici comment réaliser ce flash :

Il suffit d'aller chez votre photographe et de lui demander de vous donner un appareil de photo jetable déjà utilisé. Non seulement il vous le donnera gratuitement, mais vous aurez aussi la pile pour le faire marcher !

La première opération consiste à enlever la pile, sécurité indispensable, et à ouvrir cet appareil jetable pour accéder au circuit imprimé qui commande le flash. Ceci ne présente pas de difficulté particulière. Il vaut mieux ne pas toucher le condensateur et les fils allant à la lampe flash, sous peine de recevoir une décharge dans les doigts. Pour éviter cet inconvénient, mettez le condensateur en court-circuit sur une résistance quelconque. Puis enlevez la lentille en plastique et le diaphragme métallique, mais gardez le boîtier en plastique. Si vous avez un appareil jetable Kodak, le circuit imprimé ressemble au croquis ci-contre.



La seconde opération consiste à remplacer l'action du diaphragme qui ferme le circuit électrique au moment de la prise de vue, en reliant électriquement les deux points indiqués sur le croquis. Pour ce faire il faut souder deux fils à ces deux points et les relier à un bouton, type bouton de sonnette, qui ferme le circuit quand on appuie dessus. Ce bouton est la seule chose à acheter, il vaut environ 1 € dans les magasins de composants électroniques.

A ce stade vérifiez que le branchement est correct : installez la pile, appuyez sur le bouton numéro 2 de l'appareil jetable (Flash button) comme indiqué sur l'appareil lui-même et lorsque la lampe témoin (Control lamp n° 3) est allumée, appuyez sur le bouton auquel vous avez relié les fils : le flash fonctionne.

L'opération suivante est un peu plus compliquée : elle consiste à séparer la lampe flash du circuit imprimé et à la relier au circuit par des fils électriques. Commencez par dessouder les trois fils qui arrivent à la lampe et par souder trois nouveaux fils aux mêmes endroits. Ces nouveaux fils doivent être courts, pas plus de 30 à 40 cm, et de section pas trop faible. Du fil électrique ordinaire souple convient parfaitement. En effet lorsque le flash fonctionne, un courant très intense parcourt ces fils pendant un temps extrêmement bref (environ 100 ampères sous 250 volts pendant 1/10.000 seconde).

Des fils trop longs ou de trop faible section créeraient des pertes importantes par effet Joule, ce qui diminuerait l'énergie transmise à la lampe flash. A ce propos l'énergie fournie par un flash de ce type est de 0,5 Joule environ.

Votre flash est terminé, vérifiez qu'il fonctionne correctement.

Nous laisserons à chacun le soin d'habiller ce flash. Une solution consiste à réutiliser le boîtier de l'appareil jetable. Un bon endroit pour loger le bouton de déclenchement du flash (bouton sonnette) est l'emplacement de la lentille de l'appareil, il y a assez de place si vous enlevez un peu du plastique qui se trouve derrière. Ne pas hésiter à loger la lampe flash dans un boîtier aussi petit que possible : 1,5 cm de haut et 3 cm de diamètre sont facile à faire, ceci vous aidera à placer cette lampe au meilleur endroit dans votre microscope.

La vitesse lente de l'APN

On peut obtenir une vitesse lente sur un APN même peu sophistiqué :

- l'appareil se réglant de lui-même sur une durée d'exposition qui dépasse largement la seconde si le milieu ambiant est sombre,
- en utilisant l'un des "programmes" de l'APN, par exemple "ciel étoilé" ou "haute sensibilité".

La technique

La technique est alors la suivante :

- choisir sur l'APN "ciel étoilé" ou "haute sensibilité" ou à défaut "mode normal", sans flash ;
- observer la préparation à photographier au microscope, comme d'habitude, avec l'éclairage normal du microscope ;
- régler la vue à prendre à travers le microscope sur l'écran de l'APN : la netteté de l'image par la vis micrométrique du microscope et le champ en agissant sur le zoom de l'APN ;
- mettre le petit flash sous le condensateur du microscope ce qui empêche toute lumière d'accéder à l'objet ;
- dans une ambiance très peu éclairée, déclencher la prise de vue et actionner le flash pendant l'ouverture de l'obturateur électronique.

