

À propos du montage microscopique des moisissures

Marcel Lecomte

Le montage d'une lame d'observation destinée à l'observation des structures hyphales sporogènes chez les moisissures peut s'avérer relativement ardue, si on utilise la méthode traditionnelle.

En effet, classiquement, on prélève à l'aide d'une pince à pointes fines un peu du revêtement velouté qui se trouve à la surface du substrat, et on observe dans une goutte d'eau.

Si vous travaillez de cette manière, vous allez vous retrouver devant nombre de problèmes :

- les multiples conidies se déplacent en tous sens ;
- les conidies sont hyalines et très peu différenciées ;
- les fragments d'hyphes sont informes ;
- vous rencontrez de nombreuses bulles d'air.

Voici une méthode de travail qui vous apportera beaucoup de satisfactions

+++ La coloration

Nous utilisons de l'acide lactique pur, coloré à la fuchsine acide (attention ! Cette fuchsine n'a rien à voir avec la fuchsine basique utilisée dans le mélange de Ziehl).

Ce colorant colore le cytoplasme en rose et ainsi, les hyphes et les conidies sont bien visibles.



+++ Le prélèvement



Nous utilisons un fragment de papier collant transparent, de 10 x 5 mm, que nous appliquons délicatement sur la surface contaminée, à l'aide d'une pince et en exerçant une légère pression. De cette manière, les structures qui génèrent des conidies vont être fixées par la colle et apparaîtront clairement à l'observation, pour une détermination correcte. Vous constaterez que le grain du papier collant est nettement visible sur cette photo, qui a été réalisée en DIC (contraste interférentiel de Nomarski). Sur une photo « normale », l'egrain n'est pas visible.

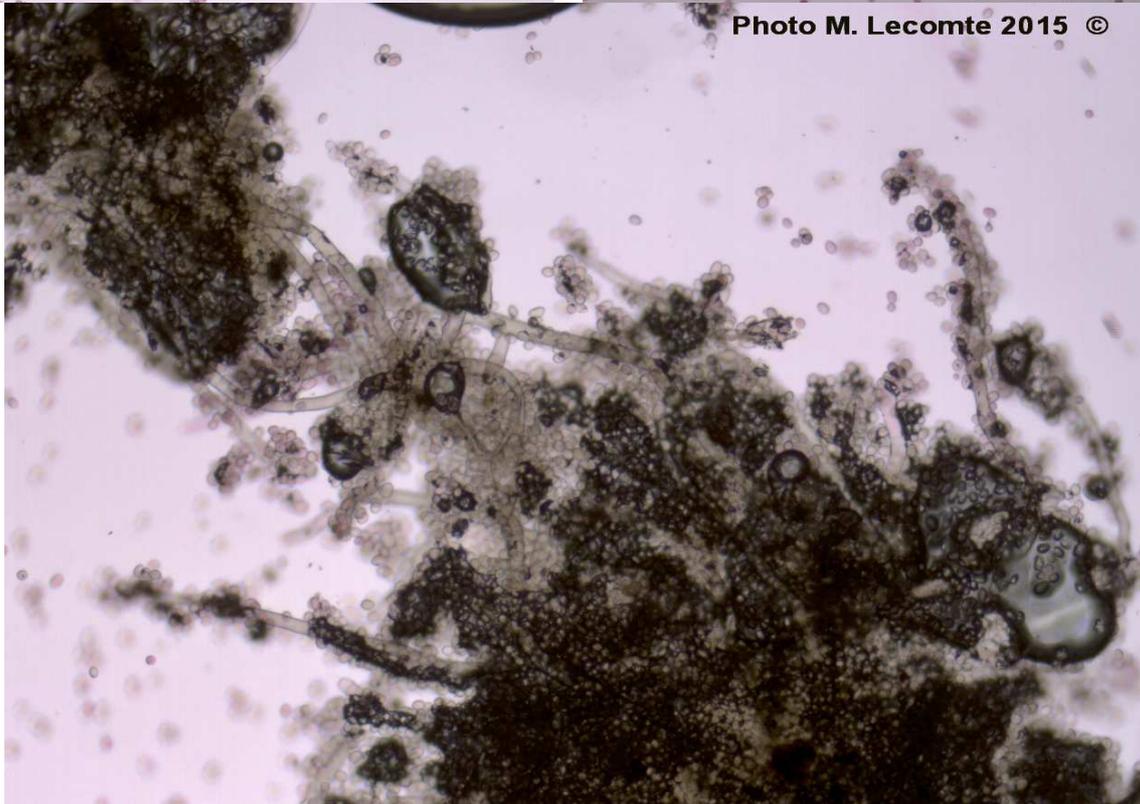
+++ Le montage



Déposer une petite goutte de fuchsine acide lactique, sur la LPO ; poser délicatement le fragment de papier collant sur la goutte, avec le prélèvement tourné vers le haut ; poser sur le tout une seconde goutte de colorant un peu plus importante ; poser ensuite délicatement la LCO, en la présentant de biais.

