

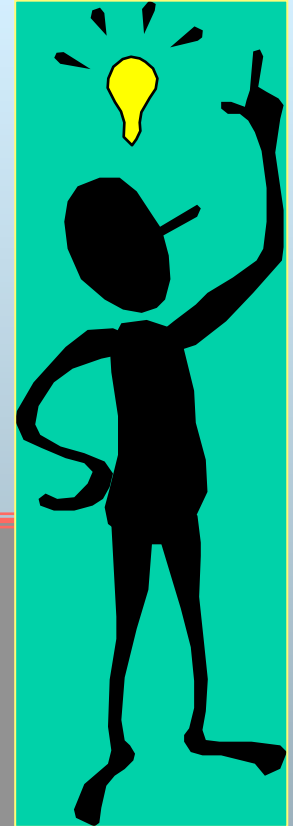
TRAVAUX PRATIQUES **de microscopie**

5ème partie !

Les outils de coupes

**Aujourd'hui :
du travail de précision :**

**LES COUPES AU
MICROTOME !**



1. La méthode la plus simple :

LA COUPE à MAIN LEVEE

- **Une lame de rasoir mécanique**
- **Un peu (beaucoup) d'habileté**
- **le travail est plus précis sous la loupe binoculaire**
- **Coupes valables minuscules, de l'ordre de 25 à 30 μm**
- **Coût : dérisoire ...**

2. Nettement plus élaboré :

Le MICROTOME de RANVIER

- **Un rasoir spécial prévu à cet effet**
- **Un morceau de polystyrène extrudé (ou de moelle de sureau)**
- **Un dispositif d'avance micrométrique**
- **Plus besoin de travailler sous la loupe binoculaire**
- **Précision de l'ordre de 15 à 20 μm (... 10 μm)**
- **Coût : environ 130,00 Euro**



3. Une autre possibilité :

Le MICROTOME à GLISSIERE

- **Se fixe sur une table et libère donc les deux mains**
- **nécessité de pratiquer l'INCLUSION**
- **Un dispositif d'avance micrométrique**
- **Plus besoin de travailler sous la loupe binoculaire**
- **Précision de l'ordre de 10 à 15 μm (... 8 μm)**
- **Coût : environ 200,00 Euro, sans aménagements**



4. Le matériel de laboratoire :

Le MICROTOME AUTOMATIQUE

- **Ici, un modèle manuel à capot**
- **nécessité de pratiquer l'INCLUSION**
- **Un dispositif d'avance micrométrique**
- **Précision de l'ordre de 1 μm (3 μm utile)**
- **Coût : environ 500 à 700,00 Euro, en occasion**

Les diverses étapes pour la préparation de coupes à destination définitive

1. La **FIXATION** :

- il s'agit de figer les divers composants des cellules et les rendre « accessibles » aux colorants
- durée : de 8 à 24 heures



- À gauche, le fixateur de Bouin-Hollande (la couleur verte est due à l'acide picrique combiné au cuivre)
- A droite, l'AFA (Alcool Formolé Acétique)
- Les fixateurs sont innombrables Et le choix peut se révéler difficile !

2. La COLORATION :

- il s'agit de COLORER les divers composants des cellules afin de les rendre plus visibles et plus interprétables**
- Durée : de 2 à 8 heures**



Pour des objets volumineux, on pratique une coloration de masse (ici dans des éprouvettes de 10 cc...)



Pour des petits objets, on pratique des essais de coloration dans des plaques en porcelaine, à cavités multiples

3. L' INCLUSION :

- Il s'agit d'enrober très intimement le moindre recoin de la pièce à traiter afin de l'immobiliser complètement dans une masse rigide**
- Durée : 8 heures**



Le matériel nécessaire

Quelques règles essentielles :

- En mycologie, la paraffine est à exclure
- Nous utilisons le PEG (PolyEthylèneGlycol)
- La 1ère partie de l'inclusion se fait dans du PEG 4000
- Le second bain est du PEG 20000
- Toutes ces opérations se réalisent à chaud (température de fonte : 55-60° C)



Le résultat final : des blocs de 2 cm^3 prêts pour la coupe....