Réglage de la puissance du flash

Si on utilise un microscope, il faut intercaler entre le flash et le condensateur des filtres neutres en nombre suffisant. Ces filtres neutres se confectionnent facilement en découpant des petits carrés dans du film neutre vendu au mètre, pour quelques euros, en largeur de 60 cm, chez les marchands d'appareils de photos ou même au BHV - Paris (c'est là que j'ai acheté le mien). En général il faut de 2 à 7 épaisseurs de filtre pour obtenir un bon résultat (1).

Si l'on prend des photos à la loupe binoculaire il suffit de faire une première photo en mettant le flash à environ 40 cm de l'objet et d'ajuster ensuite cette distance suivant le résultat obtenu, ou bien comme ci-dessus d'utiliser des filtres.

Résultats obtenus

Les résultats sont souvent bien meilleurs que ceux obtenus sans flash. Les quelques illustrations ci-dessous le montrent parfaitement. De plus la netteté et la définition sont très fortement augmentées grâce à la température de couleur élevée du flash.

Commentaire des photos

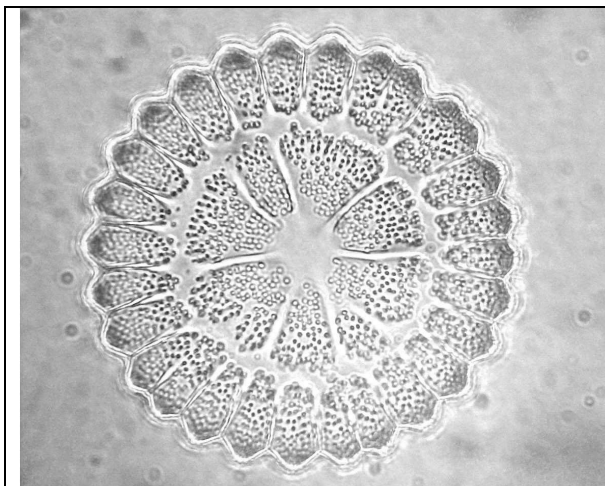
1 – La netteté et les détails obtenus sur cette photo au flash sont très supérieurs à ceux d'une photo sans flash.

2 – Les détails des épines d'oursin sont très nettement visibles, ce que je n'avais jamais pu obtenir sur une photo sans flash où le fond était moins sombre mais les épines trop blanches.

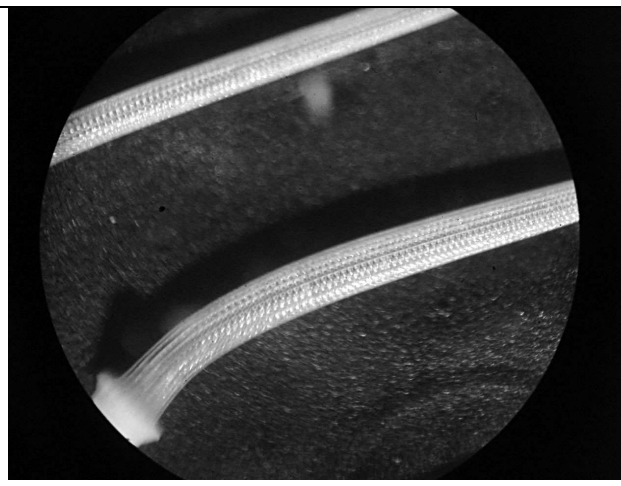
3- Cette photo, à elle seule, pourrait justifier l'emploi du flash. Il est impossible d'obtenir son équivalente sans flash où le foraminifère apparaît comme un rond blanc où les détails sont peu visibles.