+++ Observation

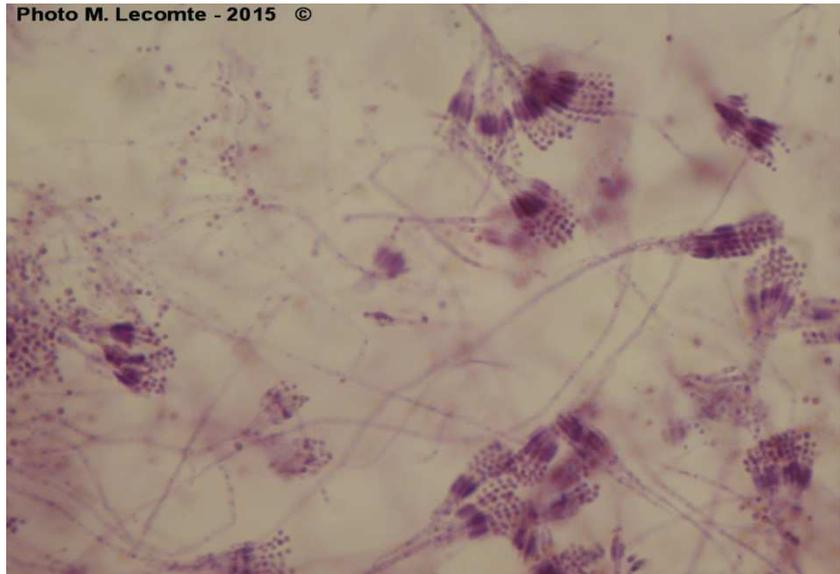
Toujours utiliser d'abord un objectif de faible grossissement. Vous allez tout de suite constater que la préparation est maculée de taches argentées, qui sont en réalité des bulles d'air parsemant la préparation. En plus d'être parfaitement inesthétiques, cela ne va pas favoriser une observation correcte des détails nécessaires à la détermination.