On peut aussi utiliser le PVA (Alcool PolyVinylique)

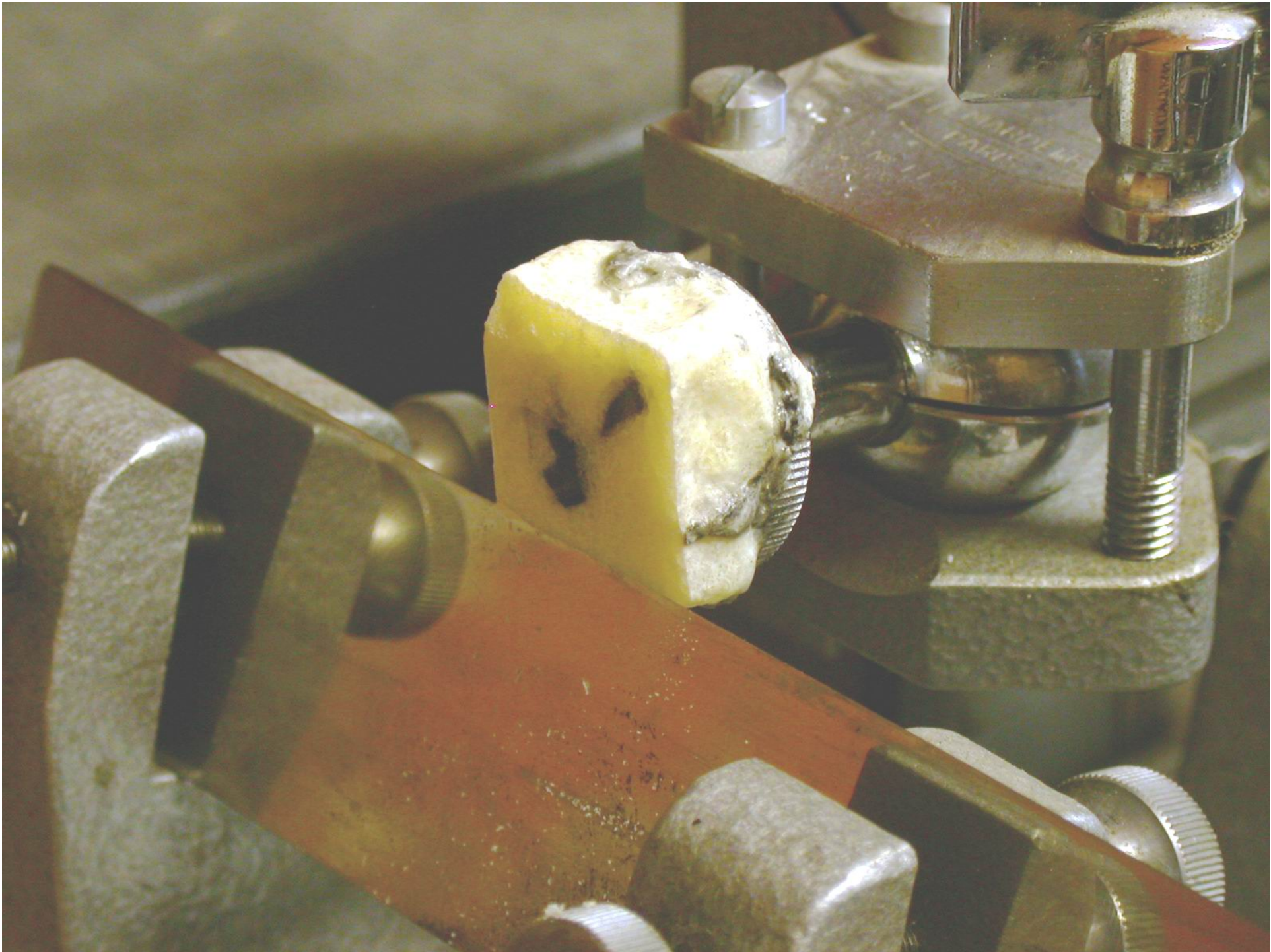


4. La COUPE :

- Elle nécessite une lame au tranchant parfait, qui doit être vérifié à la loupe binoculaire**
- Seul le microtome automatique permet d'obtenir des résultats uniformes**



