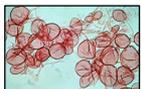




SÉMINAIRE de MICROSCOPIE 2012

Organisé par l'Association des Mycologues Francophones de Belgique

Photos de la page de couverture :



Dissociation du voile d'*Amanita muscaria* - coloration au rouge Congo SDS - préparation lavée et observation dans l'eau glycérinée - 63x.



***Peritricha* sp.** – Protozoaire de la classe des Infusoires - observation en DIC, x63, dans l'eau

MANUEL DE MICROSCOPIE

**à l'attention
des passionnés en général,
et des mycophiles en particulier.**

Marcel Lecomte

Avec la collaboration de G. Auderset, D. Baar, J.-P. Claes, F. Dubois, A. Ferville,
A. Février, P. Girodet, T. Hatt, P. Leroy, O. Levoux, A. Marchal, J.-M. Pirlot,
et G. Trichies

**« Celui qui se perd dans sa passion
Est moins perdu que celui qui perd sa passion. »**
(Saint-Exupéry)

J'adresse mes remerciements les plus vifs à :

L'A.M.F.B. (Association des Mycologues Francophones de Belgique),
qui a financé l'impression de cette publication.

Guy Auderset,
qui a supervisé l'aspect scientifique et rédigé l'introduction.

Paul Pirot,
qui a assuré la correction orthographique et grammaticale des textes, et
rédigé la préface.

Guy Auderset, Didier Baar (†), Jean-Pierre Claes, François Dubois, Alain
Ferville, André Février, Pierre Girodet (†), Thierry Hatt, Jean-Louis Jalla,
Paul Leroy, Pierre-Arthur Moreau, Jean-Marie Pirlot, Gérard Trichies,
pour leur participation écrite.

André Advocat, Christian Aubert, Guy Auderset, Didier Baar (†), Michel
Blaise, Jean-Pierre Claes, Yves Deneyer, Françoise Draye, Philippe
Dufour, Guillaume Eyssartier, Roberto Fernandez, Alain Ferville, André
Février, Daniel Ghyselincq, Pierre Girodet (†), Thierry Hatt, C. Huck, Jean-
Louis Jalla, Paul Leroy, Camille Mertens, Joseph Pellicani, Heinrich Pniok,
Dominique Prades, Serge Prévost, Henri Robert, Gérard Trichies, François
Valade, Paul-Reiner X,
pour leur participation photographique.

Didier Baar (†), Michel Blaise, Régis Courtecuisse, Philippe Dufour,
Guillaume Eyssartier, Jean-Pierre Gaveriaux, Alain Henriot, Klaus Herr-
mann, Jean Lachapelle (†), Claude Lejeune (†), Paul Leroy, Albert
Marchal, Pierre-Arthur Moreau, Serge Roelandts, Arthur Vanderweyen,
qui ont contribué à mes progrès en microscopie.

Internet, et tous les auteurs qui acceptent de partager gracieusement leur
expérience, leurs idées, leurs images, leurs croquis et leurs publications.

Table des matières

3. PRÉFACE

4. ABRÉVIATIONS UTILISÉES

5. INTRODUCTION

6. PRÉAMBULE

8. CHAPITRE 01 : L'OUTIL D'INVESTIGATION INDISPENSABLE : LE MICROSCOPE

9. IL Y A MICROSCOPE ET MICROSCOPE : LE MICROSCOPE CLASSIQUE EN LUMIÈRE PHOTONIQUE (les oculaires, les objectifs, l'ouverture numérique, l'entretien des objectifs, le condenseur {ajustement et centrage}, ajustement de l'éclairage de Köhler)

14. QUELQUES INFORMATIONS À PROPOS DE L'ÉCLAIRAGE

16. LE MICROSCOPE À LUMIÈRE POLARISÉE

21. LE MICROSCOPE À CONTRASTE DE PHASE, OU PHACO

23. DES SYSTÈMES DE CONTRASTE ENCORE PLUS ÉLABORÉS

- 23. LE CONTRASTE INTERFÉRENTIEL DE NOMARSKI (DIC)
- 24. LE CONTRASTE VAREL
- 24. LE FOND NOIR
- 25. LE PLASDIC

26. DES SYSTÈMES DE CONTRASTE SIMPLES ET PEU COÛTEUX :

LE TRIANGLE DE MATHIAS

27. LA PIÈCE DE JALLA

29. LES FILTRES DE RHEINBERG

30. LE MICROSCOPE À FLUORESCENCE

33. QUEL MICROSCOPE CHOISIR ? ... UNE IDÉE DE « MAÎTRE-ACHAT »

35. LES CONSTITUANTS DU MICROSCOPE (la partie mécanique, la partie optique)

37. CHAPITRE 02 : LES PREMIERS PAS EN MICROSCOPIE

38. MODUS OPERANDI POUR LA RÉALISATION D'UNE OBSERVATION-TYPE AU MICROSCOPE PHOTONIQUE À FOND CLAIR

38. MICROSCOPE ET PREMIERS ACCESSOIRES (les lames porte-objet et couvre-objet, l'huile à immersion, le nettoyage des oculaires et objectifs, la 1^{ère} observation)

42. LES MILIEUX D'OBSERVATION À UTILISER POUR L'EXAMEN D'UNE PRÉPARATION MICROSCOPIQUE ... L'INDICE DE RÉFRACTION

44. LES TYPES DE PRÉPARATIONS : DE ROUTINE, SEMI-DÉFINITIVES, DÉFINITIVES (les différents milieux de montage)

46. LES COUPES EN MICROSCOPIE : UN PROBLÈME ÉVIDENT ET PEU FACILE À SOLUTIONNER

- LES COUPES À MAIN LEVÉE
- LE MICROTOME DE RANVIER
- LE MICROTOME DE GENAT
- LE MICROTOME DE MINOD, À MANIVELLE
- LES MICROTOMES PROFESSIONNELS

49. CHAPITRE 03 : MICROSCOPIE ET PHOTOGRAPHIE

50. ADJONCTION D'UN APPAREIL PHOTO OU D'UNE CAMÉRA NUMÉRIQUE, À UN MICROSCOPE

54. LA SUPERPOSITION D'IMAGES

55. CONSTRUIRE UNE ÉCHELLE GRAPHIQUE, SANS CALCUL, SUR LES IMAGES DE MICROSCOPIE

59. MICROSCOPE, FLASH ET APN - BALANCE DES BLANCS

62. CHAPITRE 04 : MICROSCOPIE ET MYCOLOGIE

63. PROTOCOLE DE PRÉPARATION POUR UNE OBSERVATION MICROSCOPIQUE EN MYCOLOGIE

66. UTILISATION DU MICROSCOPE ET DE RÉACTIFS CHIMIQUES POUR L'ÉTUDE DES CHAMPIGNONS - TECHNIQUES D'OBSERVATION

68. LES PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES PAR DISSOCIATION

71. LA COLORATION DES COUPES : LIMITES ET RÉALITÉS

73. LA COLORATION RÉGRESSIVE

74. PROTOCOLES DE MISE EN ÉVIDENCE DES INCRUSTATIONS ACIDO-RÉSISTANTES SUR LES HYPHES PRIMORDIALES DE LA CUTICULE DE CERTAINES RUSSULES

76. UTILISATION DE LA RÉSINE ÉPOXY POUR L'INCLUSION DE CHAMPIGNONS DESTINÉS À LA MICROTOMIE

84. LA MICROSCOPIE DES POLYPORES ET DES CORTICIÉS

91. AIDE-MÉMOIRE DU « PETIT CHIMISTE MYCOPHILE »

- AGARICOMYCETIDAE
- APHYLLOPHOROMYCETIDAE
- GASTEROMYCETIDAE
- PHRAGMOBASIDIOMYCÉTÉS

➤ ASCOMYCÈTES

99. AIDE-MÉMOIRE DE LA MICROSCOPIE MYCOLOGIQUE VUE SOUS L'ANGLE DES GENRES

109. UN COLORANT TROP PEU UTILISÉ EN MYCOLOGIE : LE BLEU DE CRÉSYL

112. ÉTUDE DES PIGMENTS CHEZ LES CHAMPIGNONS

115. CHAPITRE 05 : MICROSCOPIE ET BOTANIQUE

116. APPLICATIONS DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE DANS L'ÉTUDE DES PLANTES

119. CHAPITRE 06 : COUPES DE TISSUS ET MONTAGE DES SPORES

119. TECHNIQUE COMPLÈTE DE PRÉPARATION D'UNE COUPE DE PLANTE OU DE CHAMPIGNON À DESTINATION DÉFINITIVE

119. GÉNÉRALITÉS RELATIVES À LA FIXATION

122. GÉNÉRALITÉS RELATIVES À L'INCLUSION

127. GÉNÉRALITÉS RELATIVES À LA COLORATION

130. LE COLLAGE DES COUPES ET DES SPORES : LA SOLUTION À BEAUCOUP DE PROBLÈMES DE COLORATION - LE FROTTIS

131. LA MÉTHODE DE DAGRON

133. PRÉPARATIONS DÉFINITIVES DE POLLENS DE RÉFÉRENCE

137. UN UNIVERS CAPTIVANT : LES DIATOMÉES

142. LE NETTOYAGE DES DIATOMÉES

145. CHAPITRE 07 : MICROSCOPIE ET ARTHROPODES

146. A PROPOS DU PVA, DE SON UTILISATION, DE SES LIMITES, ET DU MONTAGE DES ARTHROPODES

149. BAUME DU CANADA ET INVERTÉBRÉS

153. J'AI TESTÉ LE PVA POUR LE MONTAGE DES ARTHROPODES

157. LA LUMIÈRE POLARISÉE TRANSMISE SE RÉVÈLE D'UNE BELLE EFFICACITÉ ET ÉVITE DE LONGUES PRÉPARATIONS DES INSECTES

159. CHAPITRE 08 : MICROSCOPIE ET MOISSURES

160. LES MILIEUX DE CULTURE

163. LES MOISSURES – GÉNÉRALITÉS

169. LES MOISSURES – MICROSCOPIE

174. CHAPITRE 09 : UNE SYNTHÈSE DE DIVERSES TECHNIQUES

175. SYNTHÈSE DE DIVERSES TECHNIQUES DE MONTAGE PERSONNELLES

175. MONTAGE DES INSECTES DE PETITE TAILLE : TIQUES ET PUCES

MONTAGE DES INSECTES DE TAILLE MOYENNE

MONTAGE DE PARTIES D'INSECTES DE GRANDE TAILLE : PATTES OU AILES

176. MONTAGE DE LARVES D'INSECTES : VERS DE VASE

177. MONTAGE DE GRAINS DE POLLEN

RÉALISATION ET MONTAGE D'UN FROTTIS SANGUIN

178. MONTAGE DÉFINITIF DE MOISSURES

➤ À LA GÉLATINE

➤ AU PVALPH COLORÉ DANS LA MASSE

179. MONTAGE DE COUPES VÉGÉTALES SELON K. HERRMANN

OBSERVATION DE MITOSES (DIVISIONS CELLULAIRES)

181. CHAPITRE 10 : ENCORE QUELQUES COMPLÉMENTS D'INFORMATION

182. PHOTO TO SKETCH

183. DES LOGICIELS DISPONIBLES EN FREEWARE ET D'UNE UTILITÉ CERTAINE POUR VOS TRAVAUX DIVERS

184. DE LA LONGÉVITÉ DES RÉACTIFS ET COLORANTS CHIMIQUES EN MYCOLOGIE ET MICROSCOPIE

187. LA CONSERVATION DU MATÉRIEL FRAIS

189. LE TRAITEMENT DES EXSICCATA

191. A PROPOS DU MARQUAGE DES OBJECTIFS LEITZ OU ZEISS, QUI POSENT SOUVENT DES PROBLÈMES D'INTERPRÉTATION

192. A PROPOS DU NETTOYAGE DES LPO ET LCO USAGÉES

193. J'AURAIS VOULU VOUS EN PARLER AUSSI...

194. BIBLIOTHÈQUE PERSONNELLE

Préface

1976. Michel Fugain chante « le grain de sable » : « je suis l'infiniment petit, perdu dans l'infiniment grand ». Plutôt que de lever les yeux au ciel, et d'être fasciné par le vertige qui saisit quand on pense aux millions d'années-lumière qui nous séparent de certaines galaxies énormes alors qu'elles nous semblent minuscules, le passionné de microscopie s'émerveille de la taille, de la forme, de la couleur de ce qui est très petit, mais lui apparaît gigantesque dans le champ des oculaires de son télescope inversé.

Fascination pour la découverte de ce qui est invisible à nos sens limités ? Sans aucun doute : il est toujours tentant de « voir plus loin », avec le sentiment, peut-être, de pénétrer une intimité naturelle presque tabou, donc attirante... Admiration, tout aussi sûrement, face à la complexité d'un œil d'insecte, l'architecture d'une diatomée, la pureté d'un cristal de roche.

Souvenez-vous du film « Microcosmos », qui nous met au niveau de l'herbe où grouille toute une vie à laquelle nous ne prêtons guère attention ; il en va de même pour les champignons minuscules, mycènes lilliputiens, ascomycètes aquatiques ou colonisant les feuilles, minuscules pyrénomycètes : en pénétrant avec une fine aiguille à l'intérieur d'un périthèce, on ramène collée sur sa pointe toute une structure qui ne révèle ses merveilles que sous le microscope. Comme ce sont les champignons qui me fascinent le plus, je ne peux que « faire l'article » des cystides de plutées, des cristaux qui coiffent celles des inocybes, de la majesté des spores de truffes...

Il faudra de la patience, ah ça oui ! Du bon matériel, certes, mais surtout l'opiniâtreté pour réaliser de belles préparations. Comme au cinéma, on « refait la séquence » un grand nombre de fois. Avec l'aide de colorants, souvent, pour mettre en évidence les caractères à bien mettre en relief. Cet ouvrage, qui est un peu le testament de l'ami Marcel en la matière, et le superbe site qu'il propose sur internet, seront vos références au fil d'un long parcours. A moins que vous ne soyez déjà expert, le débutant comme moi, cheminera pas après pas. Et qu'importe les ratés, qui seront légion ; la satisfaction de voir puis de montrer une image où l'on a saisi l'essence d'une toute petite tache noire qui colonise une aiguille de pin au sol vaut, de loin, le plaisir que procure un match de foot à la télé ! Georges Becker pensait que la connaissance du mystère de la Nature donne une joie profonde, de celles qui comblent le cœur : même les rouilles, qui n'ont guère meilleure réputation que les moussiques, vous éblouiront par leurs spores. Et que dire des infâmes tiques... qui vous sucent le sang et peuvent même vous injecter une vilaine maladie, mais que Paul Leroy est capable de vous amener à admirer !

A moins que vous ne participiez à des séances de microscopie collective – oui, cela existe dans certains cercles, et est rendu possible par les moyens techniques d'aujourd'hui, dont la caméra et le vidéoprojecteur – c'est pendant de longues heures, dans la solitude et le secret de votre laboratoire, que vous pénétrerez au cœur de la matière vivante. Et vous souhaiterez garder des traces de vos découvertes, avec des préparations qu'on rêve définitives, des images à partager aux amis qui ont la même passion du tout petit. Que le travail présenté ici vous donne la clé de la porte vers un monde nouveau !

Paul Pirot

Président des MLB (Mycologues du Luxembourg belge)
Vice-président de l'Association des Mycologues Francophones de Belgique

Abréviations utilisées

AFA = alcool formolé acétique
 APN = appareil photo numérique compact (à objectif non amovible)
 BC = baume du Canada
 BP = boîte de Pétri
 BRN = boîtier réflex numérique
 DIC = contraste interférentiel de Nomarski (Differential interference Contrast)
 GDS = glycérine + sodium diméthyle sulfoxyde
 IR = indice de réfraction
 LCO = lame couvre-objet
 Led = light emitting diode
 LPO = lame porte-objet
 ML = Marcel Lecomte
 MO = mode opératoire ou modus operandi
 N ou n = indice de réfraction d'un liquide ou d'une matière
 NA = non amyloïde
 ND = non dextrinoïde
 nm = nanomètre
 ON = ouverture numérique
 PEG = polyéthylène glycol
 Phaco = contraste de phase
 PVA = alcool polyvinylique
 PVAL = alcool polyvinylique + acide lactique
 PVAL-FA = alcool polyvinylique lactique, coloré dans la masse à la fuchsine acide
 PVALPh = alcool polyvinylique lactophénolé
 RCA = rouge Congo ammoniacal
 RC SDS = rouge Congo aqueux SDS
 SA = ensemble des réactifs sulfoaldéhydiques
 SBA = sulfobenzaldéhyde
 SDS = sodium dodécyl sulfate, préconisé par Clémenton en mélange avec le rouge Congo aqueux ; c'est un mycologue et microscopiste suisse, qui constitue une référence incontournable en mycologie.
 SF = sulfoformol
 SP = sulfopipéronal
 SV = sulfovanilline
 μm = micron
 x10 ou 10x : nous écrirons indifféremment cette valeur, qui indique le grossissement d'un oculaire ou d'un objectif, des deux manières proposées.

Sauf mention contraire, tous les textes et photos, insérés dans ce fascicule, sont de Marcel Lecomte¹.

¹ Marcel Lecomte, rue Basse Chaussée, 117 B-5022 COGNELEE/NAMUR (Belgique) – mlecomte@skynet.be

Introduction

Vers 1870, il fut un lieu privilégié : Jena. Point de départ de la microscopie moderne.

Un mécanicien, prénom Carl Z. (on ne fait pas de pub !) produisant des bicyclettes et quelques microscopes assez quelconques, un industriel du verre (prénom Otto) tenant à développer la qualité de ce matériau, et un professeur de l'Université de Jena (prénom Ernst), travaillant à sortir l'optique microscopique de l'empirisme dominant et d'en faire une science exacte. Cette heureuse conjoncture amena la qualité de la microscopie à son niveau actuel. Tout ce qui fut inventé depuis, jusqu'à aujourd'hui, ne touche qu'au confort de l'observation ainsi qu'au développement de techniques annexes, importantes certes, mais ne pouvant se développer que par la qualité des lentilles et la formulation mathématique exacte de celles-ci.

Notons également, la collaboration extraordinaire d'un Belge à ce développement : le Dr Van Heurck, d'Anvers, régulièrement consulté par Carl de Jena pour tester les premiers objectifs apochromatiques sur son matériel, idéal pour ces essais : les Diatomées.

Il n'est pas étonnant de trouver, au musée de Jena, des lettres de remerciements émanant de biologistes et médecins célèbres, reconnaissant que leurs découvertes devaient beaucoup sinon tout à la qualité des appareils développés par la Trilogie de Jena.

Qui disait « qualité », à cette époque en tout cas, disait « prix élevés », voire exorbitants, inaccessibles pour la plupart des personnes intéressées.

A l'heure actuelle, la situation est très différente. Tous les constructeurs de microscopes ont intégré depuis longtemps les données techniques découvertes à Jena. La production industrielle aidant, les prix des appareils ont été ramenés à des montants acceptables pour tout amateur de discipline impliquant l'utilisation de cet instrument optique.

Plusieurs questions se posent au néophyte. Tout d'abord le choix d'un matériel adapté à ce qu'il désire entreprendre. Ensuite, comment utiliser au mieux le matériel acquis ? Enfin, quelles sont les techniques de base permettant les observations qu'on désire faire ?

Pour répondre à ces trois questions, la consultation d'une personne d'expérience est la plus indiquée. La balade sur le Web, secteur microscopie, est également conseillée.

Les conseils donnés par Marcel Lecomte dans le préambule de la brochure du Stage (Brochure ? Non ! Bible de poche !) sont tout-à-fait pertinents et justifiés.

Un fait est certain : la microscopie est à la portée de tous tant sur le plan financier que sur celui de l'utilisation rationnelle. Il suffit d'y plonger !

Il est aujourd'hui un autre lieu privilégié, dans les forêts de Lotharingie : Massembre. Lieu de rencontre peu après les Ides de Mars de mycologues passionnés et passionnants.

« Mon cœur est à Berlin, Sire ! » disait Voltaire au vieux Fritz.

Et moi, je vous dis sans hésiter : « Le mien est à Massembre ! »

Guy Auderset

Docteur ès Sciences Biologiques
Private Docent (enseignant à titre privé) de l'Université de Genève
Chargé de Cours à l'Université de Genève
Fellow of the Royal Microscopical Society

Préambule

La microscopie nous ouvre les portes d'un univers parallèle à notre monde quotidien. Le pouvoir de définition de notre œil a des limites physiques insurmontables, et tout ce qui est de taille inférieure au $\frac{1}{2}$ ou au $\frac{1}{4}$ de mm, se confond dans l'uniformité de l'indistinct puis de l'invisible. L'homme a raisonnablement pressenti cet univers et a cherché durant longtemps à le pénétrer, mais en vain ; il a fallu attendre le 17^{ème} siècle (Van Leeuwenhoek² et Hooke³) 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 infailible de l'observation du détail, 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 : une merveille, à l'époque, qui grossissait mille fois ...et je ne l'ai appris que bien plus tard, qui avait coûté l'équivalent d'un mois de salaire à mon père.

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 le conserve précieusement dans l' « armoire aux trésors » qui trône dans mon hall d'entrée.

Je me suis rendu compte très vite que cet univers était tellement vaste et diversifié qu'il faudrait un jour m'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 Micromycètes.

La plupart des clés de détermination récentes 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 maintenant 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, 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, mon maître-achat (un microscope de recherche, de très bonne qualité, avec tête tri-

² « Anton Van Leeuwenhoek est né le 24 octobre 1632, à Delft, en Hollande. Son père fabriquait des paniers d'osier ; sa mère était originaire d'une famille de brasseurs. Il reçut une instruction minimale à l'école primaire, puis étudia les mathématiques et la physique. Dès l'âge de seize ans, il séjourna à Amsterdam pour y apprendre le commerce auprès d'un drapier. Au cours de son voyage en Angleterre en 1668, il put voir des dessins d'agrandissement de tissus bien plus détaillés que tout ce que les lentilles alors disponibles en Hollande pouvaient permettre. A cette époque, voulant améliorer, par polissage, les perles de verres utilisées par les drapiers pour examiner la qualité du tissage des étoffes, il mit au point son premier microscope (voir dessin ci-dessus - cette copie a été faite à partir des descriptions qu'il a laissées). Les échantillons étaient placés sur la pointe mobile et positionnés de façon à être devant la lentille. L'ensemble était placé de façon à ce que la lumière diurne passe au travers du spécimen. L'observateur pouvait alors regarder à travers la lentille le matériel illuminé. Il semble qu'il ait été inspiré par la copie de l'illustration d'un livre de Robert Hooke qui décrivait ses propres observations à l'aide d'un microscope et qui était très populaire. Il avait observé la structure cellulaire de plantes à l'aide d'un microscope combiné, autour de 1665.

À partir de ce moment, la construction de centaines de microscopes, en or et en argent, et les observations microscopiques (entre autres le tartre sur ses dents et son sperme) constituèrent le but des patientes recherches de Leeuwenhoek. Il avait de toute évidence une très bonne vue puisqu'il a pu dessiner des images précises de microbes, ou des spermatozoïdes qui étaient à la limite du pouvoir de résolution de ses lentilles. »

Voir <http://www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/leeuwenhoek.htm>

³ Robert Hooke est né le 18 juillet 1635 à Freshwater (île de Wight), et mort le 3 mars 1703 à Londres ; c'est un des plus grands scientifiques expérimentaux du 17^{ème} siècle. On considère souvent Hooke comme l'inventeur du microscope composé : un assemblage de lentilles multiples, habituellement au nombre de trois : un oculaire, une lentille de champ et un objectif. Il donne ainsi de nombreux conseils pour la fabrication des microscopes au fabricant Christophe Cock. Mais cette attribution semble inexacte, car Zacharias Janssen avait déjà construit des microscopes similaires en 1590. Néanmoins, les microscopes de Hooke atteignaient un grossissement de 30 fois, ce qui était bien supérieur aux instruments précédents.

noculaire et revolver à 5 objectifs plans infinis, apte à satisfaire des exigences élevées), coûte moins de 1.500 € ; un microscope de laboratoire, d'un modèle basique, mais portant un label prestigieux, coûte entre 3.500 et 5.000 €, 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 convaincu 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 pratique hermétique, ésothérique, à même d'effrayer les mieux intentionnés et réservée à une minorité privilégiée d'initiés !

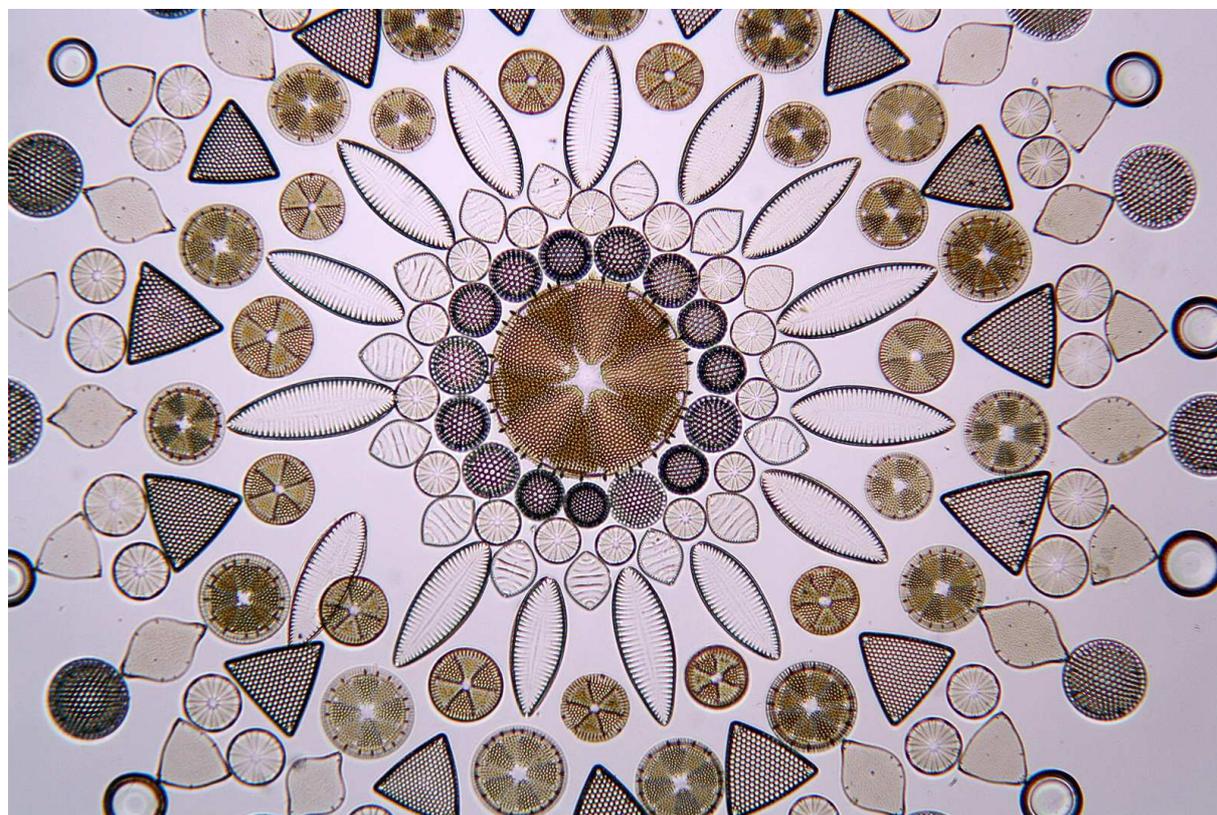
C'est faux ! Les difficultés techniques existent, certes, mais elles sont plus apparentes que réelles. La connaissance et l'utilisation de techniques simples, de réactifs et colorants faciles à se procurer (si on connaît la bonne « filière »), vous donnera des résultats immédiats, et extrêmement encourageants. Ajoutez-y patience, 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 littératures et documentations immenses, 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, ou encore les produits trop dangereux à utiliser.

Nous avons choisi délibérément d'introduire parfois des notions ardues et très théoriques dans les textes, afin que cet ouvrage ne constitue pas simplement un livre de recettes de microscopie. Certains ont envie d'aller plus loin que le « comment faire », d'en savoir plus, ce qui explique l'insertion de certains notions historiques, physiques, chimiques ou techniques.

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 ».

Marcel Lecomte



Montage artistique de diverses diatomées, appelé "rosette de salon" – œuvre réalisée par Dominique Prades, un ami français

Chapitre 01



L'OUTIL
D'INVESTIGATION
INDISPENSABLE :
LE
MICROSCOPE



DU PLUS SIMPLE AU PLUS PERFECTIONNÉ

Il y a « microscope » et « microscope »

Ce texte informatif est une large synthèse de nos multiples lectures, et d'une multitude d'articles qui sont en consultation libre sur Internet, le tout étant agrémenté de considérations personnelles.

LE MICROSCOPE CLASSIQUE EN LUMIÈRE PHOTONIQUE

Rappel des notions de base

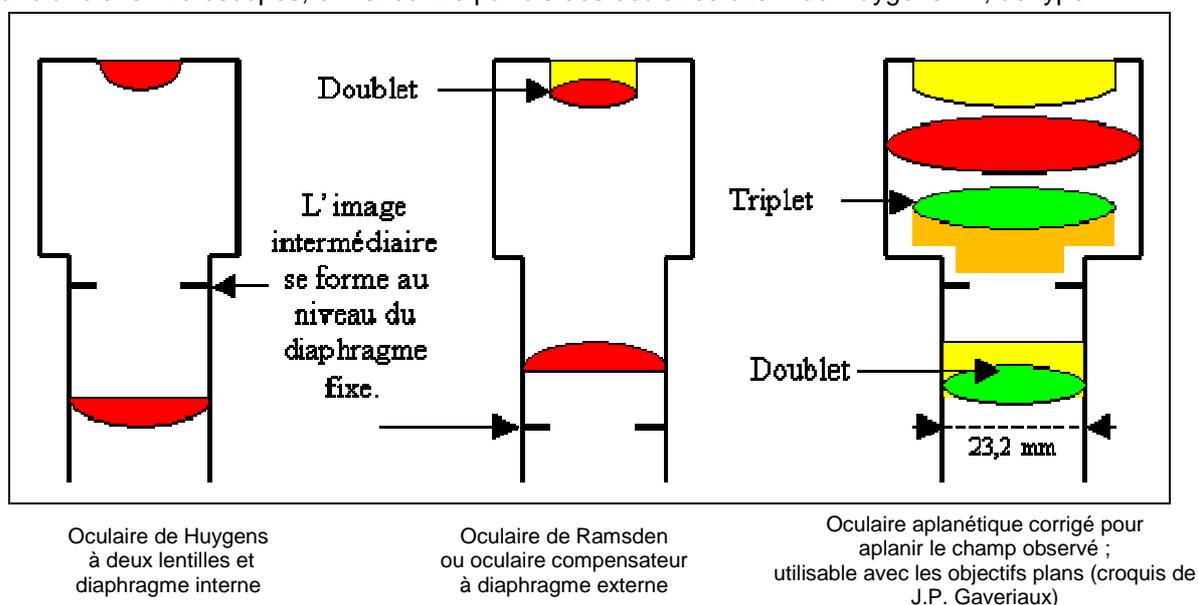
Le grossissement total du microscope est le produit du grossissement de l'objectif multiplié par le grossissement de l'oculaire. Ainsi, un objectif 40x et un oculaire 10x fournissent un grossissement total de 400x.

Cela n'est plus valable lorsqu'on fait intervenir un appareil photo numérique ou non, un tube à dessiner, ou tout autre accessoire intermédiaire, 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 existe 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.

Sur d'anciens microscopes, on rencontre parfois des oculaires dits « de Huygens ⁴ », de type H.



Les oculaires compensateurs, dont le verre d'œil est constitué de plusieurs lentilles, corrigent les défauts résiduels des objectifs. Ils rectifient en particulier la courbure de champ et les différences de grossissements pour les diverses longueurs d'onde. Ils donnent de meilleures images et sont indispensables pour exploiter correctement les objectifs achromatiques haut de gamme ainsi que les objectifs apochromatiques et semi-apochromatiques. Sur leur monture on trouve le sigle C, K ou Comp.

Les oculaires aplanétiques notés Kpl, P, PI ou CP, sont des oculaires qui forment l'image finale dans un plan ; ils sont à utiliser avec des objectifs plans.

Les oculaires grand champ sont des oculaires compensés plans qui possèdent un plus grand nombre de lentilles permettant d'accroître l'indice de champ jusqu'à pratiquement 20 (voir explication à la

⁴ C'est le plus simple et le moins onéreux. En 1703, Christian Huygens couple deux lentilles convexes afin de réaliser un oculaire minimisant les aberrations, notamment chromatiques, et portant le champ apparent à 40°, ce qui était exceptionnel pour l'époque. Cette belle amélioration s'obtient avec deux lentilles du même verre, à condition que la somme de leur longueur focale soit le double de la distance séparant les lentilles. Il comprend deux lentilles convergentes entre lesquelles il y a un diaphragme de champ fixe, situé au niveau du foyer de la lentille supérieure (appelée lentille d'œil) ; la lentille inférieure (ou lentille de champ) aplanit l'image et la rend plus claire. Le diaphragme de champ élimine les parties périphériques (où les aberrations sont trop importantes) et limite la zone circulaire qui permet de définir son indice de champ. C'est au niveau du diaphragme de champ qu'on place les dispositifs de mesure (**micromètre**), de repérage et de pointage. Ces oculaires simples équipent les microscopes d'initiation avec des objectifs achromatiques, dont les aberrations ne sont pas correctement corrigées. Leur indice de champ ne dépasse pas 14 à 16.

réf. 4, p. 9, et §4, ci-dessous). Leur marquage se fait avec les sigles GC ou GF ou GW, gravés à côté de l'indice de champ.

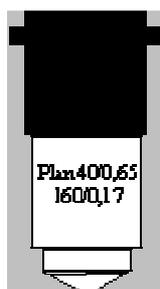
Les oculaires zoom possèdent plusieurs grossissements, x10 à x20 par exemple ; ils peuvent sembler intéressants à première vue ; toutefois leur qualité optique est inférieure à celle des oculaires n'ayant qu'un grossissement fixe ; de plus, sur un microscope binoculaire, il n'est pas toujours facile d'obtenir 2 images ayant exactement la même taille.

Certains oculaires modernes (ou anciens) sont aussi disponibles avec d'autres grossissements : 6x, 8x, 12,5x, 15x, 16x et 20x. D'autres 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 idéale de travail 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 masquer la lumière latérale.

Une autre caractéristique des oculaires est le coefficient de champ. Ce dernier détermine le diamètre du champ observé. Ainsi, un objectif 10x et un oculaire avec un coefficient de champ de 16 donnent un champ de 1,6 mm de diamètre ($1.600 \mu\text{m}$)⁵, ce qui représente une surface de 2,0096 mm². Le diamètre du champ se calcule en divisant le coefficient de champ par le grossissement de l'objectif.

A l'heure actuelle, les oculaires les plus sophistiqués sont des oculaires à grand champ apparent (au-delà de 80°) et à grand dégagement oculaire. Ils peuvent contenir jusqu'à huit lentilles, parfois de grandes dimensions et taillées dans des verres spéciaux, ce qui les rend assez coûteux. Très confortables, ils permettent de créer une excellente sensation d'immersion, vu la taille du champ couvert ; l'observateur qui revient à des oculaires plus standards a souvent l'impression d'observer alors à travers un trou de serrure.

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 plus complet, p. 190).

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 bleu⁶), avec planéité de l'image.

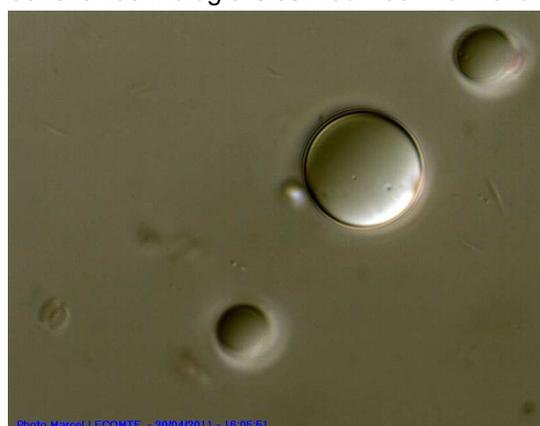
Les nombres 40/0,65 indiquent le « grossissement 40x », et l'ouverture numérique « 0,65 ».

Le nombre « 160 » donne la longueur du tube du microscope et « 0,17 » est l'épaisseur des LCO prévues pour cet objectif. La nouvelle technologie s'est tournée maintenant

vers les objectifs dits « à l'infini » (Les objectifs produisent un faisceau de lumière parallèle appelé « espace infini » ; voir complément d'information en référence 10, page 12).

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.

Un des artefacts les plus courants en microscopie : la bulle d'air.



L'ouverture numérique

Pour les férus de mathématiques, l'ouverture numérique d'un objectif est le produit de l'indice de réfraction⁷ du milieu entre la lentille frontale et la LCO par le sinus de la moitié de l'angle d'ouverture. Dans l'air, le grossissement maximum, avec une image

⁵ Le micron est une unité de longueur qui vaut 1/1.000ème de mm, soit 1/1.000.000ème de mètre.

⁶ 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 utilisée ; en lumière blanche, plusieurs images de couleurs différentes seront formées sur des plans différents. Cela explique que des images observées à travers 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.

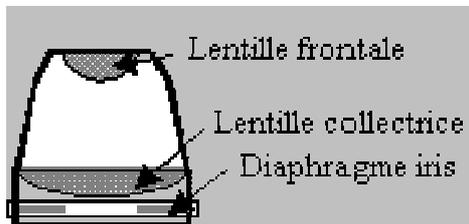
⁷ La lumière se propage différemment suivant les milieux traversés. En fait, chaque milieu est caractérisé par un indice de réfraction n , c'est-à-dire par une certaine vitesse de propagation de la lumière, qui est constante pour un élément donné.

bien nette, peut difficilement dépasser 500 fois l'ouverture numérique. Au-delà de cette limite, on peut voir apparaître des artéfacts⁸ créés par des images de diffraction.

L'air possède un indice de 1 tandis que l'huile à immersion affiche un indice de 1,515 ; l'huile permet donc des grossissements 1,515 fois plus grands.

L'entretien des objectifs

Le principal symptôme 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 essayer 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 griffure 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 de déplacement de la platine.

Le condensateur (ou condenseur)

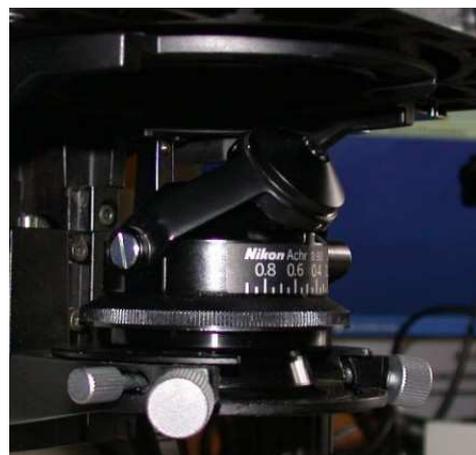
Condensateur avec lentille de Barlow et vis de réglage

Sa fonction est de concentrer la lumière sur l'objet.

Le champ éclairé par le condensateur doit être uniforme. Sa position normale se situe presque complètement en haut, avec la lentille frontale du condensateur très près de la lame. Nous verrons comment l'ajuster à sa position optimale. Certains d'entre-eux possèdent une lentille frontale escamotable (dite lentille de Barlow⁹), 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 dit « d'ouverture ». 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, possédant le même n que les objectifs, et dont la lentille supérieure est concave, de manière à pouvoir également placer de l'huile à immersion sous la lame, et améliorer ainsi les performances du système. Mais ces manipulations d'huile sont lourdes, longues, contraignantes et demandent beaucoup de soin.



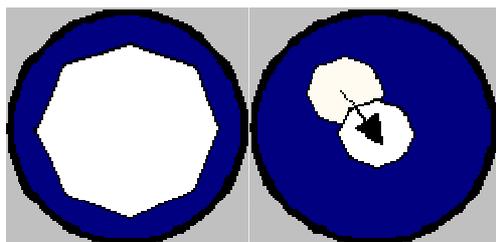
Ajustement de l'iris du condenseur

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.

⁸ Un artéfact (ou artefact) est un effet artificiel, indésirable, une sorte d'image parasite. Ce terme désigne à l'origine un phénomène créé de toute pièce par des conditions expérimentales ; très souvent, dans notre domaine, il est généré par des bulles d'air. En cytologie ou en histologie, un artéfact désigne une altération d'une structure biologique sous l'effet de réactifs, de fixateurs, de colorants, ou par dessiccation, par exemple.

⁹ Une lentille de Barlow (du nom de son inventeur Peter Barlow) est une lentille divergente permettant de multiplier artificiellement la distance focale d'un instrument. Cette augmentation se fait cependant au prix d'une certaine perte de la qualité de l'image, dans la mesure où on ajoute une lentille au système. Cette dégradation se situe au niveau d'une perte de la luminosité (de l'ordre de 0,4 % avec un traitement antireflets moderne), et de l'aberration chromatique introduite par une lentille simple.

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 (cette opération est plus simple si on utilise un oculaire avec réticule micrométrique).
- + Replacer le filtre diffuseur.

Ajustement de l'éclairage de Köhler

C'est grâce aux travaux que publie Ernst Abbe (ingénieur chez Carl Zeiss), en 1873, que le professeur Köhler met au point, en 1893, l'éclairage à double diaphragme qui porte son nom.

Selon les travaux d'Abbe, la formation d'une image de qualité dépend de deux éléments capitaux : l'objectif avec son ouverture numérique (ON) et la façon d'éclairer le spécimen.

C'est uniquement l'éclairage du sujet qui nous intéresse ici. Pour simplifier, la lumière peut avoir deux structures différentes selon que ses rayons sont parallèles ou non.

Nous avons deux types d'éclairages opposés :

Le premier est appelé **cohérent** (rayons parallèles), et l'autre, **incohérent**.

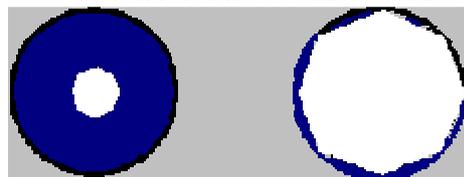
L'éclairage parfait, qui maximalise au mieux les détails, est l'éclairage totalement incohérent. Dans ce cas, le pouvoir séparateur est maximal ; il y a un minimum d'artefacts, mais l'image est sans contraste, sans profondeur de champ.

A l'inverse, plus l'éclairage est cohérent, plus l'image est contrastée, et plus la profondeur de champ augmente, mais plus la résolution diminue et plus les artefacts augmentent, à cause de la diffraction qui va créer des structures inexistantes. Dans l'éclairage de Köhler, c'est le rôle du diaphragme d'ouverture de régler le degré de cohérence de la lumière.

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 (s'il existe).
- 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 du polygone 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 éventuellement le filtre diffuseur.

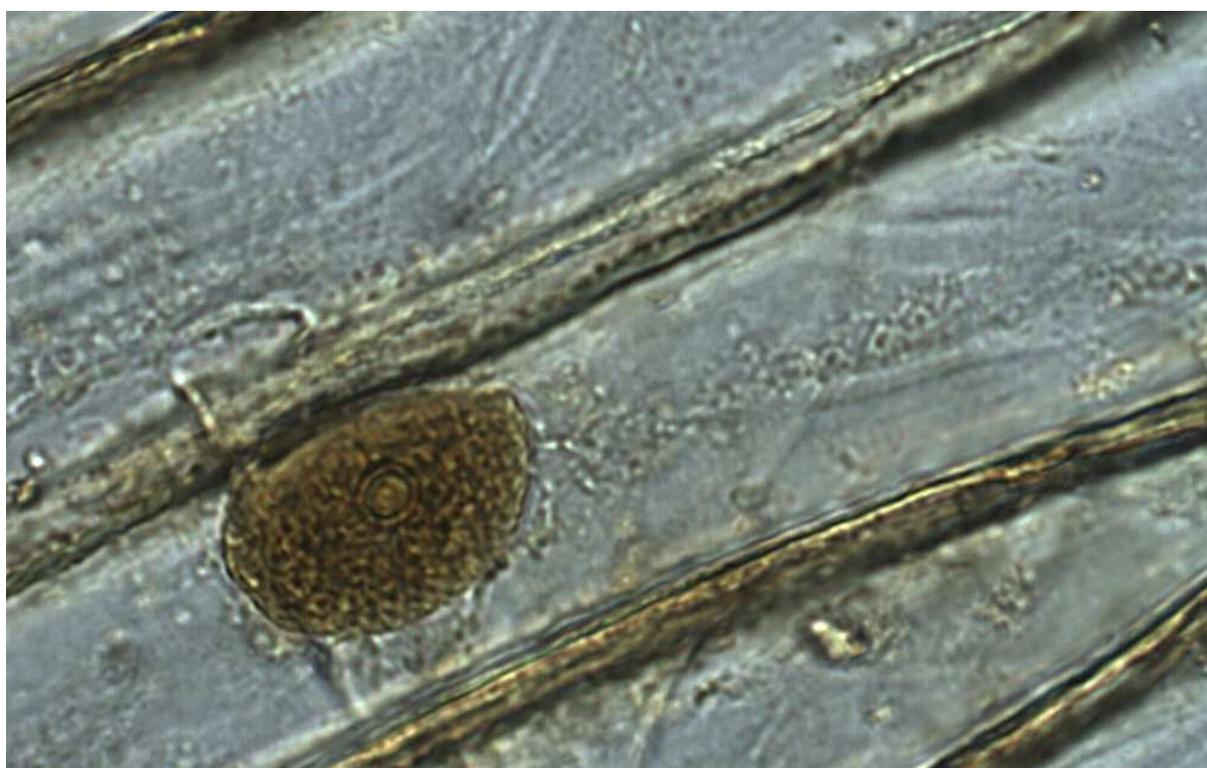
Lorsqu'on prospecte différents constructeurs afin de faire l'acquisition d'un microscope, il est important de demander s'il est possible d'adapter par la suite un contraste de phase sur le modèle choisi, de même qu'un système de polarisation, car ce n'est pas fréquemment le cas. En effet, il est très possible d'acheter par la suite un kit complet de phase, à tourelle, qui comprend en général 4 (ou 5) objectifs infinis¹⁰ (ou non), un condensateur et un oculaire d'ajustement, ou encore une simple glissière de phase destinée à un seul objectif (dans ce cas, nous privilégions le 40x), de même qu'un kit de polarisation (voir les chapitres consacrés à ce sujet).

Il nous paraît intéressant de préciser qu'un objectif de phase peut également s'utiliser en éclairage normal, et reste tout aussi performant.

¹⁰ Dans les microscopes dit « corrigés à l'infini » (au sens de la correction des aberrations), l'objectif fournit une image à l'infini (l'objet étant alors dans le plan focal objet). Une lentille de tube (le tube du microscope) ou lentille de Telan, solidaire du statif, reforme l'image dans le plan focal de l'oculaire. L'objectif est alors caractérisé par son grossissement commercial (100x par exemple), et non par son grandissement.



Photo Marcel LECOMTE - 15/01/2011 - 15:19:45



Noyau d'une cellule de l'épiderme interne d'une écaille d'oignon ▲ coloration à la lactofuchsin ▼ coloration au permanganate de potassium

Quelques informations à propos de l'ÉCLAIRAGE

La microscopie optique photonique utilise une partie du spectre visible de la lumière, dite lumière blanche. Les longueurs d'ondes utilisées vont limiter le pouvoir séparateur du microscope à $1/5^{\text{ème}}$ de micron, même avec les meilleurs des objectifs planapochromatiques. On parlera de microscopie en champ clair ou à fond clair, et c'est la technique la plus ancienne et la plus répandue.

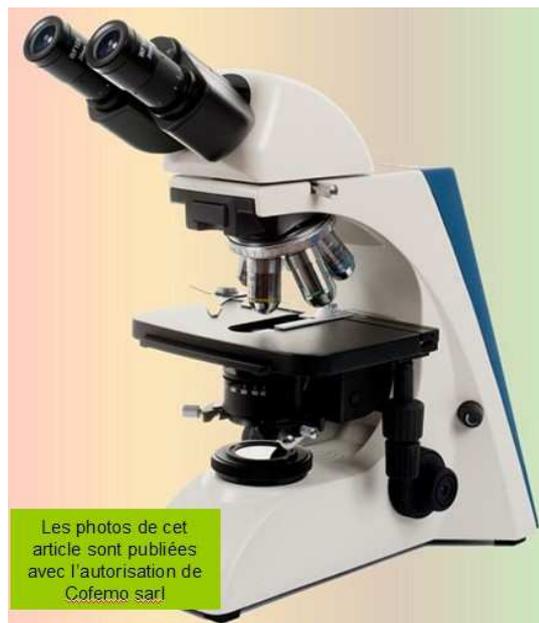
Quand on travaille avec un microscope classique, on l'utilise en transmission, c'est-à-dire que la lumière traverse l'échantillon observé ; il est éclairé par le dessous et on l'observe par le dessus ; on parlera d'un éclairage diascopique.

Plus généralement, le microscope à fond clair possède au moins trois avantages :

- + Il est le plus accessible pour des particuliers, ne disposant pas de subsides ou d'aides financières quelconques.
- + La technique est simple.
- + L'observation des sujets ne nécessite qu'un minimum de manipulations.

Il a cependant des limites bien nettes, dues au faible contraste des échantillons observés et à la faible résolution des objectifs (manque de profondeur de champ).

Mais des applications bien particulières ont amené les constructeurs à développer des appareils plus spécifiques.



Les photos de cet article sont publiées avec l'autorisation de Cofemo sarl



Le microscope inversé permet l'observation d'échantillons éclairés par le dessus, avec des objectifs à longue distance focale, qui sont situés en dessous de la platine, et donc de la préparation. Le système optique est aménagé de manière à ce que les oculaires se trouvent dans une position « normale » pour l'observateur.

Ce type d'appareil est dédié à la culture cellulaire, à l'observation de matériel vivant contenu dans des coupelles, des BP ou des lames creuses. Il est souvent combiné avec un contraste de phase¹¹ permettant d'apporter du relief aux objets observés, qui bien souvent sont hyalins, non teintés, et donc non contrastés.

2 modèles de micros inversés



Pour la cristallographie et la métallographie¹², sciences ou technologies qui demandent à observer des objets complètement opaques, ou trop épais pour le processus de transmission, des microscopes particuliers ont été développés, en utilisant la lumière blanche ou la fluorescence, mais en réflexion. Cela signifie que la source lumineuse se trouve au-dessus du statif, du même côté que l'observateur. On va alors parler d'éclairage épiscopique.

Cela peut s'appliquer sur des microscopes droits ou sur des microscopes inversés.

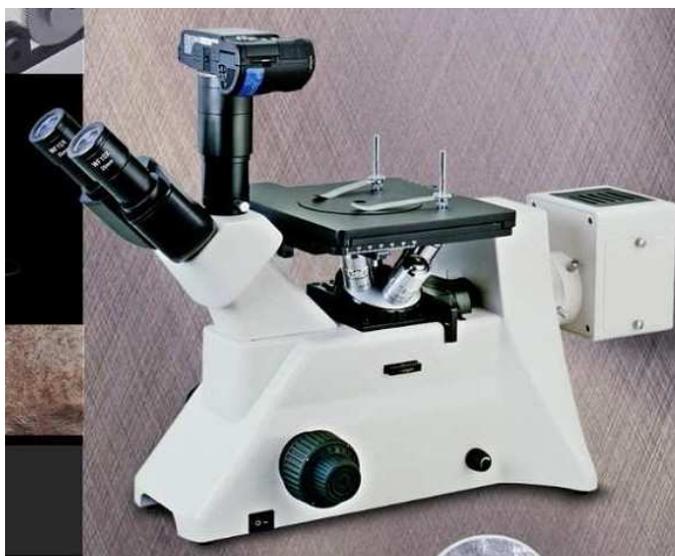
Le trajet de la lumière est complexe car, au départ de la source (qui doit être puissante), elle passe une première fois par l'objectif,

¹¹ Voir plus loin, le texte consacré à cette technique particulière.

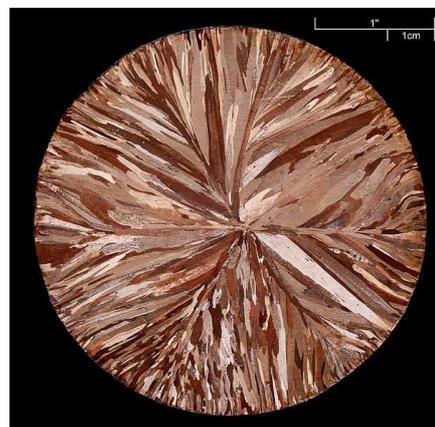
¹² C'est une technique permettant de déterminer la structure d'un métal sur base d'une observation à l'aide d'un microscope optique. Selon le but recherché, on étudiera par, exemple, la forme ou la taille des grains de matière, la direction des lignes de glissement en cas de déformation, ou encore les points de fragilité.

arrive sur l'échantillon, puis est réfléchi et repasse par l'objectif pour être dirigée vers les oculaires, ce qui nécessite plusieurs jeux de miroirs ou prismes. Cela explique le coût élevé de ce type de matériel.