4 – Toujours avec flash, les détails de ces objets sont nettement visibles.

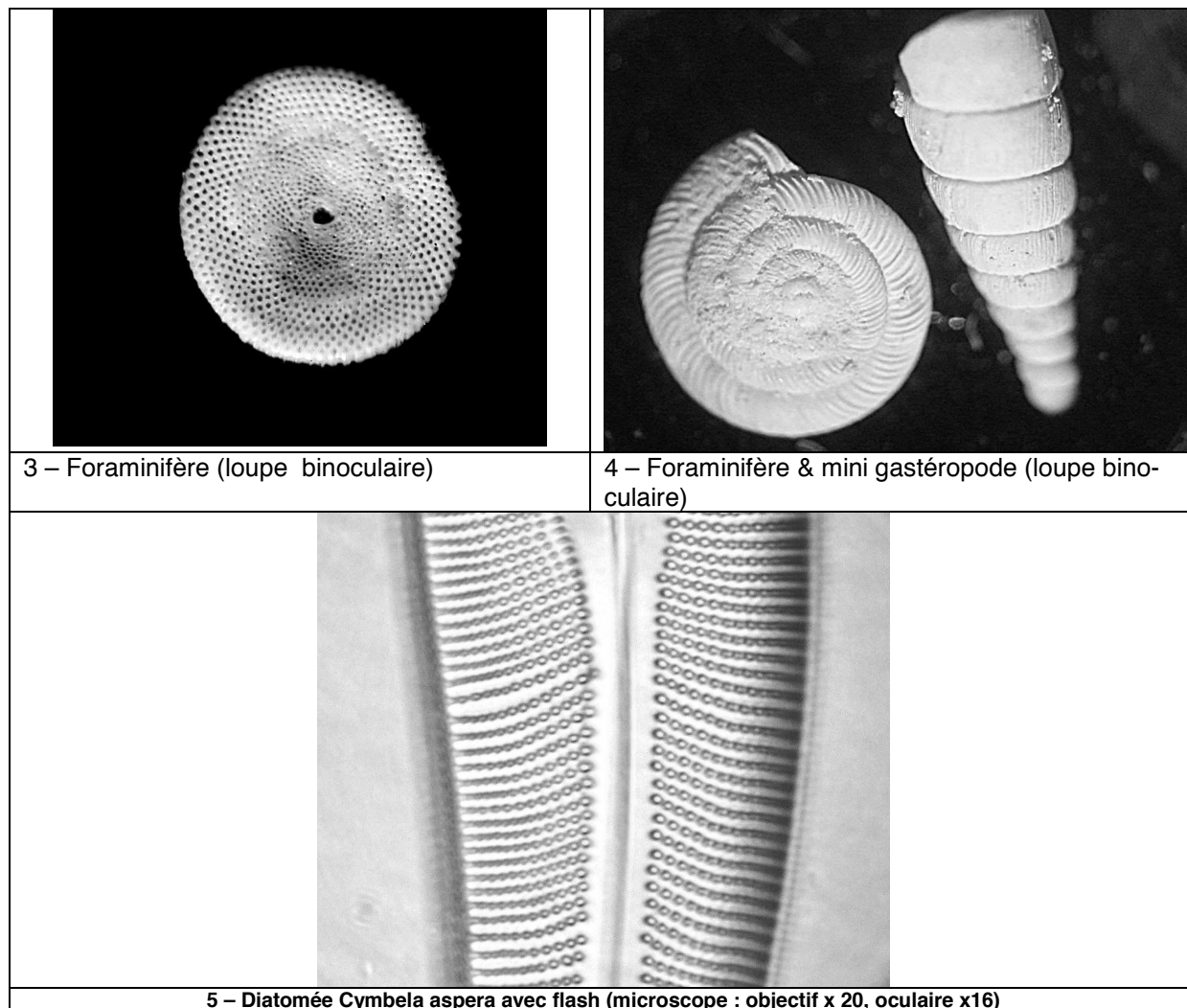
5 – Comme pour la photo 1, la netteté et la résolution sont très supérieures sur la photo prise au flash.