Le microtome automatique manuel de MINOT

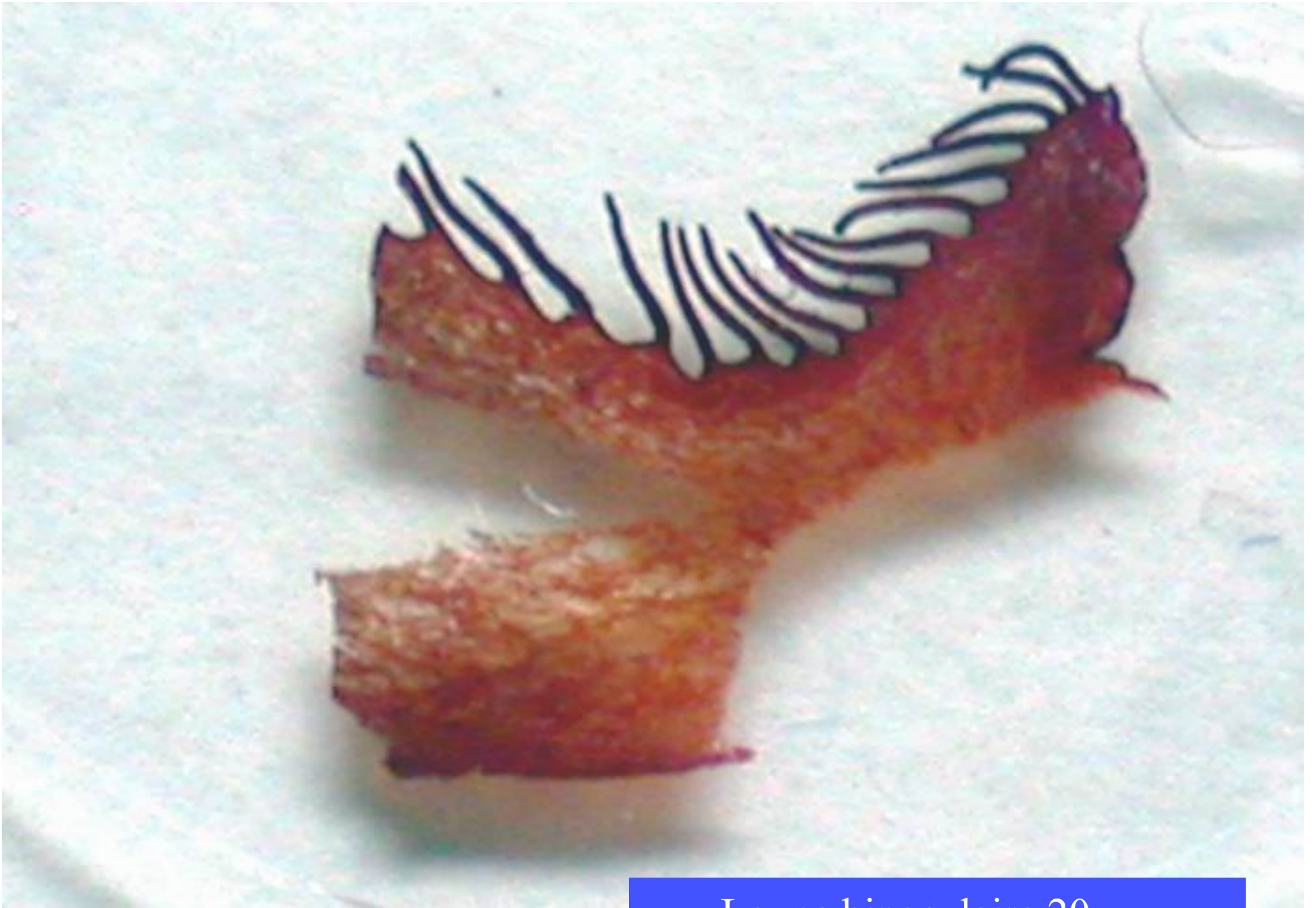


5. Le MONTAGE sur lame :

- **Si on a consacré tellement de temps à ce travail, c'est pour en conserver des traces indélébiles**
- **Utilisation de LCO rondes**
- **Milieu de montage : Conservateur de Hoyer, Glycérine Gélatinée.... Baume du Canada (sauf en mycologie)**