L'observation en lumière blanche fournira simplement des informations relatives à la surface de l'objet observé ; mais cela peut s'avérer très important pour révéler des défauts, tels que fissures ou aspérités, sur des pièces de précision usinées notamment. En lumière polarisée¹³, par contre, on va pouvoir mettre en évidence l'orientation des constituants de la matière étudiée : minéraux, cristaux, métaux.



Deux modèles de microscopes métallographiques inversés, et un modèle droit.
(images publiées avec l'autorisation de Co-femo sarl).



Disque de cuivre obtenu par coulée continue (Pureté : 99,95%, diamètre : 83 mm environ), et dépoli par traitement chimique – photo Heinrich Pniok (avec autorisation de l'auteur : CC-BY-SA-3.0de).
<http://www.pse-mendelejew.de>

¹³ Voir, en page suivante, le texte consacré à cette technique particulière.

Le microscope à LUMIÈRE POLARISÉE¹⁴

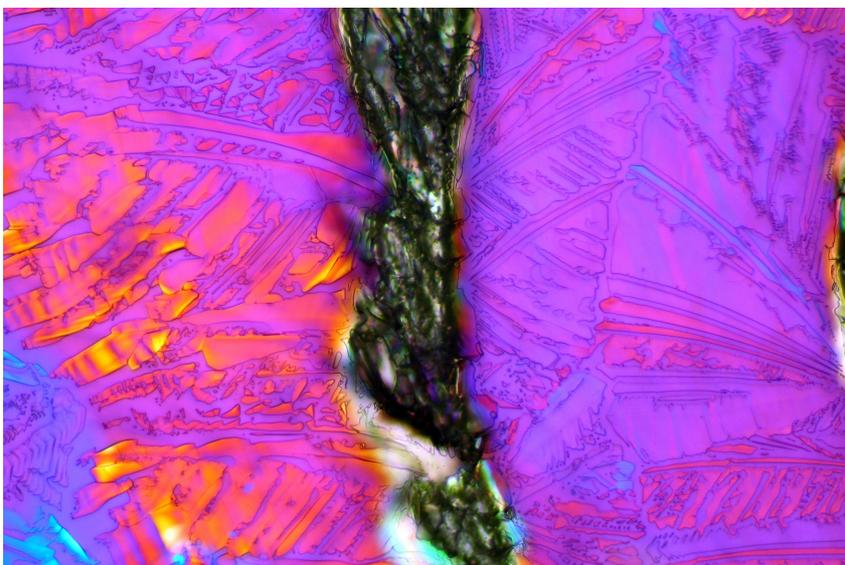


Le microscope polarisant, ou microscope polariseur analyseur, est un microscope optique muni de deux filtres polarisants, appelés **polariseur** (le premier modèle fut appelé prisme de Nicol¹⁵) et **analyseur**. Il était utilisé au départ en pétrographie pour l'observation et l'identification des minéraux 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 μ m environ.

Cet instrument optique 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, dotées 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 manière la plus simple et la plus 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 aux formes voulues, 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.

¹⁴ Les photos de microscopes apparaissant dans cet article nous ont été aimablement prêtées par Cofemo sarl.

¹⁵ Un **prisme de Nicol** ou plus simplement le **nicol** est un polariseur séparant un rayon lumineux en deux rayons de polarisations différentes. Ce fut le premier type de prisme polarisant la lumière, inventé en 1828, par William Nicol d'Édimbourg. Il est constitué d'un cristal rhomboédrique de calcite (spath d'Islande) taillé à un angle de 68°, coupé selon la diagonale, puis recollé à l'aide de baume du Canada.

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 l'examen d'éléments capables d'influencer le plan de la lumière polarisée, les rendant ainsi visibles sur un fond noir. Les deux filtres peuvent être placés sous le condensateur, mais alors, il faut utiliser un objectif spécialement conçu pour la polarisation (marqué « Pol »).



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 (IR). Cet IR 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 tandis que l'eau a un indice de 1,333. L'IR d'une solution aqueuse varie avec la densité.

Dans un corps isotrope, l'IR est unique quelle que soit la direction ; mais avec certaines substances dites anisotropes, il n'est pas le même dans toutes les directions. Plusieurs cristaux sont anisotropes c'est-à-dire biréfringents. La manifestation la plus évidente de la double réfraction est le dédoublement d'une image vue au travers d'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. En présence de 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 graisseux. 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.

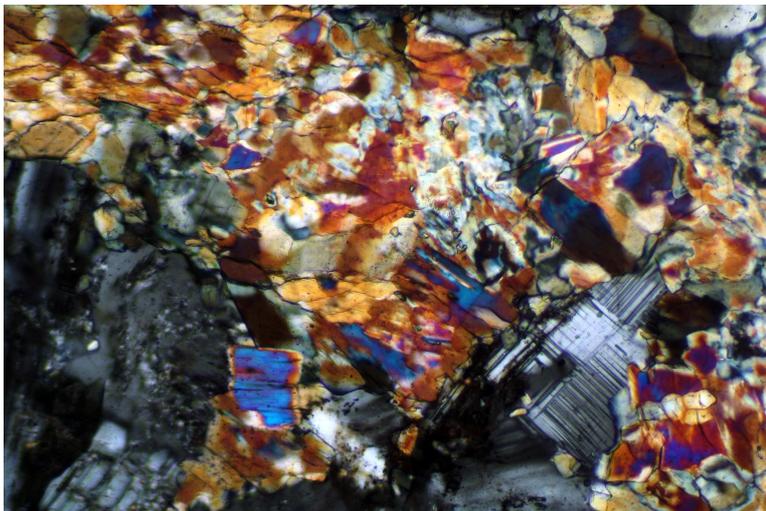
Il est possible de mesurer l'indice de réfraction d'un cristal avec la lumière polarisée. Les mesures se font en utilisant un filtre jaune proche de la raie D du sodium. Lorsqu'un cristal isotrope est placé dans un milieu qui a un IR différent, il se forme autour du cristal un halo appelé ligne de Becke. Lorsqu'on descend l'objectif, ce halo converge vers le cristal si l'IR 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 milieux qui offrent un éventail d'IR qui s'échelonnent de 1,40 à 2. 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 polarisations différentes, 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.

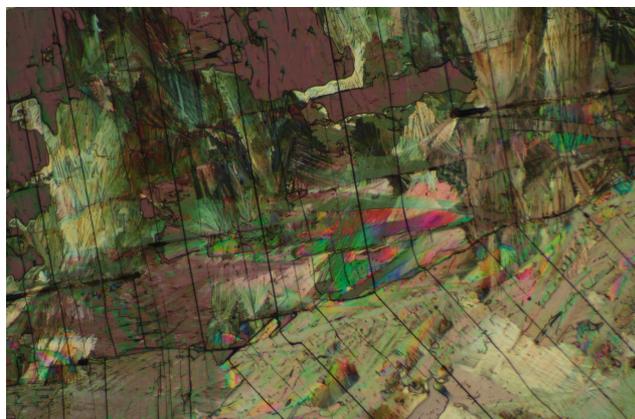
Le microscope polarisant permet également d'analyser la disposition des minéraux entre eux, de déterminer leur ordre de cristallisation, d'observer leur arrangement selon des plans ou des alignements, de mettre en évidence la structure de la roche.

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 troncatures 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, qu'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.

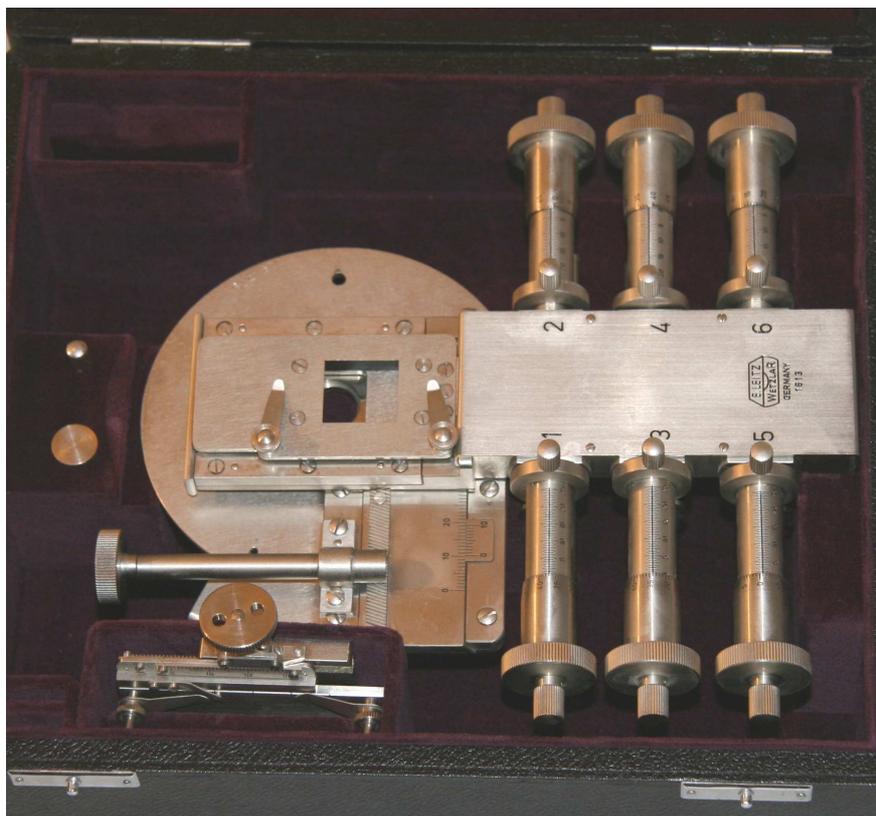
Un cristal peut être isotrope (même IR de la lumière dans toutes les directions) ou anisotrope (deux indices différents dans deux direc-

tions 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).



Platine universelle multiaxe de Fedorov, adaptable sur un microscope à polarisation

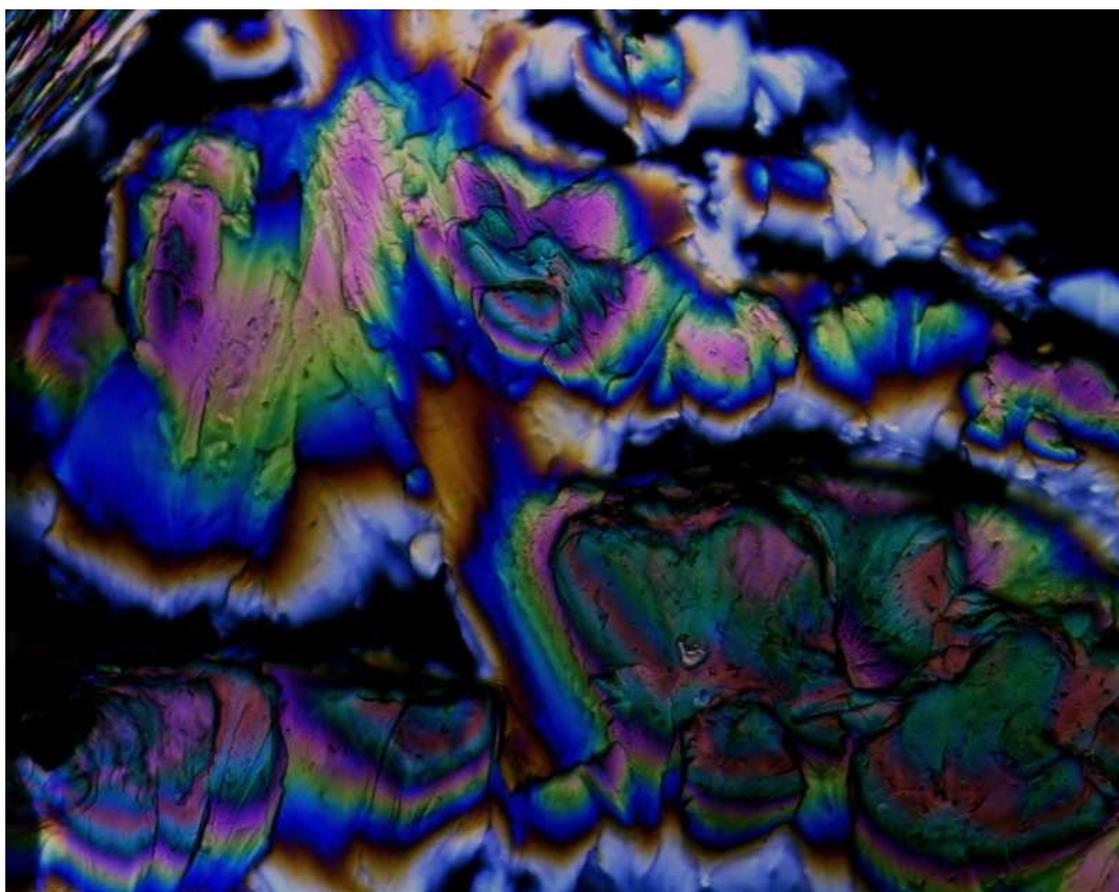
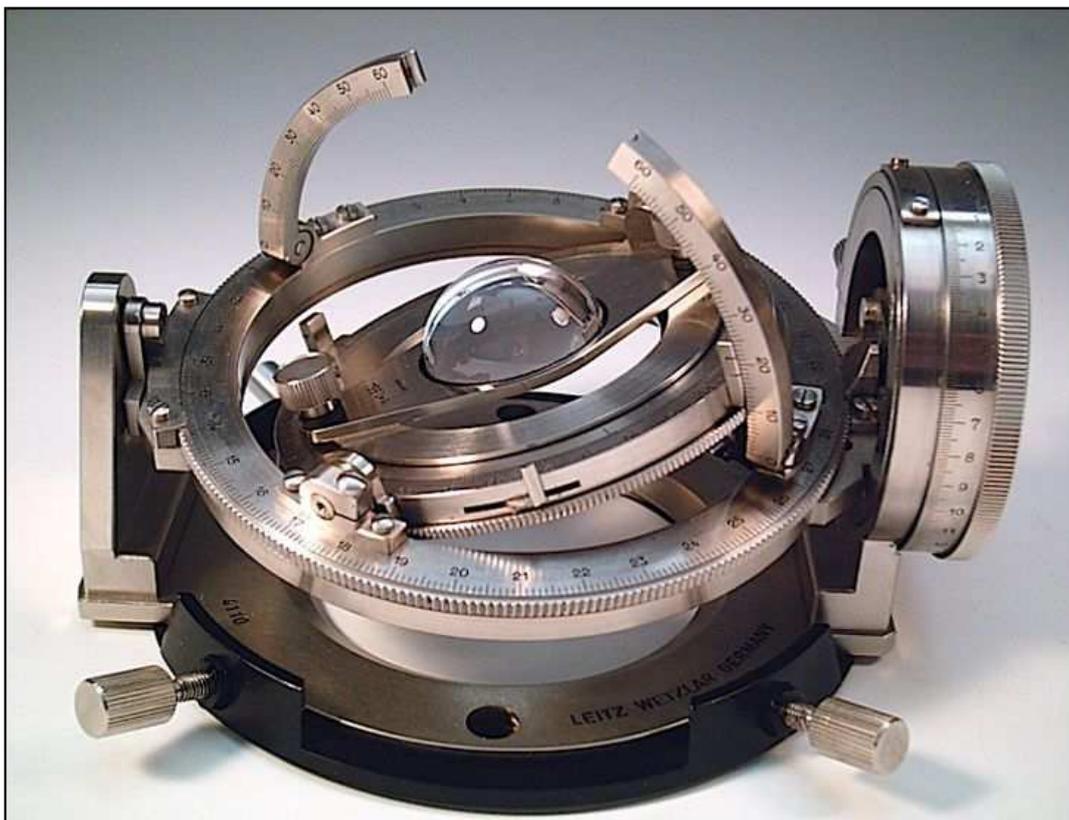
L'avènement du microscope polarisant¹⁶, tant pour les minéraux transparents que bientôt après, pour les minéraux opaques, est une véritable révolution, qui ne peut être comparée qu'à celle que constituera, un siècle plus tard, l'avènement de la microsonde électronique. Entre temps, le microscope polarisant va profiter d'abord des travaux de théoriciens comme F.-E. Mallard, ensuite de perfectionnements techniques tels l'adjonction de compensateurs pour la mesure précise des biréfringences (Brewster 1830, J. Babinet 1849), puis d'une lentille dite de Bertrand (ou Bertrand-Amici) en 1878. Treize ans après, le russe E.S. Fedorov invente la platine universelle multiaxe qui permet de travailler en 3 dimensions (voir image ci-dessus, et page suivante). Ainsi, ce nouveau microscope polarisant devient un véritable instrument d'analyse permettant non seulement la détermination des diverses espèces minérales, mais aussi l'estimation de leur composition.

Même si nous sommes totalement incapable de l'utiliser, nous ne pouvons nous empêcher de vous montrer cette merveille technologique qu'est la platine de Fedorov à 4 axes (photo page suivante).

¹⁶ Parallèlement à l'aspect géométrique, la cristallographie physique, vocable qui recouvre le troisième « caractère » de Werner (dureté, densité, couleur, propriétés optiques, électriques ou magnétiques), devait aussi connaître des développements spectaculaires, surtout liés à l'apparition d'un nouvel instrument, le microscope polarisant, et d'un nouveau mode de préparation des échantillons, la lame mince.

Depuis le XVII^{ème}, on connaissait certes le microscope, de même que le phénomène de la double réfraction (Érasme Bartholin, 1669), et même une interprétation théorique satisfaisante par C. Huyghens en 1690. Mais ces phénomènes n'étaient perceptibles que dans de grands cristaux de calcite, transparents et très biréfringents, échantillons à peu près uniques dans le monde des minéraux. La généralisation et la mise en évidence de cette dernière propriété à tous les minéraux, interviendra dans la première moitié du 19^{ème} Siècle, à la suite d'observations et de résultats convergents parmi lesquels l'École Britannique (Écosse et Angleterre) tiendra une place prépondérante. Il faut signaler cependant qu'antérieurement à la prééminence britannique, E.L. Malus, en 1801, fit connaître ses premiers travaux sur la polarisation de la lumière (par réflexion), et que D.F.J. Arago montra que certains minéraux pouvaient dévier le plan de polarisation des rayons lumineux. Des avancées décisives sont à prendre également en considération : elles sont du fait de D. Brewster, physicien écossais et observateur de génie, et de J.B. Biot, qui définit les cristaux optiquement positifs et négatifs. Toutefois, on ne pouvait toujours travailler que sur des cristaux spécifiques, soit très transparents (le quartz et la topaze pour Brewster), soit aisément clivables et donc faciles à préparer en lames très minces pour l'observation à fort grossissement (les micas pour Biot).

Après les premiers essais de microscope polarisant par G.B. Amici, l'anglais W. Nicol, vers 1830, met au point ses prismes célèbres qui donneront à cet instrument fondamental sa forme à peu près définitive. Parallèlement, les techniques de préparations de lames minces furent considérablement améliorées par Henry Clifton Sorby, qui publiera en 1851 un article célèbre, unanimement considéré comme marquant le début de la microscopie pétrographique. Suffisamment riche pour ne pas avoir à rechercher un poste officiel, il ressentit amèrement le fait de ne pas être nommé professeur à Sheffield, d'autre part, comme il le rapporte dans son journal intime, il eut à lutter toute sa vie contre certains collègues, « qui se gaussaient de le voir étudier les montagnes avec un microscope ».



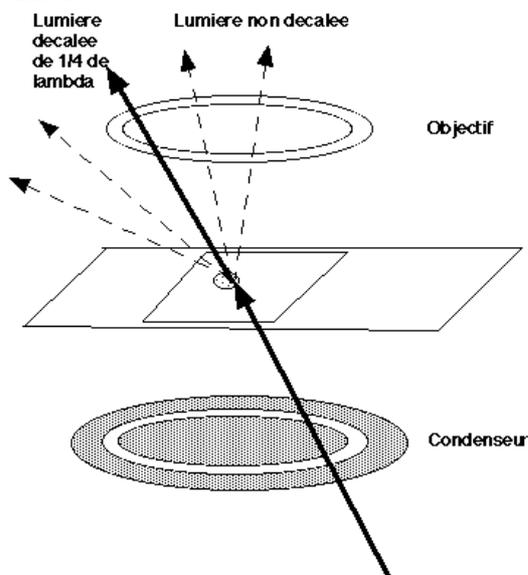
Cristaux de vanilline, observés en polarisation - x40 Pol

Si vous êtes intéressé(e) par les choses de la polarisation, nous vous conseillons fortement de consulter l'adresse suivante : <http://www.annales.org/archives/x/MineraloTouret.html> - site rédigé par Lydie Touret (Conservateur du Musée de Minéralogie de l'École nationale supérieure des mines de Paris) :
« De la Cristallographie à la Minéralogie, le XIXème Siècle ».

Le microscope à CONTRASTE DE PHASE, ou PHACO

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.

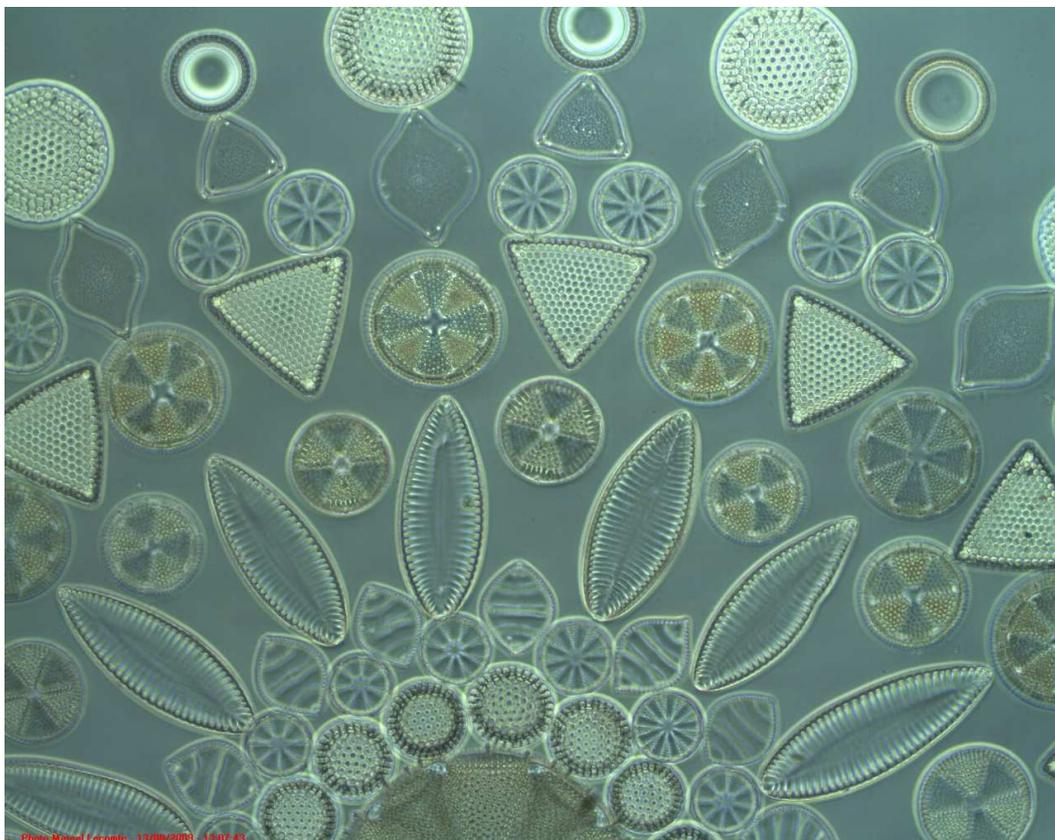


Un microscope à contraste de phase (ou en contraste de phase) est un microscope optique qui transforme en niveaux de gris les différences d'IR entre deux structures. Il visualise ainsi des structures transparentes quand leur IR diffère de celui de leur voisinage, permettant alors de voir des objets autrement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

Il permet d'étudier des cellules vivantes, sans devoir leur infliger une coloration (et donc de les conserver en vie).

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 condenseur. Le diamètre des anneaux varie avec le grossissement, de sorte que le condenseur à contraste de phase a plusieurs anneaux qui correspondent aux différents objectifs Phaco. 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.



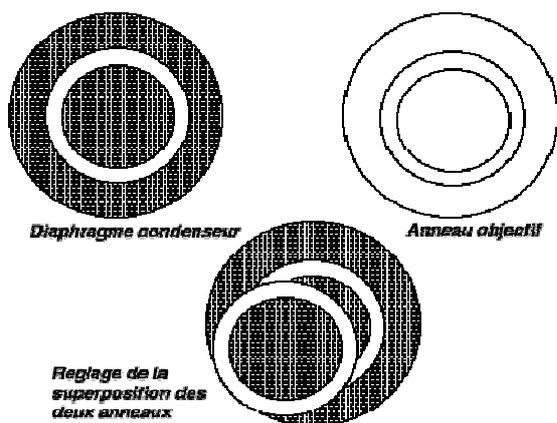
Montage artistique de diverses diatomées, observées en contraste de phase – comparer avec la photo de la page 7, réalisée en lumière transmise - (40x)

Principe

La microscopie d'absorption usuelle (transmission en lumière blanche) 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 (dispositif 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, à l'aide d'un oculaire spécial : le télescope Phaco). 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 et 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 Phaco 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 ce dernier 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.



Macrocystide couronnée de cristaux, observée en Phaco, chez *Strobilurus stephanocystis* – x40

Des systèmes de CONTRASTE encore plus élaborés

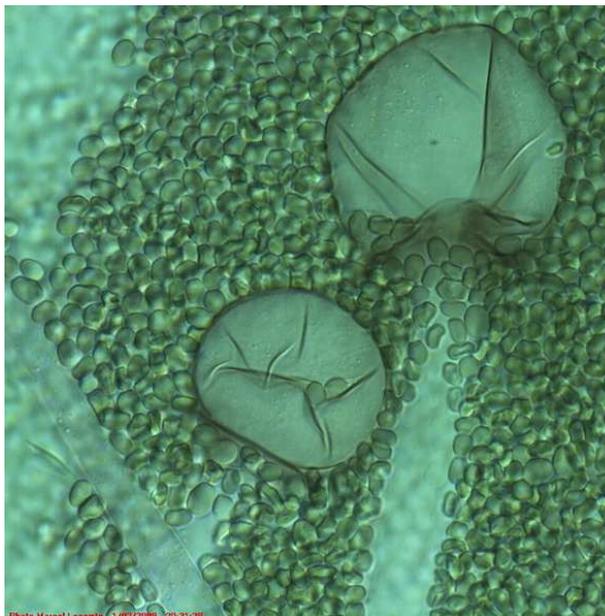
Le contraste interférentiel de Nomarski (ou D.I.C. = Differential Interference Contrast)

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 microscope à contraste interférentiel repose sur un principe différent du Phaco, 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.

Sporophores de *Mucor sp.*, DIC 40x ▶

Sang de grenouille, DIC 40x – photo Guy Auderset ▼



Selon les constructeurs, on peut envisager deux principes de DIC.

++ 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 → les oculaires.

++ La lumière passe au travers des éléments suivants : un polariseur → le condensateur → l'objet → un objectif spécial DIC → un prisme de Nakamura, au nitrure de gallium → un analyseur → les oculaires.

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

Comparaison entre PHACO et DIC

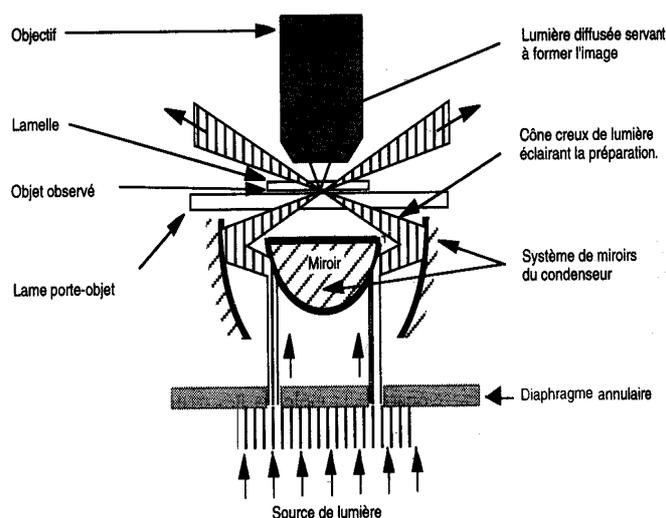
Caractéristique	Phaco	DIC
Perte de lumière en épifluorescence	28 %	73 %
Résolution latérale	Limitée par l'anneau du condensateur	Supérieure
Résolution axiale	Faible	Supérieure
Ouverture d'illumination	10 % du N de l'objectif	Variable
Effets d'azimut	Non	Oui
Halos	Oui	Non
Échantillons colorés	Pas utile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

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 la technique 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 mode de microscopie, le fond de la préparation ne diffuse pas la lumière, il apparaît noir ; l'IR est constant.

À l'inverse, les zones de la préparation qui diffusent la lumière d'éclairage apparaissent bien lumineuses ("claires") sur ce fond noir ; ces zones sont à l'origine de brusques différences d'IR (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'IR et qui, faute de contraste, ne sont que peu ou pas visibles en fond clair.

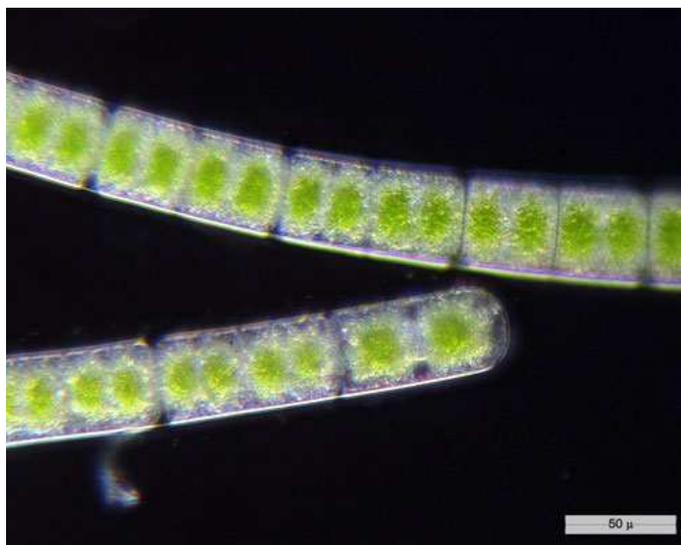
Certains microscopes à fond clair permettent, en changeant de condensateur, une observation en fond noir.

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

« Un condensateur 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* ».

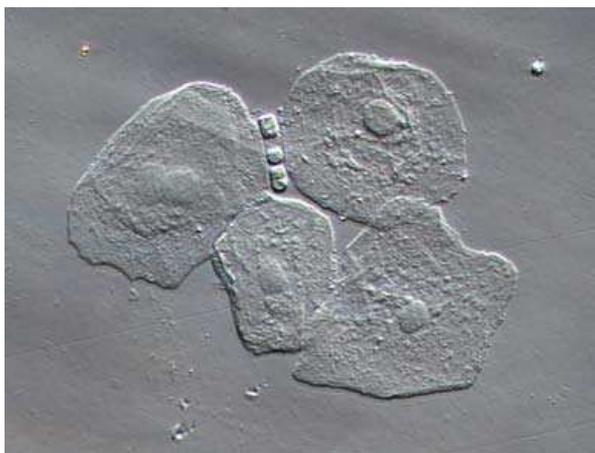


Le PlasDIC

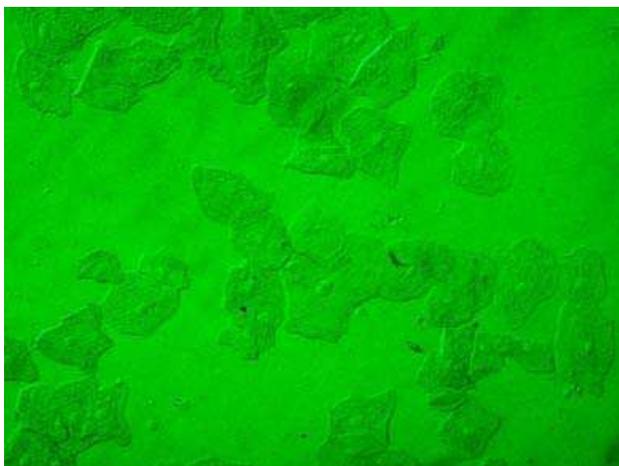
Le procédé PlasDIC ne nécessite pas de condenseur spécifique, ni de prisme côté condensateur, à l'inverse du DIC. Il est facile à mettre en œuvre et est nettement moins coûteux que le DIC. PlasDIC désigne le premier procédé de contraste interférentiel différentiel permettant d'utiliser des boîtes en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

Nouvelle variante du DIC, 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 intra cytoplasmique est grandement facilitée.



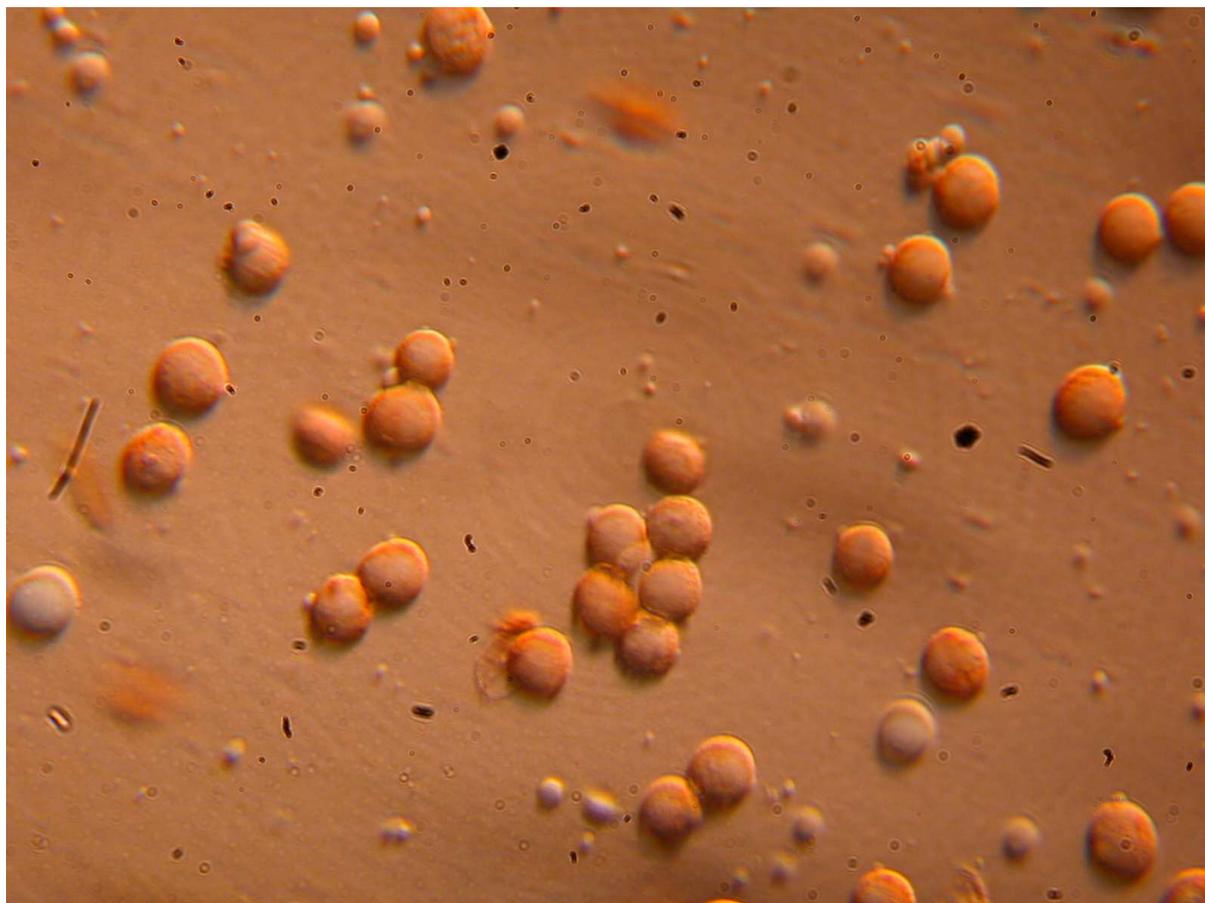
Cellules épithéliales provenant de la muqueuse buccale d'un être humain, préparées dans des boîtes de Pétri en plastique : le tout est vivant et observé en PlasDIC (images Zeiss, 10x & 40x).



Voici la même image, observée avec un DIC conventionnel et prisme de compensation. La boîte de Pétri en plastique anisotrope modifie fortement la phase ; le résultat est que l'effet de relief du DIC est à peine visible.

Des systèmes de CONTRASTE simplistes, mais efficaces

Le triangle de Mathias

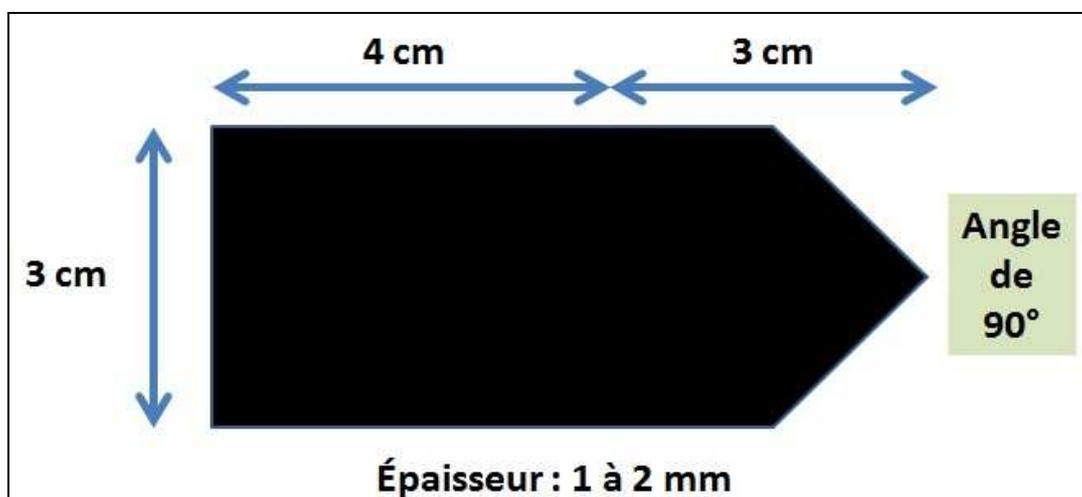


Spores d'*Amanita fulva*, observées dans le rouge Congo SDS et contrastées avec le triangle de Mathias (photo Coolpix 995 – 100x, Nikon planapochromatique, 1,40)

De quoi s'agit-il ?

Erhard Mathias a conçu un dispositif simpliste (mais génial) permettant d'améliorer l'intensification du contraste pour l'observation de pièces microscopiques transparentes.

Il s'agit d'une application très peu coûteuse, qu'on peut fabriquer soi-même, et qui ne nécessite aucun réglage spécial ; l'auteur propose d'utiliser un morceau de matériau opaque (carton noir), de 3x6 cm au départ, coupé à une extrémité, comme une pointe de flèche, avec un angle de 90°. C'est ce que nous appelons « la flèche de Mathias ».

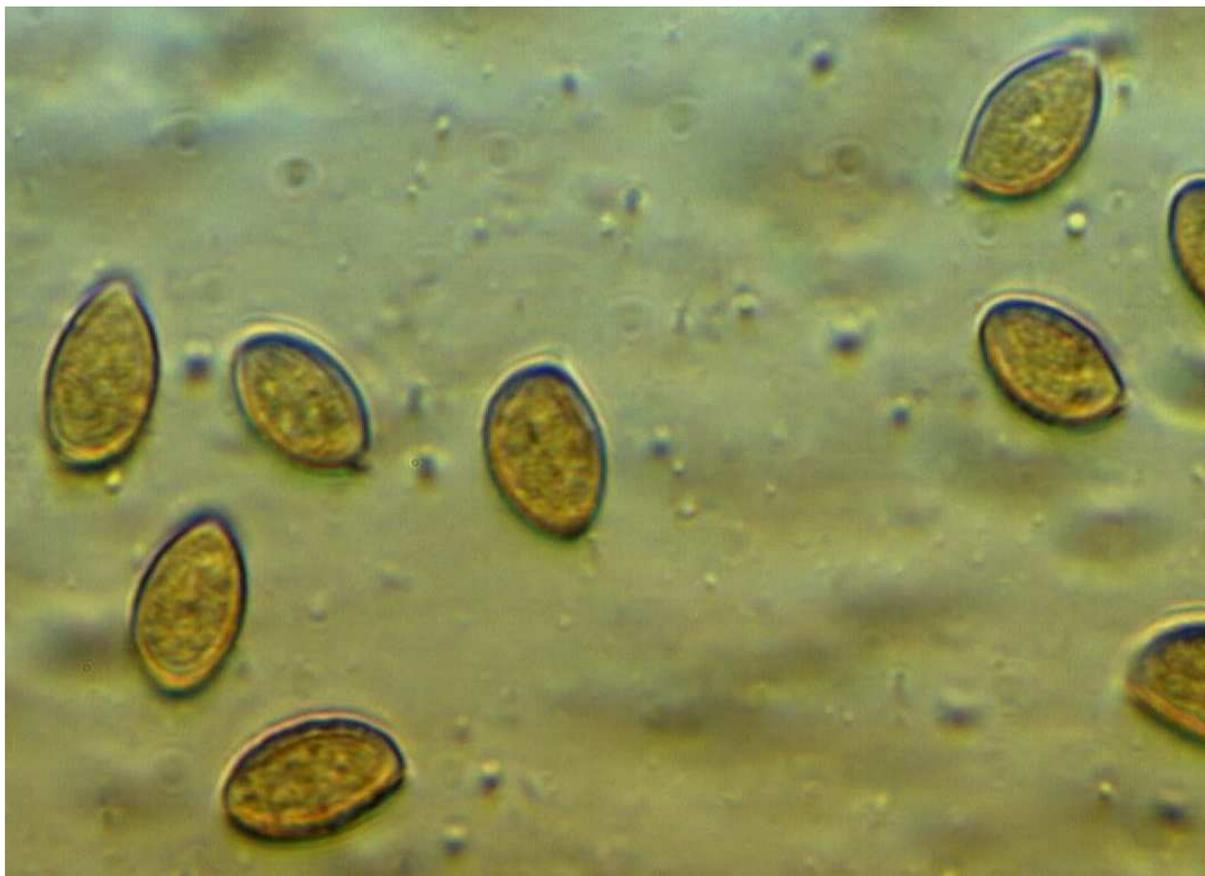


Glisser la flèche dans le porte-filtre du condensateur ; la manoeuvrer dans différentes directions ; cela permet de simuler un éclairage en fond noir, mais surtout de générer un éclairage oblique qui va permettre une sorte de contraste de phase, jusqu'à simuler un DIC : l'image de la page précédente est remarquable et suffisamment parlante !

Si le porte-filtre est absent, poser simplement la flèche sur la source lumineuse, et procéder par tâtonnements.

Malheureusement, les résultats sont rarement aussi spectaculaires, et présentent un côté très aléatoire ; mais cette technique vaut la peine d'être expérimentée le plus souvent possible¹⁷, car elle vous ouvrira, dans un certain nombre de cas, la porte vers des images qui ne sont normalement accessibles qu'à l'aide d'un matériel très coûteux, qui ne peut être installé que sur des microscopes « haut de gamme ».

E. Mathias fait preuve d'une imagination débordante et je vous engage à consulter son site¹⁸, si vous vous sentez une âme de bricoleur.



Pour comparaison : spores de *Galerina uncinatis*, observées en contraste de phase, 100x - photo Françoise Draye

La pièce de Jalla

Jean-Louis Jalla¹⁹, un mycologue du Sud de la France, m'a fait découvrir son invention personnelle lors d'un congrès consacré aux Micromycètes, dans les Vosges.

Afin de lui rendre hommage, je vais appeler cette technique « la pièce de Jalla » ; c'est plus flatteur que « contraste de phase du pauvre », nom dont il a affublé sa découverte.

¹⁷ Nous incluons dans le concept tous les dispositifs qui emploient la lumière qui passe autour des bords de quelques types d'obturateurs opaques, qui incluent les disques opaques pour champ noir, le classique trou clair dans la périphérie d'un disque opaque, l'éclairage oblique marginal (contraste de phase fait maison selon Sterrenburg), les filtres de Rheinberg, et les diaphragmes d'Illumination Circulaire Oblique raffinés (désignés par le sigle COL en Anglais) de Paul James.

¹⁸ Voir ce lien sur le sujet : <http://www.schwaben.de/home/mathias/english.html>
"Micro Contrasts – Methods for the optimization of light microscopy"

¹⁹ Jean-Louis Jalla, jjalla@aol.com

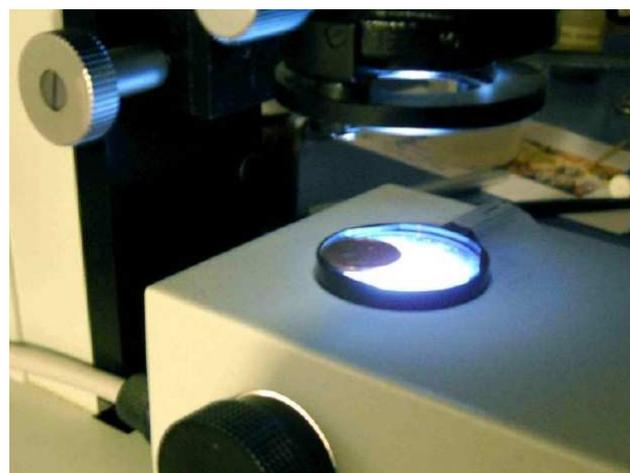
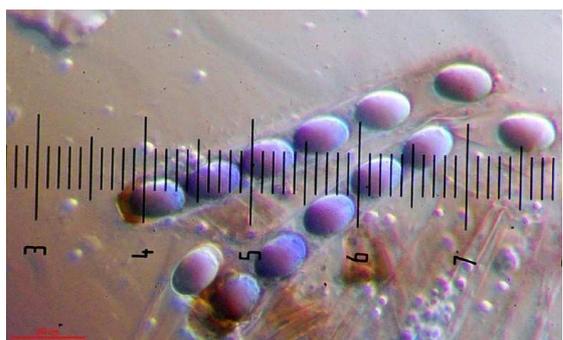
« Le diaphragme du microscope doit être ouvert. Il est souvent préférable de ne pas dépasser le grossissement 400 fois, afin de garder (un peu) de profondeur de champ. Et c'est là qu'intervient la pièce de 1 centime d'Euro. Elle est posée directement sur le filtre du générateur de lumière. Si vous êtes très riche, vous pouvez toujours essayer 2 centimes, mais cela ne va pas forcément mieux... Il est évident que les préparations doivent être les plus « propres » possible, et il est parfois nécessaire d'effectuer un post-traitement (contraste, lumière, voire nettoyage des impuretés) afin d'avoir des photos correctes. D'un point de vue strictement mycologique, cela n'ajoute guère d'informations à la préparation, mais les images sont agréables à regarder » (Note de l'auteur)



Les spores d'*Elaphomyces granulatus*, observées en contraste de Jalla - photo Jean-Louis Jalla



Asques et ascospores de *Helvella sp.*, observées en contraste de Jalla - photo Jean-Louis Jalla



Une vue de la pièce de monnaie en place sur le diaphragme de champ - photo Jean-Louis Jalla

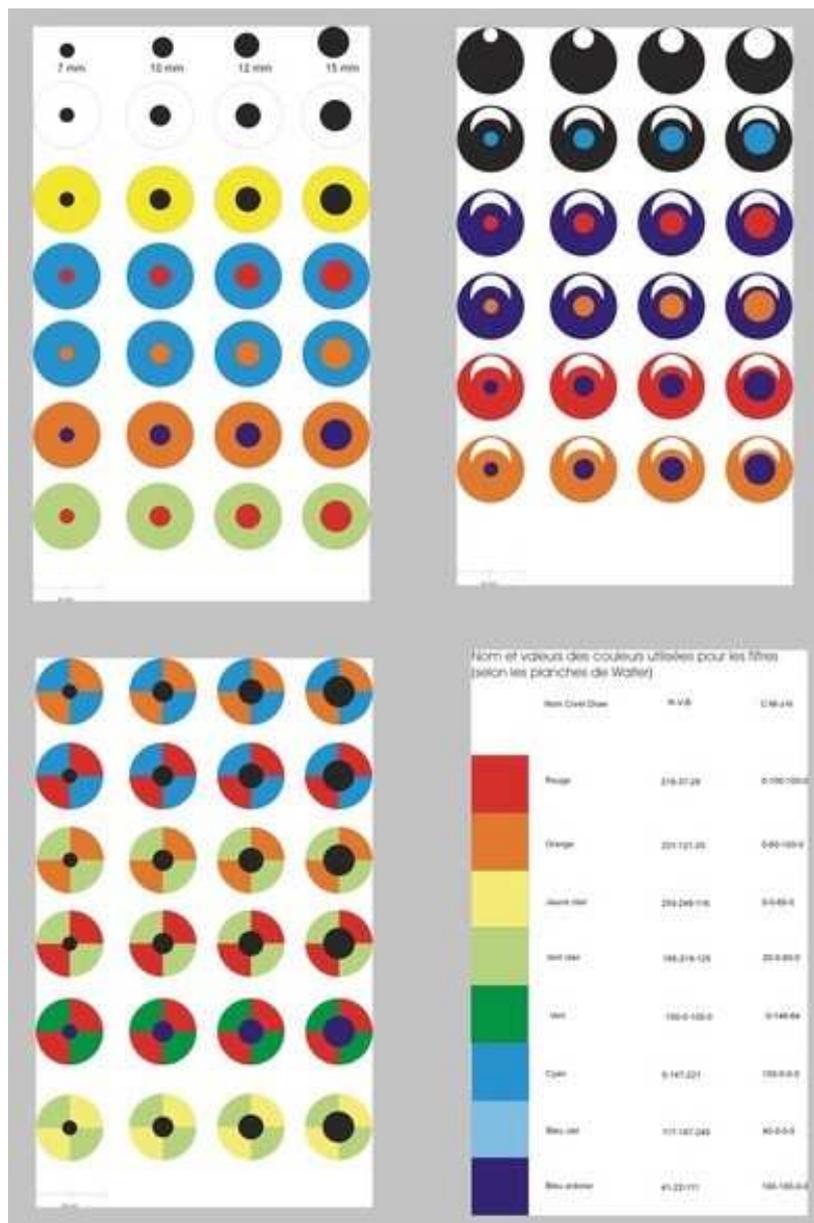
Il nous paraît important de préciser que les couleurs apparaissant sur les photos ne sont pas des couleurs naturelles ; elles sont le résultat de la combinaison entre le colorant utilisé et la déviation des rayons lumineux.

Les filtres de Rheinberg

Ici, nous sortons du domaine scientifique pour entrer de plain pied dans le monde artistique, car l'idée est de changer non seulement la couleur du fond de l'image, mais également la couleur de l'objet. L'inventeur avait conçu ses disques en découpant des feuilles d'acétate colorées, ce qui était assez fastidieux. Certains ont continué ensuite en utilisant du papier dit « vitrail ». Depuis l'avènement de l'informatique et de l'imprimante, il existe des moyens plus simples de réaliser la chose.

L'idée consiste simplement à imprimer des disques sur du papier transparent pour rétroprojecteur, et à combiner des couleurs complémentaires. D'après les utilisateurs, l'impression laser est préférable au jet d'encre pour préparer les planches.

La couleur du disque central va déterminer la couleur du fond, et l'anneau périphérique va illuminer obliquement le sujet en lui donnant sa (ses) couleur(s). On pourra aussi, à volonté, superposer les disques.



Réalisation de Christian Aubert (10/09/2004), selon les données de Walter Dionni (tous ces noms et articles complets sont accessibles avec Google)²⁰.



Photo de *Bosmina longirostris* (daphnie) réalisée par C. Huck selon ce principe.

Les images obtenues ressemblent, pour certaines, à des images réalisées en fluorescence. Cela permet parfois de mettre en valeur certains détails non visibles en éclairage normal, ou avec diverses techniques de contraste.

²⁰ Voir aussi les sites suivants :

Chuck Huck : www.microscopy-uk.org.uk/mag/artsep00/chillum.html

Wim van Egmond : www.microscopy-uk.org.uk/mag/artapr02/contrast.html

Le microscope en FLUORESCENCE²¹

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 et en médecine.

Stokes²², au milieu du 19^e siècle, fit l'observation que le minéral **fluorspar** (ou fluorite) produisait 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.