1 – Diatomée Anthodiscus, avec flash (microscope : objectif x40)

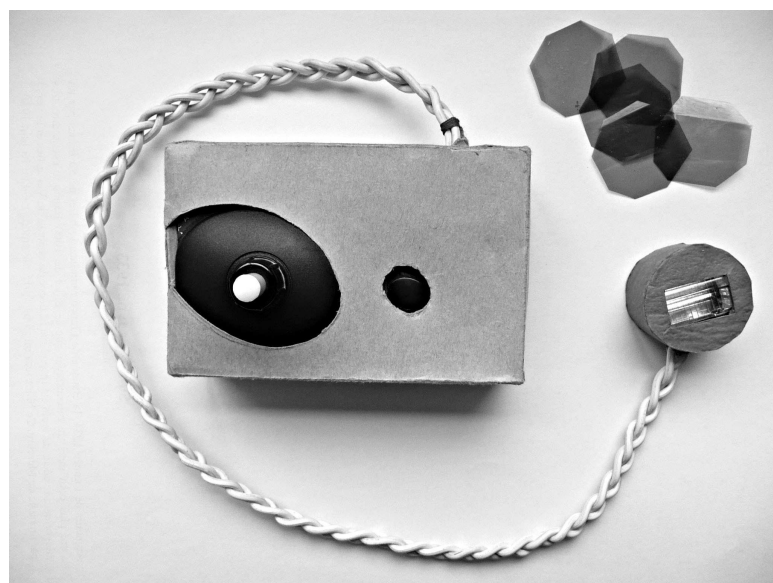


2 – Epines d'oursin (loupe binoculaire)



(1) Ce filtre neutre divise par moitié l'intensité lumineuse, donc, par exemple, 5 filtres réduisent la lumière transmise de 25 soit 32 fois. Avec mon microscope, j'utilise 2 filtres (réduction de 4 fois) pour un objectif x 40 et 7 filtres (réduction de 128 fois) pour un objectif x 4, le flash étant situé à la même place.

Voici le résultat final des manipulations :



Appareil de photo jetable – remis dans une boîte en carton – dans lequel l'objectif a été enlevé et remplacé par un bouton déclenchant le flash et le flash sorti pour le rendre plus maniable, avec des filtres neutres.

Les dimensions de l'appareil de photo jetable sont 9 x 6 x 3 cm, le flash lui-même est logé dans un petit tube en carton de 2,5 cm de diamètre pour une hauteur de 1,5 cm, ce qui permet de le mettre facilement sous le condensateur du microscope.

Des LOGICIELS disponibles en freeware et d'une utilité certaine pour vos travaux divers

PDF Creator

Ce logiciel permet de transformer en fichiers .pdf des fichiers texte accompagnés de photos (en Word) et des feuilles de calcul (Excel) ; il a en outre l'avantage d'être vierge de publicité. C'est celui que j'utilise pour les documents pdf de mon site.

Il s'installe automatiquement comme une imprimante virtuelle et figure dans la liste qui apparaît lorsque vous demandez une impression.

Il permet aussi de scanner les livres de votre bibliothèque, ce qui permet d'éviter de transporter des dizaines de kilos lorsque vous vous rendez à des congrès et de les consulter sur votre ordinateur portable. Entendons-nous : je conseille de scanner des livres qu'on possède, pas d'effectuer des copies-pirates !

PDF Split & Merge

Indissociable à nos yeux du précédent, car ce logiciel permet de fusionner et de réorganiser facilement des fichiers .pdf en un seul document.