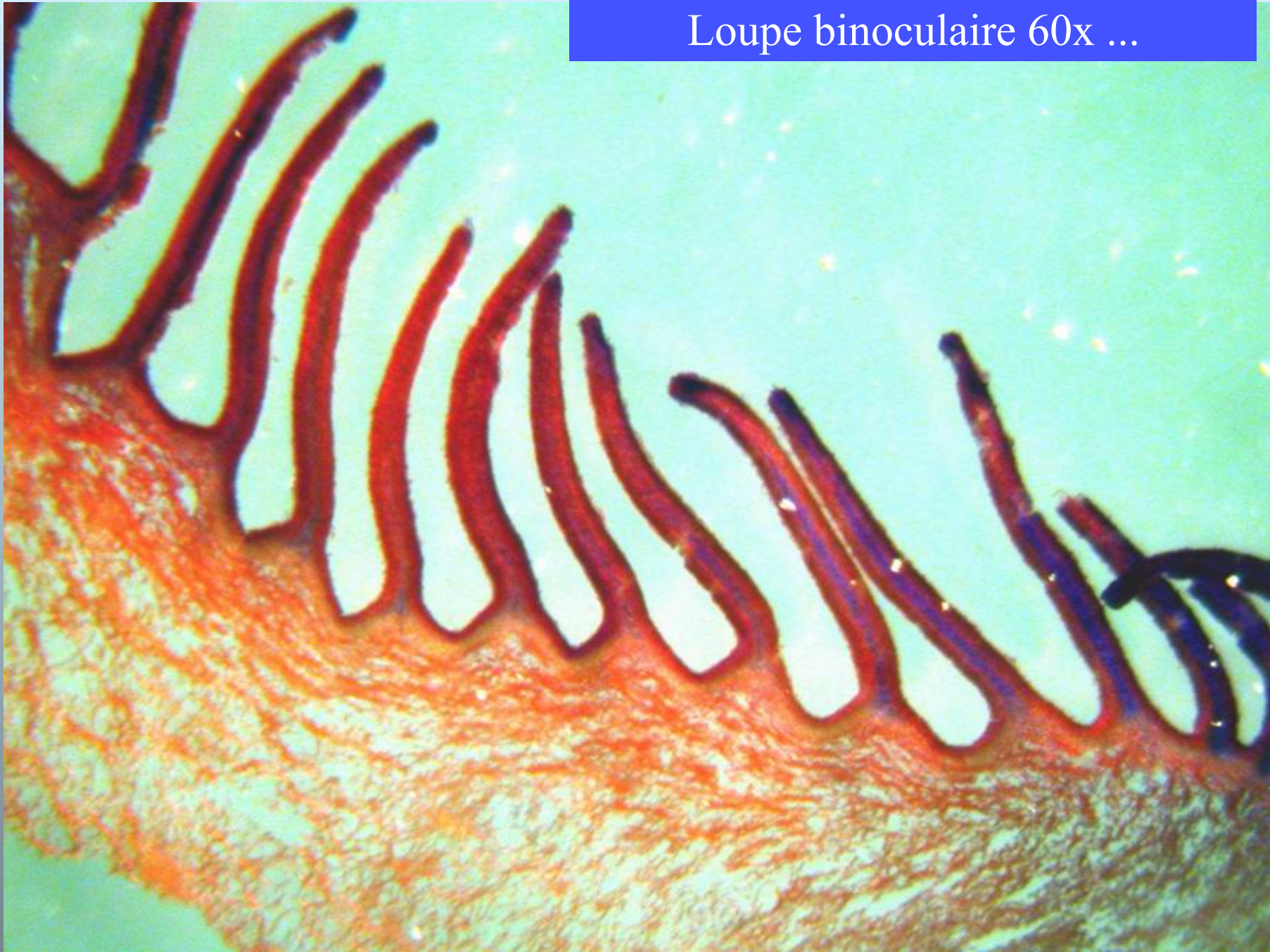


LES RESULTATS de
tout cela !