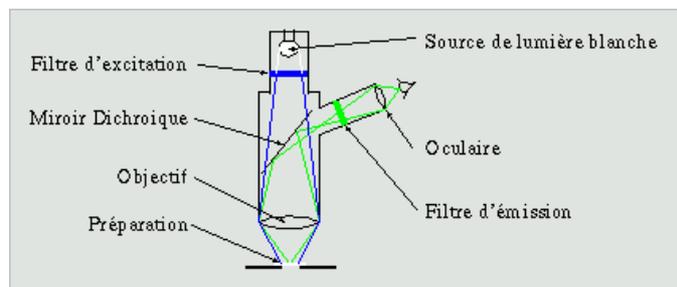
L'émission de lumière a lieu durant l'illumination (excitation) d'un chromophore qui absorbe cette lumière. Lorsqu'un échantillon vivant ou non-vivant, organique ou inorganique, absorbe et ensuite rayonne la lumière, on parle de *photoluminescence*.

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 nm²³ 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, sont fixés sur une molécule de dextran²⁴. Le tout est micro injecté dans une cellule et les cellules filles seront marquées au cours du développement embryonnaire.



²¹ Les photos de microscopes apparaissant dans cet article nous ont été aimablement prêtées par Cofemo sarl.

²² Sir George Stokes Gabriel (1819 – 1903) est un physicien britannique théorique, connu pour sa loi de viscosité, et pour le théorème de Stokes, en analyse vectorielle. Stokes a également travaillé dans l'optique, a étudié la nature de la fluorescence et a été l'un des fondateurs de la géodésie avec son étude des variations de la pesanteur.

²³ Un nanomètre (nm) = un milliardième de mètre = 10⁻⁹ mètre = 1/1.000ème de micron.

²⁴ Le dextran (ou dextrans) est un polysaccharide (polymère composé de molécules de dextrose) de poids moléculaire très élevé, appartenant au groupe des colloïdes. Lorsqu'on lui fait subir une hydrolyse (décomposition de la molécule en présence d'une enzyme spécifique et d'eau), le dextran se transforme en molécules de dextrose. Certaines de ses propriétés ont permis de l'utiliser comme un substitut du sang ou comme liquide de remplissage.

Source : <http://www.medicopedia.net/term/9121,1.xhtml#ixzz1Yu8tzUcO>



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.

On va distinguer 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 le DAPI. 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 : *Mycobacterium leprae* (lèpre), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), - coloration de Degommier -, la rhodamine et ses dérivés, la fluorescéine et ses dérivés. Ils émettent respectivement dans le rouge, le vert et le bleu.

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 nécessitant pas l'ajout d'un 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.

Retenons que la fluorescence émise peut provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau d'excitation.

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

Le 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 images en microscopie à fluorescence classique ont une perte de résolution de l'image due à l'excitation des fluorochromes se situant hors du plan focal.

Le microscope confocal à balayage laser²⁵. 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. Il s'agit d'une technologie complexe, dont les détails

²⁵ C'est un microscope qui dérive du microscope optique traditionnel, hormis que sa source lumineuse est un laser, qui balaye point par point l'objet à analyser. Dans sa configuration « réflexion », il utilise un miroir semi-réfléchissant, qui réfléchit le rayon provenant de l'objet vers un détecteur. Ce dernier peut ainsi mesurer l'intensité lumineuse de chaque point et la stocker dans un ordinateur.

Obtention d'images 3D : une fois que le balayage selon les abscisses et les ordonnées est effectué, et qu'une image à deux dimensions est obtenue, le plateau contenant l'objet est déplacé d'un incrément dz, et le balayage recommence. Ainsi, on mémorise des « tranches », qui peuvent par la suite être traitées informatiquement pour obtenir des images à trois dimensions de l'objet.

Le principe de confocalité : pour réaliser cet exploit, le microscope confocal à balayage laser se doit, quand il est mis au point sur une hauteur z, de ne pas être influencé par les couches situées au-dessus et en dessous. Pour ce faire, on place un diaphragme devant le détecteur, dans le plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (d'où l'attribut « confocal »). Ainsi, seule la lumière provenant du plan focal atteint le détecteur (définition par Futura-Sciences).

Ce type de microscope est inaccessible pour des amateurs, car il dépasse largement la centaine de milliers d'€.

dépassent les limites de cet ouvrage ... en outre, nous sommes tout-à-fait incapable d'expliquer cela clairement.

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

Attention ! il est impératif d'utiliser le filtre orange (amovible parfois) servant à une protection nécessaire des yeux.



Fluorescence endogène de la lignine sur *Pinus sp.* (coupe transversale) – 100x - photo Guy Auderset

Quel microscope choisir ?

Vous avez cerné vos desideratas 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, parfois à des prix dérisoires, mais il est devenu désuet, car son grand inconvénient est la fatigue générée par l'utilisation 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, nous pensons qu'il faut se tourner sans hésitation aucune vers un système trinoculaire, si on envisage l'usage d'un appareil photo numérique (APN), d'un réflex 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, puis des caméras, 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.

+ Dans une configuration normale, on trouve des oculaires 10x ainsi que les 4 ou 5 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 revolver 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 guère plus 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 qualité moindre, avec de moins en moins de profondeur de champ et avec une mauvaise définition.

Le meilleur des objectifs planapochromatiques a un $N = 1,40$: il coûte une fortune, et sera quand même limité à 1.400x.

Zeiss a mis au point un zoom optique complexe (et 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, tout en conservant la profondeur de champ de l'objectif utilisé.

Les objectifs planapochromatiques ne sont jamais fournis d'origine, étant nettement plus coûteux que des objectifs de série, mais il nous paraît très précieux de posséder un objectif 60x (ou 63x), qui constitue un palier intéressant entre 40x et 100x.

+ 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). Ce matériel est souvent l'apanage d'institutions scientifiques, ou de certains amateurs passionnés.

+ 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 le montage de leds (diodes électroluminescentes) qui génèrent une lumière très vive sans échauffement, avec cependant des réussites diverses et variables. Heureusement, l'utilisation de leds spécialisées est en train de se généraliser chez les constructeurs.

+ Prévoir un coffre 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 tombé en désuétude, depuis 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 peut s'avérer nécessaire d'acheter par la suite un kit complet de phase, qui comprend en général 4 ou 5 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 la propriété de ne pas devoir varier 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 !**

En dehors de l'énerverment généré par une mise au point trop changeante, un bon équilibrage des tirages des objectifs est un critère de montage de qualité. En cas de problème, il existe la possibilité toute simple de compenser les différences de tirage par quelques rondelles de papier ou mieux encore de PVC (utiliser un emporte pièce adéquat), ce qui ne nuit en rien à la qualité de l'image. Il suffit de les insérer entre l'objectif et le revolver, sur le pas de vis.

→ **N'achetez pas un microscope sans le voir et surtout, testez-le soigneusement. N'hésitez pas à solliciter l'assistance et les conseils d'un utilisateur chevronné !**

NOTRE MAITRE ACHAT idéal, capable de satisfaire les plus exigeants malgré un budget raisonnable, serait constitué de la sorte :

- Statif ergonomique, lourd et bien stable.
- Tête trinoculaire.
- Éclairage de 30 W, halogène, ou mieux encore, par leds.
- Revolver pouvant accueillir 5 objectifs.
- Condenseur avec glissière de phase 40x.
- Adaptateur pour polarisation.
- Oculaires 10x grand champ de 20 mm, dont un avec micromètre.
- 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
 - Objectif 40x contraste de phase
 - Objectif 60x – 0,95 à sec
 - Objectif 100x – 1,25 à immersion.

Cet ensemble, où il n'y a pas de composants inutiles, peut se trouver pour un montant de 2.000 à 2.500 €.

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

- L'objectif 60x – 0,95 à sec 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 près de 4.000 € (avec des objectifs de « seconde main »).

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 les photons de la lumière).

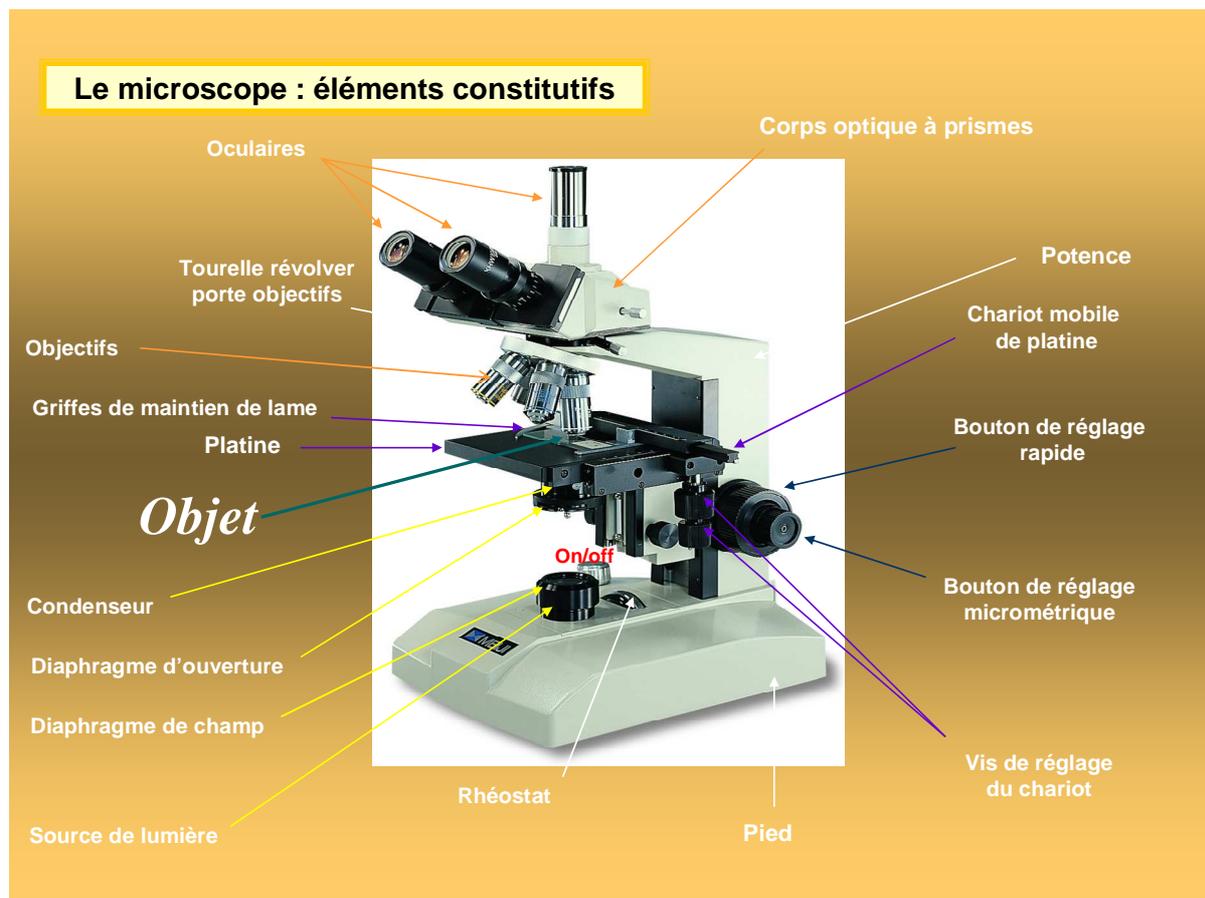


Image didactique réalisée par Philippe Dufour (Association des Mycologues Francophones de Belgique)

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 vision stéréoscopique, donc meilleure au niveau du relief notamment, 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).

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 microscopes modernes, elle est constituée par une lampe halogène, et depuis peu, par des leds.

- **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, 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 DÉPENDRE 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 souvent un élément mobile (porte-filtres) 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.

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'ocillatons 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, et positionnent les yeux à la distance correcte.
- Pour les binoculaires, ils sont positionnés sur un système permettant de régler l'écartement inter pupillaire.
- 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 x100, de déterminer un nombre précis de microns (μm) → un micromètre oculaire doit être étalonné à l'aide d'une lame micromètre objet, lors de la 1^{ère} utilisation, afin de calculer un éventuel coefficient de correction.



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.

Ils portent des inscriptions très intéressantes : exemple : 160/0,17 – 100/1,25 → 160 (mm) est la longueur du tube optique ; 0,17 (mm) est l'épaisseur recommandée pour l'épaisseur de la lame porte objet ; 100 (x) est la valeur du grossissement ; 1,25 est l'ouverture numérique (voir explications en p.42).

Cet objectif planapochromatique 100x à immersion, avec $n = 1,40$, est une merveille technologique.

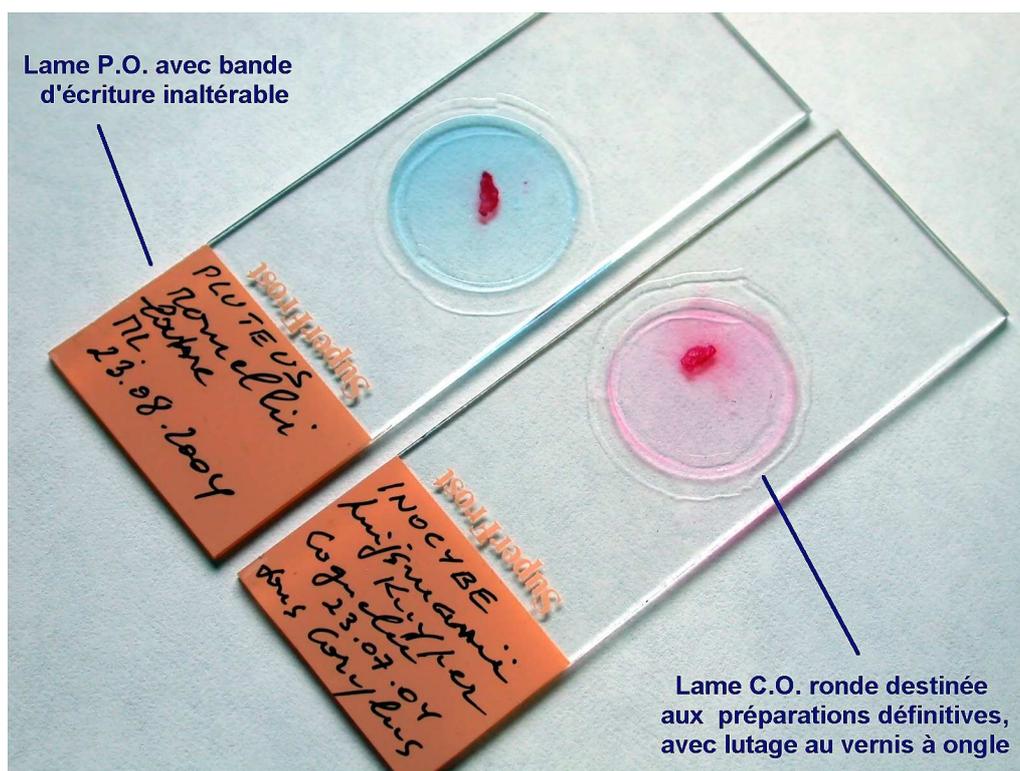
Chapitre 02

LES

PREMIERS

PAS

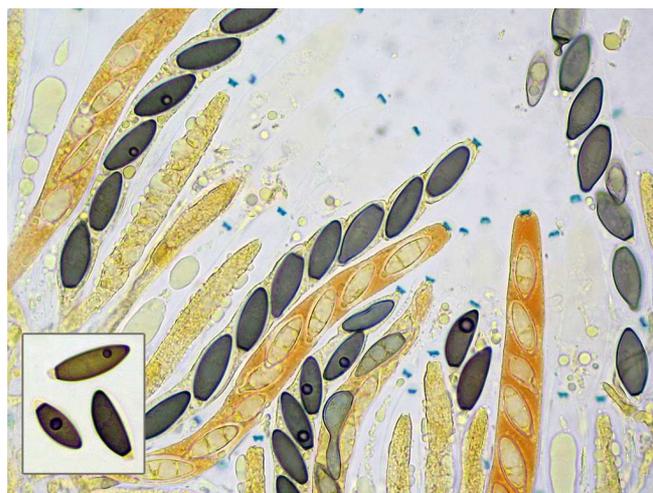
EN MICROSCOPIE



LES ÉLÉMENTS QUI VONT CONDITIONNER LA RÉUSSITE DE VOTRE FUTURE CARRIÈRE DE MICROSCOPISTE

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 condensateur).
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 inter pupillaire (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 (attention à l'intensité de la lumière).
8. Régler le diaphragme de champ.
9. Régler la hauteur du condensateur (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 de minimiser les effets de cette grave erreur de manipulation).



Anthostomella tomicoides (Ascomycète) – photo Daniel Ghyselincx

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.

TRÈS IMPORTANT : après chaque 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 condensateur et de la source d'éclairage soient vierges de toute particule ! (les tissus spéciaux vendus pour usage ménager – type Swiffer – réalisent des merveilles en la matière).

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 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 éventuelle d'un porte-filtre et d'un filtre (le filtre bleu est souvent utilisé).

Les lames porte-objet (LPO) et couvre-objet (LCO)

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

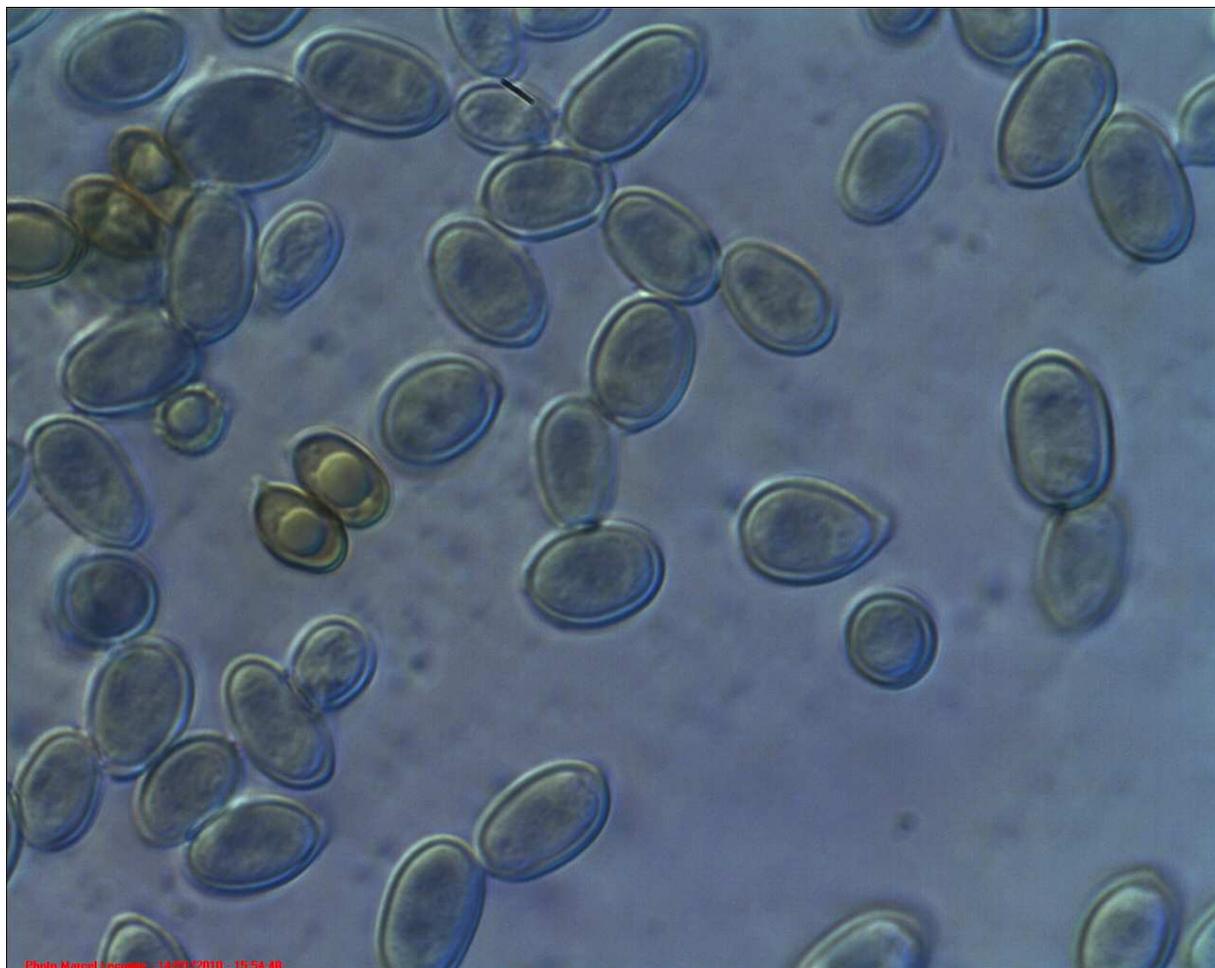
- 1/ modèle simple à coins droits et bords bruts (attention aux coupures) ;
- 2/ modèle simple à coins droits et bords rodés ;
- 3/ modèle simple à coins arrondis et bords rodés ;
- 4/ modèle à coins rodés et à bande dépolie, permettant l'écriture ;
- 5/ modèles à coins droits ou rodés et à bande d'écriture 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 spécifiques.

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.



Conidies de *Botrytis cinerea* (pourriture du raisin) – x63 DIC

Les LCO offrent plusieurs formats :

- carré ou rectangulaire : 18 x 18 mm - 20 x 20 mm – 22 x 22 mm - 20 x 32 mm - 20 x 40 mm
- circulaire, de diamètre 12, 15, 18, 20, 22 mm.

Les deux modèles carrés sont utilisés pour les préparations courantes et ponctuelles.

Les deux modèles rectangulaires s'avèrent intéressants pour travailler avec des objectifs planapochromatiques, dont la lentille frontale est beaucoup plus grande, et qui nécessitent plus d'huile.

Les modèles circulaires sont souvent utilisés pour le montage des préparations définitives.

Nous stockons nos LPO dans 2 flacons à col large, rodé, d'environ 0,4 L chacun, avec bouchon de fermeture, à ouverture suffisante, et dans l'ordre suivant :

1.- Solution de stockage pour lames neuves ou propres.

Au départ, c'était un mélange d'eau distillée (1/4) et d'alcool méthylique pur (3/4) ; maintenant, nous utilisons uniquement du méthanol pur : agiter de temps en temps et retirer les lames selon les besoins. Au départ, nous plaçons 50 LPO dans le flacon de stockage, car les lames neuves ne sont jamais tout à fait propres. Le séchage se fait avec un tissu de toile bien usé, pour éviter les peluches, ou du papier essuie tout.

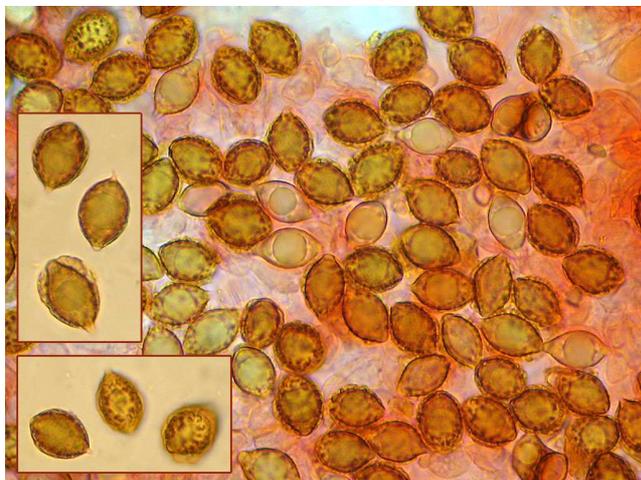
« Pour rendre les lames mouillables, passer une fois chaque face dans la flamme non fumeuse d'un brûleur à gaz, puis les essuyer, une fois refroidies, avec un linge imbibé de méthanol » (Didier BAAR). Cette pratique permet un étalement très facile des liquides sur la lame.

2.- Solution de nettoyage pour lames usagées.

Nous avons utilisé, jusqu'à 2008, un mélange de détergent vaisselle (1 cm³) avec 9 volumes de méthanol et 1 volume d'acide chlorhydrique concentré²⁶ : nous y plongeons directement les LPO usagées (nous éliminons les LCO, sans les récupérer²⁷) ; remuer de temps en temps !

Cette solution a pour but d'éliminer l'huile d'immersion, de dégraisser les lames, et de les stériliser. Si vous ne travaillez pas sur du matériel potentiellement dangereux, l'acide chlorhydrique n'est pas nécessaire.

Hymenogaster niveus (Ascomycète) – photo Daniel Ghyselincq



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 à 40 % d'acide phosphorique et se révèle d'une efficacité redoutable pour éliminer l'huile d'immersion et les colorants récalcitrants.

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) ... et le cycle recommence.

La solution 2 est changée à chaque rota-

tion de 50 LPO ; la solution 1 n'est remplacée que lorsqu'elle devient trouble.

L'huile à immersion

Elle peut être :

- **d'origine naturelle** (huile de cèdre par exemple) : nous la déconseillons fortement car elle sèche rapidement, et finit par 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 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 GLYCÉROL, qui est une glycérine hautement raffinée et purifiée ; elle présente un N de l'ordre de 1,7, ce qui est remarquable ; un avantage qui n'est pas négligeable du tout : cela se nettoie très facilement à l'eau. Nous l'avons utilisé sans problèmes sur des objectifs prévus initialement pour de l'huile.

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 chaque fois que le flacon est ouvert.

Nous utilisons un mélange d'éthanol à 95° 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 !

²⁶ L'acide chlorhydrique concentré se justifie essentiellement lorsque le microscopiste travaille sur des sujets qui peuvent s'avérer pathogènes, comme des bactéries infectieuses, des cultures microbiennes ou des mycoses par exemple.

²⁷ En ce qui concerne les LCO, 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 LCO circulaires, beaucoup moins fragiles, plus faciles à récupérer, et permettant une meilleure répartition du colorant ou du liquide d'observation.

Marcel LOCQUIN, un maître du microscope, annonçait 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 irréversible 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 ! ... Mais la qualité des ciments et des colles s'est fortement améliorée depuis cette déclaration, vieille maintenant de plusieurs dizaines d'années, et ils sont devenus inertes à l'alcool notamment.

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 une ou deux fois par quinzaine, au cas où des poussières seraient venues se fixer sur l'huile. Cette huile synthétique s'oxyde 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 LCO et que l'huile soit polluée par un colorant ; alors il est impératif de nettoyer immédiatement.

Le 2^{ème} cas de figure qui demande un nettoyage est que sur la plupart des microscopes modernes, les objectifs à immersion ont exactement la même longueur que les objectifs « à sec », et que parfois, on passe malencontreusement avec ces derniers sur la goutte d'huile déposée sur la lame ; ils sont alors pollués et il est impératif de les nettoyer immédiatement, car ces objectifs ne sont pas prévus 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.
- Il 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 LPO, baignant dans une goutte d'eau, puis recouvert d'une LCO.
- Tapoter la LCO 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 x10 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 x40 (x63) et x100 ; déposer une gouttelette d'huile à immersion sur la préparation et positionner l'objectif x100.
- 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 ainsi sensiblement l'IR.
- Avec les objectifs x40, x63 ou x100, 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 QUALITÉ DE VOTRE OBSERVATION OU DE VOTRE IMAGE dépendra uniquement de LA QUALITÉ DE VOTRE PRÉPARATION !

**Pour arriver à une image d'excellente qualité, il est essentiel de :
LAVER LA PRÉPARATION, afin d'obtenir un contraste maximal entre la pièce colorée et le milieu d'observation.**

CHERCHER LES CONDITIONS D'ÉCLAIRAGE OPTIMALES en utilisant les diaphragmes de champ et d'ouverture.

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.

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 RÉFRACTION

L'indice de réfraction (**n** ou **N**) est une indication numérique 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'IR 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 ...)²⁸

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 on voit 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 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.

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 ! Après « traduction », 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.

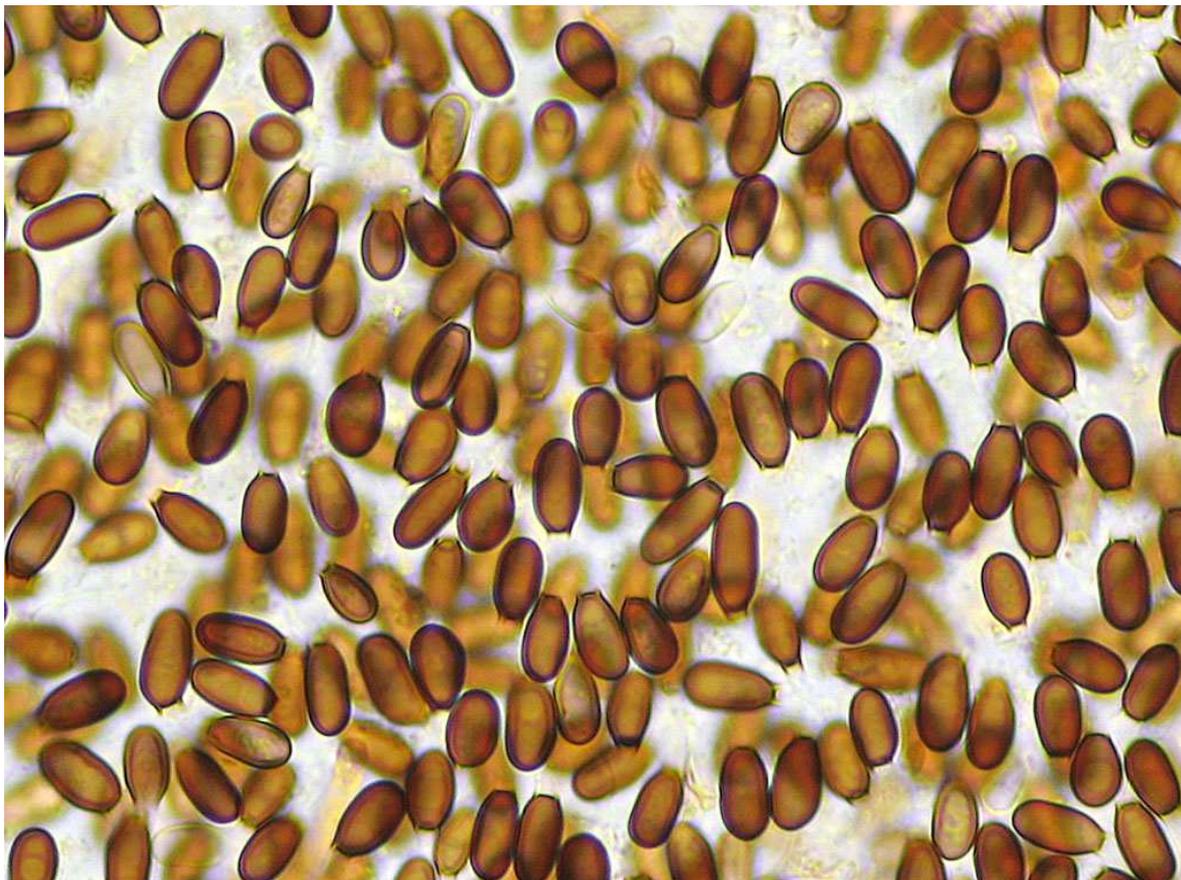
Quelques indices de réfractions intéressants pour la microscopie

air	1,0003	glycérine gélatinée	1,47
éthanol	1,329	chloral lactophénol	1,49
eau bidistillée	1,333	histolaque	+/- 1,5
ammoniaque	+/- 1,3	gomme arabique (milieu de Hoyer)	1,512
PVA	1,382	baume du Canada au xylène	1,526
PVA lactophénolé	1,4	huile d'immersion synthétique	1,53
Aquatex	1,4	huile d'immersion Zeiss	1,55
glycérine	1,47	glycérol pour microscopie	1,7
verre de microscopie	1,46 à 1,5	glycérine iodo-mercurique	1,8
Pour info → diamant pur = 2,42 - 2,75			

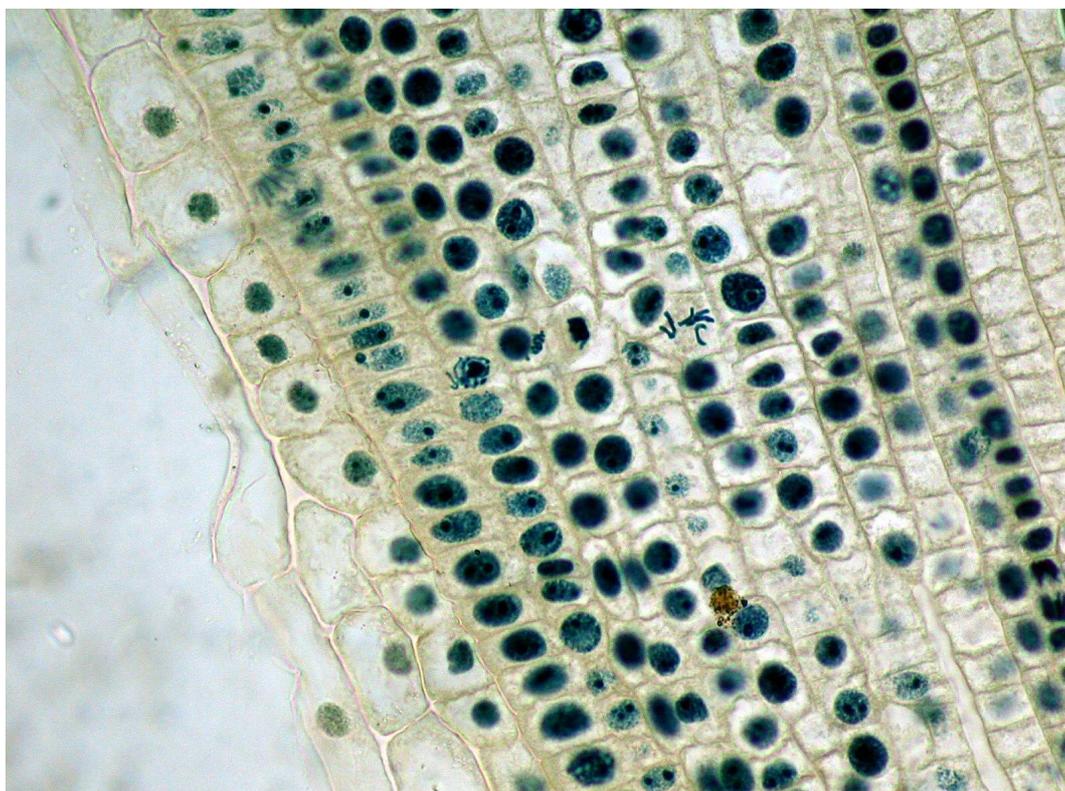
Cela signifie, par exemple, qu'une observation réalisée avec un objet posé sur une lame de verre (où il n'y a donc que de l'air entre l'objet et l'objectif) sera médiocre.

²⁸ Voir le site des chimistes de l'Université Louis Pasteur (U.L.P.) de Strasbourg.

Par contre, si on travaille avec de l'huile à immersion (1,53), un objectif de 1,40 et donc un condenseur de 1,40, une LPO et une LCO en verre (1,46) et du chloral lactophénolé (1,49) pour baigner l'objet, la qualité d'observation sera optimisée, et on se trouvera au maximum des possibilités optiques du microscope.



Spores de *Melanogaster broomeianus*, avec bouts de stérigmates (Homobasidiomycète – ordre des Mélanogastrales)
photo Daniel Ghyselincq



Mitoses dans un méristème de jacinthe, avec chromosomes bien visibles.

LES TYPES DE PRÉPARATIONS

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.**

Les préparations ponctuelles ou de routine

Nous partons du principe que nous utilisons toujours une LPO et une LCO.

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.

EAU DISTILLÉE : c'est le milieu le plus simple et le moins coûteux, qui autorise des erreurs de manipulation et donne des résultats corrects.

ÉTHANOL ou alcool éthylique : nous ne l'utilisons guère en mycologie, car son grand pouvoir déshydratant va déformer les pièces non rigides en les desséchant.

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).

CHLORAL LACTOPHÉNOL - GLYCÉRINE (ou GLYCÉROL) : 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.

Les préparations semi-définitives

Elles pourront se conserver durant plusieurs semaines, plusieurs mois, voire 2 ou 3 années, sinon plus. Elles impliquent de pratiquer une opération qui s'appelle le **lutage**, qui consiste à poser autour de la LCO un enduit durcissant (vernis à ongle, paraffine, 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 LCO de se déplacer lors d'éventuelles manipulations (nettoyage). Notre préférence va sans hésitation vers le vernis à ongle incolore.

Certains préparateurs utilisent encore le bitume de Judée (de couleur noire), qui était particulièrement prisé par les professionnels, mais il est très difficile de s'en procurer.

Les milieux qui peuvent être envisagés.

1. **Chloral lactophénol**
2. **Glycérine**
3. **Glycérine gélatinée**
4. **PVA coloré iodo-ioduré**
5. **PVA lactophénolé**

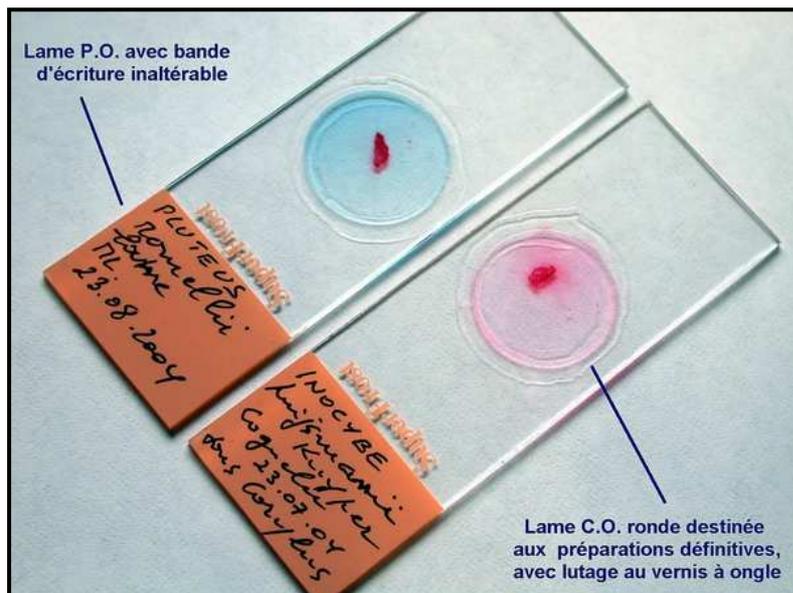
Il s'agit surtout d'une question de choix personnel (en fonction de la facilité de manipulation) et de disponibilité du produit. La glycérine gélatinée, par exemple, demande à être travaillée à chaud et génère très facilement des bulles d'air, néfastes à une bonne préparation. Ces bulles constituent d'ailleurs le problème majeur dans ce type de préparation, et la pose de la LCO demande beaucoup de soin.

Les préparations définitives

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 BC a simplement un peu jauni. Même si cela ne s'avère pas indispensable, nous conseillons vivement le lutage. On trouve sur E-Bay des préparations vieilles de plus de 100 ans, et qui sont toujours en excellent état.

Attention ! Certains conservateurs exigent d'être posés sur des objets parfaitement déshydratés, ce qui implique des manipulations parfois longues, quand on manque d'habitude.



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.

HISTOLAQUE, EUKITT, EUPARAL ou NÉO-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.

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 BC pour du matériel mou. Il polymérise de manière remarquable et il n'est même pas nécessaire de luter après son utilisation. Depuis près de 3 ans, nous l'utilisons très fréquemment pour tous les montages fragiles, notamment en mycologie.

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.

MERCKOGLASS : lorsqu'on réalise des frottis, ce produit de montage remarquable remplace avantageusement des LCO (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 (sang, salive, frottis buccal, sperme ...).

L'utilisation d'un milieu d'observation, possédant le meilleur IR soit-il, ne peut à lui seul garantir les résultats espérés ; elle doit être associée à la mise en œuvre très rigoureuse du mode opératoire, à des manipulations soigneuses, et à un réglage fin du microscope.

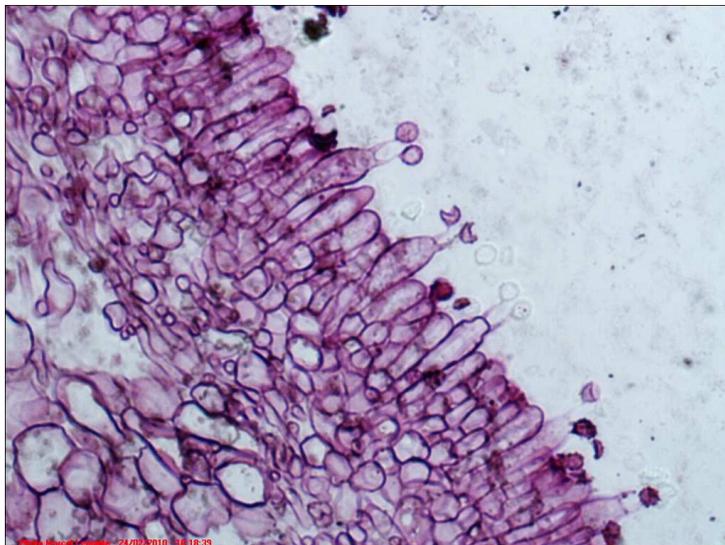


LES COUPES en microscopie : un problème évident et peu facile à solutionner !

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 quasiment toujours opaques. La seule manière d'y arriver consiste à découper l'objet en tranches tellement fines qu'elles en deviennent translucides ou transparentes.

Coupe transversale dans une lame de *Russula citrinoclora*, montée dans la résine synthétique (préparation : Albert Marchal).

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 (μm).

Quelques mesures de référence.

- Une coupe de plus de 30 μm d'épaisseur 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 éventuels 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)



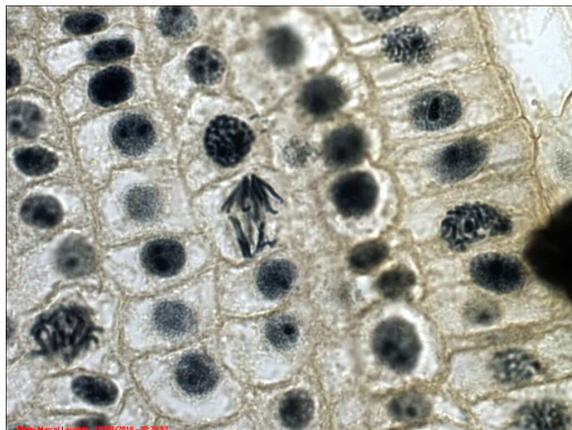
Il améliore sensiblement les résultats obtenus par la méthode de la main levée, car il permet des coupes plus fines (avec un peu d'expérience), mais surtout donne avec une relative facilité des coupes plus grandes, et beaucoup plus régulières.

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, 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 10 à 15 μm , sur du matériel placé entre 2 lames de polystyrène.

Un modèle très bien usiné, fabriqué par une firme batave, donne d'excellents résultats ! Il coûte environ 135 €, rasoir compris. Il existe une fixation de table, qui libère ainsi les deux mains.



Coupe transversale dans un méristème de jacinthe

3. Le microtome de GENAT (ou microtome « de table »)



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.

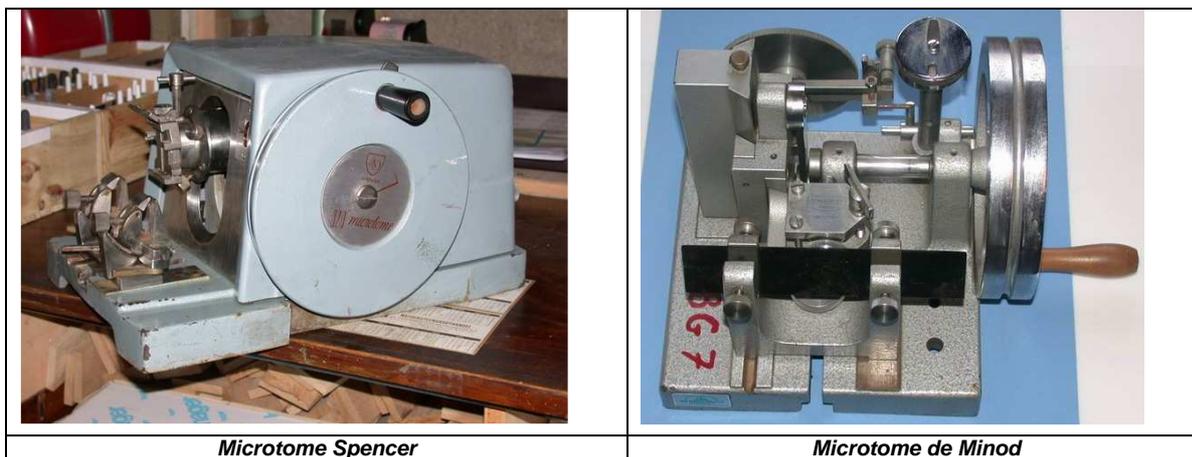
Nous avons fait l'acquisition d'un modèle de marque allemande, dont l'utilisation s'est révélée quelque peu décevante au niveau du dispositif de serrage. Nous avons pris contact avec un tourneur spécialisé qui l'a modifié et « amélioré » selon nos indications, de manière à pouvoir utiliser des cylindres 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 LPO 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 tourneur, est de l'ordre de 400 €, 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 pouvons vous parler ici de 4 modèles que nous connaissons bien et que nous utilisons : le microtome de Minod, le Spencer, modèle 820 d'American Optical Company, le A. Jung AS. Heidelberg et le Leitz Wetzlar. Ils permettent la réalisation de coupes en série, d'une finesse de l'ordre de 2 à 8 μm . Ce sont des modèles anciens, mécaniques (actionnés par une manivelle), très simples (très lourds) mais remarquablement usinés.

Nous avons prospecté le marché spécialisé dans les appareils de conception moderne, plus élaborés que les 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 € ; pour un rotatif, compter 3.000 € ; ces arguments financiers constituent évidemment de sérieux obstacles et ne relèvent plus d'un simple loisir.

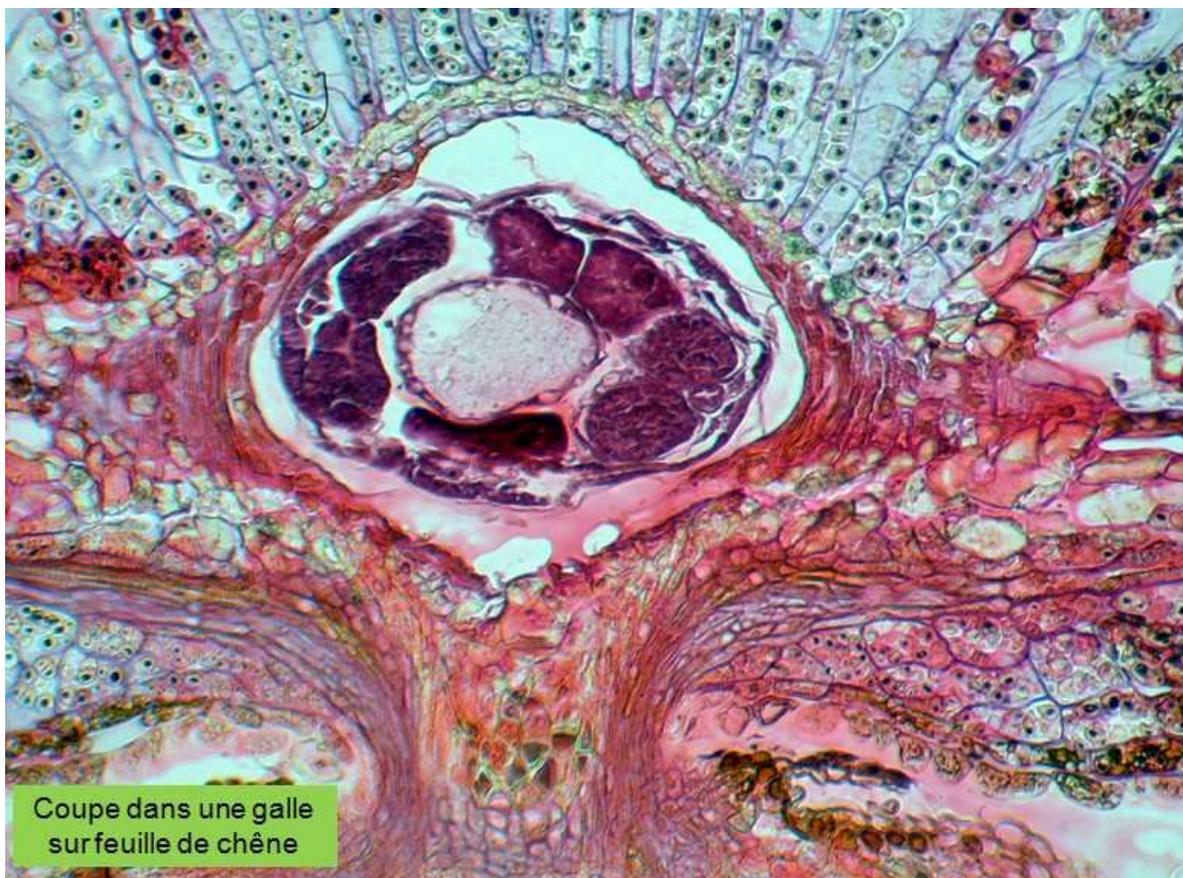
*Microtome Spencer**Microtome de Minod*

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, de la résine, du PVA ou du PEG, 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 laborantin de nos amis, cela enlève tout le charme des manipulations et des anciennes préparations manuelles.



Coupe dans une galle
sur feuille de chêne

Chapitre 03

MICROSCOPIE ET PHOTOGRAPHIE



UNE ÉVOLUTION REMARQUABLE, GRÂCE
À LA FACILITÉ DE LA PHOTOGRAPHIE
NUMÉRIQUE

Adjonction d'un APPAREIL PHOTO et d'une CAMERA numériques, à un microscope

Considérations générales

L'appareil photo ou la caméra sont situés dans le prolongement du tube du microscope, de telle manière 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.

Une remarque importante, quelle que soit la technique utilisée

A nos yeux, c'est une incohérence 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 le calcul et l'application d'un coefficient de correction applicable à toutes les mesures.

1. La photographie argentique

Il faut bien admettre qu'elle est tombée en désuétude dans le domaine qui nous intéresse, et n'est plus pratiquée que par des conservateurs inconditionnels du papier ou de la diapositive.

Des inconvénients majeurs :

- *L'impossibilité de contrôler immédiatement le résultat.*
- *Un délai d'attente assez long (à moins de disposer d'un laboratoire de développement personnel).*
- *Le prix revient élevé d'une photo (film + traitement).*
- *Des résultats souvent peu encourageants.*

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.



2. Une révolution : la photographie numérique

Les appareils compacts (APN)

Ce sont les moins coûteux et les moins encombrants ; la série des Coolpix 900, 950, 995 et 4500 de Nikon, que nous connaissons bien, donne d'excellents résultats en microscopie. Nous avons jeté notre dévolu sur cette production, car c'était la seule, à notre connaissance, qui disposait d'un pas de vis interne, au niveau de l'objectif, ce qui a permis aux passionnés de déployer des trésors d'ingéniosité pour effectuer la liaison entre l'APN et le microscope.

Cependant, la petitesse de la fenêtre d'observation nous a vite obligé à envisager des montages permettant d'observer l'image en direct sur un écran de télévision (en utilisant le canal vidéo) ou sur un écran d'ordinateur (en utilisant des boîtiers de connexion pour téléviseur) par le biais d'un port USB.

Un immense avantage : on peut utiliser des APN en les adaptant directement sur un des deux oculaires, ce qui rassure les possesseurs de microscopes non trinoculaires, ou de matériel plus ancien.

3. Un autre bouleversement : la caméra numérique



Elle a révolutionné le monde de l'imagerie microscopique. En effet, l'image est perçue cette fois en temps réel, directement sur l'écran d'un ordinateur. 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 mode vidéo, et lorsqu'une image est intéressante, il suffit de la fixer avec un programme de capture.

Deux pistes ont été explorées :

Les caméras de surveillance, à capteur²⁹ CCD³⁰ : Serge Prévoست nous a fait découvrir il y a 6 ans déjà, 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 ! Les constructeurs ont également conçu des caméras CCD destinées au microscope.

Les caméras numériques spécialement conçues pour la microscopie, à capteur C-Mos³¹ 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 linéaire de la souris.



La gamme proposée par les fabricants va depuis la petite caméra d'oculaire de 1,5 millions de pixels, coûtant moins de 150 € à la caméra de 20 millions de pixels coûtant 3 à 4.000 €.

²⁹ **Un capteur photographique** est un composant électronique photosensible servant à convertir un rayonnement électromagnétique (ultra violet, visible ou infra rouge) en un signal électrique analogique. Ce signal est ensuite amplifié, puis numérisé par un convertisseur analogique-numérique et enfin traité pour obtenir une image numérique. Le capteur est donc le composant de base des appareils photo numériques, l'équivalent du film en photographie argentique.

Le capteur photographique met à profit l'effet photoélectrique, qui permet aux photons incidents d'arracher des électrons à chaque élément actif (photosite) d'une matrice de capteurs élémentaires constitués de photodiodes. Il est nettement plus efficace que la pellicule : jusqu'à 99 % (en théorie) et près de 50 % (en pratique) des photons reçus permettent de collecter un électron, contre environ 5 % de photons qui révèlent le grain photosensible de la pellicule, d'où son essor initial en astrophotographie.