Photo to Sketch

Ce logiciel permet de transformer une photo en un dessin au trait, avec des résultats souvent très intéressants (cela dépendra évidemment de la qualité de la photo de départ).

Micro Cartouche

Ce logiciel a été conçu par Christian Aubert, excellent microscopiste suisse, que je connais personnellement.

MicroCartouche, MC pour les intimes, est un petit utilitaire gratuit qui vous aidera à préparer vos photos et les publier dans vos forums de macro/microscopie favoris. Il permet d'ajouter des « cartouches », reprenant diverses informations : échelle, titre et sous-titre, nom de l'auteur, date, etc.).

Il fonctionne sous Windows 98 - 2000 - XP - Vista SP1. Cette application est écrite par un amateur et pour des amateurs. Même si la finalité de cet outil est le formatage d'une image, MC est avant tout un programme d'étalonnage, de mesures et d'informations !

<http://www.microscopie.ch/microscopie/cartouche/aide/index.html>

Combine ZM

Ce logiciel très puissant permet de superposer des images du même sujet prises successivement avec une variation de mise au point de quelques microns, afin de régler le problème de faible profondeur de champ. Le résultat final fait que l'image est nette à tous les niveaux de profondeur. Ce logiciel est encore plus performant depuis l'apparition de la caméra qui ne génère aucune vibration lors de la prise de vue.

Redim

Ce logiciel très simple d'utilisation permet de redimensionner les images par « paquets », en 2 clics. En effet, les photos fournies par les APN, reflex et caméras sont de plus en plus lourdes et encombrantes et des fichiers de 1,2 voire 5 à 15 mégas sont très déplaisants à recevoir dans une boîte mail. Le format idéal d'expédition est situé aux alentours de 100 à 150 K, pour une taille de 600x450 ou 900x625, ce qui est largement suffisant pour une consultation à l'écran.

Il permet également de transformer des images .bmp en images au format .jpg

Piximètre

Ce logiciel a été conçu par Alain Henriot, excellent informaticien, qui met gracieusement le fruit de son travail à disposition des personnes intéressées.

Superbe logiciel de mesure d'éléments microscopiques, qui permet de réaliser très vite des séries de mesures et puis de sortir en un clic des moyennes de mesures. Il demande simplement d'étalonner une seule fois le programme avec les objectifs de votre microscope, et ensuite toutes les mesures seront automatiques. Cela nécessite une lame étalon de référence.

Power Point Images Extractor

Nous avons souvent l'occasion de visionner de superbes montages PWPpoint, qui laissent l'envie de récupérer certaines images. Ce logiciel permet d'extraire les images d'un fichier .ppt et de les sauvegarder en format .jpg.

Paint

Ce logiciel est intégré à Windows XP, et sans doute à Vista. Il permet de retravailler une image de manière assez avancée, d'y placer du texte comme une version simplifiée de Photoshop.

XNView

Excellent logiciel permettant de retravailler une image de manière très poussée ; il est beaucoup plus performant que Paint et permet toutes les fonctionnalités courantes de Photoshop. Ce dernier est un outil de professionnel, qui coûte très cher, et qu'il faut utiliser tout le temps si on veut en tirer le maximum de ses potentialités ... qui sont quasi illimitées. XNView me paraît assez simple d'emploi, avec une présentation agréable et conviviale.