Loupe binoculaire 20x ...

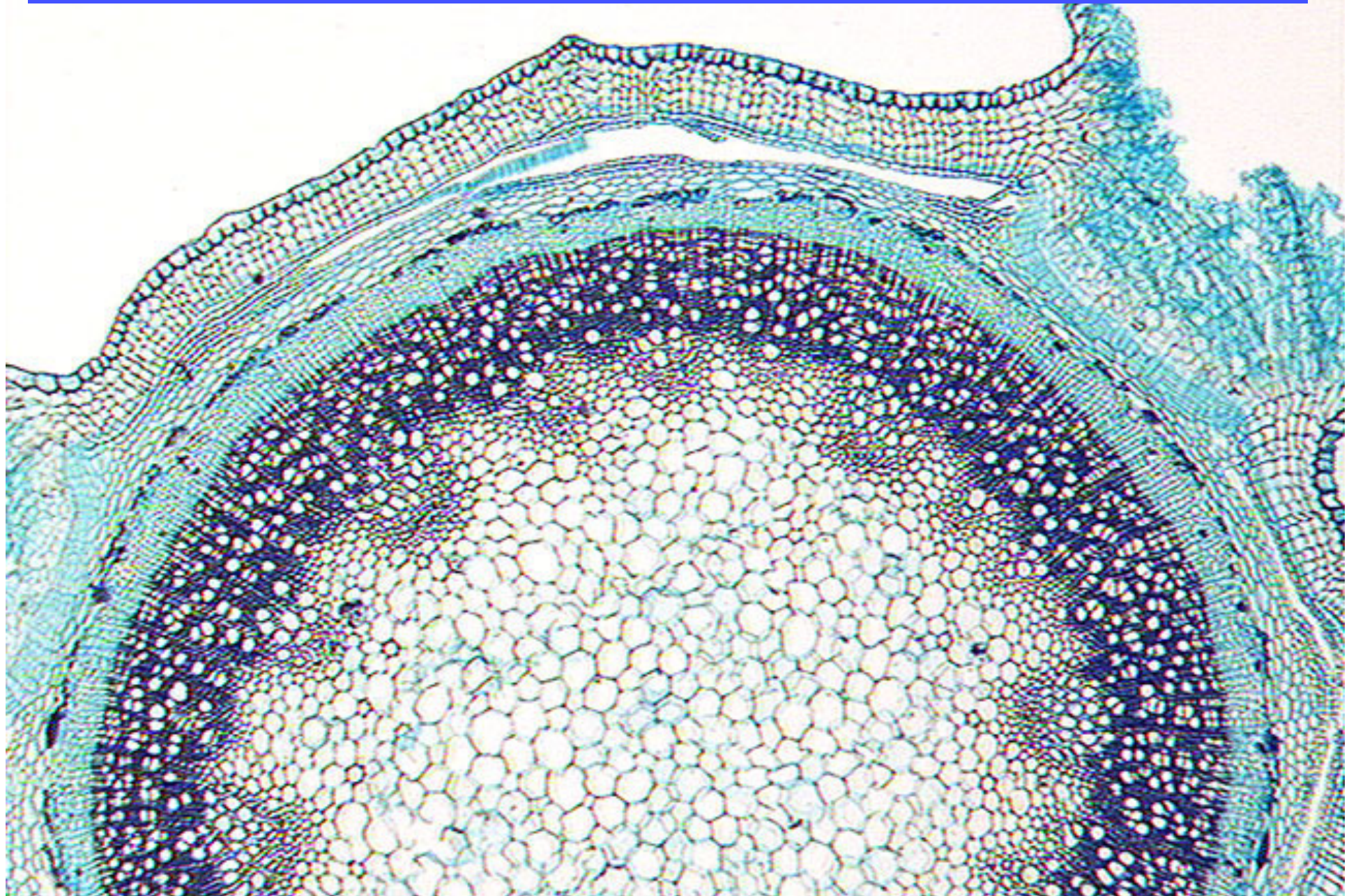
Loupe binoculaire 60x ...