³⁰ **Le CCD (Charge-Coupled Device, ou dispositif à transfert de charge)** est le plus simple à fabriquer et a une bonne sensibilité. Inventé par George E. Smith et Willard Boyle dans les Laboratoires Bell en 1969 (cette invention leur rapportera la moitié du Prix Nobel de physique en 2009), il a rapidement été adopté pour des applications de pointe (imagerie astronomique) puis popularisé sur les caméras et appareils photos.

³¹ **Les CMOS** sont apparus en 1990. Leurs principaux avantages sont issus de leur fabrication très peu coûteuse, et en grande quantité ; cela se produit comme des chips informatiques. Depuis quelques années, leur émergence par rapport aux capteurs CCD est directement liée à leur utilisation en téléphonie mobile comme caméra ou comme appareil photo embarqué. Ceci est une conséquence directe de leur fabrication à bas coût et de leur faible consommation. Pour les applications scientifiques, c'est leur vitesse de fonctionnement (cadence image), liée à la conversion de la charge sur le site de création, qui privilégie leur utilisation par rapport aux CCD. Un des capteurs de dernière génération permet de numériser des images de 1024 par 1024 pixels à une cadence de 5400 images/seconde. D'autre part, la possibilité de piloter (en manuel ou en automatique) chaque pixel indépendamment des autres, permet également leur utilisation en vision pour des scènes fortement contrastées. Le biais introduit par leur fonctionnement peut toutefois générer de fortes différences entre les images perçues par l'œil humain et l'image brute issue d'un capteur CMOS. Depuis 2007, grâce à des capteurs de plus de 12,4 méga pixels effectifs, on dépasse le format 24x36 si cher à la photographie argentique.

4. Les boîtiers réflex numériques (BRN) : c'est le présent de la photo microscopique.

Plus coûteux et plus encombrants, ils permettent de réaliser de merveilleuses photos de terrain ; mais leur utilisation pour la photo de microscopie se révèle moins facile. Cela nécessite l'utilisation impérative d'un microscope trinoculaire, 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 pratiquement 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 BRN 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.

5. 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 sont 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 gamma³², les dominantes de couleurs, la saturation, l'amélioration de la netteté, le bruit³³ ... et divers paramètres. 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 (Z, Z5, ZM, ZP) et Helicon Focus. Nous sommes tous conscients que le gros problème de la microscopie, avec des grossissements importants, est la maîtrise de la profondeur de champ, et l'impossibilité au grossissement 63x ou 100x de voir nettement l'entièreté d'une spore qui fait 10 µm de diamètre, par exemple.

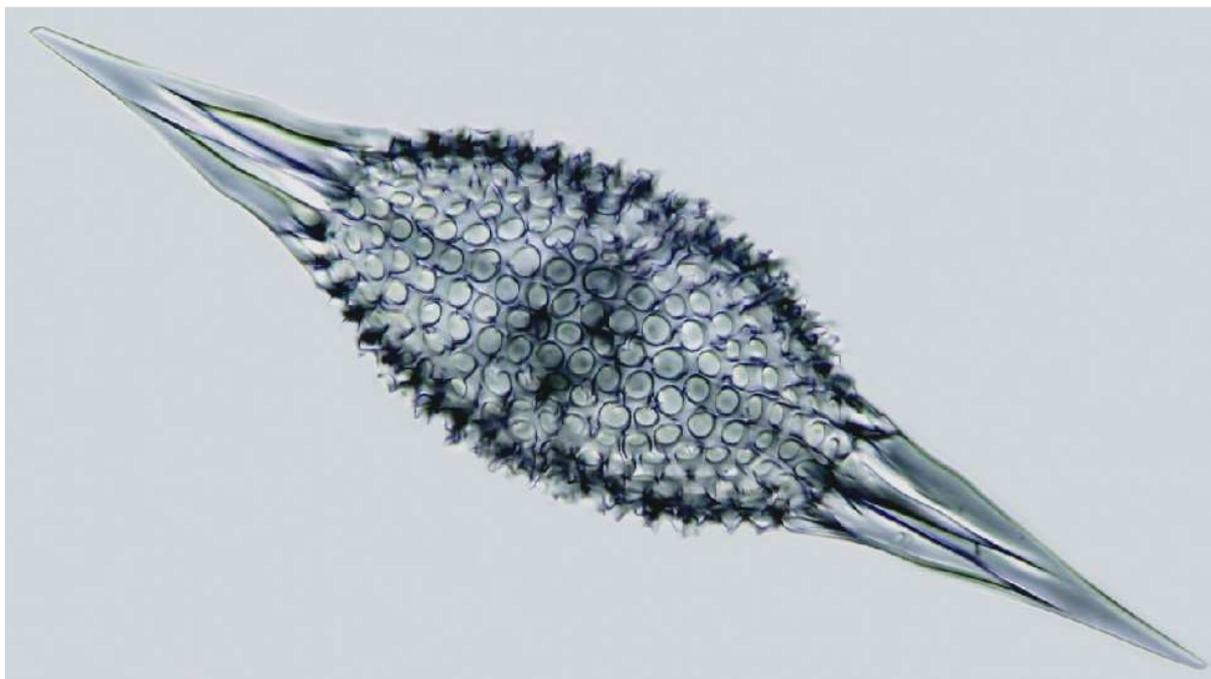
Qu'à cela tienne ! Il suffit de prendre une série de 3-5 clichés espacés chacun d'une variation de mise au point de 2 µm, avec la vis micrométrique ... et de laisser faire le programme ; en quelques secondes, il superpose les 5 images et on obtient une spore nette du haut en bas. Miracle de technologie !

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

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

³² Le problème du gamma des moniteurs s'est posé dès l'apparition de la télévision, dans la première moitié du XXème siècle. Les ingénieurs électroniciens de l'époque furent confrontés à une restitution très sombre et contrastée des images sur les postes de télévision. La cause de ce phénomène a été très vite cernée. La luminosité émise par les luminophores d'un tube cathodique n'est pas proportionnelle à la tension électrique appliquée dans le tube. Si une tension de 1 Volt donne la luminance maximum de 100, une tension moyenne de 0,5 V ne donnera pas une luminance de 50 %, mais une luminance plus faible de seulement 18 %, et le phénomène ira en s'amplifiant à mesure qu'on se rapproche des valeurs proches du zéro. En sortie, l'augmentation de la luminance est à la traîne par rapport aux valeurs d'entrée. C'est cette non-linéarité qu'on appelle le gamma.

³³ L'image est construite à partir des informations que fournit le capteur au processeur de traitement. Le rôle de ce capteur est de transformer une information lumineuse en signal électrique, qui constitue l'élément de base pour la création de l'image. Le bruit est un terme issu du domaine de l'acoustique et désigne un signal parasite. Que ce soit pour le son ou pour l'image, le principe est identique : sur tout signal de base vient s'adjoindre un ensemble d'informations parasites aléatoires. Si le niveau du signal est suffisant, la proportion de bruit dans le signal utile (le fameux rapport signal/bruit) reste insignifiante. Par contre, si le niveau de bruit prend le pas sur l'information principale, le bruit sera présent. Pour le son, on l'entend (c'est le « souffle » qu'on perçoit lorsque aucune musique n'est diffusée sur les enceintes) ; pour l'image, on le voit (c'est l'équivalent du grain argentique : des points colorés affectant particulièrement les zones sombres de l'image et on constate une perte évidente de piqué). Les capteurs des BRN sont moins sujets aux problèmes de bruit. Leurs photosites étant plus grands que ceux des APN, ils reçoivent plus de lumière à traiter, ce qui augmente le rapport signal/bruit et améliore la qualité d'image.



Cette image, réalisée par un ami allemand (spécialiste des diatomées), est le résultat final de plusieurs heures de travail, et d'un double traitement :

- Traitement d'un lot d'images avec Helicon Focus
- Nettoyage et amélioration de l'image finale avec Photoshop

Utilisation de Digital Photo Professional, sur un boîtier reflex Canon D500 et capture de 50 à 100 (cent) images, avec variation du pas de la vis micrométrique de 1 à 2 microns à chaque fois, selon l'épaisseur du sujet. C'est un véritable travail de bénédictin, mais l'image finale suscite une complète admiration.

A la page suivante, vous trouverez un mode opératoire plus simple et moins lourd, mais permettant d'améliorer notablement vos images.



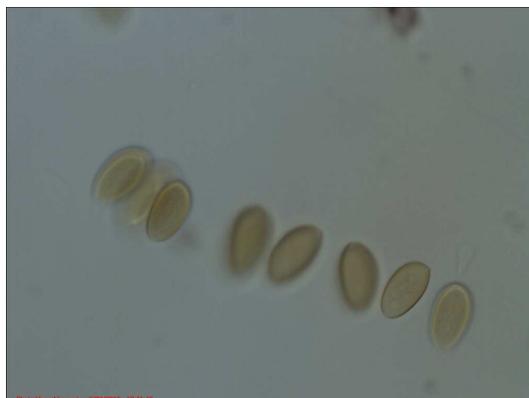
© Gérard TRICHIES

Conidiophores et conidies chez *Haplotrichum curtisii* – photo Gérard Trichies

La superposition d'images

Base de travail : observation d'une préparation d'un fragment de lame de *Strobilurus stephanocystis*, en utilisant un objectif de 100x à immersion ; une dissociation a permis d'isoler quelques rares spores, mais manifestement, elles ne se trouvent pas dans le même plan.

Objectif : réaliser une photo la plus nette possible, malgré une profondeur de champ très faible, et une préparation non uniforme.



Mode opératoire : une première observation nous permet de considérer que les sept spores sont nettes sur trois plans différents : il va donc falloir réaliser au minimum trois photos. Bien centrer les sujets ; ensuite, il est essentiel de ne plus varier d'un micron, en abscisse et en ordonnée. Le seul paramètre variable sera la hauteur : utiliser la vis micrométrique et réaliser trois prises de vue. On peut remarquer que sur ces trois photos, certains éléments passent successivement du flou au net, et l'inverse.

Faisons intervenir maintenant Combine ZM (logiciel en chargement libre sur internet).

Voici le résultat final, après un traitement de quelques dizaines de secondes : les sept spores considérées sont nettes.

Cette image (à droite) est le résultat de la superposition des trois images ci-dessus, avec cadrage plus serré de la zone qui nous intéresse. Cependant, elle reste critiquable, car le fond nous apparaît trop sombre, et ne met pas assez en évidence les éléments observés.



En traitant ensuite l'image précédente avec ACDSsee, nous avons amélioré le contraste, éliminé la dominante mauve violet et rectifié la luminosité, pour arriver à ce résultat final, qui est meilleur que ce que nous avons sous les yeux dans le tube optique.

Cette « démonstration » a d'abord pour objet de vous montrer que toute image numérique est améliorable, mais surtout que certaines superbes photos qui défilent sur les

forums sont souvent le résultat de nombreuses manipulations, et ne correspondent pas à la réalité visuelle microscopique. Cela n'enlève rien à leur valeur artistique, mais permet de ne pas complexer face à nos réalisations personnelles.

Construire une échelle graphique, sans calcul, sur les images de microscopie

Thierry Hatt³⁴, mars 2011

Géographe et informaticien de formation, photographe par passion, passé par l'astrophotographie, je me suis penché avec plaisir sur la microphotographie depuis un an. Assez rapidement s'est posée la question du calibrage des objectifs et de l'affichage de l'échelle graphique sur les images.

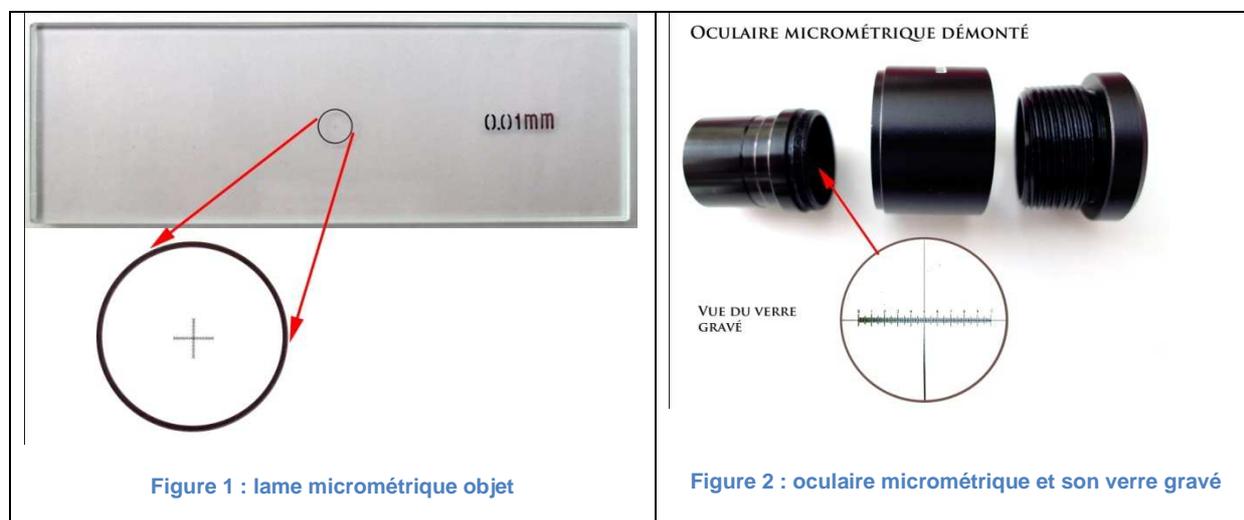
Mes recherches sur internet ont donné des résultats nombreux dont vous trouverez ici quelques exemples³⁵.

Pour la plupart, ces présentations proposent de faire des calculs parfois complexes, avec ou sans logiciel support ; on trouvera un exemple de ces calculs en annexe (figure 11).

Le calibrage suppose l'acquisition ou l'emprunt d'une LPO micrométrique (fig. 1) posée sous l'objectif, qui ne sert qu'une seule fois, et d'un oculaire micromètre gradué, représenté démonté (fig. 2).

Une fois le calibrage effectué, il suffit pour mesurer la taille d'un objet, – ici une diatomée (fig. 10, p.58), – de compter le nombre de crans du micromètre oculaire et de faire la multiplication indiquée (nombre de crans d'oculaire x valeur d'un cran pour l'objectif considéré).

Ces opérations donnent la taille d'un objet donné mais ne permettent pas d'enrichir l'image finale d'une échelle.



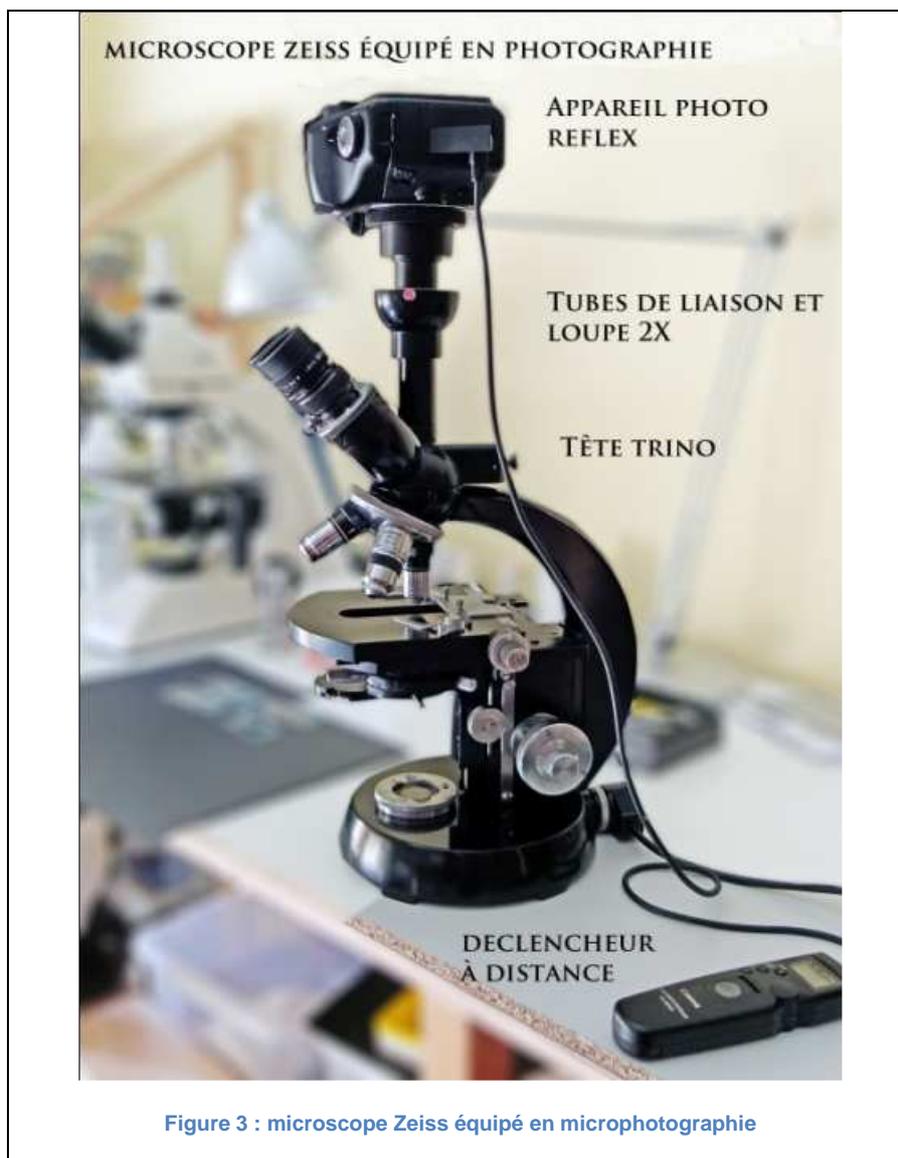
Je propose ici une approche sans calcul de l'affichage graphique d'une échelle sur les images photographiques numériques.

Équipement

On suppose qu'un équipement du type de la figure 3, est disponible, ainsi qu'une lame objet micrométrique (fig. 1). Il faut aussi disposer d'un logiciel de traitement d'images permettant la gestion des couches/calques : Photoshop, Gimp ou Image J.

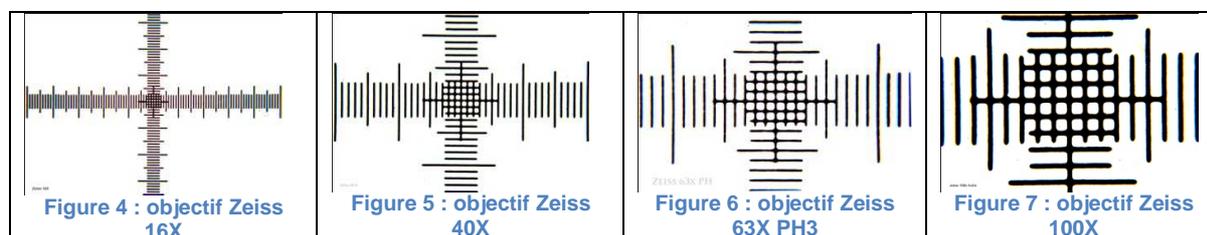
³⁴ Thierry Hatt, Professeur agrégé de l'Université, Consultant auprès de la Ville, du Musée Historique, des Archives de la Ville et de la Communauté Urbaine de Strasbourg, Président du conseil syndical.
3, Boulevard de la Dordogne, F-67000 STRASBOURG thhatt@gmail.com

³⁵ Didier Baar, « Les mesures en mycologie » : <http://tinyurl.com/5u55zn6>
J. M. Cavanilhac, « Microscopie quantitative » : <http://tinyurl.com/6bwsnk4>
Gilles Furelaud, « Échelles, grossissements, agrandissements » : <http://tinyurl.com/6y66wx9>
Walter Dioni, « A propos de microscopes, d'instruments et de mesures » : <http://tinyurl.com/5ua5jwn>
G. Fannechère, « A propos du calibrage du microscope » : <http://tinyurl.com/6b43xv5>
J. P. Gaveriaux, « L'utilisation du microscope optique en mycologie et lichénologie » : <http://tinyurl.com/6bfu3rx>



Méthode

La première démarche consiste à photographier la mire objet avec chacun des objectifs disponibles. Voici les résultats, stockés sur disque. Il faut maintenir la taille originale en pixels X/Y des images fournies par l'appareil photographique, sans la modifier.



La deuxième étape consiste à charger dans le logiciel de traitement d'images, dans un premier calque de fond, l'image de la mire objet. Il faut ensuite dessiner, dans un deuxième calque, l'échelle graphique avec sa légende, par exemple le nom et les caractéristiques de l'objectif.

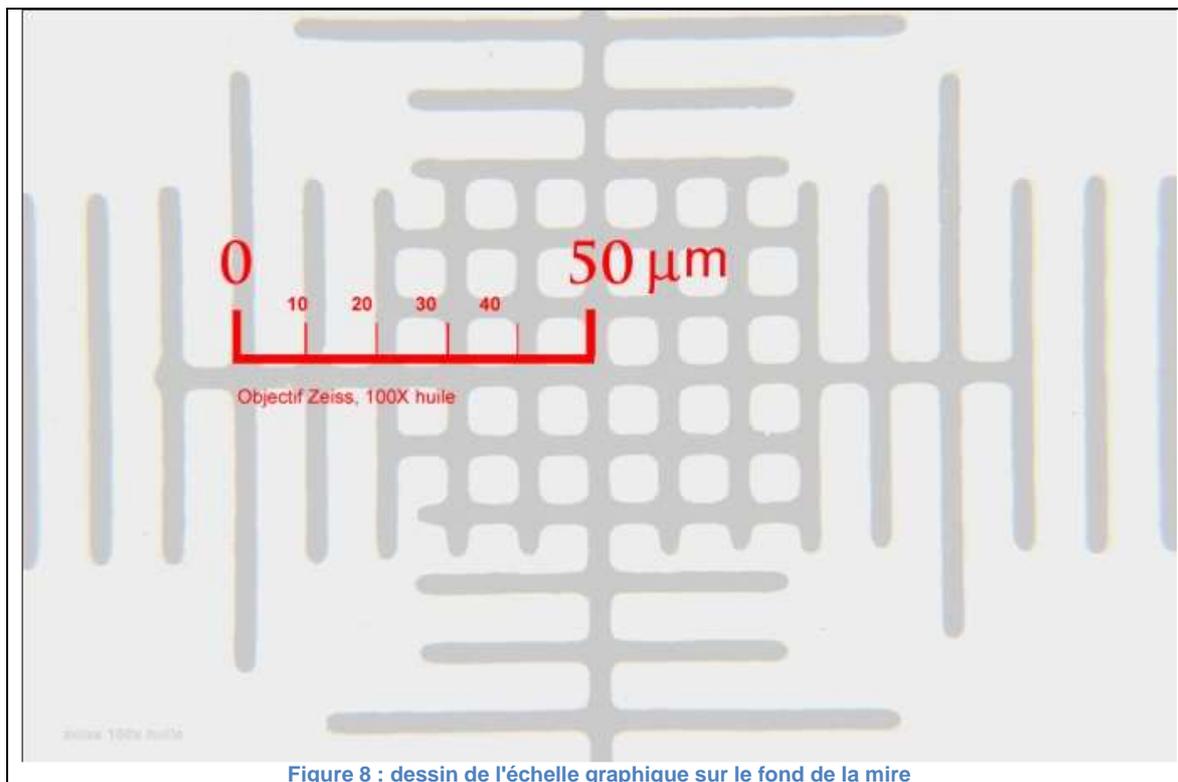


Figure 8 : dessin de l'échelle graphique sur le fond de la mire

Une fois cette opération menée, il faut sauvegarder l'échelle sans le fond en recadrant au plus près.

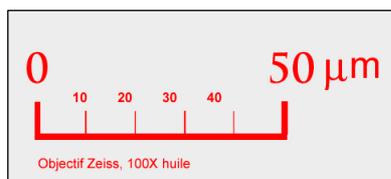


Figure 9 : échelle sauvegardée

A l'étape suivante, la photographie des objets observés – des diatomées par exemple – remplace dans le logiciel graphique la photo de la mire objet et il suffit de déplacer l'échelle graphique à sa place, ou bien on peut récupérer l'échelle graphique sur le disque et la mettre en place comme seconde couche (fig. 10, page suivante).

vante).

Il est impératif de garder la même taille, pour l'image de la mire, pour l'image de l'observation avant de placer l'échelle. Ce n'est qu'après qu'on peut faire les adaptations de taille d'image nécessaires pour les sites Internet ou l'intégration à un document texte.

Annexe : figure 10 : exemple de calcul de calibration d'objectifs

Calibrage des objectifs du microscope BK5000					
Calibrage				Exemple de la mesure d'une diatomée centrale	
Puissance de l'objectif	X 1/1000° de mm du micromètre objet	Y crans du réticule de l'oculaire	X/Y Valeur étalon d'un cran d'oculaire en microns	M Mesure de l'objet en crans d'oculaire	M*(X/Y) Taille de l'objet calculée en microns
10	1000,0	98	10,204	6	61,22
20	500,0	98	5,102	12	61,22
40	258,0	100	2,580	25	64,50
60	170,0	100	1,700	37	62,90
100	103,0	100	1,030	60	61,80
				Erreur +/-	1,64

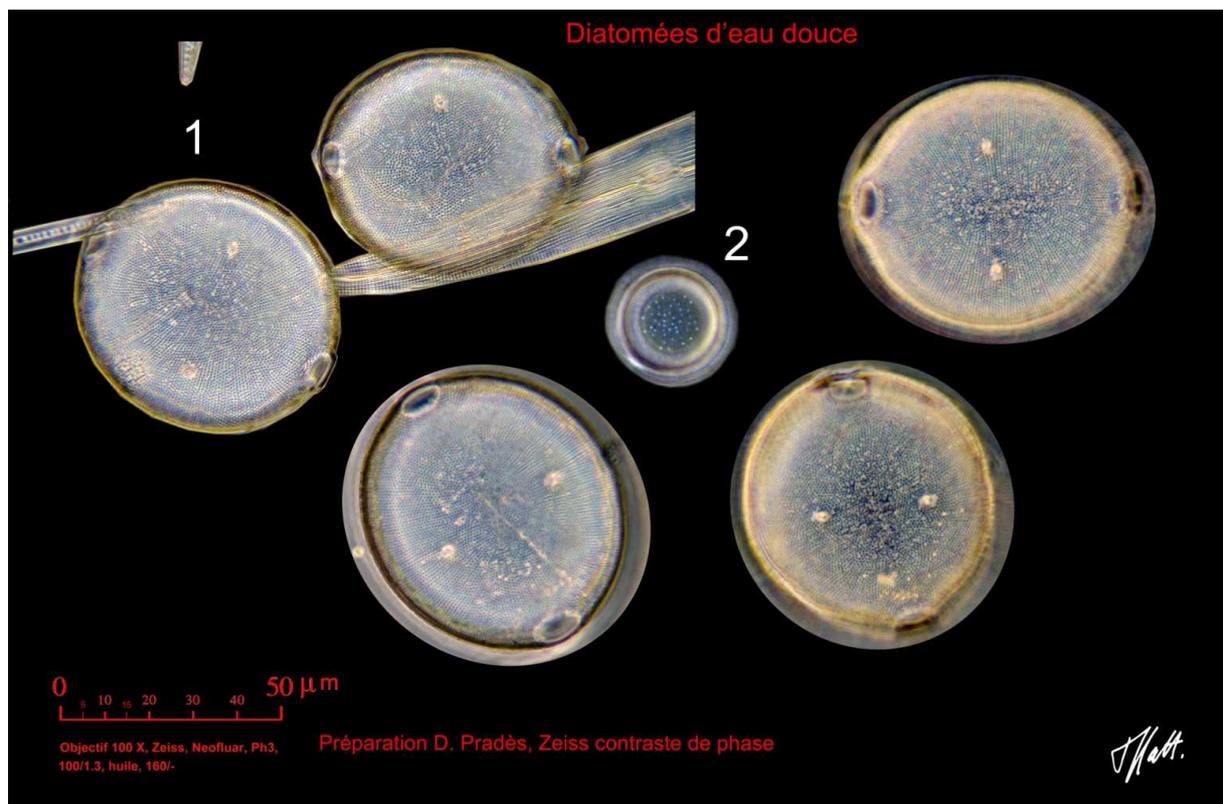
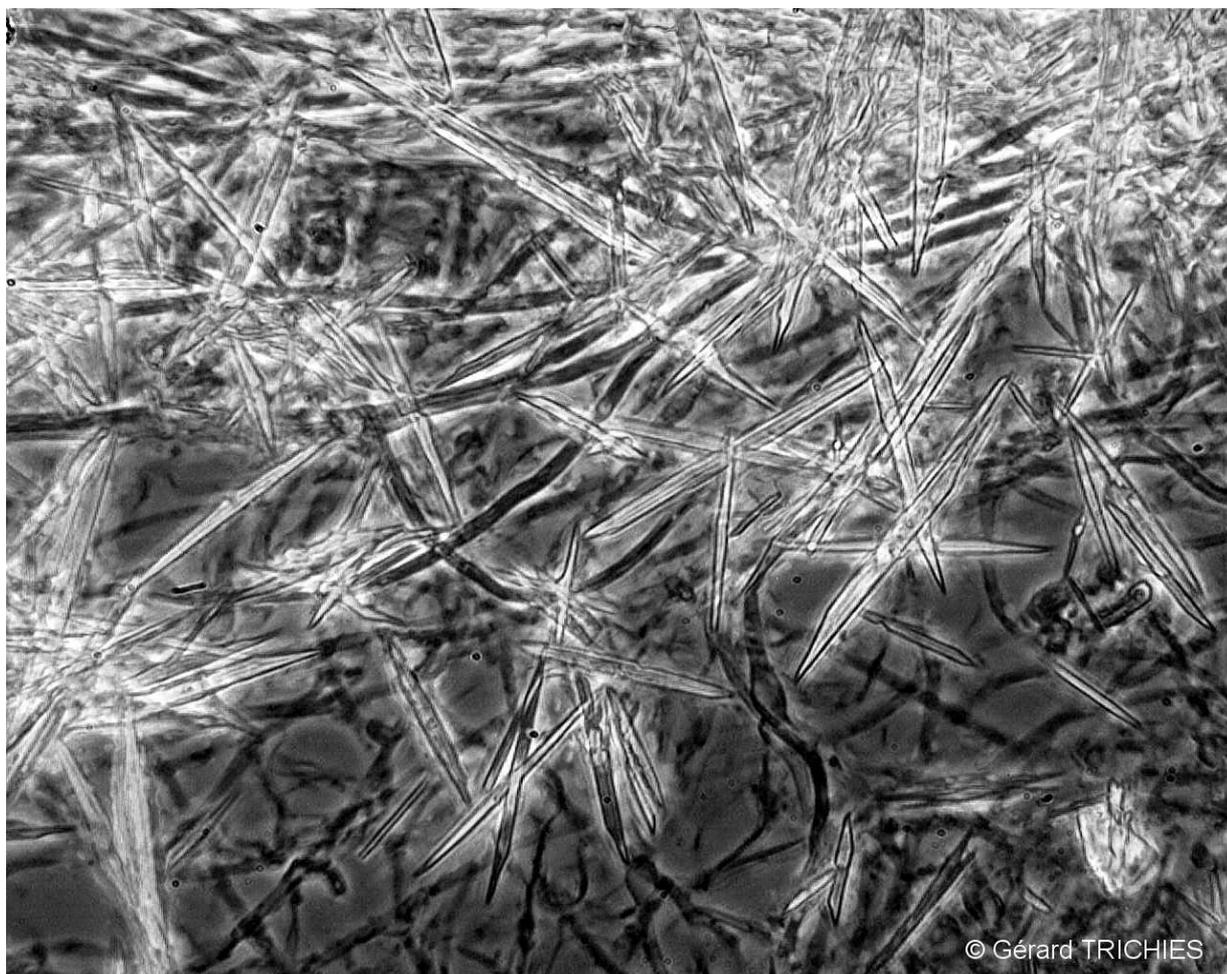


Figure 11 : intégration de l'échelle à l'image d'observation



Cristaux chez *Trechispora dimitica* – photo Gérard Trichies

MICROSCOPE, FLASH & APN - Balance des blancs

Pierre Girodet³⁶ (*)

Dans la quasi totalité des 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.

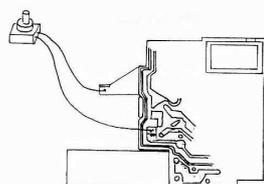
Le petit flash auxiliaire

Celui que j'utilise est celui décrit dans le numéro 1 de Microgazette³⁷, p. 12. Il a l'avantage de ne rien coûter et d'être suffisamment puissant – même trop – pour toutes les utilisations possibles.

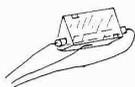
Voici comment réaliser ce flash :

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 fonctionner !

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.



Circuit imprimé (appareil Kodak)



Lampe flash

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 ; ceci vous aidera à placer cette lampe au meilleur endroit dans votre microscope.

³⁶ Pierre Girodet habitait Neuilly ; il fut, durant de nombreuses années, le secrétaire du Club Français de Microscopie. Il est décédé en 2010, des suites d'une longue et pénible maladie, qui l'empêcha de nous rejoindre en 2009, lors du séminaire de Masmembre, où il s'était promis de nous présenter une conférence traitant des microtomes, ainsi que la mise en œuvre pratique de ce flash pour microscope. Il laisse le souvenir d'un microscopiste de talent, d'un grand érudit et d'un humaniste.

³⁷ Revue du Club français de Microscopie ; <http://clubdemicroscopie.free.fr>

La vitesse lente de l'APN

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

- l'appareil se règle de lui-même sur une durée d'exposition qui dépasse largement la seconde, si le milieu ambiant est sombre
- en utilisant 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 - Paris³⁸ (c'est là que j'ai acheté le mien). En général il faut de 2 à 7 épaisseurs de filtre pour obtenir un bon résultat³⁹.

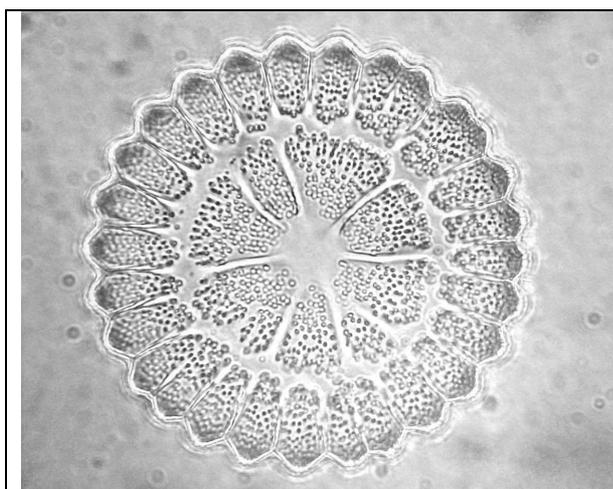
Si on prend des photos à la loupe binoculaire, il suffit de faire une première photo en mettant le flash à environ 40 cm de l'objet et d'ajuster ensuite cette distance suivant le résultat obtenu, ou bien comme ci-dessus, d'utiliser des filtres.

Résultats obtenus

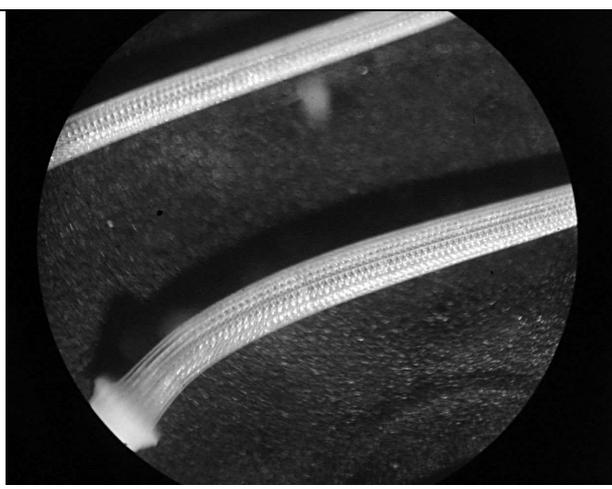
Les résultats sont souvent bien meilleurs que ceux obtenus sans flash. Les quelques illustrations ci-dessous le montrent parfaitement. De plus la netteté et la définition sont très fortement augmentées, grâce à la température de couleur élevée du flash.

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 équivalent 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.



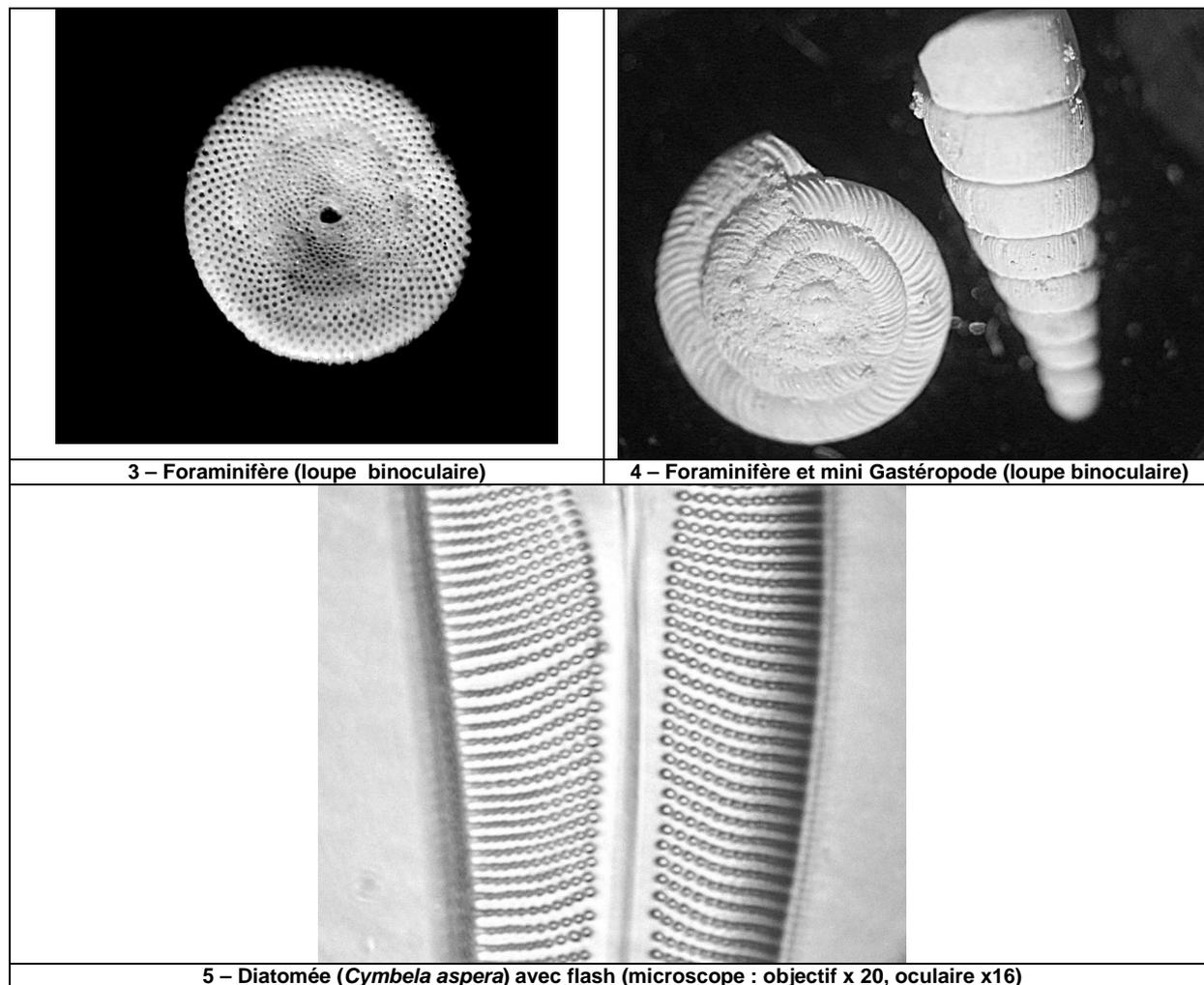
1 – Diatomée (*Anthodiscus* sp.), avec flash (microscope : objectif x40)



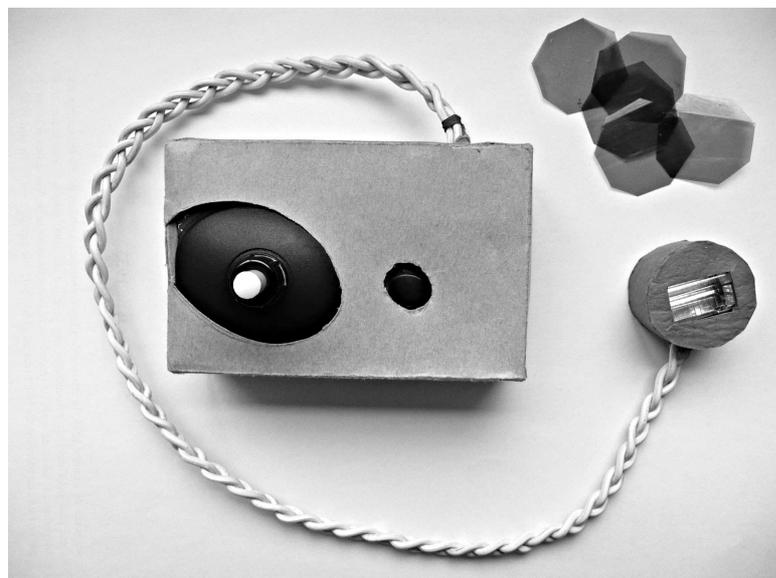
2 – Épines d'oursin (loupe binoculaire)

³⁸ Magasin BHV – 14, Rue du Temple - 75004 Paris, ou 55, rue de la Verrerie - 75189 Paris - France

³⁹ Ce filtre neutre divise par moitié l'intensité lumineuse, selon la progression suivante : 1 → 2 ; 2 → 4 ; 3 → 8 ; 4 → 16 ; 5 → 32 ; 6 → 64 ; 7 → 128 ... etc ... Donc, par exemple, 5 filtres réduisent 32 fois la lumière transmise. 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.

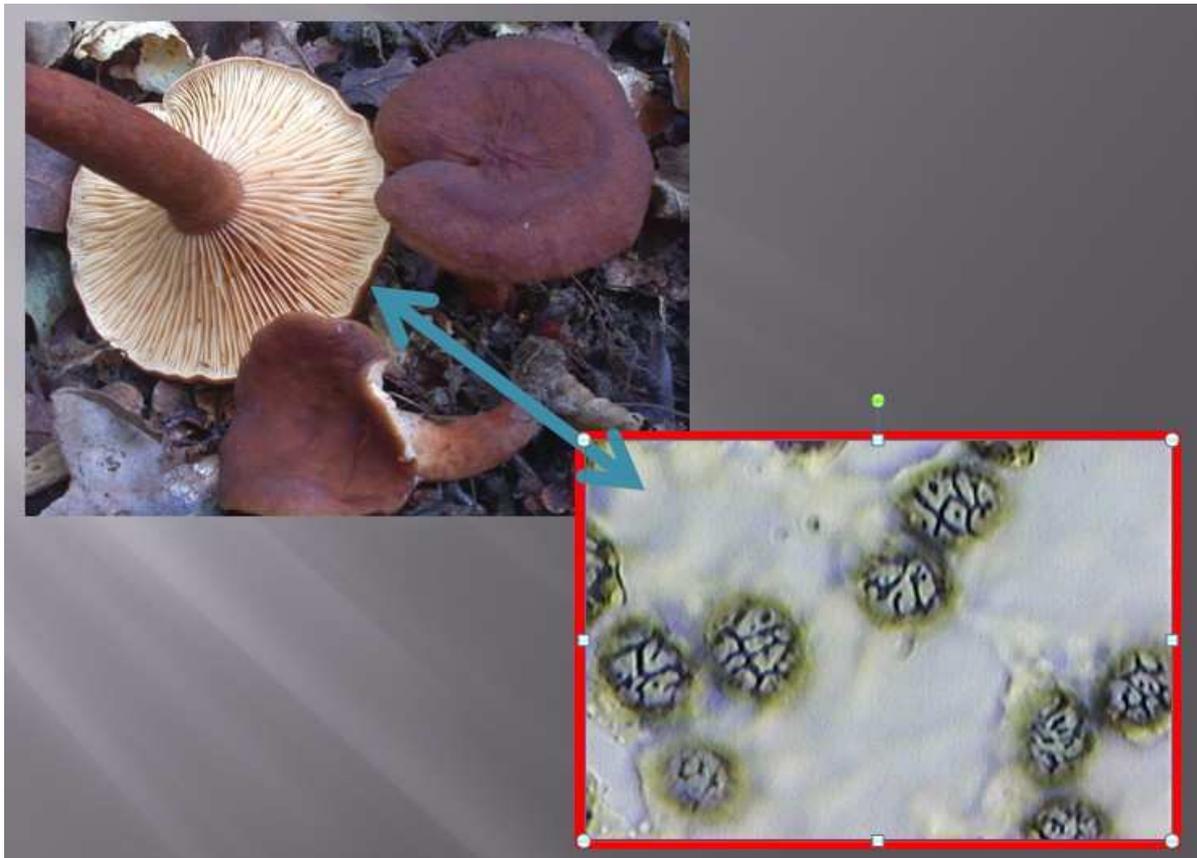
Les dimensions de l'appareil de photo jetable sont 9 x 6 x 3 cm, le flash lui-même est logé dans un petit tube en carton de 2,5 cm de diamètre, pour une hauteur de 1,5 cm, ce qui permet de le glisser facilement sous le condensateur du microscope.

Chapitre 04

MICROSCOPIE

ET

MYCOLOGIE



LES ÉLÉMENTS QUI VONT CONDITIONNER LA RÉUSSITE DE VOTRE FUTURE CARRIÈRE DE MYCOLOGUE MICROSCOPISTE

PROTOCOLE de préparation pour une observation microscopique en mycologie

Marcel Lecomte & André Février

Ce mode opératoire 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). C'est ici que le contraste de phase révèle toute son utilité.

→ 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 être réalisée au départ d'une sporée**, chaque fois que c'est possible, surtout si elle va générer des mesures.

MODE OPÉRATOIRE

1^{ère} étape : observer dans l'eau.

- Prélever soigneusement un morceau de très 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 LCO en biais pour éviter au maximum les bulles d'air.
- Éliminer 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 RC 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 LPO et y déposer une goutte de RC SDS s'il s'agit de matériel frais.
- Déposer une goutte de colorant et laisser agir 1 à 2 minutes.
- Éliminer 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 virement de couleur éventuels, ce qui arrive parfois avec l'eau de pluie ou de distribution).
- Éliminer 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.
- Poser la LCO en biais pour éviter au maximum les bulles d'air.
- Éliminer 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'ÉCLAIRAGE OPTIMALES**, en utilisant les diaphragmes de champ et d'ouverture, ainsi que le rhéostat : 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).

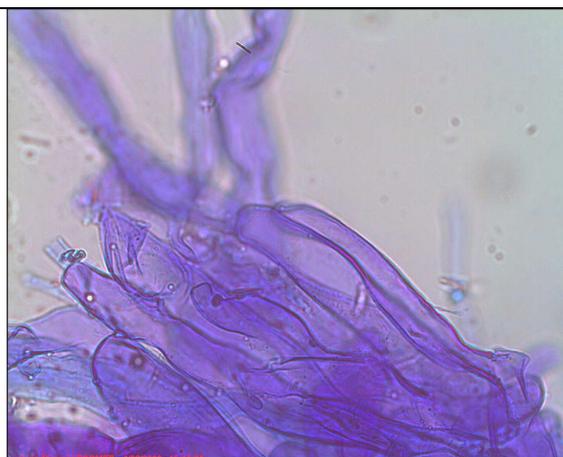
- Prélever un petit morceau dans la pièce colorée et garder soigneusement le surplus dans un verre de montre.
- Déposer une grosse goutte d'ammoniaque pure (désagréable au nez) ou mieux encore d'alcool (éthanol dénaturé ou méthanol) à 95 % : vous allez voir les spores quitter la préparation comme par magie ; cette technique est indispensable quand on veut observer le capillitium chez les Myxomycètes).
- Éliminer 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 LCO en biais pour éviter au maximum les bulles d'air.
- Éliminer 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.

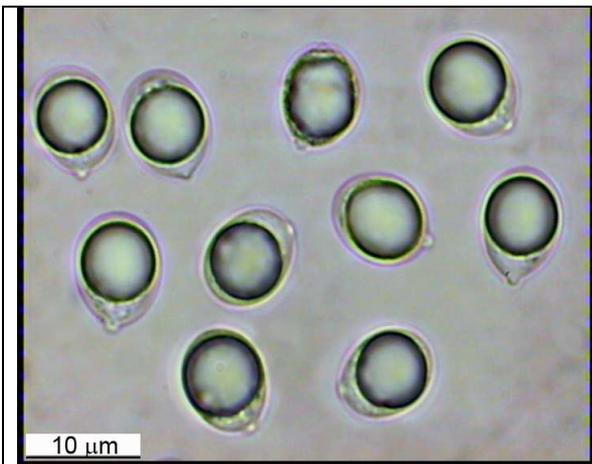
- Prélever un petit morceau dans la pièce colorée et garder soigneusement le surplus dans un verre de montre.
- Déposer une goutte de potasse à 5 %.
- Éliminer le liquide avec du papier absorbant.
- Si c'est nécessaire, répéter l'opération une seconde fois.
- Poser la LCO en biais pour éviter au maximum les bulles d'air.
- Éliminer 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.



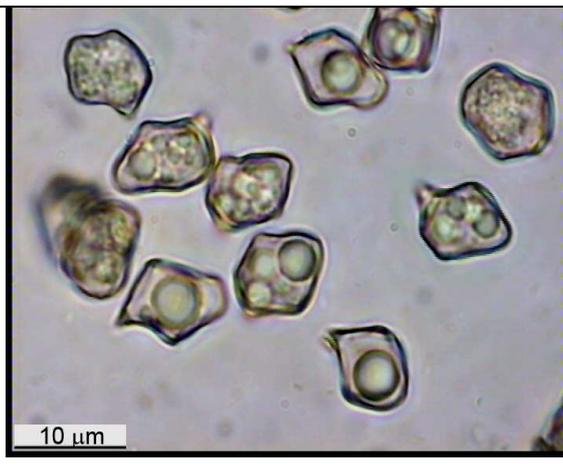
Préparation non lavée, empâtée et assombrie par le bleu d'aniline



La même préparation, lavée avant observation : elle est beaucoup plus contrastée et claire



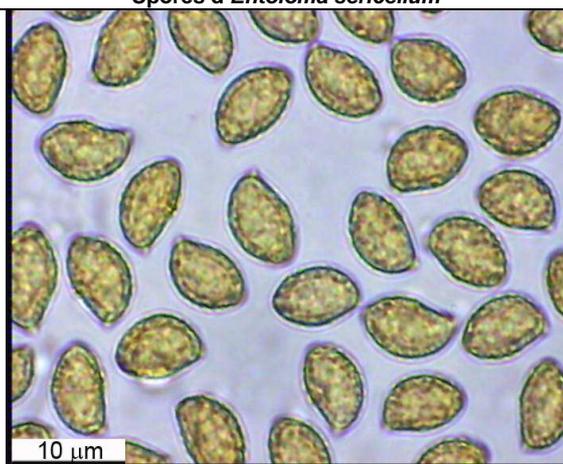
Spores de *Clavulina rugosa*



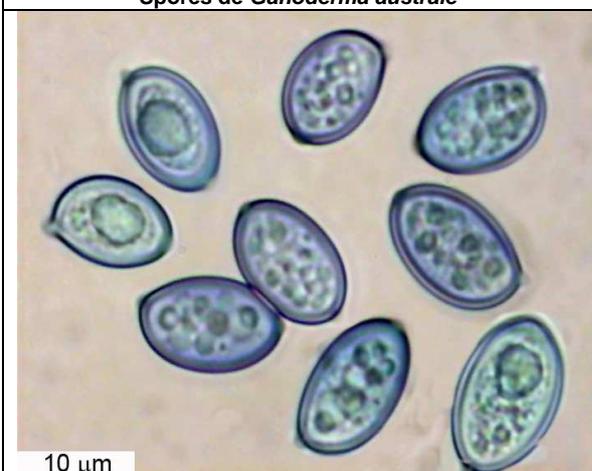
Spores d' *Entoloma sericellum*



Spores de *Ganoderma australe*



Spores de *Gymnopilus spectabilis*



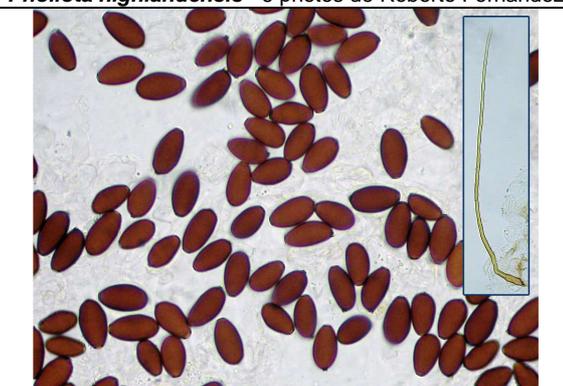
Spores de *Macrolepiota rickenii*



Pholiota highlandensis - 6 photos de Roberto Fernandez



Ganoderma adpersum - photo Daniel Ghyselincq



Coprinus auricomus - photo Daniel Ghyselincq

UTILISATION du MICROSCOPE et de RÉACTIFS CHIMIQUES pour l'ÉTUDE des CHAMPIGNONS TECHNIQUES D'OBSERVATION

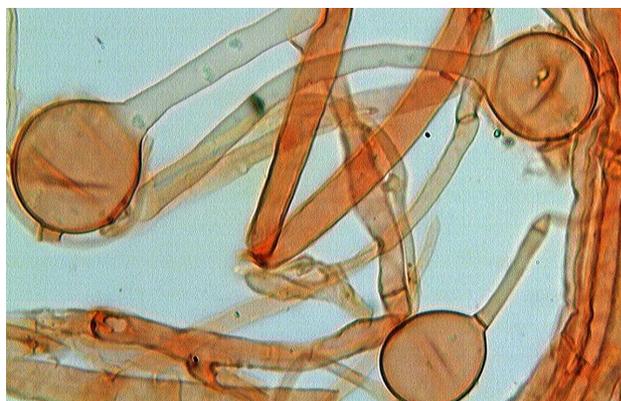
Considérations

L'utilisation de réactifs chimiques et de colorants 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 ainsi 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 !