Skype

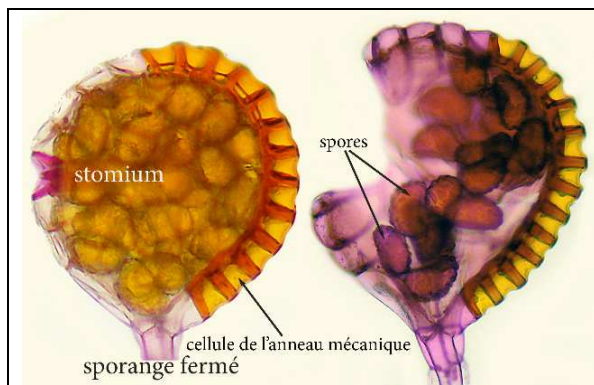
L'outil parfait de télécommunication gratuite. Il permet à 2 (ou plusieurs personnes : vidéoconférence) de converser gratuitement, sans limite de temps, de n'importe quel endroit du monde. Cela implique simplement que les interlocuteurs aient installé ce logiciel sur leurs ordinateurs respectifs, et disposent d'un casque émetteur-récepteur. Le must est évidemment la caméra (souvent avec micro intégré) qui permet en outre de voir son correspondant. Les ordinateurs portables des dernières générations comportent à l'origine micro et caméra.



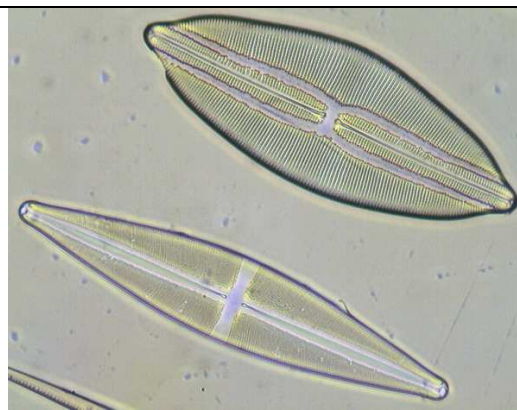
Zygote de *Mucor sp.* après mise en culture d'une moisissure trouvée sur *Pleurotus ostreatus* (leg. Bernard Clesse)

J'aurais voulu vous en parler aussi ...

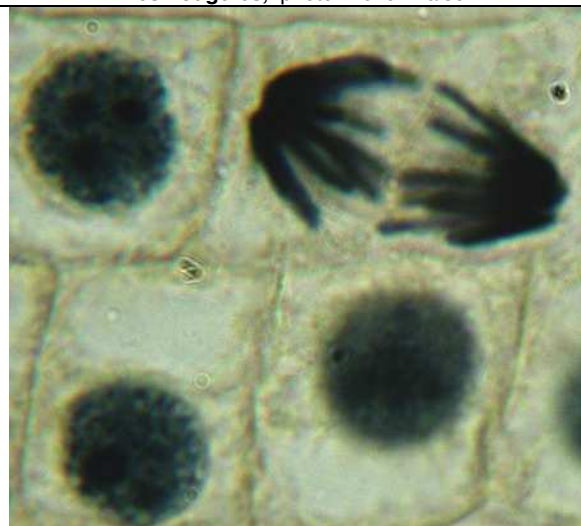
Le temps va nous manquer, et il nous aurait fallu deux ou trois semaines de plus, pour étudier aussi en détail, ou même simplement parcourir les sujets extraordinaires évoqués ci-dessous ...



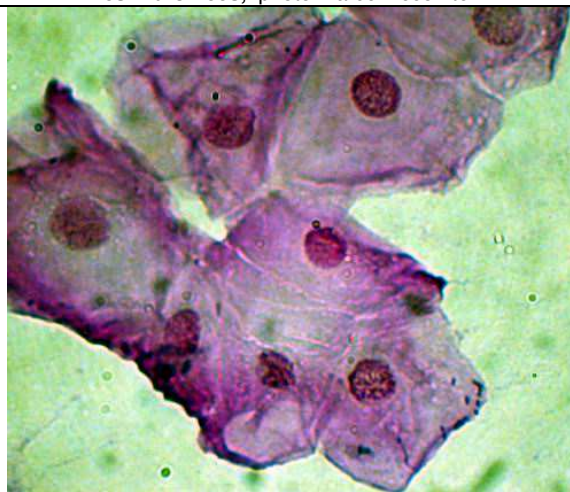
Les Fougères, photo Michel Blaise



Les Diatomées, photo Marcel Lecomte



La division cellulaire, photo Marcel Lecomte



Les tissus animaux (ici, cellules épithéliales de la bouche humaine), photo Marcel Lecomte