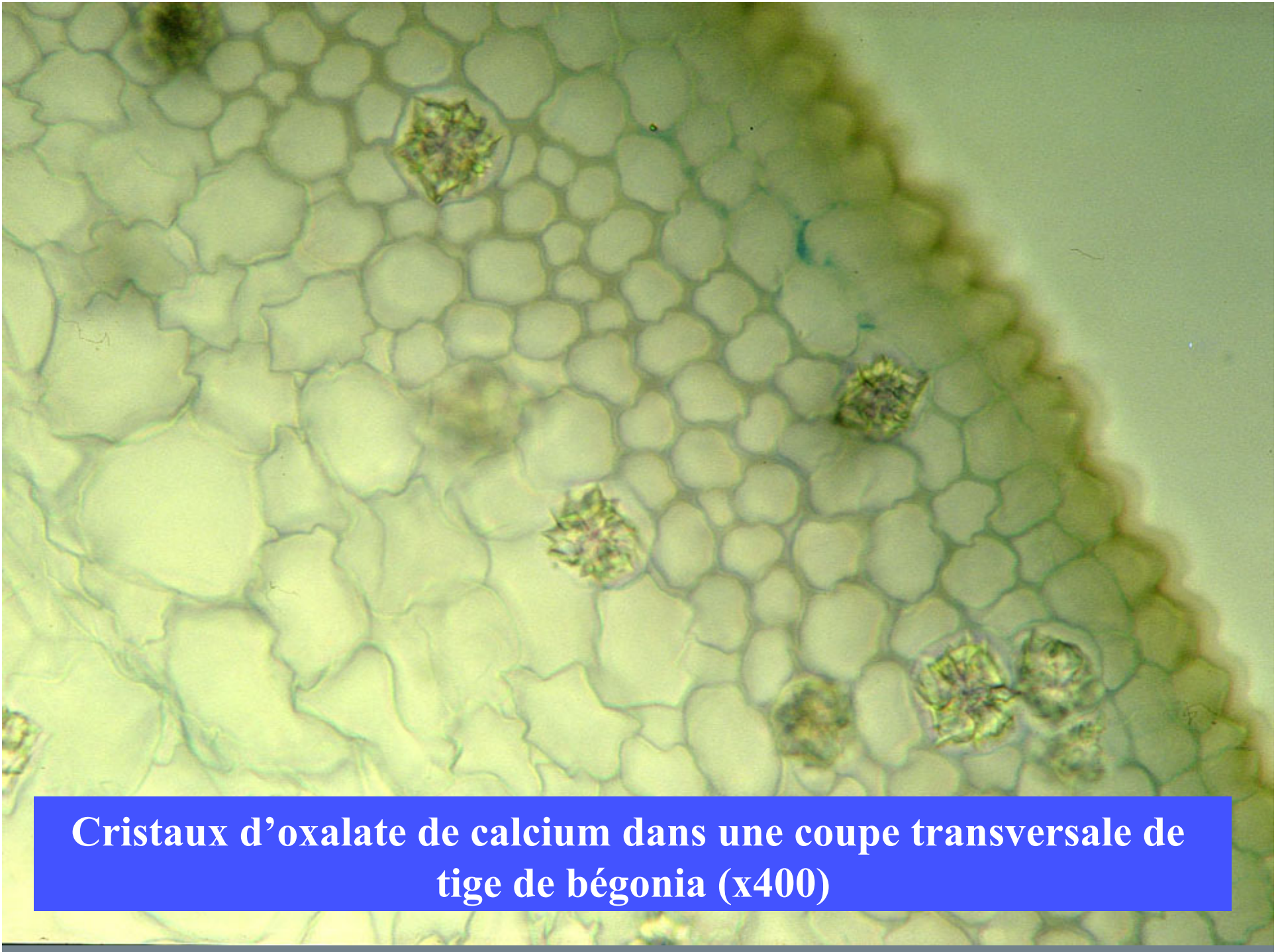


Trame de lame



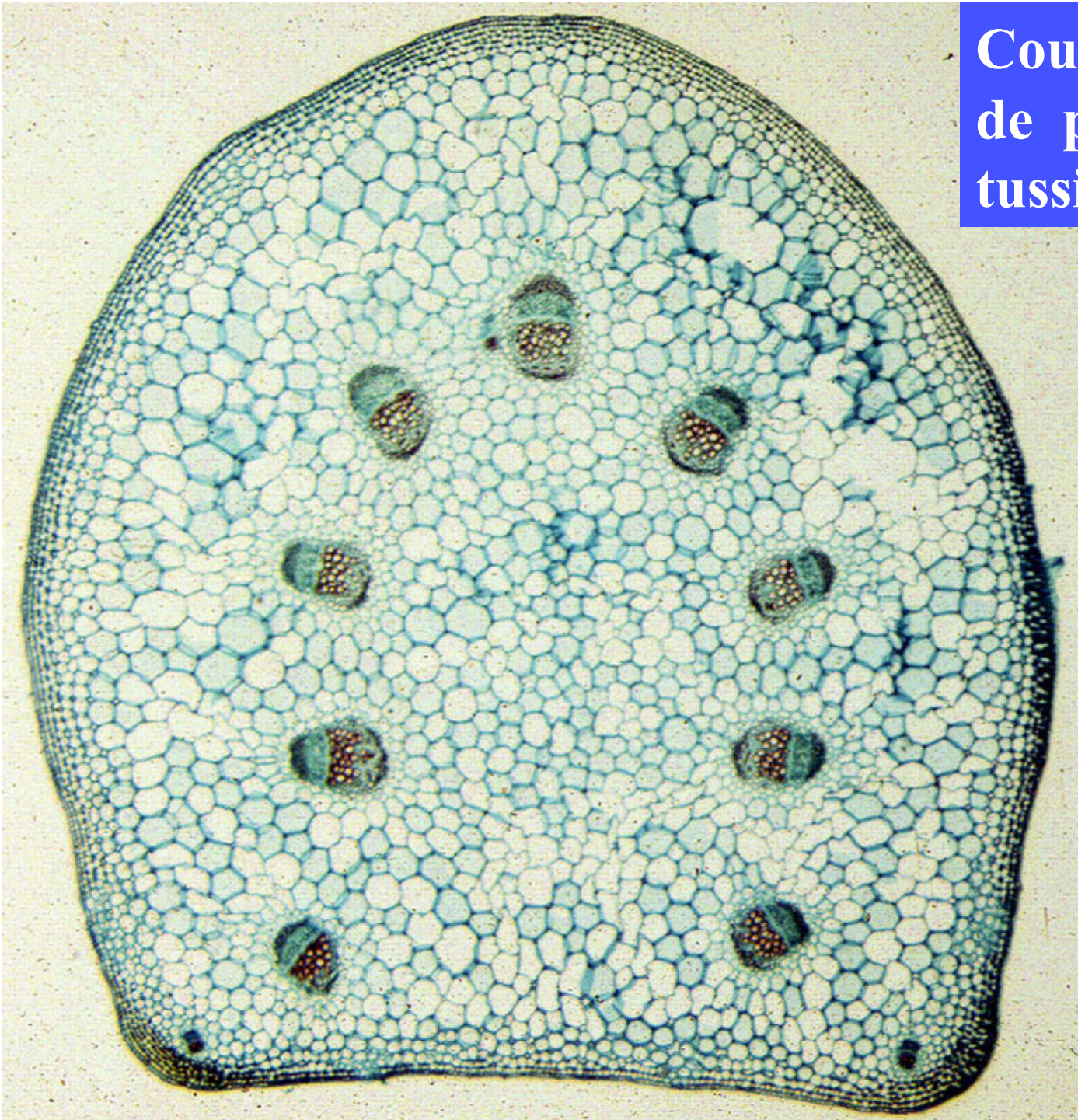
Coupe transversale dans une tige de sureau (x 40)





Cristaux d'oxalate de calcium dans une coupe transversale de tige de bégonia (x400)

Coupe transversale
de pétiole de
tussilage (x40)



FINN