Caulocystides de *Coprinellus domesticus* – observation dans le rouge Congo SDS - photo J. Pellicani

- Nous affirmons 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 excréctions 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 SDS à 1 % (ou à défaut, de détergent pour vaisselle), qui joue le rôle d'agent mouillant et contribue ainsi à « noyer » les spores dans le milieu d'observation (le résultat est tout aussi bon 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 lactophénolé, s'avère alors indispensable. 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 ou de sucre.
- 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 LPO et LCO, en utilisant un des produits suivants :
 - solution aqueuse sirupeuse d'hydrate de chloral (elle a notre préférence en raison de sa grande transparence) ;
 - chloral lactophéno (excellent également) ou chloral lactique ;
 - lactophéno ;
 - acide lactique ;
 - ammoniaque concentrée.

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

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 :

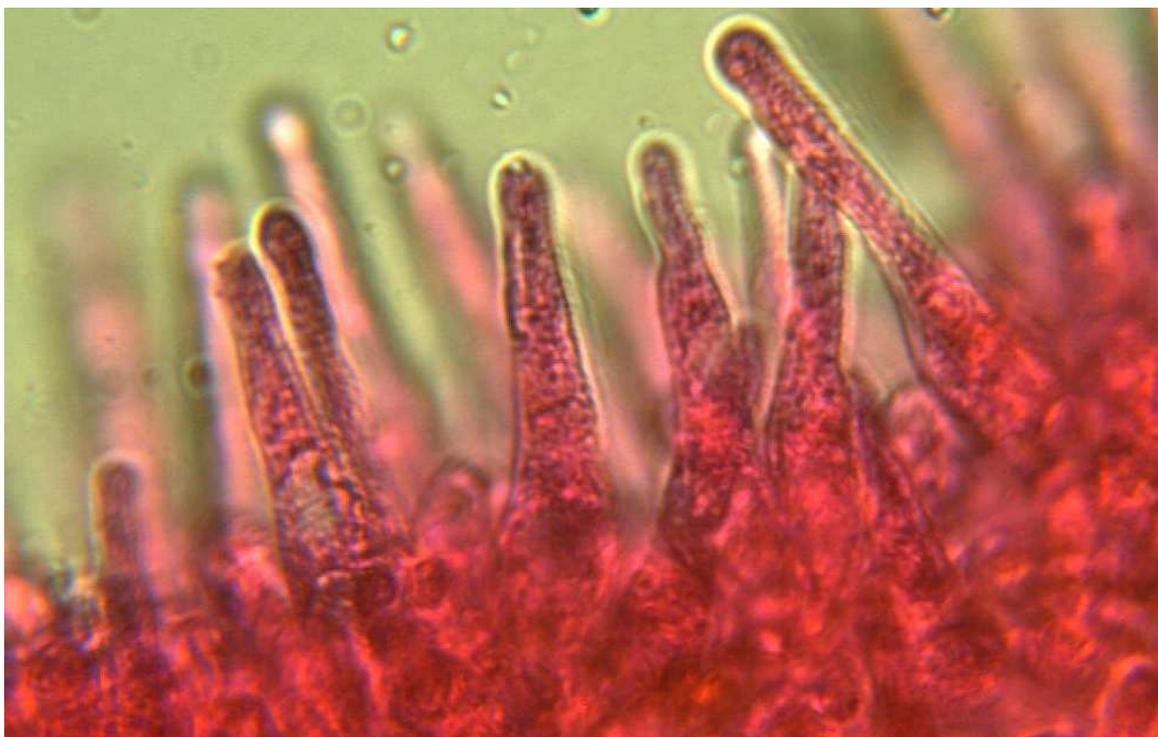
Pour l'étude d'un scalp, nous allons combiner les milieux d'observation, réactifs ou colorants suivants :

- chloral lactophéno pour le pileipellis
- réactif de Melzer ou sulfovanilline pour les laticifères
- RC SDS 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 pileïque).
- LAMPROcystides : utilisé pour des grosses cystides.
- LEPTOcystides : utilisé pour des petites cystides.
- GLEOcystides : 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*.



Macrocytides chez *Galerina uncinata* – photo Françoise Draye

Les préparations microscopiques par dissociation

Didier Baar⁴⁰⁻⁴¹ & Marcel Lecomte

Nous mettons un point d'honneur à publier ce texte de notre jeune ami, Didier, datant de quasi 11 ans maintenant, mais qui a servi de référence à nos travaux personnels. Il n'y a pas contradiction entre lui et moi, mais bien continuité : nous avons simplement amélioré ou peaufiné certains détails et introduit le lavage des préparations.

1. Principes de la dissociation

Les préparations extemporanées sont, de loin, 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 articles⁴² entre eux. Elle permet donc uniquement l'étude d'articles isolés, tels les basides⁴³, les cystides⁴⁴ ou les asques⁴⁵. La dissociation est de ce fait réservée à un usage exclusivement cytologique et ne pourra en aucun cas être utilisée à des fins histologiques.

Cystides de Basidiomycète, coloration au bleu Azur et dissociation



2. La technique de dissociation

2.1. Observation de matériel frais

- Déposer une goutte de RCA sur une LPO.
- Prélever sur le sporophore un fragment aussi réduit que possible⁴⁶ en s'aidant pour ce faire des instruments usuels : ciseaux, scalpel, pincettes et aiguilles à dissection.
- Transférer cet échantillon sur la LPO, dans la goutte de colorant.
- Couvrir délicatement la préparation avec la LCO.
- 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 LCO, de manière à la maintenir en place sur la LPO. La paraffine doit fumer mais ne peut grésiller pour bien s'étaler.
- Appliquer délicatement sur la LCO, 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 LPO et des LCO, amortit les chocs lors de la dissociation, et maintient la propre-

⁴⁰ Didier Baar, biologiste à l'Université de Liège, décédé accidentellement le 14 octobre 2001, à l'âge de 23 ans.

⁴¹ 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>

⁴² **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.

⁴³ **Basides** : ce terme désigne les articles fertiles caractéristiques des Basidiomycètes. Les basidiospores (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.

⁴⁴ **Cystides** : l'hyménium, qui est la couche fertile des champignons, présente chez les Basidiomycètes des articles stériles souvent remarquables, intercalés entre les basides, qui sont appelés les « cystides ».

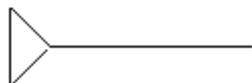
⁴⁵ **Asques** : terme désignant les articles fertiles caractéristiques des Ascomycètes. Les ascospores, généralement au nombre de huit et au contraire des basidiospores, se développent à l'intérieur des asques,.

⁴⁶ Voir les pages précédentes à ce sujet, avec notre nouvelle vision de la taille du prélèvement.

té 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 RCA 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 regonfle les tissus, tandis que le rouge 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 de Drigalski, et composé d'une tige de métal courbée trois fois.



Le fait de maintenir la LCO sur la LPO à l'aide de paraffine a plusieurs effets intéressants. Cette technique empêche la LCO 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 LCO avant utilisation de la paraffine, sinon celle-ci n'adhérerait pas sur la surface humide.

Ascospores de *Sarcoscypha austriaca*, dont certaines sont en phase de germination – photo Joseph Pellicani

Il est donc nécessaire de veiller à ne pas déposer une goutte trop importante de colorant sur la LPO 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.

Pour les dissociations, Il est généralement conseillé dans la littérature 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 LCO est altérée, car celle-ci risquerait de rayer la lentille frontale de l'objectif. De plus, le contact des réactifs peut s'avérer dangereux pour ces objectifs.



D'autres techniques de dissociation sont proposées dans la littérature : certains conseillent d'appuyer simplement sur la LCO 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 exsiccatum⁴⁷ 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 (voir 2.3) contenu dans une boîte de Pétri fermée. Laisser les tissus se regonfler durant 5 min.

+ Transférer, au centre d'une LPO, 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 (ou mouchoir en papier blanc, non parfumé).

+ Couvrir le fragment d'une goutte de RCA, puis poser une LCO. La suite des opérations se déroule exactement comme décrit plus haut.

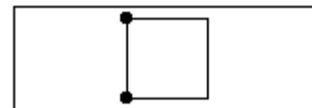
Les constituants du mélange de Cendrier étant diversement volatiles, il est absolument indispensable de le remplacer régulièrement⁴⁸ (toutes les heures au moins), et de refermer la boîte de Pétri directement après utilisation. Comme pour les dissociations de matériel frais, il peut être nécessaire d'utiliser

⁴⁷ 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 ». Au pluriel, on dit exsiccata en latin ; si on francise le mot : exsiccatas.

⁴⁸ (ML) : c'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser un récipient fermant hermétiquement, plutôt qu'une boîte de Pétri.

un autre réactif que le RCA. 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 RCA. Celui-ci reste cependant 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 LPO plutôt que de rester sous la LCO. De plus, contenant de l'éther, il s'évapore très rapidement, ce qui contraint l'observateur à le remplacer continuellement.



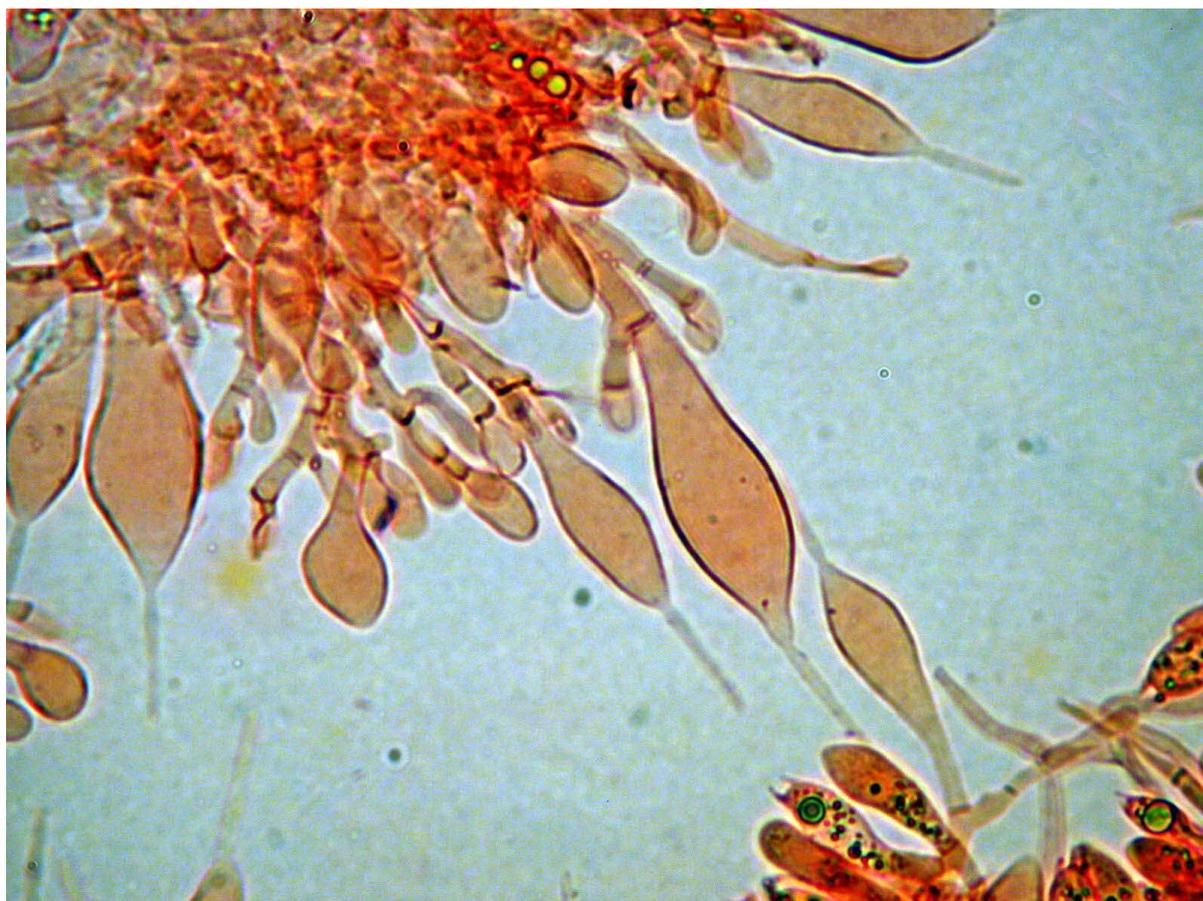
Voici l'aspect final général d'une préparation extemporanée par dissociation. Les points noirs représentent les gouttes de paraffine.

2.3. Le mélange de Cendrier

Mélanger dans un vase Erlenmeyer en ajoutant dans l'ordre les réactifs :

Éthanol à 95°	55 ml
Eau distillée	50 ml
Acétate d'éthyle	25 ml
Éther diéthylique	25 ml
Acide acétique	0,25 ml

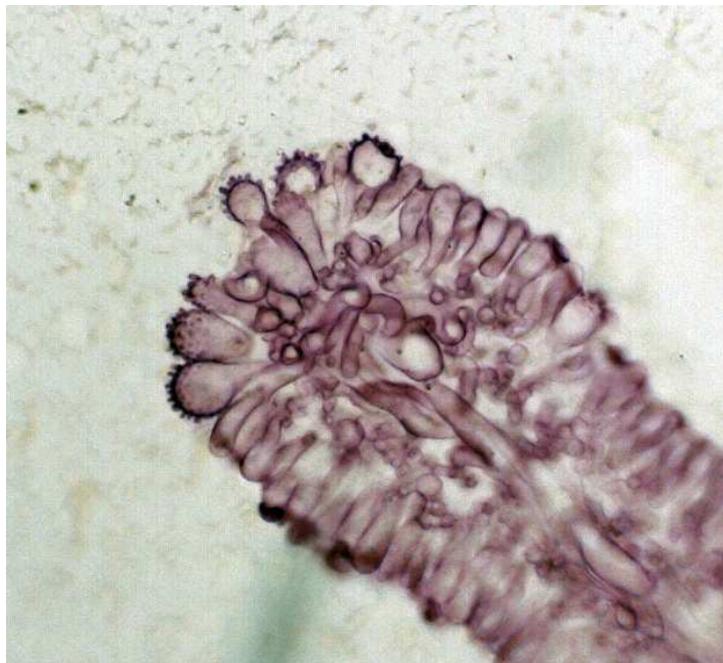
Tenir compte du fait que l'éther s'évapore très rapidement !



Macrocystides de *Pluteus thomsonii* – observation dans le rouge Congo ammoniacal

La COLORATION des coupes : limites et réalités !

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 (voire peut-être plus), le débutant se trouve submergé par une quantité incroyablement de « recettes »⁴⁹, où il devient bien difficile d'effectuer un choix.



Bout de lame de *Mycena metata*, avec cheilocystides très particulières – coloration à la fuchsine basique

Il ne faut quand même pas oublier que nombre de découvertes essentielles ont été réalisées par nos prédécesseurs, sans grand 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 rencontrerez 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.

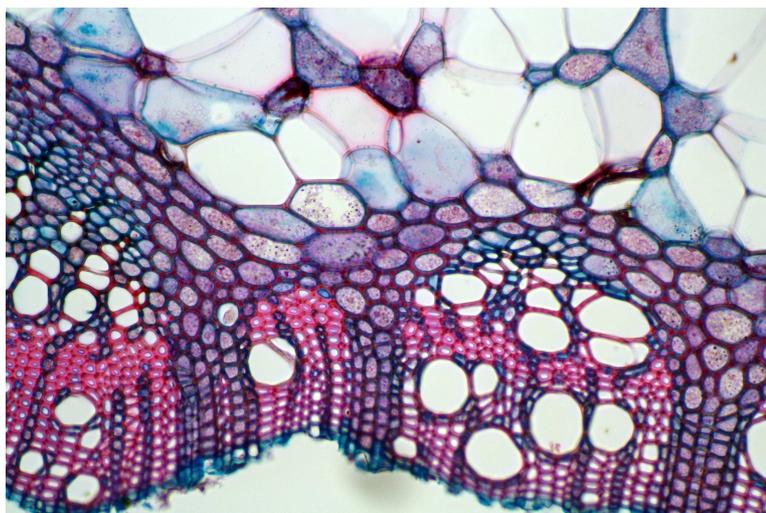
La COLORATION VITALE : elle consiste à soumettre l'organisme vivant qu'on veut étudier à l'action d'un colorant spécifique à très faible dose, qui va se fixer sur les cellules à observer, sans altérer les fonctions vitales, du moins, durant un certain temps. Ce sera donc une substance peu ou pas toxique, utilisée à dilution très importante de l'ordre de 1/1.000 à 1/10.000ème, comme l'éosine, le bleu de cré-syl ou le rouge neutre, par exemple.

La COLORATION LÉTALE : la plupart des colorants agissent sur des cellules mortes, tout simplement parce qu'ils nécessitent une fixation préalable, qui tue les éléments vivants. C'est dans ce groupe que notre action va se situer essentiellement.

Coupe dans une tige de ronce – coloration avec Etzold blau

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 pratiquer le mordantage (mordancer, c'est 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 difficile à réaliser, voire impossible.

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.

⁴⁹ Nous ne pouvons nous permettre d'encombrer cette publication avec toutes nos « recettes » de préparation des colorants ou réactifs ; à ce sujet, consulter les fiches techniques publiées sur notre site (il y en a plus de cent).
<http://www.champignons-passion.be> → chimie → fiches techniques des produits

Lors d'une **COLORATION RÉGRESSIVE**, on va colorer les sujets de manière excessive, pour ensuite les décolorer à l'aide d'un agent chimique approprié, appelé « différenciateur ou régresseur ». 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 initial.

On parlera de **COLORATIONS COMBINÉES** lorsqu'on fera agir plusieurs colorants, de manière simultanée ou successive. Ces colorants seront toujours acides ou basiques.

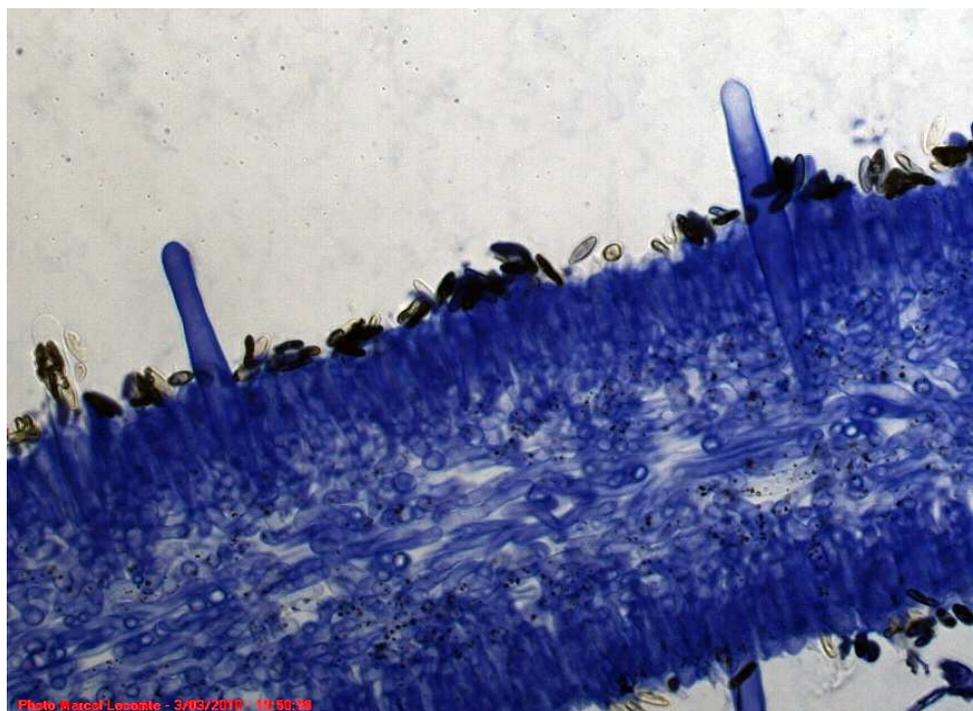


Macrocystide de *Strobilurus esculentus* – coloration à la fuchsine basique

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.



Coupe transversale dans une lame de *Chroogomphus ochracea* avec trame, spores et macrocystides – coloration au bleu azur - préparation Albert Marchal

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 constate à l'usage que ces colorations manquent de finesse dans le résultat final.

La COLORATION RÉGRESSIVE

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 régresser la coloration (décolorer), jusqu'au niveau recherché, à l'aide d'un autre agent chimique.*

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



Hyphes primordiales incrustées de *Russula* sp. – coloration à la fuchsine de Ziehl, régressée avec HCl (acide chlorhydrique) à 5 %

Il faut savoir que ce type de coloration ne s'applique initialement qu'à des frottis (ce qui est peu courant en mycologie, sauf si on réalise des frottis de spores) ou à des coupes très minces et bien régulières. Cependant, nous l'utilisons notamment 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 conseil-

lons de les monter avec de l'Aquatex ou du PVA incolore non phénolé 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, afin d'arriver à établir un MO.

MO pour une coupe :

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'alcool, de formol, d'acide acétique, d'acide picrique et d'acide chromique, la plupart du temps ! ... voir nos fiches techniques à ce sujet⁵⁰.



Bien rincer à l'eau.

Pratiquer la coloration à l'aide d'un colorant choisi, comme la fuchsine de Ziehl. On peut aussi expérimenter l'hématoxyline, la safranine, le violet de gentiane, le violet de méthyle, le Giemsa, divers bleus (méthyle, méthylène, toluidine), divers rouges (méthyle, neutre, alizarine), la pyronine, l'orange G, le vert lumière, la phloxine, l'éosine ... 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 différenciation (la régression) qui se fait en général à l'aide d'alcool (éthanol plutôt que méthanol) à 90-95°, d'alcool chlorhydrique (alcool avec 1 à 5 % d'acide chlorhydrique), ou une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 5 % (cette dernière a notre préférence).

Arrêter la différenciation avec de l'eau pour des préparations ponctuelles, ou pour celles destinées au montage à l'Aquatex. S'il s'agit de frottis, utiliser du xylène (xylol), qui stoppe instantanément la régression et permet le montage dans le BC, 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 !

⁵⁰ <http://www.champignons-passion.be> → chimie → fiches techniques des produits

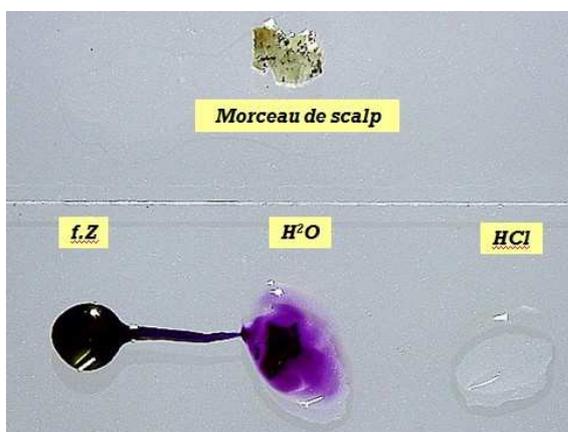
Protocoles de mise en évidence des incrustations acido-résistantes sur les hyphes primordiales de la cuticule de certaines russules.

Comment procéder !

Cette technique demande du temps, du soin et de la méticulosité, si on souhaite obtenir des préparations spectaculaires ; elle est rarement réussie au 1^{er} essai ... surtout, pas de découragement !

- Réaliser un scalp assez épais à la lame de rasoir ; il nous apparaît plus facile de “peler” le champignon en enlevant une “épluchure” d’ ½ cm de large ; il en résulte un fragment de scalp qui va en s’amenuisant et l’extrémité est quasi prête à l’emploi.
- Le retourner sur l’ongle et gratter délicatement toute la chair avec la lame de rasoir (en cuisine, on dit “émincer” ! → c’est une manipulation délicate qui demande du soin et du doigté) ; diviser le scalp obtenu en deux parties (la seconde partie sera utilisée pour la recherche des dermatocystides SV+).
- ATTENTION ! ne pas oublier de replacer le fragment préparé à l’endroit.

La recherche des incrustations peut s’effectuer selon trois techniques.



1. MO de la méthode différentielle de MELZER

- Déposer sur la partie gauche d’une LPO une goutte de fuchsine de Ziehl ; préparer au centre une goutte d’eau de rinçage et à droite une goutte d’acide chlorhydrique, dilué à 5 %.
- Déposer le morceau résultant du grattage dans la fuchsine de Ziehl et y laisser le scalp durant 15 à 30 secondes.
- Faire glisser le scalp dans l’eau et rincer.
- Faire glisser le scalp dans HCl à 5 %, placer la LCO et observer.

→ Les incrustations apparaissent comme des petites masses bleu mauve, réparties telle une chaussette autour de la dermatocystide. Sur une préparation de bonne qualité, les incrustations sont les seuls éléments non décolorés par l’acide.

2. MO de la méthode de BLUM

- Déposer sur la partie gauche d’une LPO une goutte de fuchsine de Ziehl et la diluer avec une goutte d’eau (= fZ à 50 %).
- Déposer le morceau résultant du grattage dans la solution de fuchsine de Ziehl et y laisser le scalp durant 5 à 10 minutes.
- Faire glisser le scalp dans l’eau ; placer la LCO et observer.

→ Les incrustations apparaissent comme des petites masses bleu mauve réparties comme une chaussette autour de la dermatocystide, mais pas très contrastées par rapport au fond, qui est seulement plus clair. Cette méthode nous semble valable surtout sur du matériel frais.

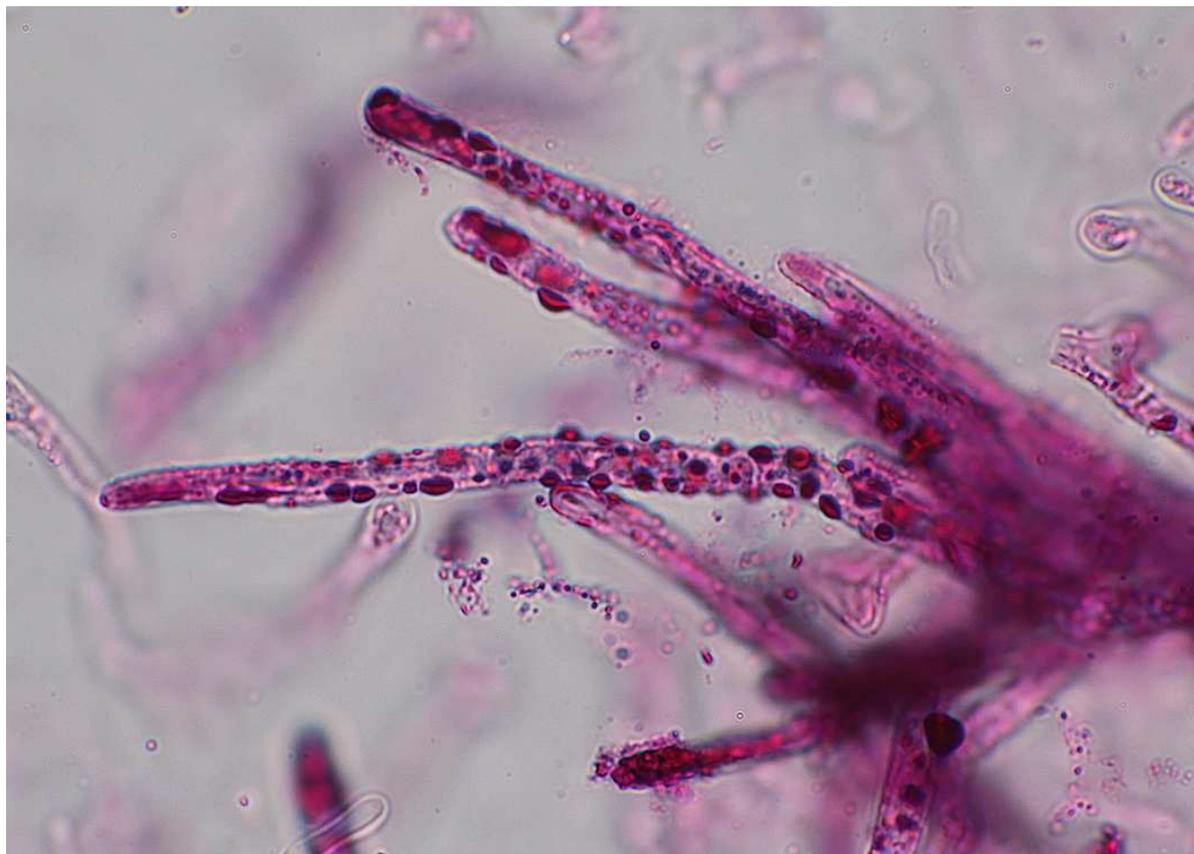


3. MO pour l’utilisation du carbolfuchsin selon Cléménçon

- Pour du matériel sec, laisser macérer d’abord dans de l’ammoniaque à 5 % durant 5 minutes, puis aspirer le liquide.
- Immerger le matériel frais dans une grosse goutte de solution de travail⁵¹ durant 5 à 10 minutes ; l’idéal est de travailler dans un verre de montre ou une lame avec dépression.
- Rincer deux ou trois fois à l’eau.

⁵¹ Pour arriver à cette solution de travail, il faut partir d’une solution mère de carbolfuchsin (fuchsine basique à 5 % dans de l’éthanol à 96°) ; ensuite, mélanger 10 % de cette solution mère avec 100 cc d’eau phénolée à 5 %.

- Transférer la pièce dans une goutte de lactoglycérol, durant 1 minute.
- Répéter l'opération 2 ou 3 fois, jusqu'à ce que plus aucune trace de colorant ne se manifeste dans la goutte : c'est dans ce liquide que se produit la régression de coloration.
- Dissocier et observer à l'immersion.



Hyphes primordiales avec incrustations acido-résistantes chez *Russula risigallina* observées dans le carbolfuchsin de Cléménçon, après régression au lactoglycérol (photo Camille Mertens)

Notre avis personnel

Après avoir expérimenté les 3 techniques, notre choix se porte résolument vers Cléménçon, car les résultats nous paraissent plus lumineux, plus contrastés, et autorisent une large marge de manœuvre : même des coupes oubliées durant plus de 20 minutes dans le carbolfuchsin sont encore exploitables sans problèmes.

La technique de Blum est intéressante, mais la critique essentielle se situe au niveau du contraste, qui n'est pas assez marqué (voir photo, page précédente).

La méthode de Melzer est plus « agressive » et la coloration est trop rapide ; un dépassement de temps d'une quinzaine de secondes génère un empâtement difficile à éliminer lors de la régression. C'est celle qui nous convainc le moins, même si elle est la plus pratiquée.

Quelques remarques

- Les incrustations acido-résistantes peuvent se trouver sur les dermatocystides et sur les hyphes primordiales.
- **ATTENTION** de ne pas confondre les incrustations acido résistantes qui se trouvent à l'extérieur des dermatocystides, avec des granulations internes des cystides qui sont parfois aussi vivement colorées (il s'agit alors souvent de contenus vacuolaires).

Quelques astuces

- Quand une russule est âcre, elle n'a pas d'incrustations (sauf *R. rubra* qui est rouge à odeur de miel, *R. rutila* qui est rouge à sporée foncée, et *R. ochroleuca*)
- Les russules "incrustées" ont une cuticule pruinuseuse ou mate ; cependant, *R. badia* est pruinuseuse et non incrustée, tandis que *R. integra* est incrustée et non pruinuseuse (c'est assez amusant, du fait qu'elles sont quasi des sosies).

UTILISATION DE LA RÉSINE ÉPOXY pour l'inclusion de champignons destinés à la microtomie

Marcel Lecomte & Albert Marchal⁵²

Cette technique nous a été enseignée par A. Marchal, éminent mycologue de Couvin (Belgique), qui l'a lui-même apprise auprès de Heinz Cléménçon, en 1978, à Lausanne. Nous tenons ici à le remercier pour son amabilité et sa disponibilité sans limites, malgré ses multiples occupations.

Nous avons tout de suite été séduit par la qualité des coupes (testées jusqu'à 4 µm), par la relative simplicité de la mise en œuvre (si on ne tient pas compte du temps) et surtout par la possibilité de conserver les blocs d'inclusion durant des dizaines d'années. En janvier 2010, A. Marchal a réalisé devant moi des coupes dans des blocs datant de 1978.

Par comparaison, l'inclusion à la paraffine, que nous pratiquions, nous paraît beaucoup plus fastidieuse, plus lourde, trop chronophage, et souvent décourageante dans ses résultats en mycologie (gros phénomènes de rétraction et de déformation notamment).

H. Cléménçon a mis des années pour peaufiner sa technique, car il accordait la priorité absolue à la préservation de la nature intime du champignon étudié. En effet, les modes de fixation classiques, utilisés depuis des dizaines d'années en botanique, présentaient à ses yeux des inconvénients majeurs en microscopie mycologique : coagulation des protéines cellulaires, apparition de granulations cytoplasmiques, forte rétraction ou destruction des vacuoles, noyaux rétractés, cellules hyphales déformées ou collapsées.

Son but a été atteint finalement en utilisant des fixateurs non coagulants, générant une excellente conservation de la finesse des détails, sans apparition d'une granulation artificielle, sans déformation des cellules, notamment lorsqu'elles contiennent des vacuoles de grande taille.

Voici une synthèse du mode opératoire original complet, agrémenté de commentaires et d'améliorations proposés par A. Marchal. Nous décrivons également des « raccourcis » de techniques susceptibles de réduire le nombre et la durée des interventions, ainsi que le coût du matériel. Tout cela vous paraîtra peut-être fastidieux la première fois, mais on peut aller relativement vite avec un peu d'entraînement et surtout beaucoup d'organisation et de rigueur.

MATÉRIEL de base nécessaire

- + Un microtome automatique de laboratoire (rotatif ou à glissière).
- + Une étuve pouvant atteindre 70°C (c'est la température qui sera toujours utilisée).
- + 1 litre de 2-méthoxyéthanol (2-MOE) ou éther monoéthylique de l'éthylène glycol (C₃H₈O₂).
- + Paraformaldéhyde en poudre (polyoxyméthylène – trioxyméthylène) ou formol très pur de laboratoire (celui du commerce est à proscrire, car il contient trop d'impuretés).
- + Tampon : Cacodylate de sodium (introuvable chez nous, car contenant de l'arsenic) → voir l'adresse suivante aux USA, où il se vend « prêt à l'emploi » :
<http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/chemicals/buffers.aspx>
- + 1 litre de 1-2 propylène oxyde (C₃H₆O) = (PPO).
- + 1 kit de résine époxy du Dr. Spurr (4 flacons), qu'il est possible de se procurer à cette adresse, aux USA : <http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/embedding/kits.aspx>



- + 1 litre d'acétone de laboratoire (celui du commerce est à rejeter car il contient trop d'impuretés).
- + 50 g de borax (borate de Na).
- + Colorants divers en poudre : fuchsine basique, bleu azur A (CI 52005) ou azur II, safranine, permanganate de potassium.
- + 1 listel de porte (12 x 12 x 200) en bois dur.
- + Colle Araldite à 2 composants.
- + 10 cc de potasse à 5 %.
- + Balance de précision (à 0,1 g).
- + Petite verrerie (1 flacon Erlenmeyer de 100 cc, et divers flacons de stockage → des pots à confi-

ture feront très bien l'affaire).

Il nous paraît conseillé, voire indispensable, de consulter un mycologue pratiquant cette technique, afin de prendre la mesure de ce qu'elle implique comme obligations et aussi (élément non négligeable) comme éventuels engagements financiers.

⁵² Albert MARCHAL, rue de la Foulérie, 1 B-5660 COUVIN (Belgique) albertmrchl@gmail.com

Chapitre 1. RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS

Comme la procédure complète d'inclusion s'étale sur 10 à 14 jours, il est conseillé de préparer plusieurs échantillons à la fois : 5, 10 voire 20 espèces différentes... → cela dépendra de votre disponibilité et de votre temps libre (la retraite a son charme !)

Choisir des exemplaires bien frais et matures, les conditionner selon leur taille, et les placer très rapidement dans le fixateur. Il nous semble nécessaire de tenir un carnet de notes où toutes les expérimentations seront consignées en détail. Les spécimens récoltés peuvent se conserver très facilement au cours de leur fixation (voir chapitre 3) ; il peut donc s'avérer utile, chaque fois que c'est possible, de se constituer un stock de matériel de travail qui sera le bienvenu en cas de « disette mycologique » (la météo semblant de plus en plus capricieuse).

Chapitre 2. LA FIXATION et LA DÉSHYDRATATION

Quelle que soit la méthode utilisée, la fixation se fait toujours à 0°C. (bain de glace).

1^{ère} méthode, que nous appellerons MÉTHODE LENTE « A » → c'est la meilleure, mais la plus longue et la plus onéreuse

FIXATION : utilisation du formol.

Phase préalable 1 : préparation d'une solution tampon mère (STM).

- + Mélanger 21,4 g de cacodylate de Na, 87,4 cc d'eau distillée, 12,6 cc d'HCl.
- + On obtient une solution mère avec pH de 6,9, à diluer 20x.

Phase préalable 2 : préparation d'une solution mère de chlorure de Ca (SCaM).

- + Mélanger 225 cc d'eau distillée et 250 mg de CaCl² anhydre (ou 330 mg en cas si on dispose de CaCl² 2-hydraté).

Phase 1 : préparation du formol pur (FP) → flacon A

- + Mélanger 2 g de paraformaldéhyde avec 25 cc d'eau distillée froide (on obtient un mélange d'un blanc laiteux).
- + Chauffer à 60-70° (la température est atteinte lorsqu'on ne peut plus poser le flacon sur la paume de la main).
- + Ajouter 2-3 gouttes de KOH à 5 % → maintenir la température et agiter jusqu'à clarification → refroidir sous l'eau courante → éventuellement filtrer.

Phase 2 : préparation du tampon → flacon B : mélanger 22,5 cc de SCaM et 2,5 cc de STM.

Phase 3 : préparation du fixateur : mélanger le contenu des flacons A et B : cela représente 50 cc de fixateur, qui doit être utilisé immédiatement.

Phase 4 : refroidir le fixateur dans un bain de glace : placer le flacon dans un contenant en polystyrène expansé (moins de déperdition de chaleur) et placer le tout dans le réfrigérateur.

Phase 5 : introduire les spécimens dans le fixateur : selon le nombre et la taille des spécimens les laisser entre 1 et 12 h dans le bain.

REMARQUES : si l'objet est de bonne taille, le refroidir au préalable ; le réhydrater éventuellement en plaçant le pied dans l'eau (comme pour provoquer une sporulation)

ATTENTION ! Pas de rinçage entre la fixation et la déshydratation

DÉSHYDRATATION : utilisation du 2-méthoxyéthanol.

- + Poser l'objet fixé durant quelques secondes sur du papier absorbant.
- + Refroidir une quantité adéquate de 2-MOE sur bain de glace.
- + Ensuite, y transférer l'objet et laisser 1 à 12 heures à 0°C.
- + Réchauffement à température ambiante.
- + Changer le 2-MOE et y replacer les pièces.

On peut stocker dans ce second bain durant très longtemps (plusieurs mois), en flacon bien fermé, soit à température ambiante ou mieux encore, dans le freezer.

- + Si on choisit de continuer tout de suite : placer les pièces, à température ambiante, dans un 1^{er} bain de PPO durant 1 à 12 heures (on peut le remplacer par de l'acétone très pur) → le propylène oxyde permet d'éliminer toute trace de 2-MOA... des traces de celui-ci ne peuvent pas se retrouver dans la résine qui ne durcirait pas bien lors de la polymérisation.

- + 2^{ème} bain de PPO durant 1 à 12 heures.

- + Inclure ensuite dans le mélange suivant : résine + PPO (25/50) et suivre la démarche du § 5 (inclusion).

2^{ème} méthode, dite MÉTHODE LENTE « B » → un peu moins longue, mais qui reste onéreuse

Lors de l'imprégnation, on passe directement du PPO dans la résine : cela permet de court-circuiter 6 bains successifs.

H. Cléménçon a revu par la suite sa position sur ce sujet, et annonce qu'il a obtenu des résultats tout aussi valables en plongeant directement les pièces déshydratées dans de la résine pure.

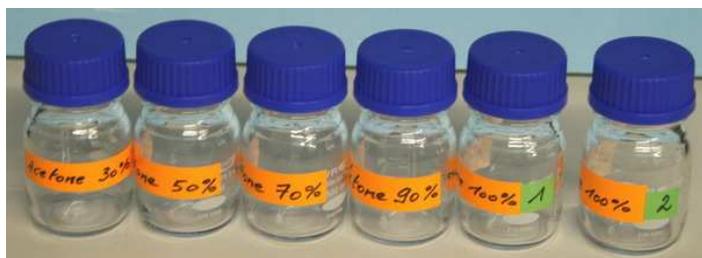
- + Laisser l'objet descendre dans la résine par gravitation et par imprégnation progressive.
- + Des blocs de petite taille (jusque 6 mm) sont complètement imprégnés après 10-12 heures, à température ambiante.
- + Pour de plus gros blocs, cela peut prendre plusieurs jours ; les placer alors au réfrigérateur.
- + La résine utilisée pour l'imprégnation peut aussi être utilisée pour l'inclusion, mais c'est déconseillé si on travaille sur des pièces non encore colorées (en effet, les résidus d'imprégnation du champignon qui sont en suspension dans la résine, vont également se colorer et polluer la future préparation).
- + Polymériser durant 12 heures à 70° (étuve).

Cette méthode est à expérimenter, car nous n'avons pas fait d'essais à son sujet.

3^{ème} méthode, dite MÉTHODE RAPIDE « A » → c'est plus rapide et plus économique

FIXATION : on reprend le mode opératoire de la méthode lente

DÉSHYDRATATION : utilisation de l'acétone



- + Préparer des bains d'acétone (solution aqueuse) à 30 % - 50 % - 70 % - 90 % - 100 % A – 100 % B.
- + Éponger les pièces colorées au KMnO_4
- + Aller de la concentration la plus faible à la plus forte et laisser les pièces durant 1 à 12 heures dans chaque bain.

INCLUSION

- + Verser la résine dans le dernier bain d'acétone à 100 %, où se trouvent les pièces.
- + Placer le récipient sur une source faible de chaleur (20-30° C. max.) pour que l'acétone s'évapore lentement (12 à 24 heures) → « pour accélérer l'évaporation, j'utilise un petit ventilateur d'ordinateur qui ventile directement au-dessus de l'orifice du flacon... » (A. Marchal) → quand tout l'acétone est évaporé, l'objet se retrouve dans le Spurr à 100 %.
- + Polymériser à 70°C. durant 10 à 16 heures.

Cette méthode n'a pas d'avantages, semble-t-il, par rapport au 2-MOE, sinon qu'elle permet de se passer de produits assez coûteux (2-MOE & PPO) et difficiles à trouver. Selon Cléménçon, elle est utile si l'objet est difficile à pénétrer (sclérotés, pieds de marasmes, spores à paroi épaisse).

A. Marchal l'a expérimentée il y a peu de temps, avec du formol et de l'acétone du commerce, à bas prix, ce que déconseille fortement H. Cléménçon : il a rencontré des problèmes majeurs à cause des impuretés contenues dans les produits basiques. Cependant, cela vaudrait la peine de l'expérimenter sérieusement avec de l'acétone et du formol très purs, de laboratoire.

4^{ème} méthode, dite MÉTHODE RAPIDE « B » → c'est de loin la plus rapide et la plus économique

FIXATION : utilisation de KMnO_4

Le fixateur sera une solution aqueuse de permanganate de K à 1 %, tamponnée au cacodylate (0,5 g de permanganate, 50 cc eau distillée, 2,5 cc de STM).

Les pièces vont se colorer en violet sombre quasi noir (la coloration est donc déjà réalisée) → laisser tremper à température ambiante durant 20 à 30 minutes → rincer 2 ou 3 fois avec la solution tampon avant de déshydrater.

DÉSHYDRATATION : utilisation de l'acétone, comme dans la méthode rapide A, ci-dessus : cela permet de conserver la coloration générée par le permanganate.

On déshydrate ensuite avec la série de bains d'acétone mentionnée ci-dessus → avec du 2-MOE, la coloration est régressive et les objets se décolorent quasi complètement.

Chapitre 3. L'IMPRÉGNATION

MÉTHODE 2-MOE :

- + Préparation de la résine : voir le chapitre 5 (inclusion) juste avant l'emploi.
- + Elle peut être stockée dans des pipettes à échantillons de 2,5 cc qui, bien fermées, se conservent durant plusieurs semaines dans le bac à glaçons d'un frigidaire.

A : mélanger deux volumes de PPO et un volume de résine (50/25) → utiliser des flacons en verre car le PPO dissout le plastique et le PVC → y placer l'objet et attendre 1 à 12 heures.

B : ajouter un volume de résine (= 75 %) → attendre 1 à 12 heures.

C : prélever 2 volumes de B et ajouter un volume de résine → attendre 1 à 12 heures.

D : prélever 1 volume de C et ajouter un volume de résine → attendre 1 à 12 heures.

E : ajouter 2 volumes de résine neuve → attendre 1 à 12 heures.

F : ajouter 2 volumes de résine neuve → attendre 1 à 12 heures.

- + Polymériser durant 12 heures à 70°, à l'étuve (la vitesse de polymérisation est une fonction directe de la température : à 50°, il faudra 18 à 24 heures ; à température ambiante, cela prendra des semaines).

Chapitre 4. L'INCLUSION

Préparation de la résine.

- + Manipuler avec précaution, dans un endroit ventilé.
- + Le kit du Dr. Spurr est composé de 4 éléments : ERL4206 / DER736 / NSA / S1.
- + Selon la quantité désirée, il faut les mélanger dans les proportions ci-dessous.
- + Le mélange se réalise dans des petits récipients jetables (gobelets PVC cristal par exemple).
- + Les mesures ci-dessous sont exprimées en grammes (gouttes pour S1), à mesurer avec une balance de précision.
- + Les valeurs colorées en rouge sont intéressantes, car elles représentent un nombre entier de gouttes.

Chez le fournisseur américain (Electron Microscopy Sciences), le ERL4206 est maintenant remplacé par ERL4221 ; S1 est appelé DMAE (diméthylaminoéthanol).

ERL4221	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,25	2,50	2,75	3,00	3,25
DER736	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,40	2,60
NSA	1,30	1,95	2,60	3,25	3,90	4,55	5,20	5,85	6,50	7,15	7,80	8,45
S1 (gouttes)	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	2,80	3,20	3,60	4,00	4,40	4,80	5,20
TOTAL	2,20	3,30	4,40	5,50	6,60	7,70	8,80	9,90	11,00	12,10	13,20	14,30

ERL4221	3,50	3,75	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00	6,25
DER736	2,80	3,00	3,20	3,40	3,60	3,80	4,00	4,20	4,40	4,60	4,80	5,00
NSA	9,10	9,75	10,40	11,05	11,70	12,35	13,00	13,65	14,30	14,95	15,60	16,25
S1 (gouttes)	5,60	6,00	6,40	6,80	7,20	7,60	8,00	8,40	8,80	9,20	9,60	10,00
TOTAL	15,40	16,50	17,60	18,70	19,80	20,90	22,00	23,10	24,20	25,30	26,40	27,50

ERL4221	6,50	6,75	7,00	7,25	7,50	7,75	8,00	8,25	8,50	8,75	9,00	9,25
DER736	5,20	5,40	5,60	5,80	6,00	6,20	6,40	6,60	6,80	7,00	7,20	7,40
NSA	16,90	17,55	18,20	18,85	19,50	20,15	20,80	21,45	22,10	22,75	23,40	24,05
S1 (gouttes)	10,40	10,80	11,20	11,60	12,00	12,40	12,80	13,20	13,60	14,00	14,40	14,80
TOTAL	28,60	29,70	30,80	31,90	33,00	34,10	35,20	36,30	37,40	38,50	39,60	40,70



- + Placer l'objet dans de la résine pure, dans un moule adéquat (trouver des objets de la vie courante adaptés (petits godets en alu de 3 – 4 cm de diamètre contenant à l'origine une bougie pour chauffe-plat)



- + Polymériser à 70°C. durant 12 h.

Chapitre 5. PRÉPARATION DES BLOCS

+ Découper la latte de bois dur en morceaux de 3 ou 4 cm de longueur (futur support des blocs de résine) selon la taille des mâchoires de votre microtome.

+ Démouler l'objet et le façonner à l'aide d'une petite scie à lame fine (cette opération est très importante, car c'est ici qu'on va orienter l'objet pour les futures coupes).

Voici des blocs d'inclusion fixés sur leur support en bois.

+ Passer le bloc sur du papier de verre à grain fin pour lisser les arêtes.

+ Mélanger 2 gouttes de chaque composant d'une colle époxy (Araldite ou autre).

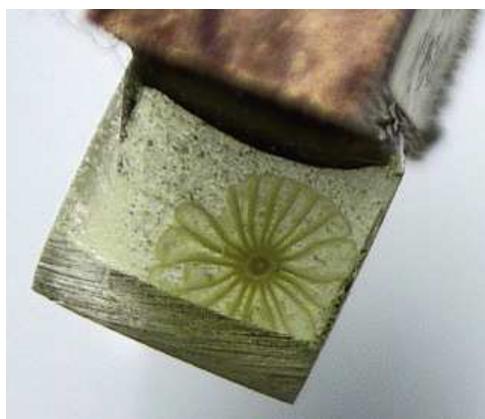
+ Fixer le bloc sur la réglette en bois.

+ Laisser à l'étuve (70°) durant 1 à 2 heures pour accélérer la polymérisation de la colle.

+ Le bloc est prêt à être fixé dans les mors du microtome.



Chapitre 6. LES COUPES



+ Fixer le support en bois dans les mors du microtome.

+ Il est indispensable d'utiliser un couteau spécial, adapté à la résine (ceux utilisés pour la paraffine ne conviennent pas).

+ La première fois, bien régler la position transversale du couteau (nous ne reprenons pas ici la théorie relative à la qualité de l'aiguisage de la lame, et à l'utilisation générale d'un microtome automatique ... voir d'autres articles personnels écrits sur ce sujet).

+ La majorité des coupes sera réalisée avec un réglage compris entre 4 et 8 μm .

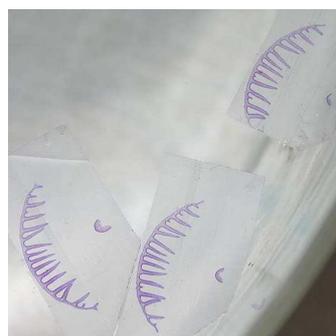
Un chapeau de *Marasmius rotula* inclus dans la résine.

+ Les coupes, d'aspect un peu laiteux, vont adhérer au couteau par électricité statique (pas possible ici de réaliser des rubans comme avec la paraffine).

+ Les ranger une à une sur le dessus du couteau avec une aiguille montée, durant quelques minutes.

+ Après 4-5 minutes, les coupes peuvent être enlevées avec une fine pincette, sans danger d'enroulement → éliminer les éventuels déchets avec un petit pinceau.

Chapitre 7. RECONSTITUTION DE LA FORME de la coupe



+ Prendre de l'eau bien chaude (60°), dans un flacon à col bien large (7-8 cm de diamètre) → y déposer les coupes une à une.

+ Après quelques minutes, elles ont retrouvé leur forme originale → laisser refroidir → elles acquièrent maintenant leur forme définitive, bien plane.

+ Les coupes sont prêtes pour une observation en contraste de phase.

+ Si on décide de les colorer, passer directement de l'eau chaude au flacon de colorant (toujours à col large).