+++ Élimination des bulles d'air

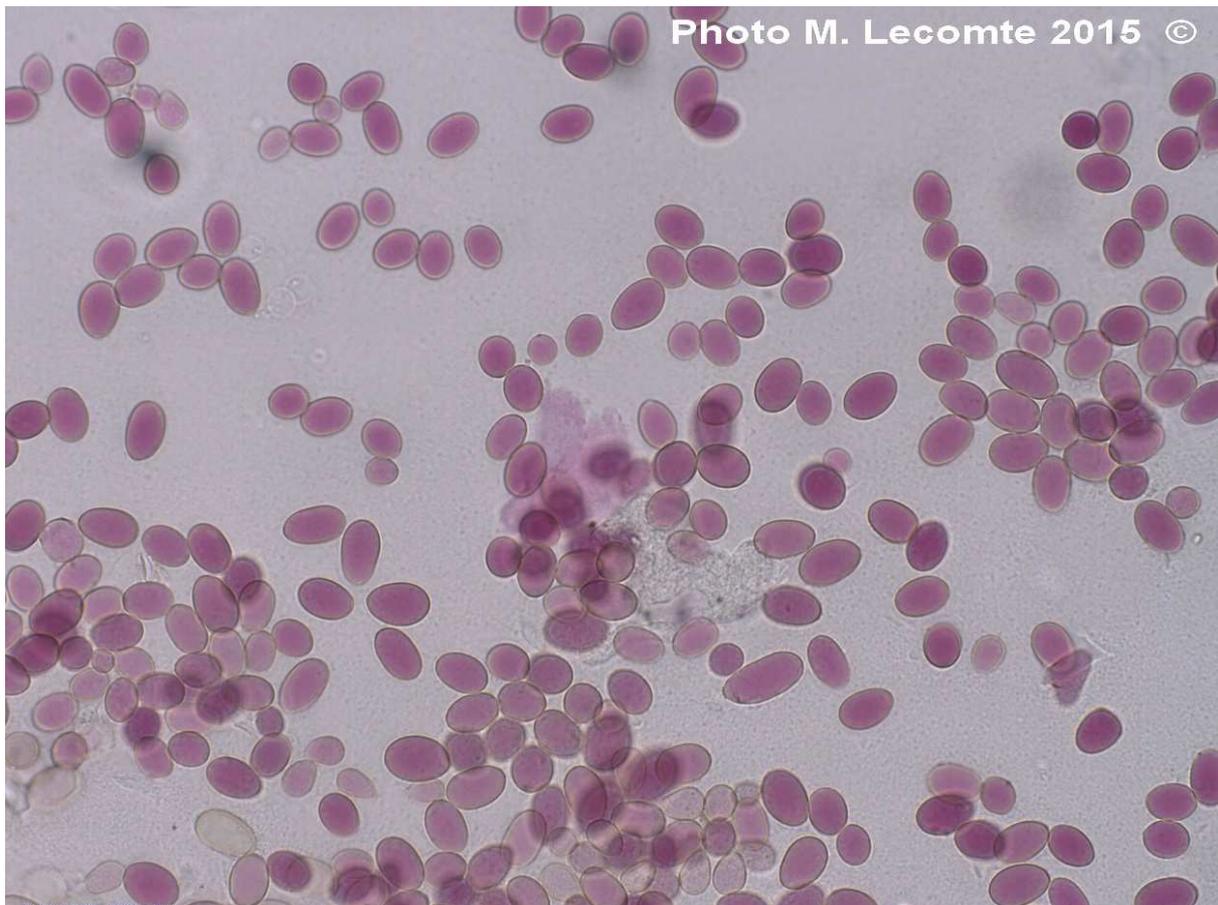
Cela va se faire tout simplement par chauffage. L'idéal est d'utiliser une petite réchaud de laboratoire à alcool (ce dernier le plus pur possible, afin de ne pas avoir des résidus noirâtres sur la face inférieure de la lame). Passer délicatement la lame à la flamme en décrivant de petits cercles dans le plan horizontal, jusqu'à l'apparition des premiers bouillons. À ce moment-là, déposer le plus rapidement possible la lame sur une surface froide et vous allez voir les bulles d'air qui, comme par magie, vont disparaître une à une : il est possible de répéter l'opération une seconde fois si le résultat n'est pas satisfaisant.

Attention : si vous chauffez trop fort, le colorant va se mettre à bouillir, sortir de la LCO en projetant des gouttelettes brûlantes, et en emportant le contenu de ce que vous deviez observer.



+++ Observation finale

Après avoir nettoyé les éventuels débordements causés par la chaleur (afin de ne pas polluer vos objectifs), observez, et vous constaterez que votre préparation est bien nette, que les bulles ont disparu et qu'en outre, la prise de colorant par les divers éléments a été exacerbée par la chaleur.



Ce long descriptif peut paraître fastidieux, mais il est beaucoup plus long à décrire qu'à réaliser dans la pratique. Il doit devenir pour vous une routine et pourra être appliqué dans nombre d'autres situations, où les éléments à colorer sont susceptibles de retenir ou de contenir des bulles d'air.

En voici un exemple qui aurait pu être corrigé par un simple petit chauffage de la préparation. Pour un néophyte, ces éléments pourraient constituer des éléments représentatifs, alors que ce sont tout simplement des artefacts.



Dernier conseil

Si vous êtes amenés à observer des éléments de quelque nature qu'ils soient, et que vous souhaitez éviter des déplacements intempestifs au sein de la préparation (notamment pour la réalisation de photographies), nous vous conseillons d'utiliser comme milieu d'observation un des produits suivants, qui sont plus visqueux et ont l'avantage en outre de posséder un indice de réfraction supérieur à celui de l'eau : l'eau glycinée, la glycérine pure, l'acide lactique, hydrate de chloral, le chloral lactophénolé (une réserve quand même à propos de ce dernier, car le phénol est très toxique, cancérigène, et se dégage fortement lors du chauffage... chaque fois que c'est possible, ne plus l'utiliser).

C'est ainsi que nous conseillons également d'utiliser le bleu coton lactique, plutôt que le bleu coton lactophénolé.