Les Lichens (ici, *Parmelia conspersa*) - photo Marc Paquay



Les Algues (ici, *Nostoc* sp.), photo Christian Aubert



Les coupes histologiques animales (ici, tête de poisson), photo Marcel Lecomte



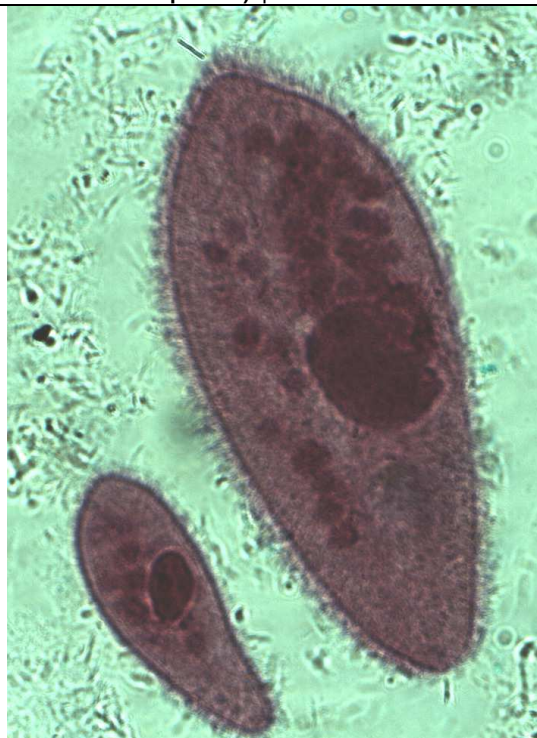
Les *Volvox* (algues vivant en colonies) photo Marcel Lecomte



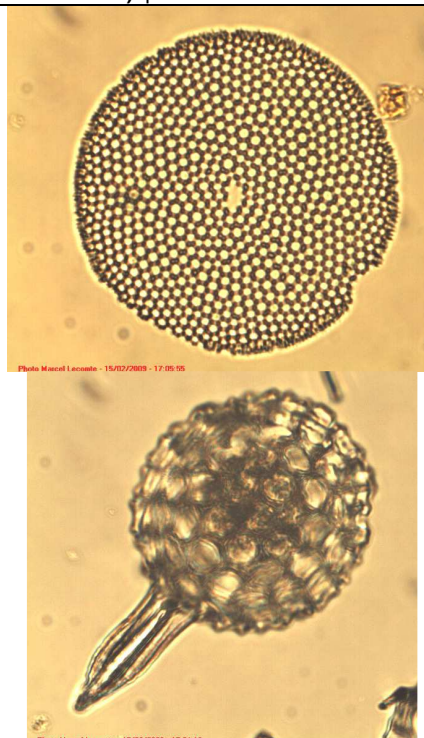
Les *Spirogyres* (algues avec double réseau hélicoïdal de chloroplastes) photo Marcel Lecomte



Les Acariens parasites des Insectes (ici, d'un bourdon) photo Marcel Lecomte



Les *Paramecies* (protozoaires Infusoires, à marge frangée de cils) photo Marcel Lecomte



Les Radiolaires (protozoaires à squelette siliceux) photo Marcel Lecomte

BIBLIOGRAPHIE personnelle :

- AUDERSET G.** BIOLOGIE VEGETALE Genève
Florimontaines 1987 268 pages
- 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
- Barnett H.L. & Hunter B.B.** (sans date !, la seconde édition date de 1999) Illustrated genera of imperfect fungi (4th ed.). APS Press, St Paul, Minesota, USA. xxii, 218 p. [clés des genres, très nombreux dessins, ISBN 0-89054-192-2]
- 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** INITIATION AUX TECHNIQUES de l'HISTOLOGIE ANIMALE
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