Chapitre 8. LA COLORATION

La question se pose de savoir s'il ne serait pas intéressant de réaliser une coloration de masse, au départ du 2-MOE (y dissoudre le colorant brut) ... à expérimenter !

Notre méthode de coloration (les résultats obtenus sont remarquables).

+ Les coupes sont colorées en les flottant sur les divers colorants.

+ Les transferts sont réalisés avec une pincette à bec fin.

+ Laisser durant 12 à 24 h dans le bac à colorant (certaines colorations se feront à l'étuve à 70°).

1. La plus simple.

- + Solution aqueuse de permanganate de potassium à 2 %, non tamponnée, durant 15 minutes, à température ambiante → rincer à l'eau.
- + Décolorer la résine avec une solution aqueuse d'acide oxalique à 0,5 % durant 30-40 secondes → rincer à l'eau et sécher à température ambiante, sur papier absorbant.



2. Coloration au bleu azur A ou azur II.

- + (A) préparer une solution aqueuse (300 cc) de borax à 1 %, de pH = 9.
- + (B1) préparer une solution mère de colorant à 0,1 % : mélanger 100 cc de (A) et 0,1 g de bleu (cette dernière va se conserver durant des années).
- + (B2) mélanger 100 cc de (A) et 10 cc de (B1) : on a une solution à 0,01 %.
- + (B3) mélanger 100 cc de (A) et 10 cc de (B2) : on a une solution à 0,001 % → ce sont les solutions B2 & B3 qui serviront à la coloration des coupes.
- + Dans un tout petit cristalliseur muni d'un couvercle, on verse la solution à 0,01% ou 0,001 % ; on y fait flotter les coupes et on place le tout à l'étuve à 70° durant 1 à 2 heures (B2) ou toute la nuit (B3).

3. Coloration à la fuchsine basique.

- + (A) préparer une solution aqueuse d'alun de potasse à 5 %, de pH = 3.
- + (B1) préparer une solution mère de fuchsine basique, à 1 % : mélanger 100 cc de (A) et 1 g de colorant (cette dernière va se conserver durant des années).
- + (B2) mélanger 50 cc de (A) et 50 cc de (B1) : on a une solution à 0,5 % → c'est celle-ci qui servira souvent à la coloration des coupes.
- + (B3) mélanger 100 cc de (A) et 10 cc de (B1) : on a une solution à 0,01 % → pour des colorations plus douces.
- + Placer le colorant supportant les coupes à l'étuve, durant 12 heures.

4. Possibilité d'utiliser d'autres colorants.

Comme solvant, utiliser une solution aqueuse d'alun de potasse à 5 %, de pH = 3.
 Safranine (0,005 %), pyronine (1 %), bleu azur II (0,002 %), trypan blue (1 %), bleu de méthyle (1 %), crystal violet (0,1 %), fuchsine acide (0,5 %), bleu de méthyle (1 %).



5. Les coupes sont colorées.

- + Les manipuler avec grand soin, à l'aide d'une pince à becs très fins, en les prenant par un coin.
- + Les sortir avec précaution du bain de colorant refroidi (afin de les laisser réduire).
- + Les poser sur du papier absorbant afin d'éliminer le surplus de colorant et les laisser sécher.
- + Les retailler afin d'éviter le surplus de résine inutile (cela facilite le montage).
- + (ML) : personnellement, nous plaçons ensuite les coupes entre deux plaques de verre (30 x 30 cm), à température ambiante, durant 24 à 48 heures, afin de les rendre bien planes et faciliter le montage ou le stockage.

Chapitre 9. LE MONTAGE DES COUPES

- + Il se fera entre LPO et LCO ; personnellement, notre choix va sans hésitation vers les LCO rondes pour le montage définitif ; nous utilisons des LPO à bande inscriptible.
- + Les coupes sèches ne peuvent pas être montées dans n'importe quel milieu : dans la plupart des cas, la bande de plastique laiteux sera visible. Nous avons testé 5 milieux de montage conventionnels : PVALPh (à proscrire, car il décolore les coupes), BC (mauvais résultats), Aquatex, Histolaque & Neo-Entellan donnent des résultats variant de B- à TB, et ces 3 milieux polymérisent très vite.
- + Il est beaucoup plus judicieux de monter la coupe dans la résine d'inclusion : en effet, comme les indices de réfraction sont identiques, la partie non colorée devient quasi invisible.

Technique.

- + On a intérêt à utiliser une résine vieille de quelques jours (ainsi, elle est plus épaisse et la coupe ne gondole pas aussi facilement).
- + Envisager une série de lames à monter pour éviter le gaspillage de résine.
- + La veille, sortir du réfrigérateur un microtube (1,5 cc) contenant de la résine (il va servir pendant plusieurs jours et s'épaissir de plus en plus).
- + Lui ajouter en dernière minute, une goutte (voire 2) de durcisseur : ensuite, la résine d'inclusion doit être utilisée très vite.
- + Avec une tige de verre (5 mm de diamètre), déposer une grosse goutte de résine au milieu de la lame PO.
- + Avec l'extrémité de la baguette de verre imprégnée de résine, transférer une coupe colorée dans la grosse goutte de résine au milieu de la lame.
- + Toujours avec l'extrémité de la baguette, orienter convenablement la coupe tout en l'immergeant entièrement dans la résine.
- + Positionner la lame CO en la présentant de biais (pour éliminer les éventuelles bulles d'air).
- + Retourner la lame PO face vers le bas et la déposer délicatement sur une quadruple couche de papier absorbant : immédiatement, l'excès de résine diffuse dans ce dernier.

Surtout, ne pas placer la lame préparée dans l'étuve, car sous l'action de la chaleur, la coupe va ressembler à de la tôle ondulée, dans 99 % des cas.



- + Changer la couche de papier absorbant et y positionner à nouveau les lames, face vers le bas.
- + Poser une petite masse métallique sur la lame préparée (par exemple un poids de 5 g), durant 12 h, afin d'éliminer le solde du surplus de résine (cela permet d'observer au grossissement 100x, sans toucher la lame avec l'objectif → personnellement, j'utilise plutôt une pince à linge (beaucoup plus facile à manipuler).
- + Retourner les lames face vers le haut, les numéroter éventuellement,

les marquer des indications nécessaires et suffisantes, vérifier le bon état de la coupe au microscope.

- + S'il manque de la résine (c'est fréquent dans les coins des lames CO carrées), il suffit alors d'en déposer une gouttelette avec la baguette en verre juste au bord de la lamelle → le vide se comble par diffusion.
- + Laisser polymériser durant 2-3 jours à température ambiante.
- + Éventuellement, luter au vernis à ongle incolore.
- + Ranger les préparations dans une boîte ad hoc durant 3 à 4 semaines jusqu'à polymérisation totale.
- + Nettoyer les surplus de résine et les taches avec un morceau de chiffon ou de papier absorbant imbibé d'acétone.
- + Vous êtes maintenant l'heureux possesseur d'une coupe qui va se conserver durant des dizaines d'années (35 ans de recul à ce jour).

Chapitre 10. LES RÉSULTATS

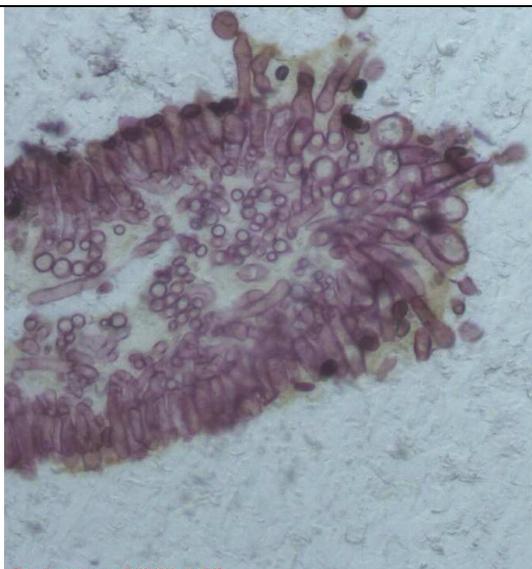


Photo: Marcel Lecointre - 19/02/2010 - 16:45:27

Bout de lame chez *Pseudoclitocybe cyathiformis*



Macrocystides multidigitées de *Mycena metata*

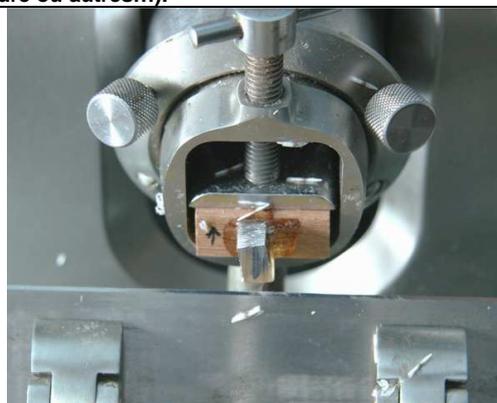
Quelques vues du matériel et des coupes :



La verrerie utilisée pour les manipulations diverses. Tout cela peut être remplacé à moindre frais par de la verrerie « quotidienne » (pots à confiture ou autres...).



Plan de travail avec microtome et réchaud. Il est impératif de travailler dans une pièce très bien ventilée.



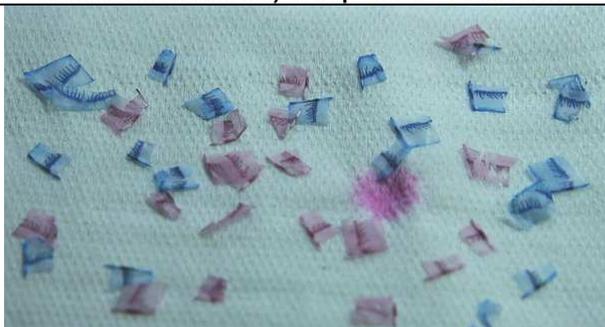
Détail du microtome avec le bloc d'inclusion en place pour la coupe.



Moulage des blocs dans des capsules PVC (couvreilles de boîtes à médicaments) → trop difficile à démonter.



Inclusion dans des supports de bougies à chauffe-plat → excellent : rien de mieux jusqu'à présent.



Des coupes en train de sécher, à la sortie du bain de coloration.



Les coupes retillées et mises en forme, sont prêtes pour le montage.

La microscopie des Polypores et Corticiés (« Croûtes »).

Marcel Lecomte, Jean-Marie Pirlot, Gérard Trichies (auteur également des croquis et photos)

Scientifiquement, les Polypores et les Croûtes appartiennent à la classe des Basidiomycètes, à l'ordre des Aphylliphorales⁵³. Ils peuvent être étudiés en toute saison, car ils se développent tout au long de l'année ; la seule manière de travailler correctement, est d'en réaliser la microscopie : sans cela, il nous paraît difficile d'arriver à un résultat probant. Si les spécimens sont séchés, ils peuvent être ramollis avec du KOH ou du rouge Congo ammoniacal.



couvre-objets car le débutant en cassera souvent, sur des sujets **coriaces**⁵⁶. Le gros problème réside dans l'épaisseur des coupes qui doivent être très minces. Mais avec un peu d'entraînement, et l'aide d'une bonne lame Gillette (*nous n'avons pas signé de contrat publicitaire avec cette société ...*), nous réussirons de belles coupes. L'utilisation de la loupe stéréoscopique s'avère, à notre avis, indispensable pour les réaliser. A défaut de microtome, nous conseillons les coupes en triangle, dont on conservera ensuite la partie la plus fine.

Un beau polypore : *Hexagonia nitida*



Une belle croûte : *Phlebia subochracea*

Lorsque l'on travaille sur un polypore et qu'on ne trouve pas directement de spores, il n'y en aura pas : inutile de tenter de provoquer la sporulation ; par contre, les croûtes récoltées avec leur support peuvent parfois générer des spores si on attend quelques jours⁵⁴. On entendra parfois dire que ces dernières ne sont pas très attirantes ou spectaculaires⁵⁵, ce qui est une erreur à notre sens.

La microscopie de ces groupes nécessite de la patience : il faut s'en armer, et d'une belle quantité de lames

⁵³ Ce terme a une utilité pratique et une connotation anecdotique, sans valeur scientifique réelle. Quant à la position systématique de ces champignons, elle est actuellement très variée (et variable, hélas !) car ils sont répartis dans un grand nombre d'ordres différents (par exemple, selon Boidin, 1998) : Athélales, Botryobasidiales, Cératobasidiales, Hyphodermatales, Phanérochaetales et autres Phlébiales, pour n'en citer que quelques-uns.

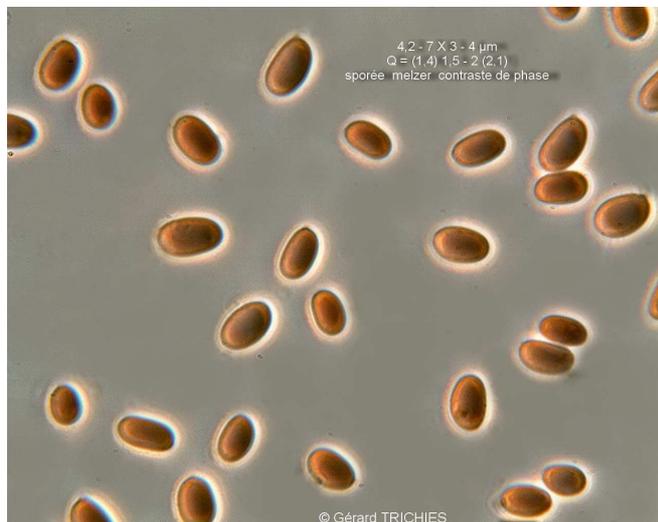
⁵⁴ Hormis pendant leur prime jeunesse et à leur vétusté, les Corticiés se montrent fertiles plus longtemps que les champignons charnus, car ils produisent généralement un hyménium au fonctionnement durable : les basides nouvelles se glissent entre les basides flétries et les dépassent, l'hyménium s'épaississant peu à peu (il est dit alors « crassescens »). Le basidiome est constitué d'abord d'un subiculum, couche plus ou moins épaisse d'hyphes basales le plus souvent parallèles au substrat, sur lequel se développe un sous-hyménium qui génère finalement l'hyménium fertile. Il est souvent très facile de vérifier à la loupe la présence d'éventuelles cystides émergentes : elles donnent un aspect velouté à la surface hyméniale. Si on n'observe que des hyphes dans un prélèvement correctement effectué, on se trouve sans doute en présence d'un primordium ou d'un spécimen inactif ou vétuste dépourvu de strate hyméniale. Dans ce cas, sauf exception notable, il est inutile de poursuivre toute tentative de détermination de l'échantillon.

⁵⁵ Quand on s'y intéresse d'un peu plus près, et, a fortiori, si on le fait avec passion, on se rend vite compte que ces grands méritants, si injustement méprisés de la mycologie de salon, présentent une grande diversité d'aspect, aussi bien en ce qui concerne le relief de leurs basidiomes que les nuances de leur coloration. S'il est vrai, cependant, que beaucoup d'espèces offrent des teintes plutôt claires, il n'en reste pas moins qu'au gré des découvertes, toute la palette des couleurs peut apparaître dans ce groupe. Et d'ailleurs, entre nous, cette variabilité chromatique ou formelle est-elle vraiment plus prononcée chez les agarics ou les inocybes ? Et que dire, à ce point de vue, de la monotonie des *Hebeloma*, des *Conocybe* et autres *Galerina* ?

⁵⁶ La plupart des espèces concernées ne le sont pas, cette épithète qualifiant une texture souple et résistante comme le cuir. Les champignons dits coriaces (majoritairement des polypores) le sont en raison de leur structure généralement (di- ou) trimittique, c'est-à-dire composée d'hyphes conjonctives (ou ligatives), et aussi, le plus souvent, d'hyphes squelettiques, en plus des indispensables hyphes génératrices. Au contraire, les Corticiés sont, en majorité, de consistance plutôt tendre et fragile, quand ils ne sont pas franchement poreux ou aranéeux, à cause de leur système hyphal monomitique. Ils s'étalent comme une croûte sur leur support (ou substrat) souvent ligneux.

Deux évidences quand même :

- La littérature sur le sujet est moins accessible, car les ouvrages « grand public » ou de vulgarisation ne traitent que de la mycologie au sens populaire et traditionnel de ce terme, c'est-à-dire généralement des champignons munis d'un pied et d'un chapeau. Et la littérature spécialisée, à visée plus scientifique, n'est le plus souvent que le reflet de cette situation et son prolongement logique.
- L'identification des récoltes est plus sûre, étant basée sur des critères plus stables, le plus souvent de nature microscopique, car liés à la reproduction de l'espèce, laissant à cette fin une part moins belle à des caractères plus subjectifs, sujets à une plus grande variation car tributaires des conditions extérieures de croissance (habitus particulier, couleur, odeur...).



Spores de *Parmastomyces mollissimus*, observées dans le melzer

Le matériel et les colorants

Notre ami Gérard Trichies⁵⁷, spécialiste français des Aphyllophorales, considère que l'utilisation du contraste de phase est indispensable. Comme colorant, il n'utilise quasi que **le réactif de Melzer**⁵⁸, ce qui lui permet en même temps de vérifier si la réaction est amyloïde, dextrinoïde, ou nulle.

D'autres possibilités :

L'eau : pour connaître la physionomie réelle des organes.

Le rouge Congo : il est intéressant de procéder par capillarité en introduisant le colorant sur le côté de la lamelle porte-objet et

en épongeant de l'autre. Il va colorer la paroi des basides.

La phloxine B : d'abord rincer avec un peu de potasse et ensuite à nouveau par capillarité, introduire la phloxine. Remettre de la potasse pour rincer et avoir une coupe claire. La phloxine colore le cytoplasme.

Le bleu coton : utilisé pour mettre en évidence la cyanophilie éventuelle.

Le bleu de crésyl permet la mise en évidence de la paroi métachromatique des spores de certaines récoltes comme chez les *Xenasma*.

Les sulfoaldéhydes (dont la sulfovanilline et le sulfoformol), pour tester le contenu des gléocystides présentes. Ils donnent, dans certain cas, des réactions comparables à celles observées chez les Russules.

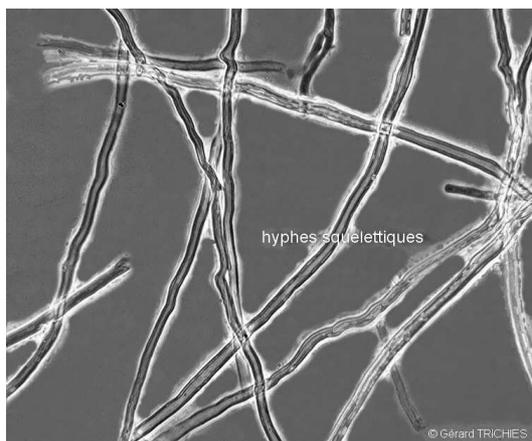


Spores de *Tomentella bryophila*

⁵⁷ Il préfère travailler sur du matériel frais, mais constitue un herbier où figure, pour chaque récolte, un exsiccatum accompagné -sauf exception- d'une ou de plusieurs sporées recueillies sur lame en plastique. Les exsiccata comprennent l'intégrité du champignon, depuis les hyphes primordiales incluses dans le substrat jusqu'à son hyménium fertile, car ils comportent quasi toujours un morceau de substrat. Ceci va permettre, le cas échéant- en particulier pour leur examen ultérieur- de les regonfler assez facilement en les réhumidifiant par flottage dans un récipient rempli d'eau. Il est ainsi possible, dans ces conditions, de ravivifier le matériel sec et même, dans certains cas, d'en obtenir une nouvelle sporée.

Adresse de contact : Gérard Trichies, France - trichies.gerard@sfr.fr

⁵⁸ (« Devant un champignon inconnu, il faut commencer par le melzer... » affirme le grand spécialiste Jacques Boidin). Cette technique permet d'éviter la coloration des éléments hyalins et offre une grande lisibilité de la préparation, en particulier dans l'appréciation de l'épaisseur des parois et des ornements éventuels des spores. Le melzer présente d'ailleurs deux autres avantages non négligeables. D'abord, comme c'est un milieu visqueux qui ne s'évapore que lentement, il procure un grand confort en autorisant une plus longue observation en continu. Mais surtout, en lumière claire (il suffit, pour ce faire, de retirer instantanément la lame de phase), il permet l'indispensable mise en évidence de l'amyloïdie ou de la dextrinoïdie de certains organes examinés : ceci est d'une importance souvent décisive dans le processus de détermination du spécimen étudié, sachant, par exemple, que seules 10% environ des espèces en cause sont concernées par l'un ou l'autre de ces deux caractères.



Techniques diverses

++ Coupe avec une lame de rasoir mécanique (de préférence sur du matériel frais, et sous la loupe binoculaire, en s'assurant bien qu'elles comportent une partie de l'hyménium).

++ Laisser mijoter la coupe dans de la potasse (KOH) à 5% ; une solution à 10% peut être aussi utilisée mais n'est pas conseillée car elle va dissoudre certains éléments comme les cristaux.

++ Après un certain moment (ne pas vouloir travailler trop vite), la propriété regonflante du KOH va agir et permettre de dissocier le prélèvement et de réaliser une première observation.

++ Pour arriver à une bonne observation, il est impératif, en dernier ressort, de bien dissocier le fragment prélevé. Penser aussi, le cas échéant, à effectuer plusieurs prélèvements successifs, par exemple vers le centre du basidiome (partie la plus mûre) et à sa marge (où se découvre généralement le subiculum nu).

Méthode d'observation préconisée par J.M. Pirlot⁵⁹ :

- Placer le spécimen dans du KOH.
- Introduire ensuite le rouge Congo par diffusion.
- Rincer à l'ammoniaque.
- Ensuite, faire pareil avec la phloxine (les hyphes génératrices se colorent en rose).
- Laver à nouveau à l'ammoniaque pour obtenir une préparation claire.
- Regarder avec l'objectif x40, pour avoir une vue d'ensemble, avant de passer à x100.



Les observations

Lors de l'observation microscopique, les éléments suivants vont être essentiels à noter.

Le mitisme (outre les hyphes génératrices⁶⁰, contrôler la présence éventuelle d'hyphes squelettiques et d'hyphes conjonctives (ligatives), (ces deux dernières étant dépourvues de cloisons). Toutefois, il faut noter que la grande majorité des espèces de Corticiés ont une structure strictement monomitique.

Cela va donner lieu à divers systèmes hyphaux :

Soit monomitique : uniquement des hyphes génératrices ; soit dimitique : 2 types associés ; soit trimitique : 3 types associés.

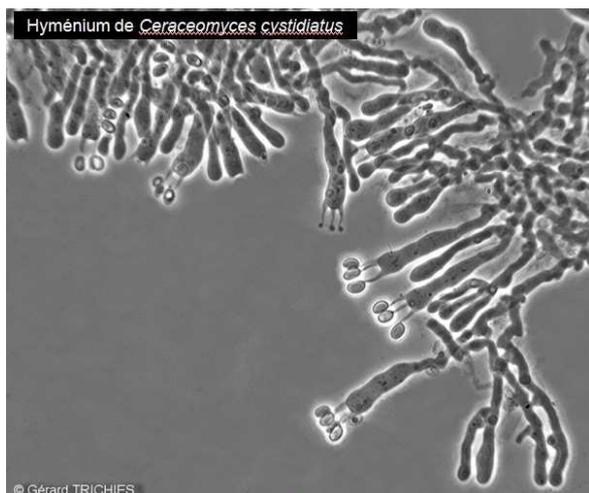
Le type de cloisons : simples ou pourvues de boucles. Noter que ces dernières peuvent être rares, localisées ou inconstantes. On sera attentif à la cloison qui peut être « fausse » ; en fait, ce qu'on voit

⁵⁹ Jean-Marie Pirlot, rue des Bluets, 7 – B-6840 NEUFCHÂTEAU – jeanmarie@tinel.be

⁶⁰ Les hyphes génératrices sont septées ; on va donc souvent les trouver plus en surface.

Chez les polypores, lorsqu'on regarde les hyphes près du substrat, elles sont souvent bouclées ; s'il y a des boucles, les basides sont presque chaque fois bouclées ; faire attention à l'endroit de prélèvement, car on pourrait croire qu'il y a des boucles, alors qu'il n'y en a pas ; prélever plus en profondeur. Leur diamètre varie selon l'espèce rencontrée ; elles sont souvent ramifiées. Elles peuvent être gonflées en ballon, incrustées ou non ; les cristaux ont des formes diverses : étoiles, cylindres, pointes. Les hyphes peuvent aussi former des cordons mycéliens formant comme des ficelles, qu'il est parfois impossible de dissocier dans la préparation. Elles peuvent contenir des matières huileuses (inclusions lipidiques).

alors est une image due à la rétraction du cytoplasme : elle est souvent en arc de cercle. On s'en aperçoit en regardant la paroi de l'hyphe : la cloison véritable a la même épaisseur que la cloison de l'hyphe.



Les cystides éventuelles peuvent présenter des formes remarquables et être couronnées de cristaux. Elles sont souvent déterminantes pour caractériser une espèce ou un genre tout entier. Chez les Aphyllophorales, on peut observer des cystides très diverses, beaucoup plus diversifiées que chez les Agaricales.

Lorsqu'on veut voir correctement les gléocystides, on utilise un sulfoaldéhyde : cela les met en évidence par rapport aux basides, en cas de réaction positive. Elles se dissolvent dans le KOH ; on les observera donc dans le melzer, ou dans l'eau.

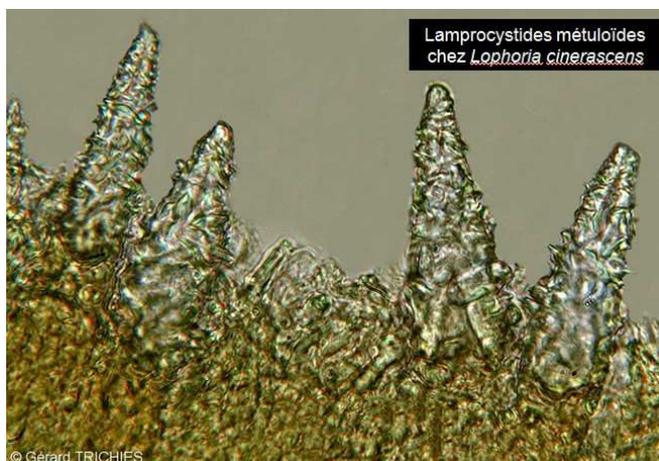
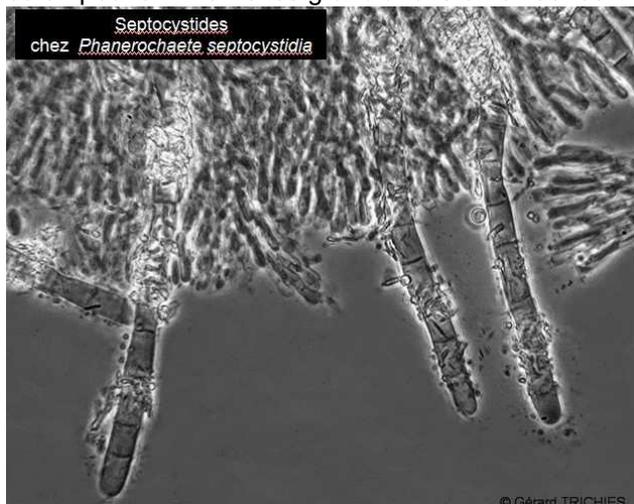
On peut trouver aussi des cystides bouclées, contenant des gouttelettes.

Les basides peuvent être très variables. Elles sont bouclées ou non, terminales ou pleurales, si-

tuées parfois au milieu de l'hyphe, très longues, renflées, urniformes, pédicellées. Leur silhouette et leur conformation orientent souvent la détermination d'une façon rapide et décisive. Le contenu est intéressant aussi à observer : il peut être granuleux et on mettra ces granulations en évidence avec du bleu coton, si elles sont cyanophiles. Elles peuvent être monosporiques, bisporiques, tétrasporiques (en grande majorité), hexasporiques, octosporiques (genres très précis).

La répétobaside peut se former à partir d'une ancienne baside, chez certaines espèces.

Les spores ont des formes très variées : fusiformes, naviculaires, en pépin de citron, en forme de haricot. Elles peuvent être lisses ou verruqueuses, anguleuses, réticulées. Elles réagissent aux colorants et réactifs usuels : le melzer et le bleu coton peuvent mettre les granulations en évidence.



Il est important de mesurer les spores prélevées sur des sporées préalablement obtenues. Ceci permet « *non seulement de s'assurer du bon état végétatif du champignon, mais surtout est indispensable pour des mesures précises de spores projetées mûres. En effet, sur le basidiome se trouvent, à côté de nombreuses spores immatures, des spores déformées par germination et des spores étrangères. Il faut mesurer les spores bien placées de profil* » (J. Boidin).

Technique utilisée par G. Trichies : les sporées sont déposées sur une lame plastique transparente (épaisseur de 0,1 à 0,5 mm), marquée à l'aide de Tippex (correcteur blanc) afin de bien repérer la face porteuse supérieure. Si possible, obtenir 2 (ou un nombre pair) de sporées

afin de pouvoir poser les 2 lames face contre face, et les enfermer dans un emballage de papier inscriptible. De cette manière, il est possible d'avoir recours à tout moment à la sporée pour un contrôle ou une vérification.

Dans l'hyménium, se trouvent les basides et parfois des éléments stériles, dont les cystides. Juste en dessous, on trouve le subhyménium, formé d'hyphe génératrices +/- enchevêtrées. En dessous du précédent, se trouve le subiculum.

On peut trouver aussi d'autres éléments hyméniaux stériles caractéristiques, comme des dendrophyses, des acanthophyses, des stéphanocystes, des dichophyses (se séparant en deux et devenant noires au KOH), des soies (asterosetae), etc.



En hommage à Claude Lejeune (* en 2010), nous vous présentons un courrier échangé le 11 décembre 2004, sur ce sujet.

« Les Corticiacées compensent l'archaïsme de leur morphologie et leurs modestes atours (c'est un euphémisme) par la beauté plastique de certaines de leurs cellules, à l'origine d'authentiques coups de foudres mycologiques et micrographiques : ces champignons scellent indiscutablement ces deux passions.

C'est sur la face inférieure du bois mort qu'on fera les plus belles récoltes. Il suffit en général de "s'attabler" à un vieux tas de bois et de le démonter en inspectant méthodiquement les morceaux : les branches du dessous, et notamment celles qui sont restées au contact du sol (humidité préservée), sont les plus riches

en croûtes.

Récolter au couteau ou à la serpette avec une tranche de substrat (en général, écorce ou bois à nu : attention, on se blesse facilement !) ; transporter tes spécimens dans du papier journal pour éviter une trop brutale déshydratation, et face inférieure maintenue dans sa position originelle⁶¹.

Ensuite, réhydrater éventuellement (en imprégnant d'eau le papier journal, par exemple, et en laissant la croûte y séjourner un quart d'heure) puis :

- gratter, s'il s'agit d'un Corticié pelliculaire, "crémeux" ou très finement membraneux
- réaliser une très fine coupe plus ou moins radiale si ta croûte est plus épaisse
- colorer : rouge Congo ammoniacal, ou mieux : KOH (ou soude domestique) à 5% + rouge Phloxine B ; ou, encore mieux : les deux, successivement⁶²
- recouvrir d'une lamelle, puis écraser à la fois délicatement et fermement ta préparation (p. ex. avec la gomme emboutie sur un crayon) et observer à x 400 au minimum, puis détailler en immersion.



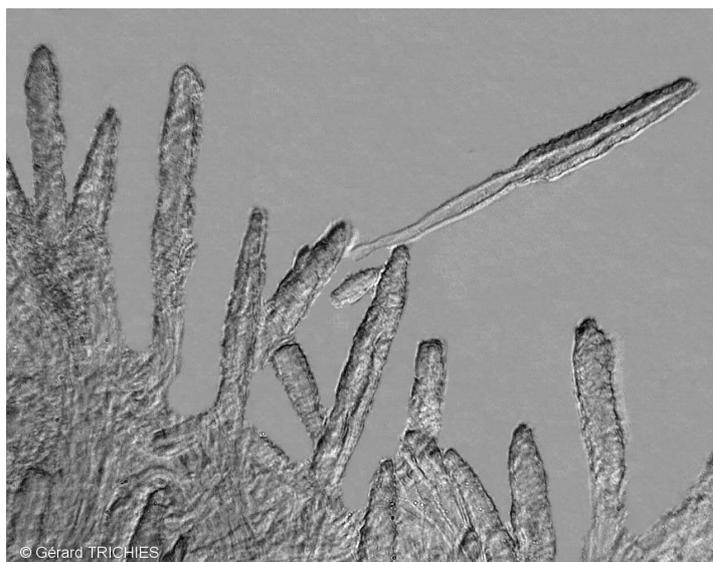
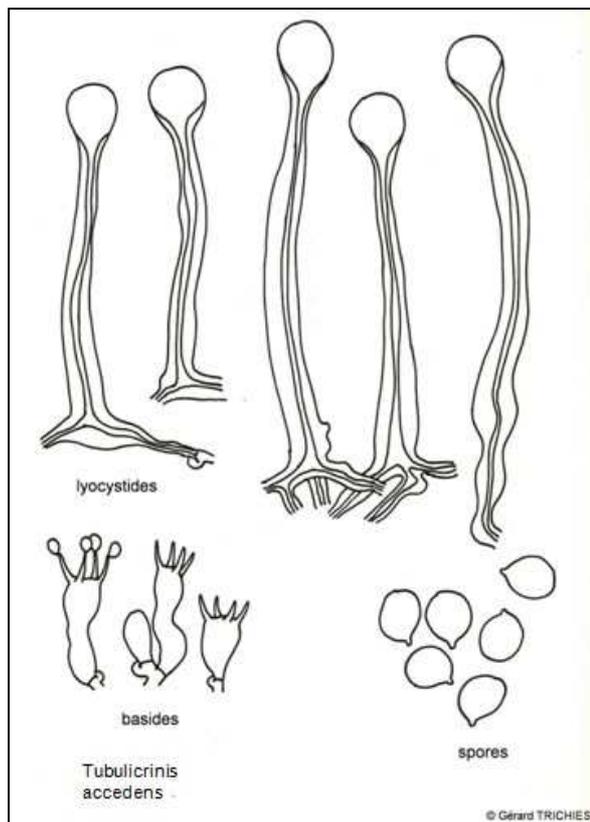
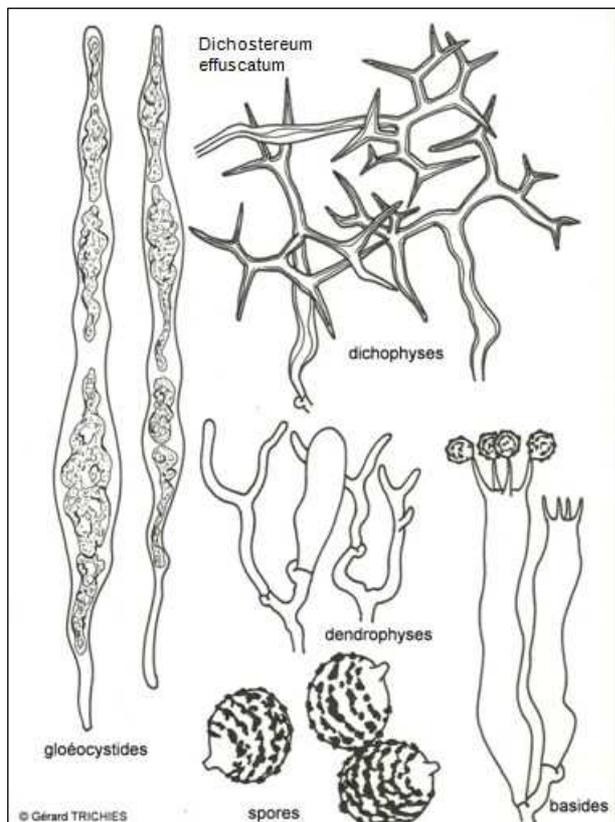
Les Corticiés ou croûtes "résupinées" (= totalement étalées sur leur support et donc privées de "chapeau" et de pied) ont une structure simple : une assise externe de cellules allongées dans le sens du support, qui se redressent progressivement et dans le prolongement desquelles s'épanouissent les basides et différents types de cystides (éléments stériles entre les basides, ou immergés dans la trame même de la croûte). Ce sont ces cystides qui peuvent être étonnamment belles : couvertes de cristaux, encapuchonnées de gros globules, gavées de sucres qui noirciront ou bleuiront dans certains réactifs, etc.

D'autres Corticiés ont évolué vers une plus grande différenciation : amorce de "chapeau" (un bout plus ou moins grand de la croûte se détache légèrement du substrat) : on dit alors qu'ils sont "étalés-réfléchis".

Ils sont primitifs, certes, mais leur rôle écologique est important (vital même) : ils sont les tout premiers à s'attaquer au bois mort, à le décortiquer et (ou) à préparer l'arrivée des autres champignons "lignivores" qui, tous armés de puissants enzymes, vont réaliser cette "extraordinaire performance biochimique" (l'expression n'est pas de moi : je suis hélas nul en chimie...) qui consiste à décomposer la cellulose et la lignine et, partant, à recycler le carbone ».

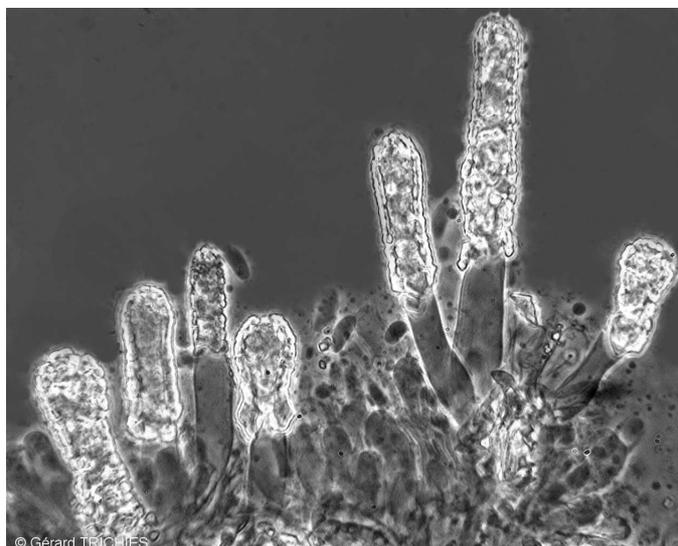
⁶¹ Les croûtes abandonnées un jour ou une après-midi, dans une boîte humide, continuent de se développer. Leur cellules, pratiquement réduites à leur "hyménium" (= leur surface fertile, l'usine à spores en quelque sorte) continuent de croître, en respectant le géotropisme. Les cellules d'une croûte séjournant à l'envers s'enchevêtrèrent donc cul par dessus tête.

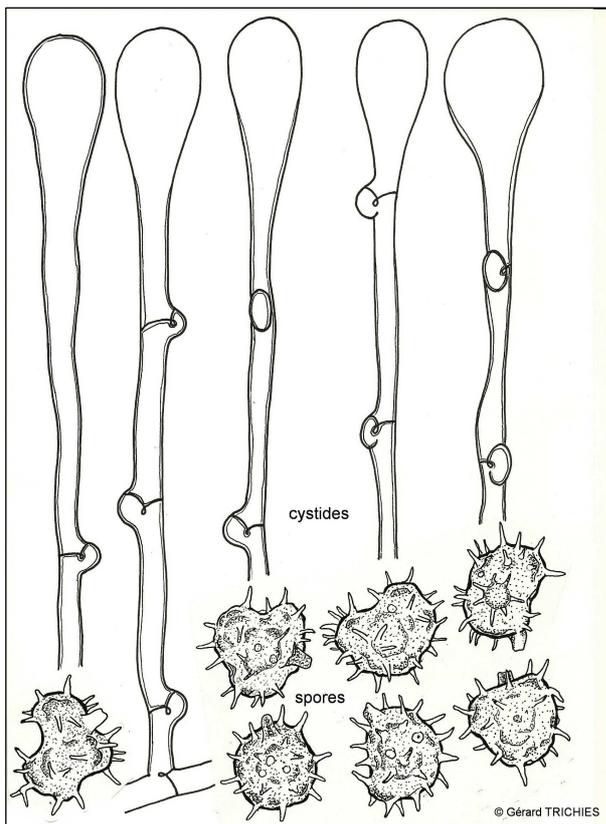
⁶² En mycologie, le rouge Congo est un colorant pariétal (les parois des cellules – hyphes – sont essentiellement composées de chitine). La phloxine B quant à elle colore le cytoplasme. Mais ce n'est jamais que de la « cuisine » : on peut aussi tester d'autres colorants ! La présence d'un alcali aide à regonfler et à dissocier les structures.



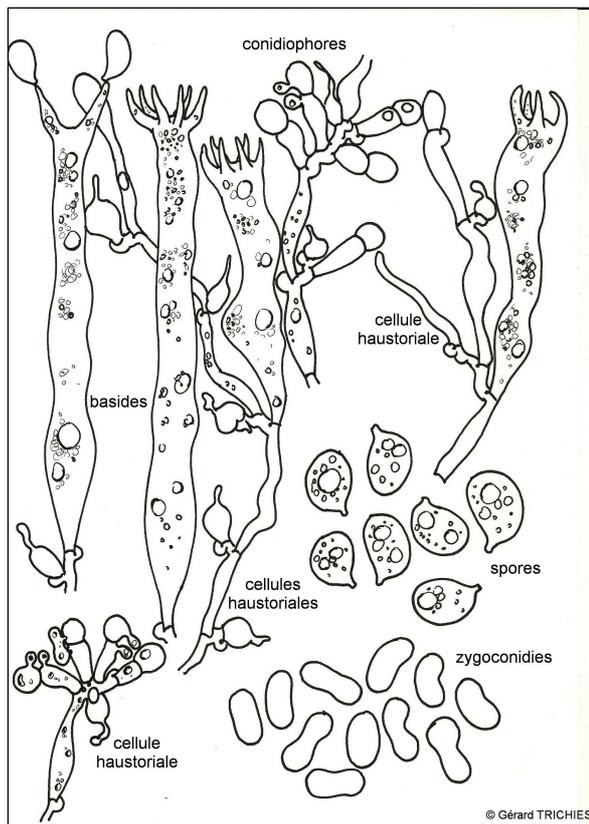
Squelettocystides chez *Cabalodontia (Phlebia) queletii*

Lamprocystides chez *Hyphoderma guttuliferum*

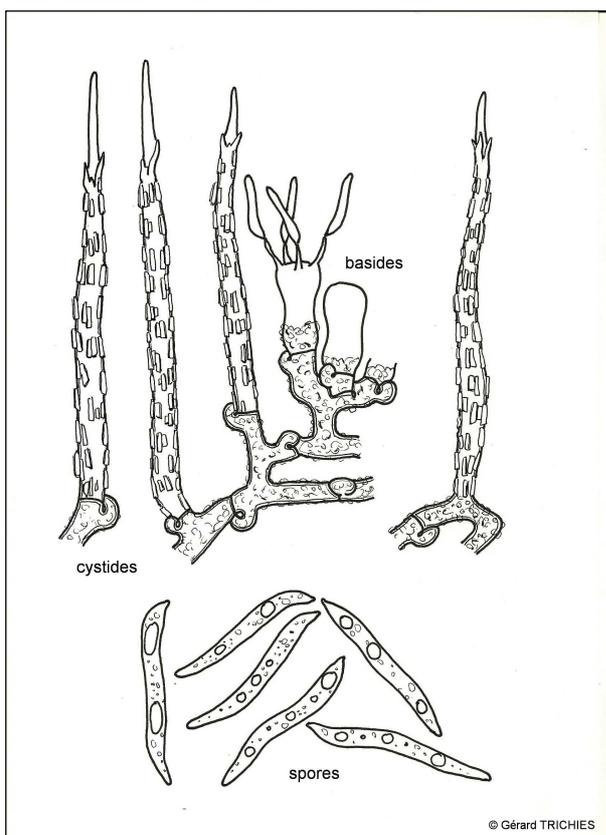




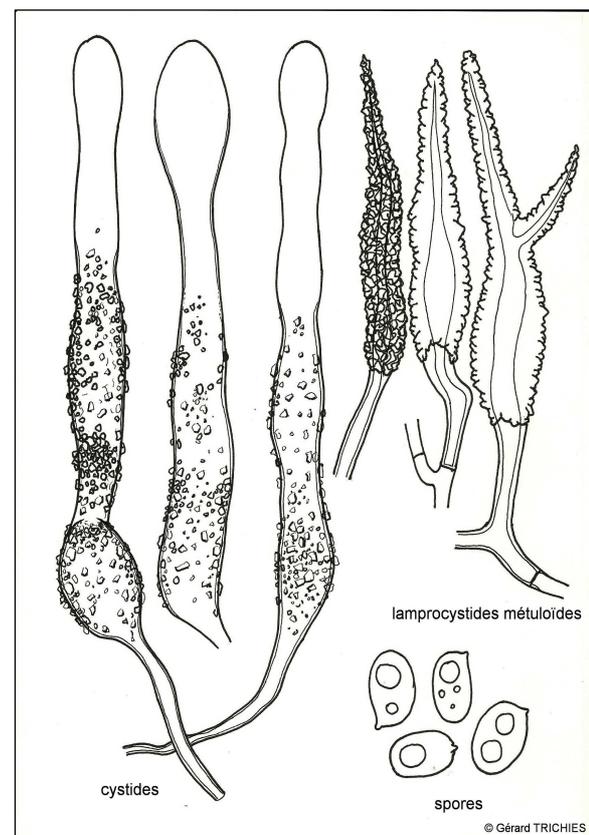
Tomentella pilosa



Syzygospora pallida



Subulicystidium longisporum



Scopuloides leprosa

AIDE – MÉMOIRE

du « petit chimiste mycophile et microscopiste » !

ATTENTION !!! CERTAINS PRODUITS CITES SONT DANGEREUX et peuvent être CORROSIFS, NOCIFs, voire très TOXIQUES ...

Conventions :	
<ul style="list-style-type: none"> Lorsque nous parlons d'un produit à x %, sans autre indication, cela signifie qu'il s'agit d'une solution aqueuse, réalisée dans l'eau bidistillée. Lorsque nous parlons d'eau, il s'agit toujours d'eau bidistillée. Les objets colorés, qui doivent être lavés, le sont (en général) dans le solvant du colorant. 	
Acide acétique $C_2H_4O_2$	A 2 ou 5 %, est utilisé comme ramollisseur pour des espèces un peu coriaces.
Acide chlorhydrique HCl	A 3 ou 5 %, il permet de régresser les coupes colorées à la fuchsine de Ziehl. Mise en évidence de la périspore chez certains coprins.
Acide lactique	Regonflant très énergique des exsiccata.
Acide nitrique + aniline $HNO_3 + C_6H_5NH_2$	Ces 2 produits permettent de réaliser la réaction de Schaeffer sur la cuticule des agarics (si la réaction est positive, l'intersection des 2 produits, appliqués en croix, devient orange rouge vif).
Acide picrique	C'est le seul agent, à notre connaissance, qui soit à la fois fixateur et colorant ; propriété très intéressante : il ne durcit presque pas les tissus, qui restent bien mous.
Acide sulfurique H_2SO_4	à 50 ou 80 %, est utilisé pour les réactions sulfoaldéhydiques (vanilline, benzaldéhyde, pipéronal).
Alcool (éthanol - C_2H_6O - ou méthanol - CH_4O)	Eau et alcool ne font pas bon ménage ! Un colorant en solution alcoolique se lave à l'alcool ; un colorant en solution aqueuse se lave à l'eau. Il est très hygroscopique (avide d'eau) : il contracte fortement les cellules (la moitié de leur volume) et rigidifie les tissus.
Alcool chlorhydrique à 10 %	Pour le nettoyage des LPO, en particulier avant de faire des frottis ou avant montage des diatomées, employer du méthanol chlorhydrique à 10 %.
Alcool faible	Pour obtenir de l'alcool faible, verser de l'eau bidistillée dans de l'alcool, selon les normes des tables de Gay-Lussac ⁶³ .
Alcool pur	L'alcool obtenu par distillation des liqueurs fermentées n'est jamais exempt d'eau. A l'aide de certains agents très avides d'eau (chaux concassée, baryte caustique), on peut obtenir l'alcool à l'état de pureté (alcool absolu). L'alcool éthylique et l'alcool méthylique absolus peuvent servir de fixateurs pour les frottis, mais serviront surtout comme déshydratants. Tenir compte du fait que les

63

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Attention : Le volume final est inférieur à la somme des volumes mis en jeu ! C'est le phénomène dit de « contraction de volume », variable en fonction du titre de l'alcool initial.

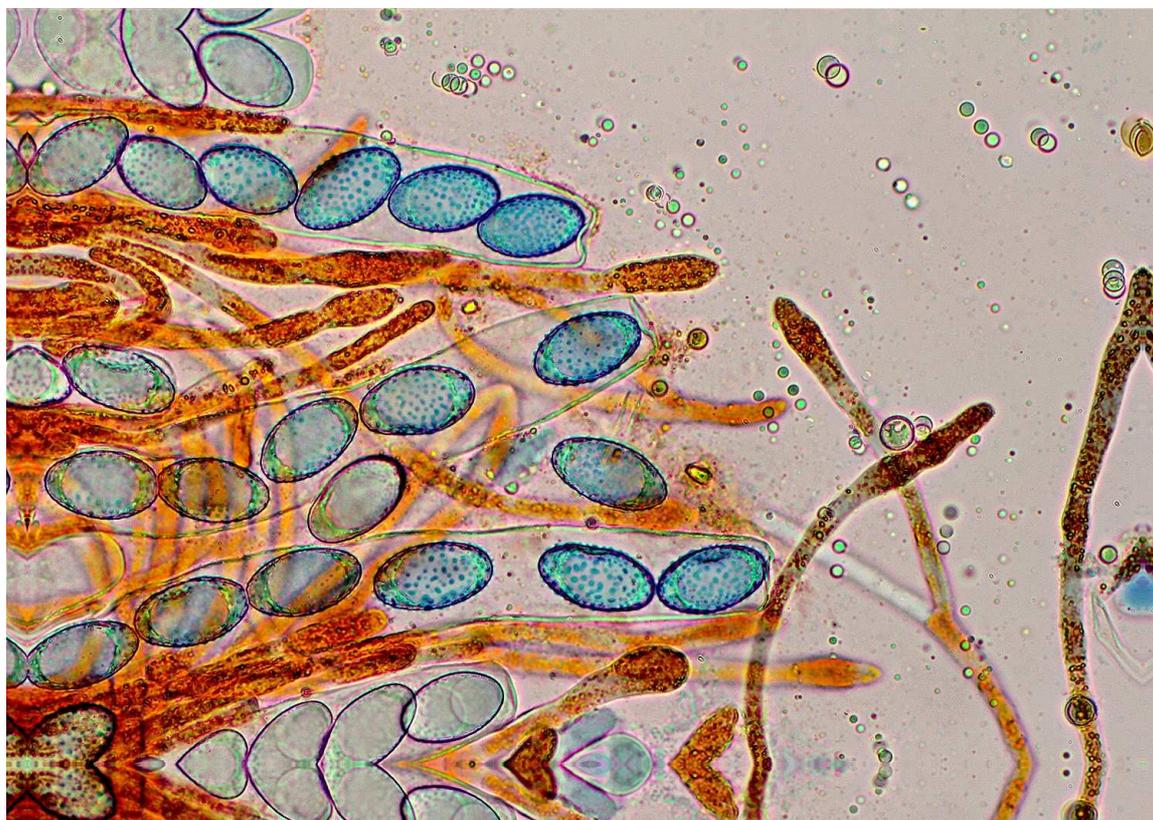
	objets qu'on plonge dans l'alcool contiennent une forte proportion d'eau. Il faudra, pour que la déshydratation soit bonne, appliquer plusieurs bains. De plus, au fur et à mesure de l'utilisation de l'alcool, et afin qu'il ne s'hydrate pas, mettre dans le flacon des petits morceaux de verre, de façon à ce que le niveau de l'alcool soit toujours à la hauteur du goulot de la bouteille. Pour s'assurer que l'alcool est bien absolu, verser quelques gouttes dans un tube à essai, à demi rempli de xylol. S'il ne se produit aucune « louche » (traînée blanchâtre), l'alcool est absolu. Pour déshydrater, après passage dans l'alcool à 90 °, à défaut d'alcool absolu, mettre l'objet dans le benzène, et renouveler plusieurs fois.
Alcool polyvinylique	Milieu de montage aqueux, qui peut être coloré dans la masse avec divers bleus (aniline, méthyle, toluidine), de la fuchsine acide, du rouge Congo.
Ammoniaque NH ₄ OH	Concentrée, elle a le pouvoir de regonfler les exsiccata ou de ramollir les hyphes des champignons frais ; elle met en évidence les chrysocystides (masse réfringente réagissant en jaune) chez les <i>Strophariaceae</i> .
Ammoniaque 50 %	Laver les préparations montées dans le rouge Congo ammoniacal, avant de réaliser des photos.
Aquatex	Milieu de montage définitif pour pièces fragiles, qui polymérise rapidement mais dont le solvant est l'eau → indispensable en mycologie.
Auramine	Utilisée pour la microscopie en fluorescence.
Baume du Canada	Résine de conifère qui permet de conserver définitivement des préparations microscopiques → très gros inconvénient en mycologie : il nécessite une déshydratation complète, ce qui « ratatine » les éléments fragiles. Déposer sur une LPO deux ou trois gouttes de baume, la préparation sortant du xylol. Porter l'objet rapidement au milieu du BC ; l'y enfoncer de façon à ce que le xylol qui imprègne l'objet ne s'évapore pas complètement ; recouvrir avec une LCO si nécessaire ; appuyer très légèrement ; laisser sécher la préparation à plat. Avec le BC sirupeux, un bon collage demande plusieurs jours. Pour activer le séchage, on pourra placer la préparation près d'un radiateur. Mais n'exagérez pas la chaleur ; soyez patients, c'est une condition essentielle de réussite en microscopie. Le BC sirupeux trouvé dans le commerce est trop épais, s'il n'a pas été dilué spécialement pour réaliser des préparations. Il sera nécessaire d'ajouter du xylol pour obtenir un baume suffisamment fluide. Vous vous rendez compte que le BC est prêt à l'emploi, en plongeant un agitateur dans votre bouteille : le sortir → il faut que la goutte se détache doucement mais nettement, sans faire de « fils ».
Benzaldéhyde	Mélangé extemporanément avec de l'acide sulfurique à 80 %, il noircit les pilécystides de certaines russules (on parlera alors de SBA+).
Bleu d'aniline	Ascomycètes : coloration des asques et des ascospores.
Bleu de méthyle (bleu coton) lactique ou lactophénolé	Laver les préparations montées dans le bleu lactique, avec du lactophénol ; permet de mettre en évidence l'ornementation sporale des Ascomycètes. Chez les Cortinariales, forte cyanophilie des spores. Il est parfois appelé bleu lactique de Guégen.
Bleu de crésyl	Excellent colorant, encore trop souvent délaissé par les mycologues ; donne d'excellents résultats pour la métachromasie et les cuticules de russules.
Bleu de méthylène	Colorant basique, ou nucléaire (basophilie et cyanophilie sont synonymes).
Bleu de méthylène phéniqué	Coloration des Protozoaires pendant quelques minutes. Idem pour les Infusoires, les Rhysopodes, les Algues.
Bleu de toluidine	Excellent colorant, trop souvent délaissé par les mycologues ; il colore en bleu tous les éléments amyloïdes. Bleu de toluidine phéniqué : même emploi.
Bleu trypan	On peut utiliser cette coloration pour visualiser les hyphes de champignons et les Straménopiles (organismes eucaryotes présentant au cours de leur cycle des cellules biflagellées, à deux flagelles de structure différente : un lisse et un plumeux).
Carbolfuchsin de Clémenton	Colore en violet foncé les incrustations acido-résistantes des hyphes primordiales de la cuticule de certaines russules.
Carmin acétique	Permet de mettre en évidence la sidérophilie des cystides chez les <i>Lyophyllum</i> notamment ; est utilisé pour l'observation des noyaux et le comptage des chromosomes, qui sont fortement mais finement colorés.
Carmin aluné	Colorant très électif des noyaux et des membranes végétales non lignifiées pour petits objets : au sortir de l'eau, plonger l'objet dans le produit, laisser colorer de 30 minutes à 24 heures. Laver à l'eau. En botanique, il est d'un usage courant. Coloration double avec le vert d'iode ou le bleu de méthylène phéniqué ; la deuxième coloration est très rapide.

Carmino vert de Mirande	Mélanger en parties égales du carmin aluné et du vert d'iode ; utilisé en botanique. Vous obtiendrez une double coloration d'un très bel effet. Les parties celluloses seront colorées en rouge violacé, les tissus lignifiés en vert.
Chloral lactophénolé	Permet de déshydrater les tissus aqueux en quelques minutes, sans contraction ni retrait. Éclaircissant puissant. Certains objets tels que poils, pattes de mouches, d'abeilles, de hannetons, qui ne seraient pas suffisamment éclaircis par le lactophénol, seront traités de la même façon par le chloral lactophénolé.
Chloral phénolé	Éclaircissant puissant, recommandé pour les insectes ou parties d'insectes ; cristallise facilement ; dans ce cas, faire fondre doucement le produit au bain-marie. Il a l'avantage de déshydrater (c'est-à-dire de faire disparaître l'eau des tissus) tout en éclaircissant, ce qui permet un montage direct dans le BC. Changer le produit 3x. Pour activer son action, le chauffer en passant sur la flamme de la lampe à alcool. Les objets traités de cette façon ne seront pas colorés.
Coumarone	Milieu de montage peu utilisé, même si l'indice de réfraction est plus élevé que celui du BC. Recommandé pour le montage des diatomées, spongiaires, radio-laires, etc. Si la coumarone s'épaissit, ajouter quelques gouttes de xylol.
Eau albumineuse	À utiliser pour le collage des spores et la réalisation d'un frottis.
Eau bidistillée	Premier milieu d'observation, et le seul capable de révéler tous les éléments constitutifs (ils sont nettement mis en évidence par le contraste de phase, ou le DIC). Elle doit être préférée à l'eau du robinet, qui est souvent très calcaire et peut générer des précipités ou un changement de couleur.
Eau de Javel	Voir hypochlorite de soude.
Eau glycinée	Comme elle est plus visqueuse, elle est intéressante pour limiter les déplacements des spores dans une préparation, et ainsi, faciliter la photographie ; l'évaporation est ralentie. À utiliser avant montage dans la gélatine glycinée.
Eau physiologique	Pendant vos manipulations (coupes, examens au microscope à l'état frais), les tissus animaux et végétaux seront placés dans l'eau physiologique au chlorure de sodium (dans 100 grammes d'eau, incorporer 6 grammes de sel de cuisine) ; la dessiccation rendrait les pièces inutilisables.
Éosine	C'est un colorant des plus courants, acide (acidophilie et éosinophilie sont synonymes) et plasmatique : il colore le contenu de la cellule en rose. En surcolorant, régresser dans l'alcool faible à 45° ; il met en évidence les éléments musculaires ; ces derniers seront roses sur fond à peine rosé. L'éosine colore les petits organismes animaux et végétaux et peut être utilisée également pour étalement sur LPO. Coloration combinée, après coloration par l'hémalum. Un mélange en parties égales d'éosine à 1% avec orange G. à 1%, constitue la plus classique des colorations combinées : colorer 30 minutes ou plus, laver abondamment, déshydrater rapidement. Les noyaux sont colorés en bleu foncé, le cytoplasme en rose, le plasma en orange.
Essences diverses	Essence de girofle, de lavande, de cannelle : ces essences végétales (huiles essentielles), servent comme éclaircissants en zoologie.
Fixateur au picroformol de Bouin	Fixateur universel, le picroformol convient pour toutes sortes de travaux, aussi bien en mycologie, en botanique qu'en zoologie. Les objets pourront séjourner longtemps dans ce liquide. Les organismes sont fixés très rapidement (une demi-heure à quelques heures) et demanderont de 3 à 8 jours pour les objets destinés à faire des coupes. Il y aura intérêt à prolonger la fixation. Après fixation, pratiquer un lavage abondant. On peut l'employer tel quel, mais il est préférable d'ajouter une goutte d'acide acétique à 20 gouttes de picroformol.
Formol (ou formaldéhyde) CH ₂ O	C'est un bon fixateur, mais qui durcit fortement les tissus ; le formol commercial est très impur (il contient de l'acide formique et du méthanol) et très acide (il doit être neutralisé avant emploi avec du carbonate de calcium par exemple). Il nous paraît plus indiqué d'utiliser du formol de laboratoire ; la fixation par le formol renforce nettement les affinités basophiles.
Fuchsine acide (ou lactofuchsine)	Coloration progressive, en rose fuchsia, du contenu de tous les types de spores (ascospores, basidiospores, écidiospores, urédospores, téléospores), et du cytoplasme en général.
Fuchsine de Ziehl	Colore en violet foncé les incrustations acido-résistantes des hyphes primordiales de la cuticule de certaines ruses. Elle est utilisée en histologie. Coloration combinée avec le vert lumière. Très employée en bactériologie ; coloration rapide. En cas de surcoloration, régresser dans l'alcool chlorhydrique faible. Donne une coloration rose vif.
Gaïac (soluté de)	La base de ce réactif est une résine extraite d'arbres d'origine américaine : <i>Guajacum officinale</i> et <i>G. sanctum</i> . D'un point de vue biochimique, la résine de

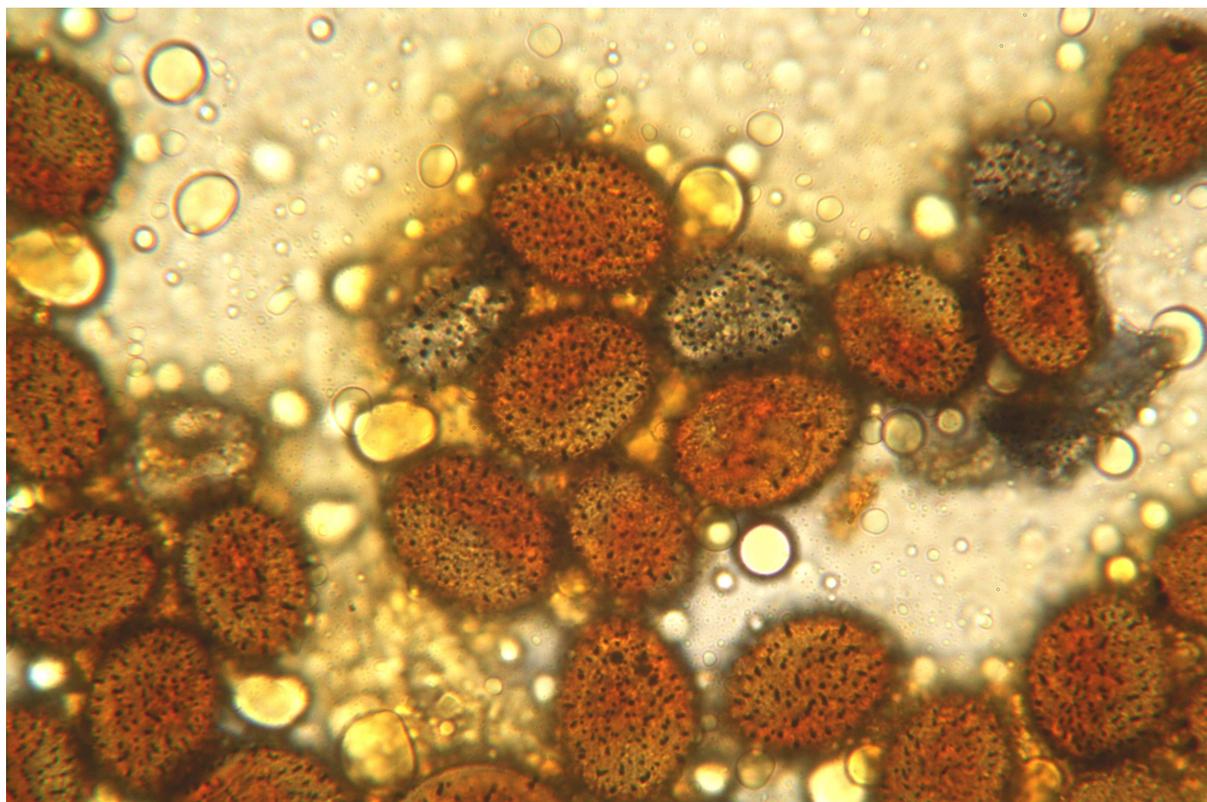
	gaïac met en évidence les phénoloxydases. Il est très utilisé chez les russules.
Gaïacol	D'un point de vue biochimique, le gaïacol met en évidence les phénoloxydases, avec lesquelles il donne une coloration rouge grenat. Chez les cortinaires, il génère des réactions bien colorées. En parasitologie, il est considéré comme un éclaircissant très puissant, aussi efficace que la potasse ; on l'utilise pour l'étude des Dermatophytes (champignons des teignes) qui s'attaquent aux poils, cheveux et squames chez l'homme et les mammifères.
Giemsa	Coloration des noyaux des hyphes du mycélium (technique assez lourde - voir H.G. Cléménçon). R. Kühner l'utilise pour colorer les noyaux, selon une technique sophistiquée et assez longue, mais sans grande difficulté. Elle les met remarquablement en évidence.
Glycérine - C ₃ H ₈ O ₃	Présente dans nombre de liquides d'observation, elle évite le dessèchement et améliore l'indice de réfraction optique.
Glycérine gélatinée	Elle permet la conservation de préparations (préparations semi-définitives) et peut être colorée dans la masse. Ne jamais employer d'alcool pour ce montage. Pour employer la gélatine glycé- rinée, la faire fondre au bain-marie, puis déposer une petite goutte sur la LPO. Placer l'objet dans la goutte, puis recouvrir avec la LCO ; chauffer légèrement sur la flamme de la lampe à alcool ; laisser refroidir la préparation à plat. On peut également employer la gélatine glycé- rinée à froid. Avec votre aiguille lancéolée, prélever très peu de gélatine ; déposer sur votre LPO ; chauffer légè- rement, la flamme en dessous ; le verre se chauffant légèrement, la gélatine s'étale. Il arrive souvent que de petites bulles d'air restent emprisonnées entre LPO et LCO. Pour les éliminer avant de recouvrir avec la LCO, prenez votre ai- guille droite, chauffer le bout légèrement, puis crever les bulles une à une. Ne pas chauffer votre LPO trop vite ou trop fort, ce qui produirait infailliblement de nouvelles bulles. Pour la conservation, il est indispensable de luter.
Hémalun	Colore toutes sortes d'objets en 5 à 20 minutes. S'il y a surcoloration, régresser dans l'alcool chlorhydrique à 1%. Action rapide : quelques secondes. Surveiller. Laver abondamment. Si on lave à l'eau de source, la coloration du noyau sera bleue. Déshydrater ; monter au BC.
Huile de cèdre	Ayant à peu près le même N que le verre (1,53), elle a été longtemps utilisée pour les objectifs à immersion ; cependant, nous déconseillons l'usage des huiles naturelles qui se dégradent vite et peuvent sécher sur l'objectif. Après examen, enlever l'huile avec quelques gouttes de liqueur d'Hoffman. Sert éga- lement de milieu de montage.
Hypochlorite de soude (eau de ja- vel)	Elle permet de blanchir les coupes. L'eau de javel est un dérivé impur de l'hypochlorite de soude, et est peu conseillée en microscopie. Ce produit a la propriété de dissoudre complètement le contenu des cellules (pratiquement, on l'utilise surtout en histologie végétale lorsqu'on souhaite ne garder que les parois cellulosiques des tissus) ; action rapide : quelques secondes à dix minutes. La- ver à l'eau acétifiée à 5 % puis laver à l'eau ordinaire. A 50 %, il jaunit la cuticule des agarics de la section des <i>Xanthodermatei</i> .
Lactochloral	Permet de déshydrater les tissus aqueux en quelques minutes, sans contraction ni retrait.
Lactoglycérol	Fortement recommandé par H. Cléménçon pour remplacer le chloral lacto- phénolé ou le lactophénol, qui sont tous deux toxiques et corrosifs ; c'est le complément régresseur du carbofuchsin.
Lactophénol de Aman	Liquide d'un emploi constant pour éclaircir les tissus végétaux ou petits animaux. Son emploi est extrêmement simple. Il suffit, soit sur une LPO, soit dans un tube de verre, de recouvrir l'objet de lactophénol. On pourra activer l'action du produit en le chauffant légèrement sur la flamme de la lampe à alcool ; renouveler le produit deux ou trois fois. Il restitue aux objets les caractéristiques qu'ils avaient à l'état frais. On peut monter directement dans la gélatine glycé- rinée ; ne pas oublier de luter.
Lugol ou IKI	Il est utilisé pour mettre en évidence la réaction amyloïde ou héli-amyloïde de l'appareil apical des Discomycètes unitoniques.
Lugol selon Nicolle ou selon Moser	Une ligne tracée sur l'hyménophore permet de vérifier directement si les spores sont amyloïdes. On peut les utiliser pour le mordantage.
Métol	Ce produit est utilisé quasi exclusivement pour la détermination des cortinaires (une trentaine d'espèces ont une réaction évidente).
Nigrosine	Produit d'observation par contraste, sur fond gris-noir ; elle pénètre très faci- lement dans les vacuoles, sur les pièces vivantes. Coloration des infusoires en

	frottis (faire le frottis, laisser sécher à froid aussi rapidement que possible).
Noir de chlorazol	L'examen direct permet de visualiser les filaments septés, réguliers d'un dermatophyte, les filaments septés plus grossiers et irréguliers, formant des vésicules, d'une moisissure, les pseudo-filaments et les blastospores d'un <i>Candida</i> . Chez certains ascomycètes, pyrénomycètes ou discomycètes, il permet de colorer les composés chitinoïdes, au même titre que le rouge Congo (en solution aqueuse) ou l'encre Waterman (noire ou bleu noir).
Noir Soudan III	Permet de colorer les inclusions lipidiques (guttules) trouvées fréquemment dans les ascospores.
Orcéine acétique	Coloration des chromosomes (à utiliser surtout sur des pièces végétales : méristèmes d'ail ou de jacinthe par exemple).
Papier tournesol	Permet de déterminer la nature acide ou basique d'un milieu liquide (le pH neutre se situe à 7) ; plus on tend vers 1, plus le milieu est acide : le papier est de + en + rouge ; plus on tend vers 14, plus le milieu est basique : le papier est de + en + bleu.
Paraphénylène diamine	Il révèle les phénoloxydases se trouvant dans la cuticule des champignons, en donnant une coloration violet sombre noirâtre. Produit très toxique.
Permanganate de potassium	Colorant universel, très intéressant mais méconnu ou ignoré ; à utiliser à 1 ou 2 %, en solution aqueuse.
Phénol	C'est au départ, un désinfectant puissant ; il génère des réactions intéressantes chez certaines russules et amanites. Associé à de l'aniline, il est utilisé pour la détermination des cortinaires. Très toxique.
Phloxine B	Colorant acide, plasmatique, de la cellule. Intéressante pour l'étude des Polypores, et pour la pratique de la double coloration, en association avec le rouge Congo : les parois sont teintées par le congo et le contenu des hyphes, basides et cystides, par la phloxine.
Potasse = hydroxyde de potassium (KOH)	A 2 ou 5 % (selon la fragilité du matériel traité), elle regonfle les exsiccata ; à 10 %, on l'utilisera pour dissocier les « croûtes » et les polypores ; compatible avec le rouge Congo ammoniacal ; incompatible avec le rouge Congo SDS (formation d'un précipité) ; à 20 ou 30 % et à chaud, elle permet de regonfler les Polyporacées.
Potasse à l'alcool à 20 %	Éclaircissant pour gros insectes : mouches, fourmis, doryphores, etc. ; laver abondamment à l'eau acétifiée à 5%. Faire fondre dans du méthanol. Pour préparer la potasse à 10 %, il suffit de faire fondre 10 g de potasse dans 100 g d'alcool ; si on désire chauffer la potasse, la faire fondre dans l'eau (il est très dangereux de chauffer de l'alcool).
Pyronine	Colore les cystides des inocybes en rouge vif, mais pas les cristaux sommitaux. Chez les Basidiomycètes : colorant des parois de toutes les structures (hyphes, basides, cystides, spores) ; peut être utilisée à la place du rouge Congo.
Ramollisseur de Cléménçon	Il est très efficace, mais ne s'utilise qu'avec le rouge Congo ammoniacal.
Ramollisseur GSD de Cléménçon	Il est très efficace, mais ne s'utilise qu'avec le rouge Congo SDS.
Regonflage des exsiccata	On peut utiliser notamment des alcalis (ammoniacque, potasse, soude) ou le lactophénol, le chloral lactophénolé, le lactochloral, l'acide lactique, l'hydrate de chloral, l'eau acétique à 50%.
Rouge Congo	Colorant des parois des cellules (boucles, hyphes, cystides, basides) → révélateur des milieux acides : il devient alors tout noir. Il s'utilise comme colorant de routine : mise en évidence des gélifications (congophobie des hyphes gélifiées).
Rouge Congo ammoniacal	Excellent liquide d'observation pour des exsiccata ; ne pas laver les préparations à l'eau (qui provoque une cristallisation) mais à l'ammoniaque à 50 % ; utilisable sur du matériel frais, si on veut examiner les hyphes qui sont ramollies par l'ammoniaque.
Rouge Congo SDS	Excellent liquide de première observation, conseillé sur du matériel frais.
Rouge huile O	Coloration des lipides de toutes sortes, et des inclusions lipidiques.
Rouge neutre	Coloration vitale peu toxique. S'applique au liquide contenant des organismes vivants (amibes, infusoires, etc. : les colore sans les tuer). Dans ce cas, l'employer très dilué de façon à obtenir une solution au 1/1000 ou à 5/1000. Dans dix gouttes d'eau, incorporer une goutte de rouge neutre à 1%. Les vacuoles digestives seront colorées en orange (réaction alcaline), en rouge cerise (réaction acide), le noyau généralement en rouge net.
Safranine	Elle peut remplacer avantageusement la fuchsine, dans divers procédés de coloration. S'il y a lieu, on régresse dans l'alcool absolu (sinon à 96°).

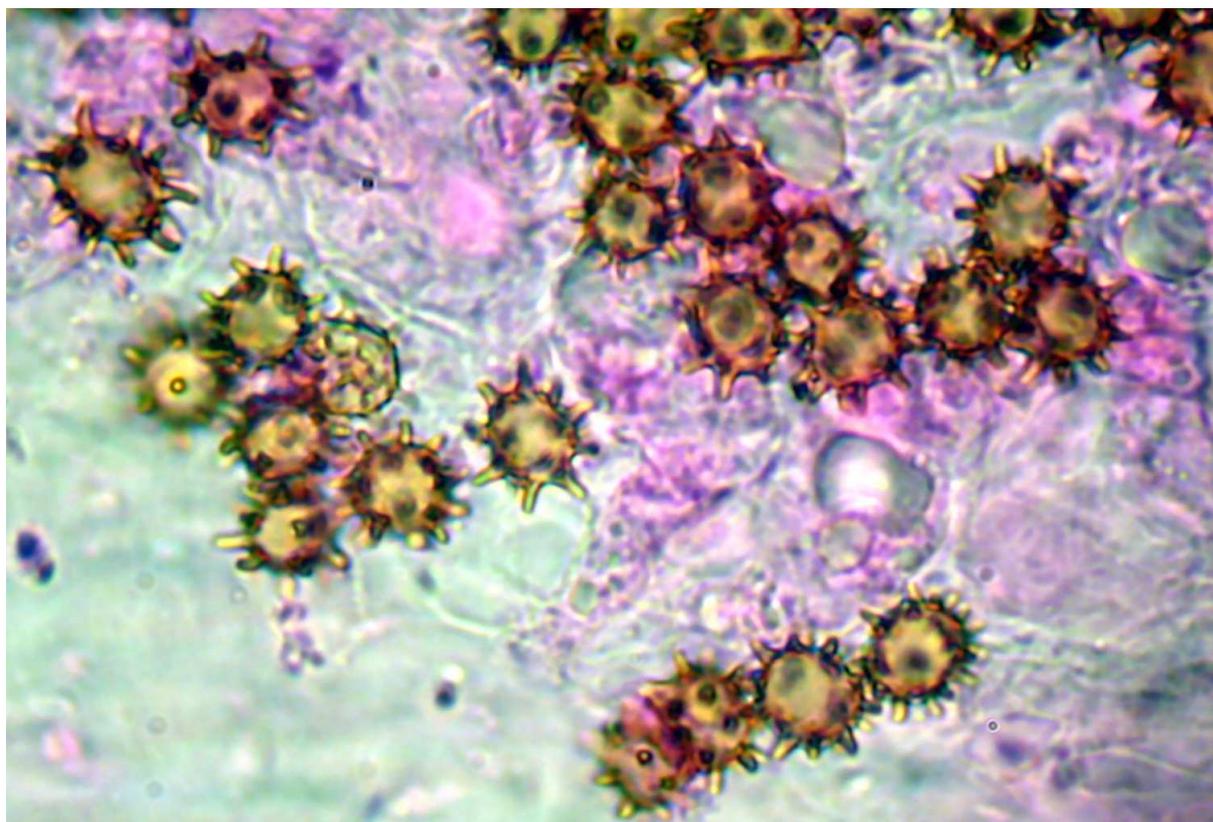
SDS = Sodium Dodecyl Sulfate	C'est un agent mouillant stable, un détergent industriel, qui facilite nettement la coloration ; on peut le remplacer, avec un certain succès, par un bon détergent de vaisselle, ou un agent mouillant pour photographie. Nous l'ajoutons au rouge Congo aqueux, au bleu de toluidine, entre autres.
Solution hypertonique avec sel ou sucre	Mise en évidence des pigments vacuolaires ou des pigments diffus dans le cytoplasme ; en absorbant l'eau contenue dans la cellule, elle va provoquer la concentration des pigments et de ce fait, intensifier leur coloration.
Soude = hydroxyde de sodium (NaOH)	Elle a les mêmes propriétés que la potasse, MAIS est compatible avec le rouge Congo SDS.
Sulfate de fer	En solution aqueuse stabilisée ou en cristal, il est très utilisé pour la détermination des russules et des <i>Leccinum</i> notamment.
Sulfovanilline	Étude des gloécystides des russules et des lactaires ; mise en évidence des laticifères, qui grisonnent ou noircissent.
TL4	Réactif macrochimique très intéressant, dont un des composants (oxyde de thallium) est un poison extrêmement dangereux.
Vert d'iode	Il colore en vert les tissus végétaux lignifiés. Colorer avec le vert d'iode. Laver. Coloration double avec le carmin aluné.
Vert lumière	Colorant plasmatique ; on l'emploie en général après coloration nucléaire rouge (safranine, carmin, fuchsine, etc.). Colorer avec la fuchsine de Ziehl. Si nécessaire, régresser dans l'alcool chlorhydrique à 1-5 %. Laver. Colorer avec vert lumière, action rapide. Laver.
Violet de gentiane phéniqué	Colorer 20 minutes ou plus si c'est nécessaire ; régresser dans l'alcool chlorhydrique à 1-5 %.
Xylène ou xylol	Solvant de la paraffine ; déshydratant puissant. En phase de déshydratation : après avoir égoutté l'alcool, recouvrir de xylol. Si le xylol reste limpide, la déshydratation est bonne. A défaut de xylol, remplacer par du benzène (très toxique).



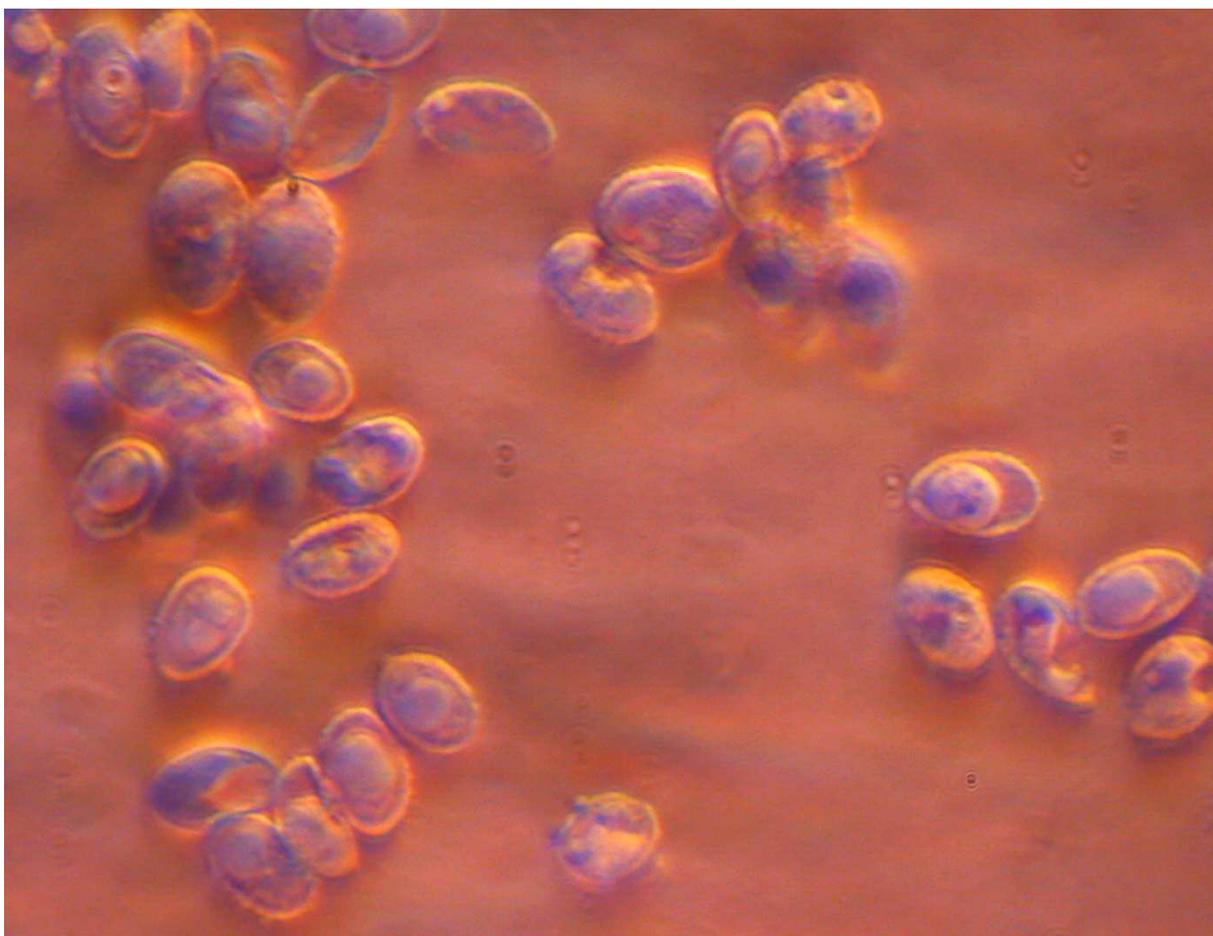
Neotiella vivida, coloration au bleu coton lactique – photo Camille Mertens, 40x



Ornementation sporale amyloïde (réagissant au melzer) chez *Aleurodiscus wakefieldiae* – 63x



Spores d'*Inocybe calospora* – 100x – montage dans le PVAL-FA



Spores de *Melanoleuca cognata* (contraste de phase et rouge Congo SDS) – photo Françoise Draye



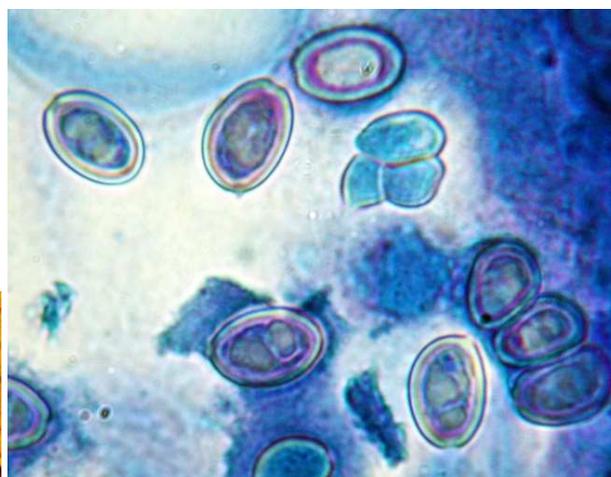
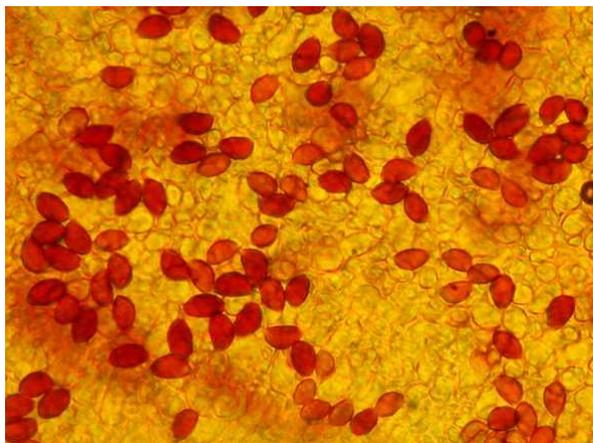
Ascospores de *Tuber melanosporum* (coloration au rouge Congo SDS)

AIDE – MÉMOIRE de la microscopie mycologique vue sous l'angle des GENRES

ASCOMYCÈTES BASIDIOMYCÈTES	Toujours réaliser une 1 ^{ère} observation à l'eau bidistillée. Le noir Soudan III (et le rouge huile 0) permettent de colorer les inclusions lipidiques (guttules) trouvées fréquemment dans les ascospores. Vérifier la cyanophilie des spores à l'aide du bleu coton lactique (ou lactophénolé) → l'enveloppe sporale doit devenir bleue. Il faut savoir que l'ammoniaque dissout certains éléments comme les incrustations acido-résistantes de la cuticule des russules, qu'il altère quelquefois la couleur des pigments, et qu'il détruit les pigments pariétaux ou vacuolaires des entolomes, notamment.
APHYLLOPHORALES	Coloration des différents types d'hyphes, avec le rouge Congo (colorant pariétal) et la phloxine B (colorant cytoplasmique), en mélange. Les regonfler avec de la potasse à 20 ou 30 %.
BASIDIOMYCÈTES	En 1976, Robert KÜHNER a énoncé une règle essentielle, qu'il considère comme valable pour tous les hyménomycètes à lames : « <i>Les spores dont au moins une couche de la paroi gonfle fortement par le procédé ammoniac-acétique (*), sont toujours fortement dextrinoïdes jusqu'à maturité et puissamment cyanophiles</i> ». C'est le cas notamment du genre <i>Lepiota</i> . (*): traiter les spores à l'ammoniaque (milieu basique) et ensuite par l'acide acétique (milieu acide).
DISCOMYCÈTES unituniqués	Lugol (ou IKI) est utilisé pour mettre en évidence la réaction amyloïde ou hémiamyloïde de l'appareil apical.
BOLETACEAE	Hyphes bouclées et spores lisses (<i>Gyroporus</i> , <i>Gyrodon</i> , <i>Boletinus</i>). Hyphes non bouclées et spores ornées (<i>Strobilomyces</i>). Hyphes non bouclées et spores lisses (<i>tous les autres genres de la famille</i>).

Convention = NA signifie non-amyloïde ; ND signifie non-dextrinoïde.

- Pour qu'une spore soit qualifiée de « cyanophile », il faut que la paroi sporale se colore impérativement (la coloration du contenu sporale n'intervient pas dans la qualification), au bleu coton ou au bleu de crésyl.
- On parlera de coloration métachromatique lorsque l'endospore des spores à paroi épaisse devient rouge quand on la colore au bleu de crésyl (à chaud).
- dans le melzer, des spores sont dites amyloïdes lorsqu'elles prennent une couleur bleu noir.

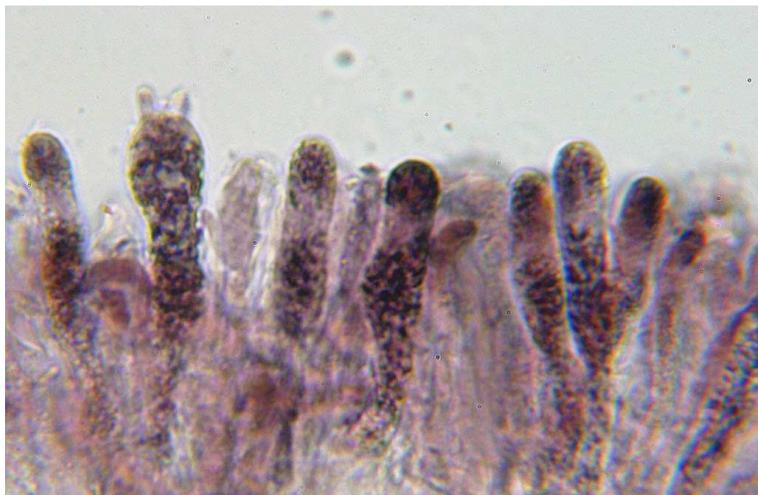


▲ Endospore métachromatique chez *Macrolepiota* sp. - photo Françoise Draye

◀ *Hebeloma sinapizans* (spores dextrinoïdes) – photo Françoise Draye

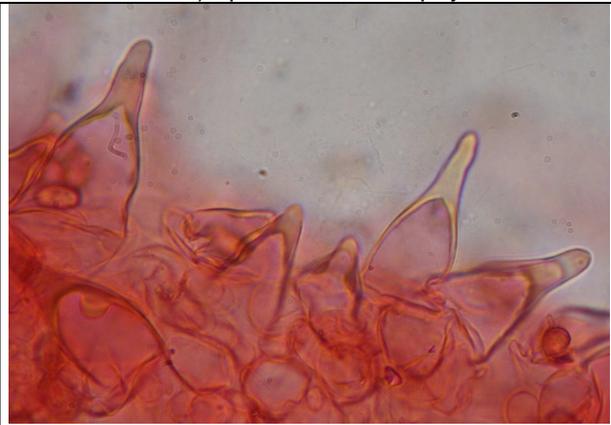
- Elles sont dites pseudo-amyloïdes lorsqu'elles prennent une couleur brun foncé.
- Elles sont dites dextrinoïdes lorsqu'elles prennent une couleur brun rougeâtre.
- Elles sont dites non-amyloïdes lorsqu'elles ne réagissent pas.
- Des basides sont carminophiles (ou sidérophiles) lorsque des granulations noires apparaissent en présence de carmin acétique de Sémichon et de chlorure de fer III, après chauffage) → bons résultats également avec la nigrosine.

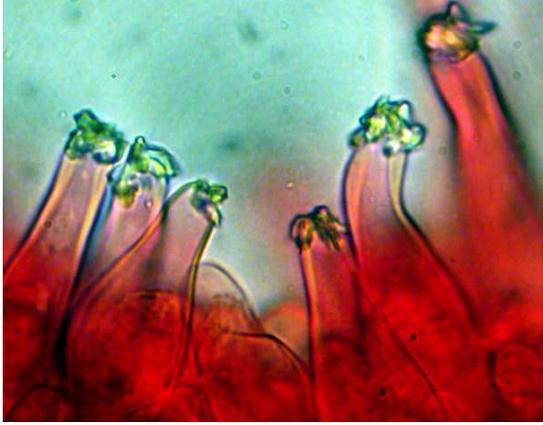
Réaction acéto-ferrique des basides de *Lyophyllum connatum* ▼ (préparation et photo : Yves Deneayer).



Mode opératoire :

- + Placer une grosse goutte de carmin acétique sur une lame de verre et y placer le bout de lame.
- + Chauffer à la flamme durant quelques secondes jusqu'aux premières bulles.
- + Ajouter une gouttelette de chlorure de fer III.
- + Compenser l'évaporation par un apport de carmin, goutte par goutte.
- + Dès que le carmin acétique vire au rouge bleuâtre puis noirâtre, et perd sa transparence, refroidir avant la formation d'une pellicule de surface (toute l'opération dure de 60 à 90 secondes).
- + Placer les pièces colorées dans une nouvelle goutte de carmin acétique, dissocier et observer.

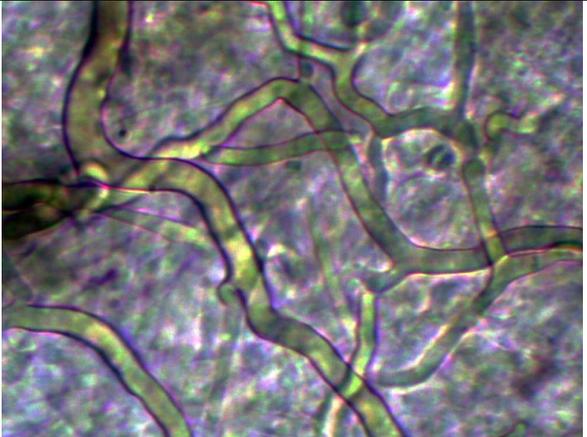
AGARICOMYCETIDAE	
<i>AGARICUS</i>	Spores lisses, NA - ND ; pas de boucles ; cheilocystides parfois absentes.
<i>AGROCYBE</i>	Spores NA - ND ; <i>A. erebia</i> a des basides bisporiques.
<i>ALBATRELLUS</i>	Spores amyloïdes ; <i>A. confluens</i> présente des hyphes amyloïdes.
<i>ALNICOLA</i>	Spores NA - ND ; cystides d'arête souvent en poils d'ortie, avec ou sans cristaux ; <i>A. scolecina</i> : les incrustations des hyphes cuticulaires sont remarquablement visibles, dans le bleu de crésyl.
<i>AMANITA</i> p.p. : à chapeau non strié	Sous-genre <i>Lepidella</i> , sections <i>Phalloideae</i> & <i>Amidella</i> : spores amyloïdes et souvent globuleuses ; présence d'acrophysalides (hyphes de la chair à cellules terminales renflées).
<i>AMANITA</i> p.p. : à chapeau non strié	Spores amyloïdes ; présence d'acrophysalides (hyphes de la chair à cellules terminales renflées).
<i>AMANITA</i> p.p. : à chapeau strié	Sections <i>Amanita</i> , <i>Caesareae</i> , <i>Vaginateae</i> & <i>Inauratae</i> : spores non-amyloïdes et souvent ovoïdes (pas de réaction au melzer) ; présence d'acrophysalides.
	
Chrysocystide chez <i>Pholiota squarrosa</i> photo Françoise Draye	Macrocystides chez <i>Psathyrella sarcocephala</i> - coloration à la pyronine – photo Françoise Draye
<i>ARMILLARIA</i>	Spores NA - ND ; épicutis avec pigment pariétal.
<i>ARRHENIA</i>	Spores NA - ND ; pas de cystides ; épicutis à pigments pariétaux incrustants.
<i>ARTOMYCES</i>	<i>A. pyxidatus</i> : spores amyloïdes.
<i>ASTEROPHORA</i>	Épicutis absent, transformé en chlamydo-spores (conidies) de forme étoilée, prenant bien le bleu coton ; spores NA - ND.
<i>BAEOSPORA</i>	Spores amyloïdes.
<i>BOLBITIUS</i>	Spores NA - ND, avec pore germinatif très net.
<i>BOLETUS</i>	La chair réagit en bleu au jus de pomme de terre ; certaines espèces avec divers pigments au niveau des hyphes de l'épicutis ; spores NA - ND.
<i>BOLETUS</i> p.p	Hyphes amyloïdes.
<i>BUCHWALDOBOLETUS</i>	Chair (hyphes) non amyloïde, même à la base du pied.
<i>CALLITOSPORIUM</i>	Spores NA - ND, à gouttelette jaune vif dans les bases ; basides teintées en jaune et rougissant aux bases fortes.

CALOCERA	Basides typiques, avec stérigmates très épais (allure de diapason).
CALOCYBE	Spores NA - ND ; basides carminophiles.
CAMAROPHYLLOPSIS	Spores NA - ND ; pas de cheilocystides.
CAMPANELLA	Spores NA - ND ; cuticule à hyphes fortement diverticulées.
CANTHARELLULA	<i>C. umbonata</i> a les spores amyloïdes.
 	
Ornementation amyloïde des spores de <i>Lactarius pyrogalus</i>	
Cystides métuloïdes chez <i>Inocybe huijsmanii</i> - coloration au rouge Congo ammoniacal	
CHROOGOMPHUS	Hyphes à incrustations amyloïdes, au moins à la base du pied, et parfois à paroi épaissie.
CHRYSOMPHALINA	Spores NA - ND ; épicutis à pigment intracellulaire jaune.
CLITOCYBE	Spores lisses, NA - ND ; cheilocystides très souvent absentes ; certaines espèces nettement cyanophiles et d'autres pas du tout.
CLITOCYBULA p.p.	Spores amyloïdes.
CLITOPILUS	Spores NA - ND ; pas de cheilocystides ; chair avec hyphes non-métachromatiques.
COLLYBIA p.p.	Chair et spores NA, parfois dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes ; cheilocystides parfois absentes.
CONOCYBE	Spores NA - ND, avec pore germinatif sur quasi toutes les espèces. D'après Kühner : « mettre un fragment de lame ou de chapeau entre lame PO et CO dans une goutte d'ammoniaque, laisser agir 10 mn, voire plusieurs heures. Ensuite, on doit observer de longues aiguilles incolores de 60 à 100µ x 1 à 3µ de large ; ces aiguilles sont visibles, mêlées aux basides et cystides. ». Cette réaction est très nette sur <i>C. tenera</i> .
COPRINOPSIS	<i>C. laanii</i> : mise en évidence de la périspore (sorte de gaine entourant la spore), avec l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique. Idem avec le rouge Congo ammoniacal, selon Daniel Ghyselink.
COPRINUS	Spores NA - ND, avec pore germinatif toujours évident. Les spores virent du brun foncé au violet grisâtre sous l'action de l'acide sulfurique pur.
CORTINARIUS	Spores verruqueuses, NA - ND. Pas de pleurocystides ; cheilocystides rarement présentes. La potasse met en évidence l'ornementation sporale. Les cystides de quelques espèces deviennent brun orangé avec le sulfobenzaldéhyde (le reste de la préparation est coloré en rose) → idem avec la sulfovanilline.
CREPIDOTUS	Spores NA - ND, lisses ou verruqueuses.
CRINIPELLIS	Spores cyanophiles, ND - NA ; épicutis à longs poils raides dextrinoïdes.
CUPHOPHYLLUS	Spores NA - ND.
CYSTODERMA	Spores amyloïdes parfois totalement ou partiellement (réduites alors à la plage supra-apiculaire) ou NA ; cheilocystides souvent absentes ; si présentes, elles sont nombreuses, en poils d'orties, avec des cristaux sommitaux.
CYSTODERMELLA	Spores NA - ND.
CYSTOLEPIOTA p.p.	Spores NA, parfois dextrinoïdes.
DELICATULA	Spores amyloïdes.
DERMOLOMA	Spores parfois amyloïdes, ND ; pas de cheilocystides.
ECHINODERMA	Spores dextrinoïdes ; épicutis avec des chaînes d'éléments globuleux au niveau des verrues.
ENTOMOLA	Spores cyanophiles. Rechercher la présence (ou non) de pigments pariétaux au niveau de la cuticule (dans l'eau) : soit ils sont <i>intracellulaires</i> , diffus dans les cellules, alors l'observation est facilitée si on concentre le contenu de la vacuole par une plasmolyse avec de l'eau sucrée, soit ils sont <i>pariétaux</i> , c'est-à-dire liés à la paroi cellulaire, formant des incrustations, selon les cas, lisses ou zébrées.

	Ce travail est facilité par l'utilisation de la potasse ou de l'hydrate de chloral. Boucles présentes ou non au pied des basides (rouge Congo).
FAERBERIA	Cystides métuloïdes, dextrinoïdes ; <i>F. carbonaria</i> : spores NA - ND ; lamprocystides finement cristallisées.
FAYODIA	Spores amyloïdes.
FLAMMULINA	Chez <i>F. velutipes</i> , le gélin de l'ixocutis est congophobe ; l'hyménophore est plus réceptif.
FLOCCULARIA	<i>F. luteovirens</i> : spores amyloïdes.
GALERINA	Spores dextrinoïdes ou non, parfois pseudo-amyloïdes. L'observation dans le melzer peut mettre en évidence les verrues sporales. En colorant des lames de <i>G. marginata</i> au giemsa, on remarque que la paroi des basides prend une coloration rouge vif au niveau de la partie ventrue (R. Kühner) ; verrues de <i>G. uncialis</i> nettement visibles dans le melzer.
GAMUNDIA	Spores NA - ND.
GOMPHIDIUS	Spores NA - ND, fusoïdes ; pas d'hyphes à incrustations amyloïdes, même à la base du pied.
GYMNOPIUS	Spores dextrinoïdes, avec pigments dans les hyphes de l'épicutis, et pigment extracellulaire jaune granuleux, dans la trame des lames.
GYMNOPIUS	Spores NA - ND.
GYROPORUS	Hyphes de l'épicutis filamenteux, avec un pigment incrustant jaune.
HEBELOMA	Spores presque lisses à verruqueuses, parfois fortement dextrinoïdes.
HEBELOMINA	Spores verruqueuses, toujours dextrinoïdes.
HEMIMYCENA	Spores et trame NA - ND.
HOHENBUEHELIA	Souvent des cystides métuloïdes, ou alors ramifiées, avec une goutte de mucus sommitale (gliosphex = piège à nématodes). Avec le bleu de crésyl, métachromasie de la paroi des cystides hyméniales (pour les espèces cystidiées).
HYDROPUS	Spores lisses, NA - ND ; hyphes pseudo-amyloïdes ; nombreuses dermatocystides à pigment vacuolaire.
HYGROCYBE HYGROPHORUS	Spores lisses, NA - ND ; basides souvent très longues ; cheilocystides souvent absentes ; <i>H. psittacina</i> avec boucles typiques en médaillon.
HYGROPHOROPSIS	<i>H. aurantiaca</i> : spores dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes ; spores lisses et présence de boucles.
HYPHOLOMA	Spores NA - ND. L'ammoniaque colore en jaune le contenu des chrysocystides ; même résultat avec le bleu de méthyle ; ne sont pas présentes sur toutes les espèces.
INOCYBE	Spores NA - ND, non verruqueuses. Mise en évidence des cristaux d'oxalate de calcium sur les lamprocystides, avec le réactif de Bailingier ou le vert d'anthracène (si elles sont absentes, les poils d'arête sont bien différenciés) ; spores lisses ou bosselées.
KUEHNEROMYCES	<i>K. mutabilis</i> : spores lisses, NA - ND, avec petit pore germinatif ; pas de cystides.
LACCARIA	Mise en évidence de l'ornementation sporale avec le bleu coton – idem avec la phloxine B ; spores NA - ND ; ornementation sporale nettement épineuse.
LACRYMARIA	Spores verruqueuses, NA - ND.
LACTARIUS	Chair grenue, avec des sphérocytes ; pas de boucles ; spores à ornementation amyloïde. Mise en évidence des laticifères avec la sulfovanilline (vanilline + acide sulfurique à 80 %) → coloration gris ardoise.
LECCINUM	La chair NE réagit PAS en bleu au jus de pomme de terre ; spores NA - ND.
LENTINELLUS	Spores amyloïdes, finement verruqueuses ; chair souvent amyloïde ; hyphes avec des inclusions huileuses réagissant aux réactifs sulfoaldéhydriques (SBA+) ; <i>L. cochleatus</i> présente des chlamydospores dans le revêtement du pied et parfois sur la cuticule ; <i>L. marcelianus</i> a des chlamydospores dans tous les tissus.
LENTINUS	Spores NA - ND ; pas de gloécystides ou de cystides métuloïdes ; présence d' « Hyphal Pegs » (faisceaux d'hyphes agglutinées).
LEPIOTA	Les lépiotes sténosporées, fusisporées et ovisporées sont dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes. R. Kühner utilise le giemsa pour colorer de manière élective l'endospore. Il perfectionne une double coloration giemsa–iode qui permet de distinguer très nettement, en dehors de l'endospore, deux feuillettes (couches) supplémentaires qui avaient déjà été proposés par M. Locquin ; l'endospore, qui a été colorée en rouge pourpre par le giemsa, noircit après traitement à l'eau iodo-acétifiée, ce qui met les deux couches en évidence. Chez <i>L. boudieri</i> : les pigments vacuolaires des hyphes du pileipellis apparaissent (dans le bleu de

	crésyl selon Cléménçon) comme des billes franchement colorées dans un sac tubulaire.
<i>LEPISTA</i>	Spores NA - ND ; pas de cheilocystides.
<i>LEUCOAGARICUS</i>	Spores dextrinoïdes ; pour nombre d'espèces, coloration métachromatique de l'endospore.
<i>LEUCOCOPRINUS</i>	Spores dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes ; pour nombre d'espèces, bleu de crésyl + ammoniacque + acide acétique : coloration métachromatique (rouge) de la paroi sporale interne (dite endospore).
<i>LEUCOPAXILLUS</i>	Spores amyloïdes ; idem pour les verrues présentes.
<i>LIMACELLA p.p.</i>	Spores dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes ; pas de cheilocystides.
<i>LYOPHYLLUM</i>	Spores NA - ND ; basides carminophiles ; épicutis avec pigment pariétal incrustant, chez les espèces non noircissantes.
	
Macrocystides chez <i>Laccaria macrocystidiata</i> - coloration au rouge Congo SDS	Chlamydospores chez <i>Nyctalis parasitica</i> - coloration à la fuchsine acide
<i>MACROCYSTIDIA</i>	<i>M. cucumis</i> : cystides caractéristiques, fusoïdes et très longues (100 µm et +) ; Spores NA - ND.
<i>MACROLEPIOTA</i>	Spores dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes ; exospore orthochromatique (bleue) et endospore métachromatique (rouge), avec le bleu de crésyl ; certaines espèces ont le pore germinatif couvert par un cal transparent, en forme de lentille ; d'autres ont le pore germinatif large et tronqué.
<i>MARASMIELLUS</i>	Spores NA - ND.
<i>MARASMIUS</i>	Trame (chair) : hyphes pseudo-amyloïdes ; spores NA - ND.
<i>MEGACOLLYBIA</i>	Spores N - ND.
<i>MELANOLEUCA</i>	Spores et (ou) verrues amyloïdes.
<i>MELANOPHYLLUM</i>	Spores NA - ND ; épicutis à sphérocytes.
<i>MELANOTUS</i>	Spores NA - ND ; les spores foncent en présence de potasse.
<i>MICROMPHALE</i>	Spores NA - ND ; pas de cheilocystides.
<i>MOLLISIA p.p.</i>	Coloration en jaune du contenu des paraphyses avec la potasse.
<i>MYCENA</i>	Spores amyloïdes chez la plupart des espèces ; chez les autres, spores amyloïdes OU chair rougeâtre-vineux ; cystides souvent de forme particulière. Trame : hyphes pseudo-amyloïdes. Pas d'oléocystides. Examen de la cuticule à la phloxine B, qui met bien en évidence le volume et donc la forme des ornements des hyphes superficielles du revêtement.
<i>MYCENELLA</i>	Nombreuses cystides cuticulaires ; spores NA à apicule de grande taille ; spores et trame ND. ; <i>M. bryophila</i> : cystides lagéniformes, sur chapeau, lames et pied.
<i>MYCETINIS</i>	Spores NA - ND.
<i>MYXOCYBE</i>	Spores dextrinoïdes.
<i>MYXOMPHALIA</i>	Spores amyloïdes.
<i>NAUCORIA</i>	Voir <i>ALNICOLA</i>
<i>OMPHALINA</i>	Spores NA - ND ; trame des lames enchevêtrée ; épicutis très souvent avec pigments pariétaux ; boucles souvent présentes.
<i>OMPHALOTUS</i>	<i>O. olearius</i> : spores NA - ND ; épicutis à hyphes parallèles, avec amas de pigments extracellulaires qui verdissent dans l'ammoniacque.
<i>OUDEMANSIELLA</i>	Spores NA - ND. ; <i>O. mucida</i> : spores très grandes, subglobuleuses (15-18 µm).
<i>PANELLUS</i>	Spores nettement amyloïdes. <i>P. serotinus</i> : pileipellis gélatinifère seulement chez cette espèce.
<i>PANAEOLUS</i>	Spores NA - ND. Les spores ne sont pas décolorées par l'acide sulfurique pur ; chrysocystides parfois présentes.
<i>PANUS</i>	Spores NA - ND ; présence de gléocystides (cystides réfringentes) ou de cystides métuloïdes ; pas d' « hyphal pegs » (faisceaux d'hyphes agglutinées).

PAXILLUS	Spores NA - ND ; présence de boucles chez les espèces européennes ; parfois des pigments divers au niveau de l'épicutis.
PENIOPHORA	Mise en évidence des gléocystides avec la sulfovanilline.
PHAEOCOLLYBIA	Spores +/- dextrinoïdes.
PHAEOGALERA	Spores NA - ND.
PHAEOLEPIOTA	Spores NA - ND, apparaissant finement verruqueuses dans l'acide sulfurique à 80 %.
PHAEOMARASMIUS	Spores NA - ND.
PHOLIOTA	Spores NA - ND. L'ammoniaque colore en jaune le contenu des chrysocystides ; même résultat avec le bleu de méthyle ; chez <i>P. flammans</i> , on trouve des pleurocystides lancéolées, à apex pointu, qui sont colorées en bleu azur par l'acide lactique.
PHOLIOTINA	Spores NA - ND, avec pore germinatif très net sur presque toutes les espèces.
PHYLLOTOPSIS	Spores NA - ND ; <i>P. nidulans</i> : présence de pigments caroténoïdes.
PLEUROTUS	Spores NA - ND ; <i>P. eryngii</i> avec épicutis à hyphes terminales, avec pigments incrustants en spirale.
PLUTEUS	Spores lisses, NA - ND. Nombre d'espèces proches de <i>P. cervinus</i> ont également des lamprocystides à crochets (utiliser le rouge Congo).
	
Macrocystides chez <i>Psathyrella spadicea</i> - coloration au rouge Congo SDS + phloxine B	Sphérocytes du voile d'<i>Amanita muscaria</i> - coloration au rouge Congo SDS + préparation lavée
PORPOLOMA	Spores amyloïdes.
PSATHYRELLA	Spores NA - ND. Chez certaines espèces, la trame hyméniale devient brune avec l'ammoniaque à 10 %. <i>P. populina</i> a les cystides qui verdissent dans NH ₄ OH à 10-20 %. Les spores virent du brun foncé au violet grisâtre sous l'action de l'acide sulfurique pur (parfois, elles sont simplement blanchies et décolorées). <i>P. gossypina</i> : cheilocystides à grosse goutte jaunâtre. <i>P. lutensis</i> : mucus vert vif au sommet des cheilocystides (dans rouge Congo ammoniacal).
PSEUDOBAEOSPORA	Spores dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes ; hyphes pseudo-amyloïdes.
PSEUDOCLITOCYBE	<i>P. cyathiformis</i> : spores amyloïdes.
PSEUDOOMPHALINA	Spores amyloïdes.
PSILOCYBE	Spores NA - ND. Cystides rares ou absentes.
PULVEROLEPIOTA	Coloration métachromatique de l'endospore ; pas de cheilocystides.
RAMARIA p.p.	Mise en évidence de l'ornementation sporale avec le bleu coton.
RESUPINATUS	Pas de cystides métuloïdes ; cystides +/- ramifiées, sans gliosphex, mais présence de digitocystes sur le mycélium (pièges à nématodes).
RHODOCOLLYBIA	<i>C. butyracea</i> : spores avec paroi épaisse et dextrinoïde.
RHODOCYBE	Spores NA - ND ; souvent pas de cheilocystides.
RHODOTUS	Spores NA - ND.
RIPARTITES	<i>R. tricholoma</i> : spores NA - ND, globuleuses, avec verrues tronquées, formant une roue dentée.
ROZITES	Spores NA - ND ; <i>R. caperatus</i> a les hyphes amyloïdes.
RUGOSOMYCES	Spores NA - ND.
RUSSULA	Spores à ornementation amyloïde. Mise en évidence des laticifères avec la sulfovanilline (vanilline + acide sulfurique à 80 %). Vérifier la réaction SBA+ ou SBA- des piléocystides de la cuticule, avec le sulfobenzaldéhyde. Mise en évidence des incrustations acido-résistantes sur les hyphes primordiales de la cuticule (fuchsine de Ziehl + acide chlorhydrique à 5 % ou carbolfuchsin de Cléménçon + lactoglycérol).
SERICEOMYCES	Spores dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes ; coloration métachromatique de l'en-

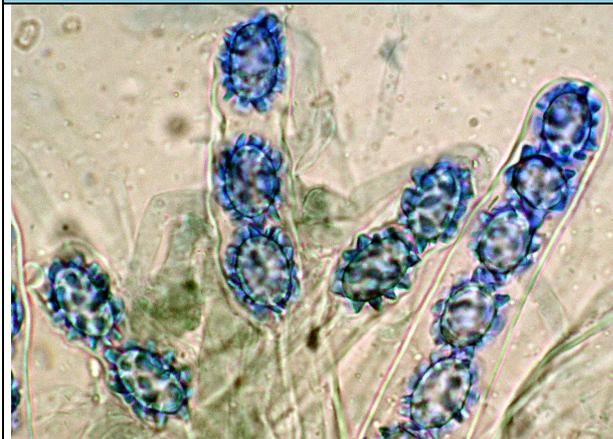
	dospore.
SETULIPES	Chair et spores NA - ND.
SIMOCYBE	Spores NA - ND.
SQUAMANITA p.p.	<i>S. paradoxa</i> : spores dextrinoïdes ou pseudo-amyloïdes ; pas de cheilocystides.
STEREUM	Spores amyloïdes.
STROBILURUS	Cystides fusiformes, à parois épaisses, à sommet obtus, avec une couronne de cristaux (ceux-ci, parfois absents) ; spores lisses, NA – ND ; métachromasie de la paroi des cystides, avec bleu de crésyl, chez <i>S. tenacellus</i> et <i>S. esculentus</i> , au contraire de <i>S. stephanocystis</i> et <i>S. griseus</i> .
STROPHARIA	Spores NA - ND. L'ammoniacque colore en jaune le contenu des chrysocystides ; même résultat avec le bleu de méthyle.
STROPHOLOMA	Spores NA - ND ; pas de chrysocystides.
SUILLUS	Spores de longueur inférieure à 14 µm, à observer dans eau glycinée ; cystides granuleuses ; certaines espèces présentent des cystides avec un pigment jaune ou brunâtre, ou un épicutis avec des hyphes à granulations brunâtres.
TECTELLA	Spores très petites, à amyloïdie variable.
TEPHROCYBE	Spores NA - ND ; basides carminophiles.
TRICHOLOMA	Spores lisses, NA - ND ; chez <i>T. sulphureum</i> , les hyphes jaunâtres deviennent turquoise avec le bleu de crésyl ou le bleu de toluidine ; utiliser le permanganate de potassium pour colorer les spores de petite taille (cela facilite les mesures) ; épicutis particulier chez <i>T. terreum</i> ; chez <i>T. acerbum</i> , les pigments pariétaux des hyphes du pileipellis apparaissent - pour reprendre l'expression d'A. Marchand - comme des épines sur une tige de ronce, dans le bleu de crésyl.
	
<i>Russula luteotacta</i> – dermatocystides cuticulaires mises en évidence avec le sulfobenzaldéhyde	Laticifères chez <i>Lactarius</i> sp. - mises en évidence avec la sulfovanilline
TRICHOLOMOPSIS	Spores NA - ND ; avec poils ou cystides remarquables et hyphes bouclées.
TUBARIA	Spores dextrinoïdes.
TYPHULA p.p.	Spores amyloïdes.
VOLVARIELLA	Spores NA - ND.
XEROCOMUS	Au niveau de l'épicutis, on peut trouver des pigments pariétaux (lisses ou incrustants) ou intracellulaires, parfois zébrants sur les hyphes). <i>X. pruinosus</i> se reconnaît aux larges hyphes amyloïdes à parois épaisses, dans la chair de la base du pied (plus qu'à ses spores striées). <i>X. armeniacus</i> présente des taches évidentes (visibles dans le rouge Congo ammoniacal) sur les hyphes terminales de l'épicutis.
XEROMPHALINA	spores lisses, amyloïdes.
XERULA	Spores NA - ND.

APHYLLOPHOROMYCETIDAE	
AMYLOSTEREUM	Réaction amyloïde des hyphes squelettiques.
CANTHARELLUS CRATERELLUS	Spores lisses, NA - ND, insensibles à tous les réactifs et colorants ; basides généralement 5-sporiques, mais parfois 2-, 3-, 4-, 6- ou 7-sporiques, pas de cystides.
CLAVARIA CLAVARIADELPHUS	Spores lisses, NA - ND ; basides 4-sporiques ; pas de cystides.
CLAVULINA	Spores lisses, NA - ND ; basides 2-sporiques ; pas de cystides.
HYDNUM	Spores lisses, NA - ND ; chair à structure monomitique ; pas de cystides.
LENTINELLUS	Réaction amyloïde des hyphes squelettiques.
POLYPORES s.l.	A 20 % ou 30 %, et à chaud, la potasse permet de regonfler les polyporacées.
RESUPINATUS	La trame des lames est gélifiée (visible avec le rouge Congo).
RAMARIA	Spores avec stries ou verrues, NA - ND ; chair à structure monomitique ; pas de cystides ; <i>R. botrytis</i> : spores jaunes, striées longitudinalement.
SARCODON	Spores NA - ND ; chair à structure monomitique ; pas de cystides. <i>S. imbricatus</i> avec spores jaune doré dans l'eau, présentant de grosses bosses.
SCHIZOPHYLLUM	Spores NA - ND ; chair à structure monomitique ; pas de cystides.
SPARASSIS	Spores lisses, NA - ND ; chair gélifiée, avec hyphes à paroi épaisse ; pas de cystides ; basides 4-sporiques.
XERULACEAE	aucun tissu hyménial n'est gélifié.

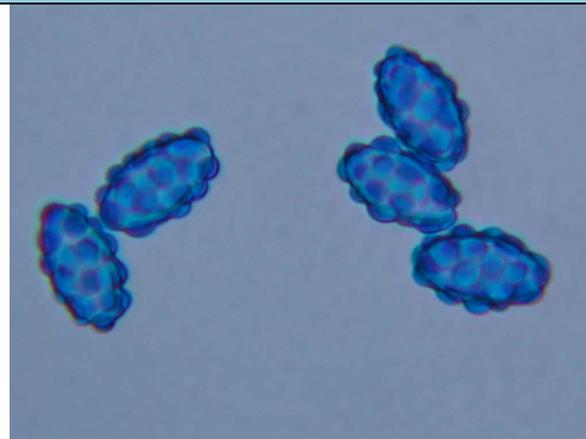
GASTEROMYCETIDAE	
BOVISTA	Spores NA - ND, avec un long reste de stérigmate, finement verruqueuses (c'est nettement plus visible après traitement à l'acide sulfurique à 80 % durant 15 minutes).
CALVATIA	Spores NA - ND, jaune doré dans l'eau ; l'acide sulfurique à 80 % met en évidence de fines aiguilles.
CLATHRUS	Spores lisses, NA - ND.
GEASTRUM	Spores verruqueuses, NA - ND ; capillitium à paroi épaisse (rugueuse ou avec des verrues incrustées).
LYCOPERDON	Spores quasi lisses, ou nettement échinulées, NA - ND. <i>Lycoperdon pyriforme</i> est la seule espèce du genre à posséder une spore lisse, à gouttelette centrale.
MUTINUS	Spores lisses, hyalines, NA - ND.
NIDULARIA	Spores lisses, NA - ND.
PHALLUS	Spores lisses, NA - ND.
RHIZOPOGON	Spores NA - ND ; périidium à hyphes parallèles ; pas de boucles.
SCLERODERMA	Spores NA - ND, à aiguillons et (ou) réseau. Observer les spores dans le KOH à 10 ou 20 %, ce qui va dissoudre la gangue grasseuse et éclaircir les parois.

PHRAGMOBASIDIOMYCETES	
AURICULARIA	Spores lisses, hyalines, arquées (en forme de banane), NA - ND ; basides avec cloisons transversales ; pas de cystides ; pas de boucles.
CALOCERA	Spores lisses, hyalines, avec parfois une cloison, NA - ND ; basides fourchues ; pas de cystides ; pas de boucles.
DACRYMYCES	Spores avec 1 à 3 cloisons, NA - ND ; trame avec hyphes à pigment jaune vif ; pas de cystides ; pas de boucles.
EXIDIA	Spores allantoïdes (en forme de saucisse), NA - ND ; basides avec cloisons longitudinales ; pas de cystides ; présence de boucles.
PSEUDOHYDNUM	Spores globuleuses, NA - ND ; basides avec cloisons longitudinales ; pas de cystides ; pas de boucles.
UREDINALES	Le bleu coton lactique ou lactophénolé est très efficace, surtout chauffé.

ASCOMYCETES



Ascospores de *Peziza vacini* – photo François Valade



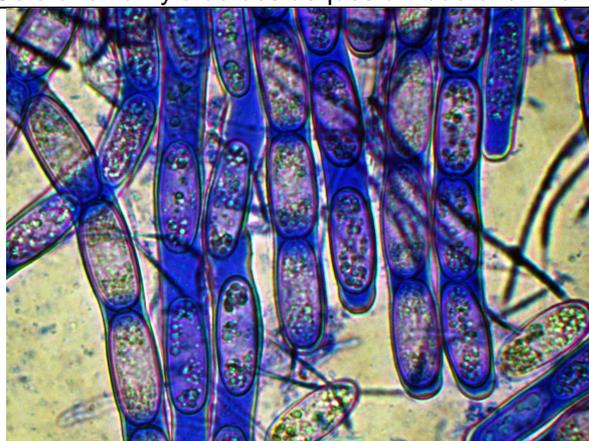
Ascospores de *Trichophaeopsis paludosa var. tuberculata*
photo Yves Deneeyer

Ornementation sporale des ascospores et asques sont remarquablement mis en évidence par divers bleus, dont le bleu coton lactique ou lactophénolé, le bleu de crésyl, le bleu de toluidine.

L'appareil apical (nasse apicale) se colore en bleu avec les réactifs iodés (réactif de Melzer, lugol et IKI).

Pas de coloration des asques à l'iode chez les morilles, helvelles et truffes, chez *Thelebolaceae*, *Sarcoscyphaceae*, *Pyrenomataceae*.

Coloration amyloïde des asques à l'iode chez *Pezizaceae* et *Ascobolaceae*.



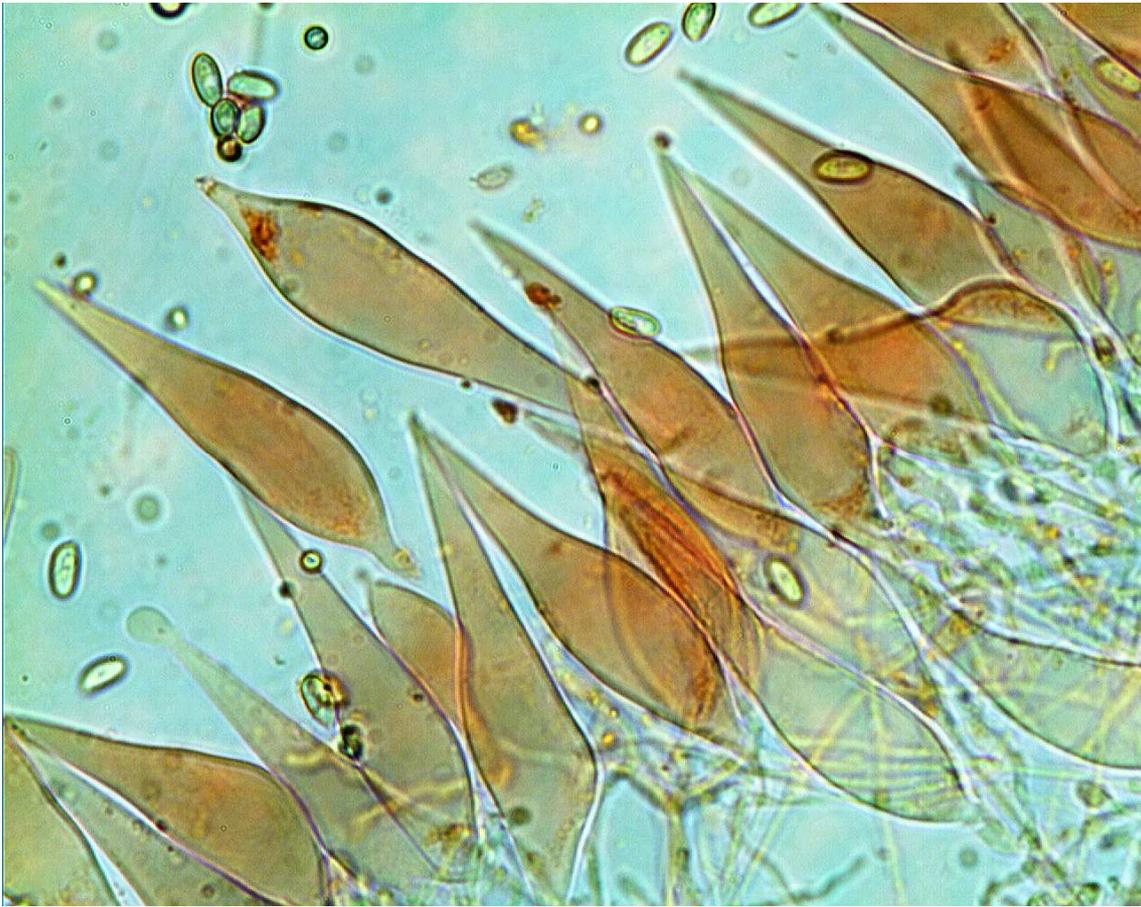
Sarcoscypha coccinea (bleu de crésyl)

Asques et ascospores chez *Tuber aestivum* - Coloration avec Rouge Congo SDS

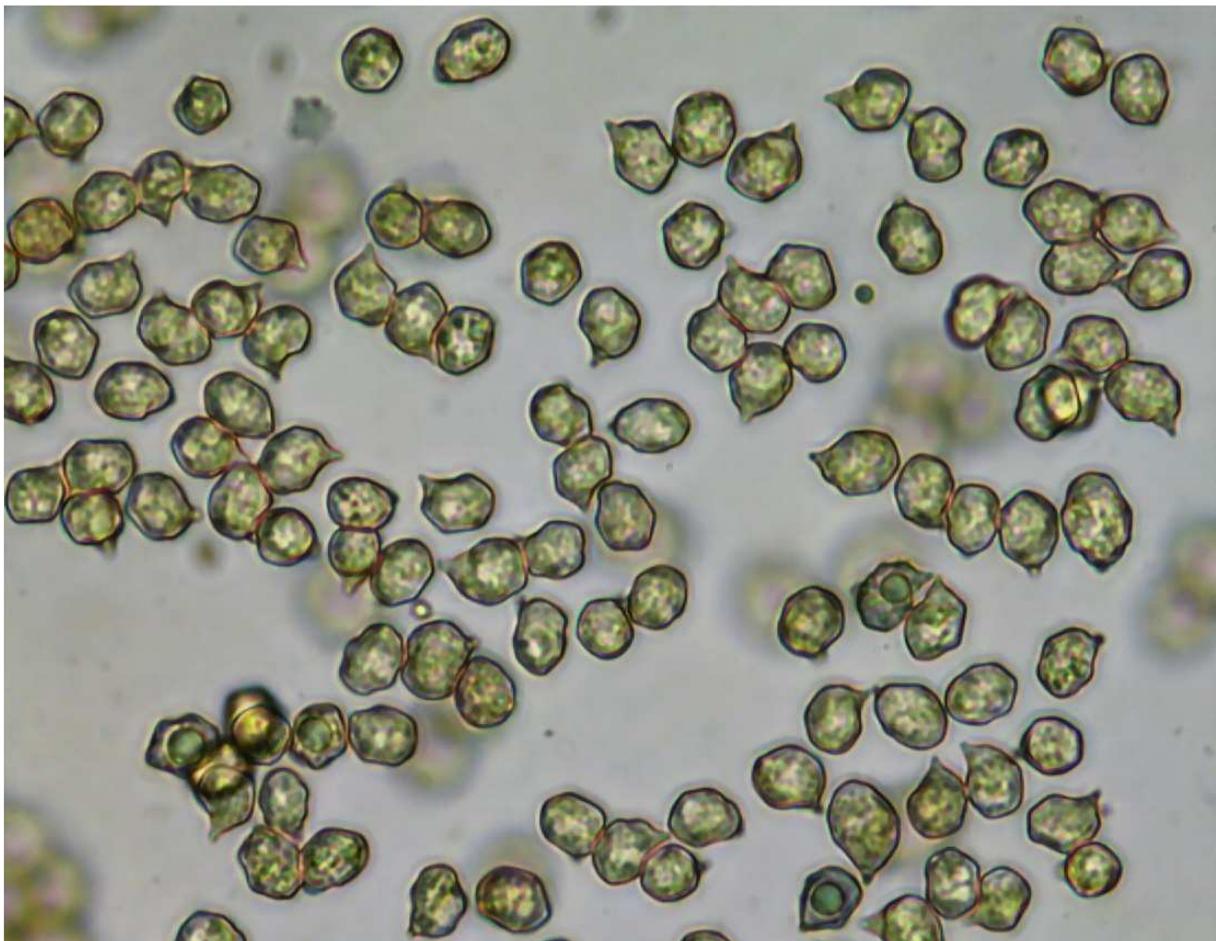


GEOPORA

coloration évidente des noyaux avec carmin acétique + chlorure de fer III



Macrocytides chez *Macrocytidia cucumis*, 40x



Spores anguleuses chez *Entoloma rhodopolium*, 40x, mises en évidence avec Azoblack

Un colorant trop peu utilisé en mycologie : le bleu de crésyl

PRÉPARATION : nous rappelons que la manipulation de produits chimiques purs demande des précautions importantes, notamment au niveau respiratoire : utilisation impérative d'une hotte aspirante ; la bonne cohésion d'un colorant justifie aussi l'utilisation d'un agitateur magnétique.

La solution aqueuse :

eau bidistillée :	100 ml
bleu de crésyl :	1 g
agent mouillant : SDS	0,5 g

La solution alcoolique :

alcool éthylique à 90° :	100 ml
bleu de crésyl :	2 g
agent mouillant : SDS	0,5 g
eau bidistillée :	100 ml

La formule de Cléménçon (1972) :

éthanol à 96° :	27 ml
bleu de crésyl :	0,5 g
eau bidistillée :	55,5 ml
agent mouillant : SDS	0,5 g
glycérine pure :	17 ml

Mélanger longuement (agitateur magnétique durant 6 heures) et filtrer.

UTILISATION

C'est un colorant orthochromatique (le bleu colore en bleu), mais lors d'applications particulières, il devient **métachromatique**, c'est-à-dire qu'il colore différents éléments de la cellule en nuances différentes (le préfixe méta- implique une idée de changement).

Au départ, le bleu de crésyl est un **colorant vital**, c'est-à-dire qu'il colore les tissus et les éléments cellulaires d'un être vivant (animal, plante, champignon), sans exercer d'action nocive ou létale immédiate. Dans ce cas, la dilution est très grande : de l'ordre de 1/10.000. Une coloration vitale n'est pas une teinture, mais une accumulation de colorant dans des parties bien spéciales de la cellule ; c'est un colorant basique des vacuoles, qui affichent une coloration uniforme ou montrent une inclusion plus ou moins importante de granulations fortement teintées.

En solution aqueuse concentrée, il colore le protoplasme des cellules en bleu foncé et les tue.

Pour la détermination d'un genre ou d'une espèce mycologique, il faut accorder beaucoup d'importance à la coloration prise par la paroi cellulaire ; elle peut réagir de manières différentes :

- elle ne se colore pas
- elle se colore en bleu ou violet (couleurs normales du bleu de crésyl) : on parle alors de **orthochromasie** ou de **coloration orthochromatique**.
- elle se colore en pourpre ou rouge (couleurs différentes du bleu de crésyl) : on parle alors de **métachromasie** ou de **coloration métachromatique**.

La littérature spécialisée apporte beaucoup de renseignements sur ce sujet :

POUR ROBERT KÜHNER

Cela permet de mettre remarquablement en évidence l'endospore de la paroi sporique des *Macrospora* & *Leucocoprineae*, qui se colore de manière élective en rouge pourpre.

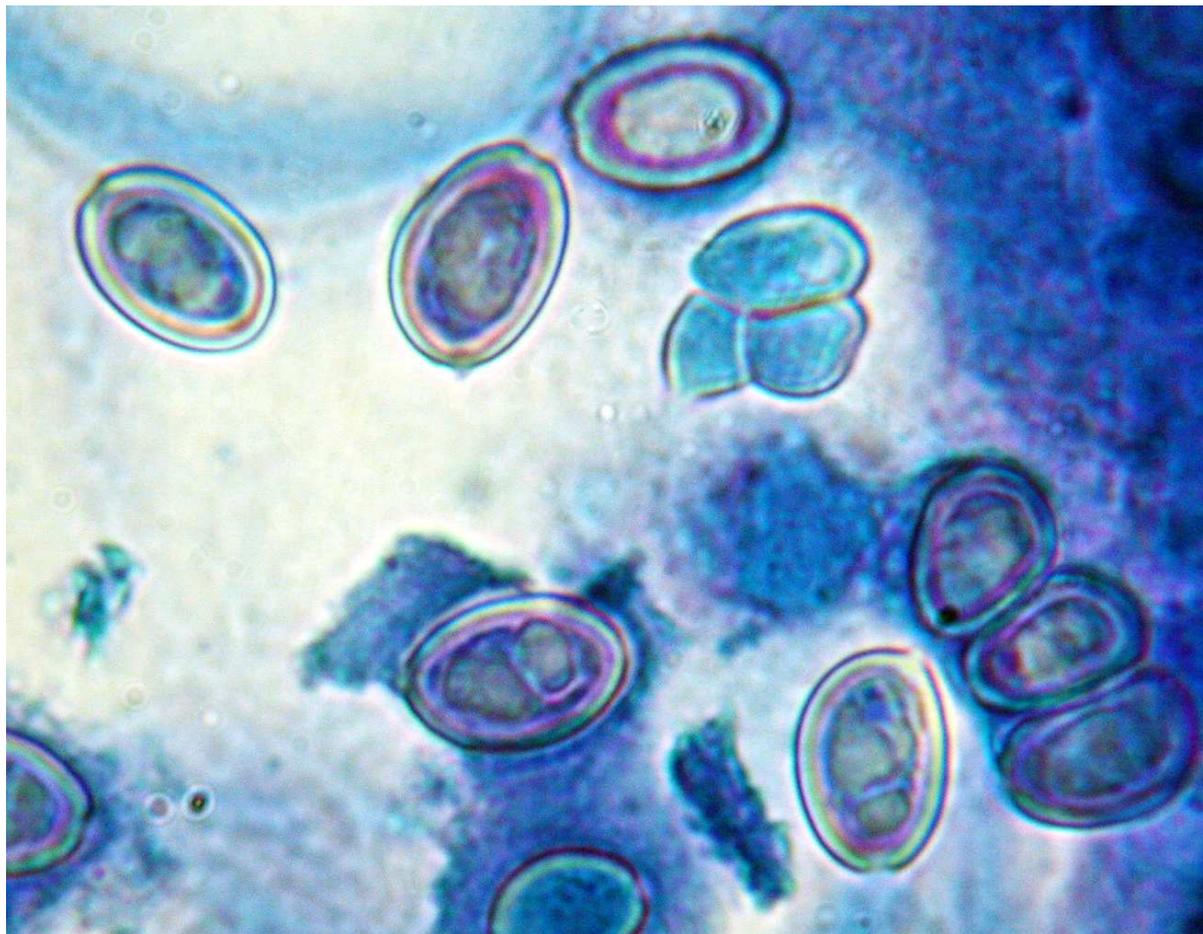
- Écraser un fragment de tissu dans une grosse goutte de bleu de crésyl entre deux LPO.
- Enlever une des lames et verser sur le fragment dissocié une nouvelle goutte de bleu.
- Laisser agir 10 minutes, poser une LCO et observer à la lumière du jour (afin de bien saisir les nuances de violet qui paraissent plus rouges avec une lumière artificielle).
- A la loupe, on peut déjà reconnaître une réaction métachromatique, mais le contrôle microscopique est indispensable, à cause de la superposition des teintes.

Le même auteur a également démontré que le bleu de crésyl colore de manière caractéristique les enclaves ou exsudats lipidiques :

- Colorer la préparation dans une solution aqueuse de bleu de crésyl.

- Placer ensuite la préparation dans une goutte d'ammoniaque et observer.
- Les lipides libres se colorent en jaune doré caractéristique tandis que la préparation se décolore et se salit.

SELON BART BUYCK, le spécialiste mondial des Russules : « *En solution alcoolique, il est devenu pour moi un réactif de routine, permettant souvent une observation de qualité supérieure à celle dans le rouge Congo ou d'autres réactifs pour pas mal de russules. Toutes mes descriptions publiées depuis 1990 mentionnent systématiquement la coloration du revêtement dans le bleu de crésyl, mais il n'y a plus eu d'article portant uniquement sur l'importance du bleu de crésyl dans les russules. En Europe, le bleu de crésyl est surtout utile pour l'observation des incrustations sur les hyphes (primordiales ou autres) et la reconnaissance du groupe de cyanoxantha (dans les rares cas où on aurait des doutes sur le terrain). L'intense coloration métachromatique dans ce dernier groupe ne trouve son équivalent que dans certains Foetentineae, moléculairement les espèces les plus proches de cyanoxantha* ».



DAGRON A MIS AU POINT UNE TECHNIQUE très élaborée de double coloration pour les pilécystides des scalps de russules : c'est long mais cela donne des résultats extraordinaires.

Voici la marche à suivre, en tenant compte qu'entre chaque étape, il est impératif de laver à l'eau :

- + placer le scalp durant 15 minutes dans l'ammoniaque ;
- + le passer ensuite dans l'eau de javel commerciale durant 15 minutes ;
- + 4 heures minimum dans le rouge Congo concentré, pour assurer la saturation des cloisons des cystides ;
- + 2 à 15 minutes dans le bleu de crésyl, selon le niveau de coloration souhaité.

COMMENTAIRES ET REMARQUES DIVERS

« *Le genre Macrolepiota et les Leucocoprineae présentent une endospore métachromatique (rouge-violacé dans le bleu de crésyl) et un pore germinatif proéminent. Cependant, les "Lepioteae" (dont fait partie le genre "Lepiota") ne possèdent ni endospore métachromatique, ni pore germinatif nettement marqué* » (Philippe Dufour).

« *Il est possible de déceler une réaction métachromatique sur les spores de Leucoagaricus machrorizus en combinant avec un traitement préalable à NH₄OH (ammoniaque) portée à l'ébullition, en chauffant la préparation. La réaction métachromatique est bien visible dans ces conditions* » (Serge Poumarat)

« Le bleu de crésyl fait apparaître une gangue rugueuse sur les pleurocystides à crochets, chez certains *Pluteus* » (Guillaume Eyssartier)

ECHANGE DE CORRESPONDANCE AVEC JEAN LACHAPPELLE (†), qui a réalisé des expériences de mise en évidence des pigments et des incrustations pariétales qu'ils occasionnent : les résultats sont spectaculaires en utilisant la solution alcoolique recommandée par Cléménçon.

Le bleu de crésyl révèle les caractères des dermatocystides et des laticifères des russules ; dans ce dernier genre, il révèle aussi les incrustations des hyphes primordiales et d'autres cellules.

Les pigments pariétaux des hyphes du pileipellis de *Tricholoma acerbum* apparaissent - pour reprendre l'expression d'A. Marchand - comme des épines sur une tige de ronce !

Les incrustations des hyphes cuticulaires de *Alnicola scolecina* sont remarquablement visibles.

Les pigments vacuolaires des hyphes du pileipellis de *Lepiota boudieri* apparaissent comme des billes franchement colorées dans un sac tubulaire.

Les premières observations sont prometteuses. Il faudrait inciter l'un ou l'autre mycologue intéressé à faire de telles expériences de son côté.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

Un bain de 60 sec. dans le bleu de crésyl selon Cléménçon donne d'excellents résultats sur *Morchella rotunda*, avec les asques colorés en bleu clair et les ascospores bien visibles, certaines fixant vivement le bleu ; on distingue nettement sur certaines spores, de fines gouttelettes externes, agglutinées aux deux pôles. Pas de métachromasie au niveau de la paroi (mais cela existe-t-il chez les ascomycètes ?)

Le bleu de crésyl selon Cléménçon, appliqué durant 2 minutes, s'avère excellent pour différencier le contenu du cytoplasme des spores chez *Mitruha paludosa* ; mais le résultat est médiocre au niveau des asques et des paraphyses. Il faut noter que ce colorant est très efficace sur le cytoplasme des algues filamenteuses, dont j'ai trouvé des débris dans ma préparation, ce qui n'est pas surprenant puisque ce champignon vit dans des lieux très humides et même dans l'eau.

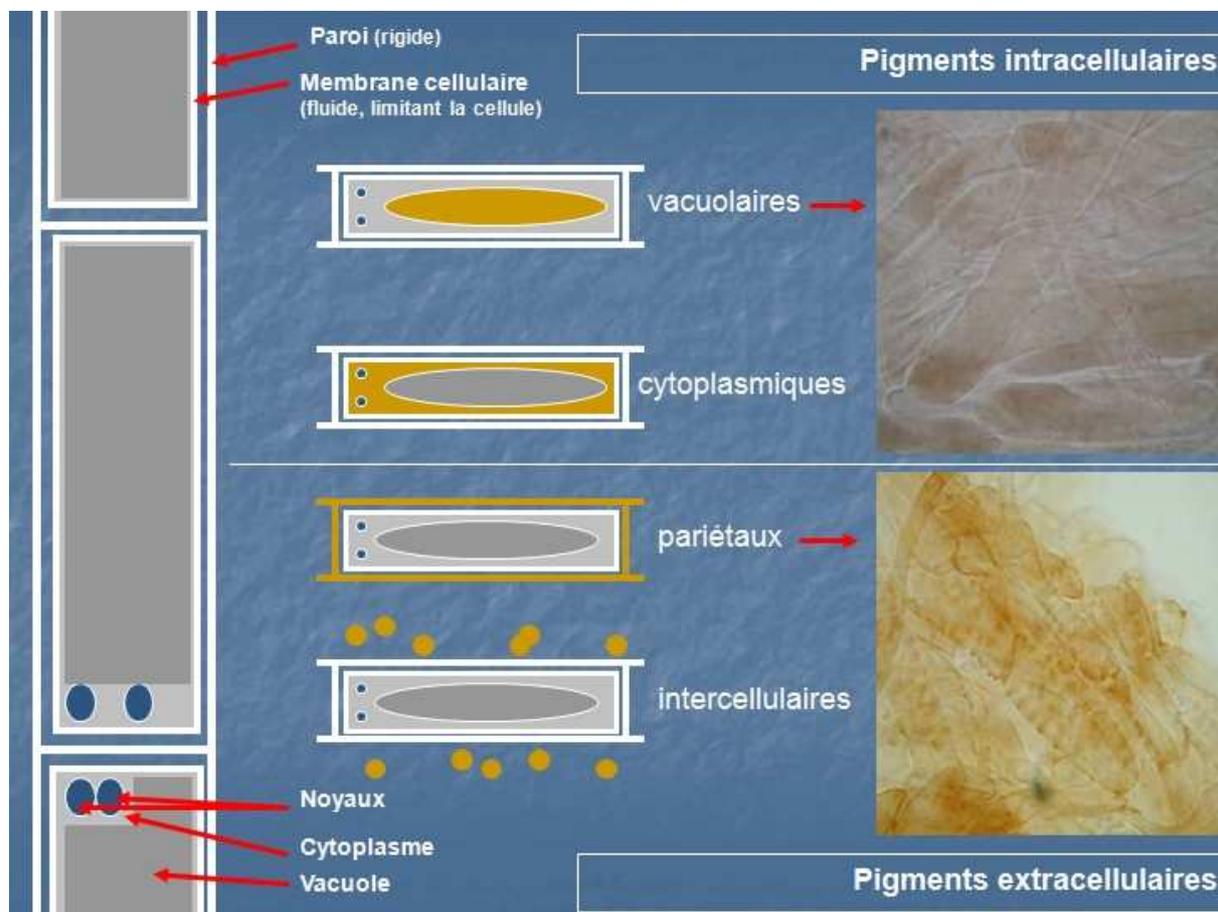
En faible solution aqueuse (1/200 à 1/500), il sert à colorer le corps sporal des *Orbillia*, dont l'observation est obligatoire pour l'identification (à plus forte concentration, ou dans une solution alcoolique, la cellule est tuée).

Avec les cystides des lactaires de la section *Vollemi*, on a une réaction orthochromatique.

Etude des pigments chez les champignons

Un pigment est une substance colorée présente dans les cellules auxquelles elle confère leur couleur. Des exemples sont bien connus des naturalistes : la mélanine est le pigment brun de la peau ; la chlorophylle est le pigment vert des feuilles ; des pigments sont responsables de la couleur des fleurs et des fruits. Ils sont très présents notamment dans le monde végétal, car ce sont des métabolites secondaires⁶⁴ des plantes ; on les rencontre aussi chez les bactéries et les champignons. La principale famille des pigments flavonoïdes⁶⁵ est celle des anthocyanes⁶⁶.

Dans le remarquable schéma ci-dessous (préparé par Guillaume Eyssartier), nous reconnaissons les



différents types de pigments que nous allons rencontrer lors d'observations microscopiques réalisées au niveau de la cuticule des champignons. Cela concernera notamment les Entolomes et les Inocybes, car leur situation permettra de se diriger vers des sections différentes.

On recherchera les pigments dits **intracellulaires** (ils se rencontreront à l'intérieur de la cellule) :

- les pigments **vacuolaires** seront présents à l'intérieur des vacuoles
- les pigments **cytoplasmiques** se trouveront dans le cytoplasme.

Les pigments **extracellulaires** (qui sont à l'extérieur de la cellule) seront de deux ordres :

- les pigments **pariétaux**, qui se trouvent dans ou sur les parois
- les pigments **intercellulaires** portent bien leur nom : ils se rencontreront entre les cellules.

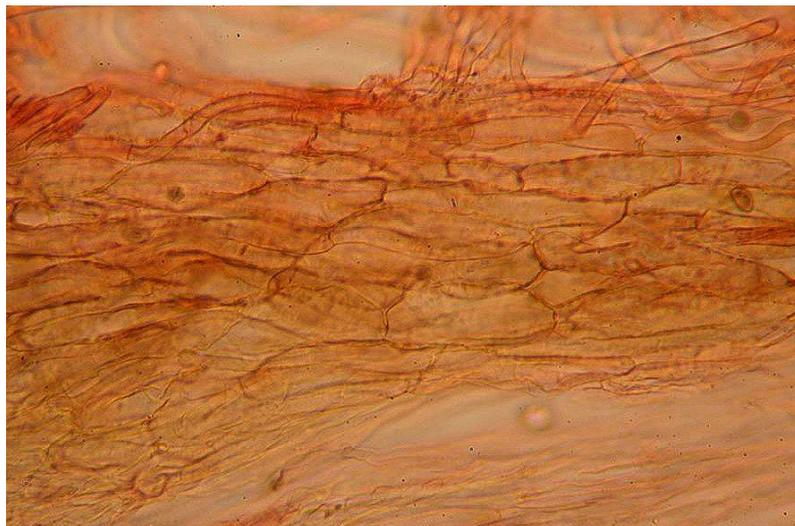
⁶⁴ Il faut savoir que les métabolites primaires participent directement à la vie d'un organisme en assurant croissance et développement, et sont indispensables à la nutrition ; on compte parmi eux les acides aminés, les glucides, les lipides ou encore les acides nucléiques.

Les métabolites secondaires jouent un rôle plus ponctuel et ne participent pas directement au cycle vital, mais peuvent intervenir dans la vie relationnelle d'un organisme (défense ou attirance par exemple). Ils appartiennent à trois grands groupes : les phénols, les terpènes, les composés azotés.

⁶⁵ Les flavonoïdes sont des composés chimiques qui appartiennent aux polyphénols. Ces molécules sont principalement responsables de la couleur, notamment des fleurs et des fruits ; ils représentent une source importante d'agents antioxydants dans l'alimentation humaine. Leur structure de base est composée de deux cycles benzéniques de carbone (C₆) séparés par un pont en C₃. Ils ont été découverts par hasard en 1936, par un médecin, Albert Szent-Györgyi, alors qu'il cherchait à traiter un patient souffrant de problèmes capillaires, générant des saignements.

⁶⁶ Ce sont des molécules absorbant certaines longueurs d'ondes lumineuses. Elles vont du rouge au bleu et sont situées dans les vacuoles des cellules. En modifiant le pH, on peut modifier la délocalisation électronique de la molécule, et donc la couleur. Voilà pourquoi une fleur vieillissante change de couleur : en effet son pH augmente.

Les mettre en évidence n'est pas très facile, car ils ne résistent pas longtemps aux traitements chimiques (colorations) et la plupart sont hydrosolubles.



Cuticule d'*Inocybe pusio*, avec pigments vacuolaires – photos Alain Ferville

Dans le cas présent, il n'est pas nécessaire de travailler sur du matériel frais, car il n'y a pas de problème - en principe - pour mettre les pigments en évidence sur des exsiccata, en ce qui concerne les pigments pariétaux et intracellulaires.

Marcel Bon parle de pigments mixtes dans ses clés des *Inocybes*, mais cette notion ne nous paraît pas très claire.

« Chez *Inocybe malençonni*, par exemple, M. Bon annonce une pigmentation mixte : effectivement ici on voit très bien le pigment pariétal épaississant et donnant la réfringence de la paroi, et à l'intérieur une texture granuleuse nuageuse, qui pourrait traduire ce fameux pigment intracellulaire ... »
(Alain Ferville)

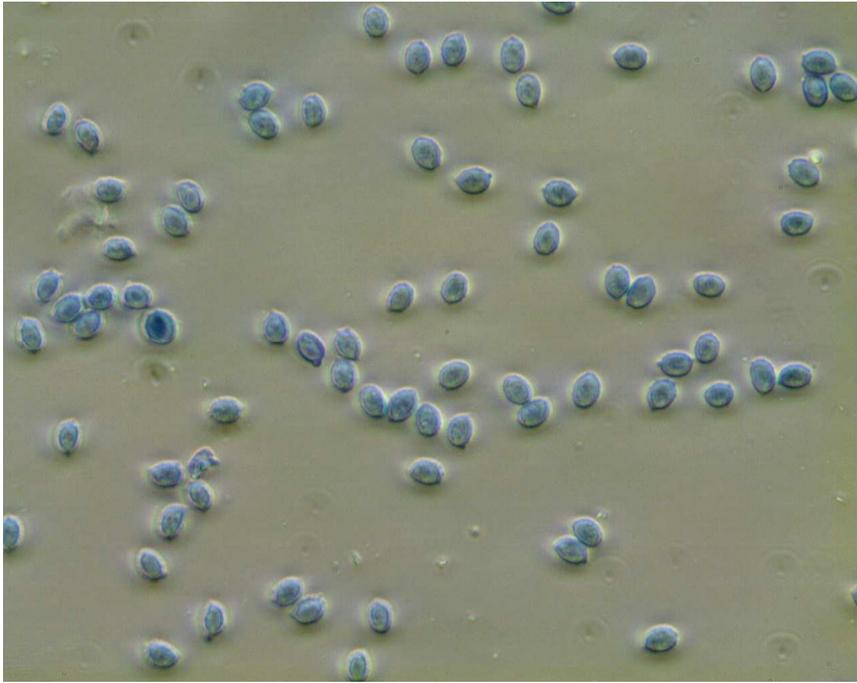


Mode opératoire :

- prélever un fragment de cuticule
- dissocier et observer dans l'eau.

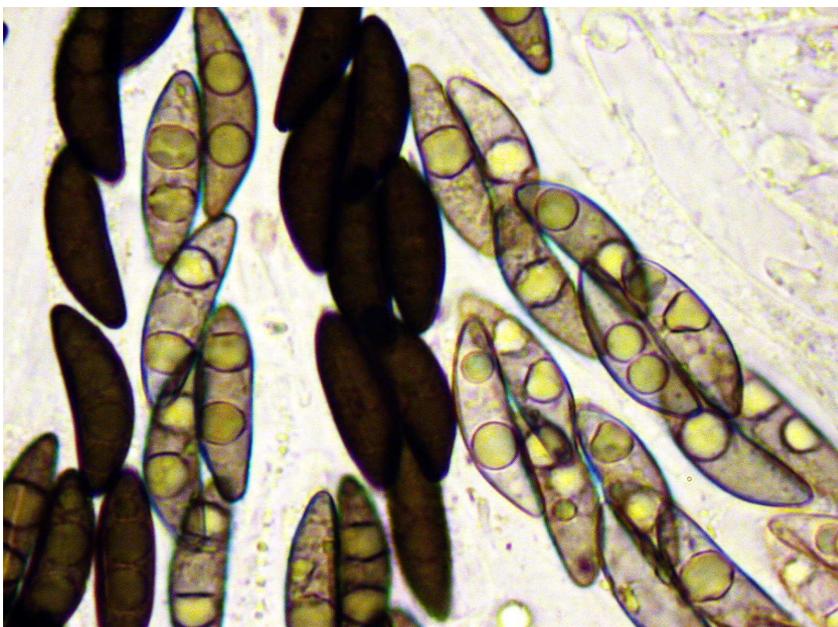
Certains pigments sont célèbres : ce sont les anthraquinones, qu'on rencontre chez les représentants du genre *Dermocybe*. Cependant, il faut être bien conscient que l'intérêt de ces pigments ne s'exprime que par rapport à des espèces proches des *Dermocybe*, qui ne possèdent pas ces pigments, et qu'on peut classer sur cette base. Il est certain qu'on trouve des anthraquinones dans beaucoup d'autres groupes (comme les *Tricholomes*, par exemple) qui n'ont pas le moindre caractère commun avec les *Dermocybe*.

Dans le genre *Cortinarius*, section des *Incrustati*, les hyphes de l'épicutis sont souvent incrustées, de même que le revêtement cuticulaire a des hyphes à pigmentation incrustante.



Spores de *Rhodocybe obscura*, observées en contraste de phase

Helicosporium sp.



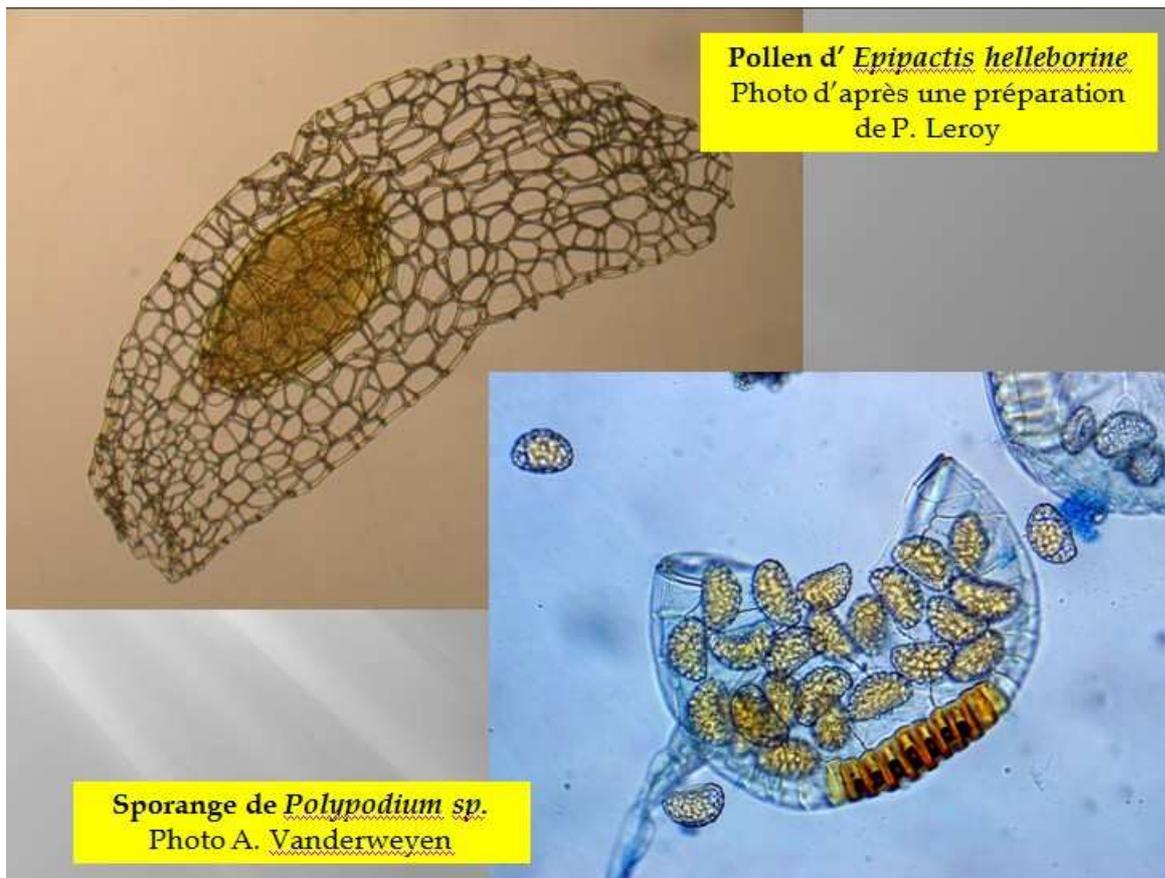
Xylaria polymorpha

Chapitre 05

MICROSCOPIE

ET

BOTANIQUE



Applications de la microscopie optique dans l'étude des plantes

Guy Auderset⁶⁷

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) est calculé 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.

Attention : 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 mélange de produits, le fixateur, dont les composants vont agir sur les structures cellulaires en les stabilisant : 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 vi-

⁶⁷ Docteur en Sciences biologiques (1974), chargé de cours à l'Université de Genève - consultant en microscopie pour entreprises et particuliers, dans des projets impliquant le développement de la microscopie et de techniques associées.
Site : <http://www.microresolution.net/> ; contact : info@microresolution.net

sualisation 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 qui donne un résultat acceptable est le **FAA** ou **AFA** (Alcool Formolé 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 LPO 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. Le choix d'un 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 AFA.

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.

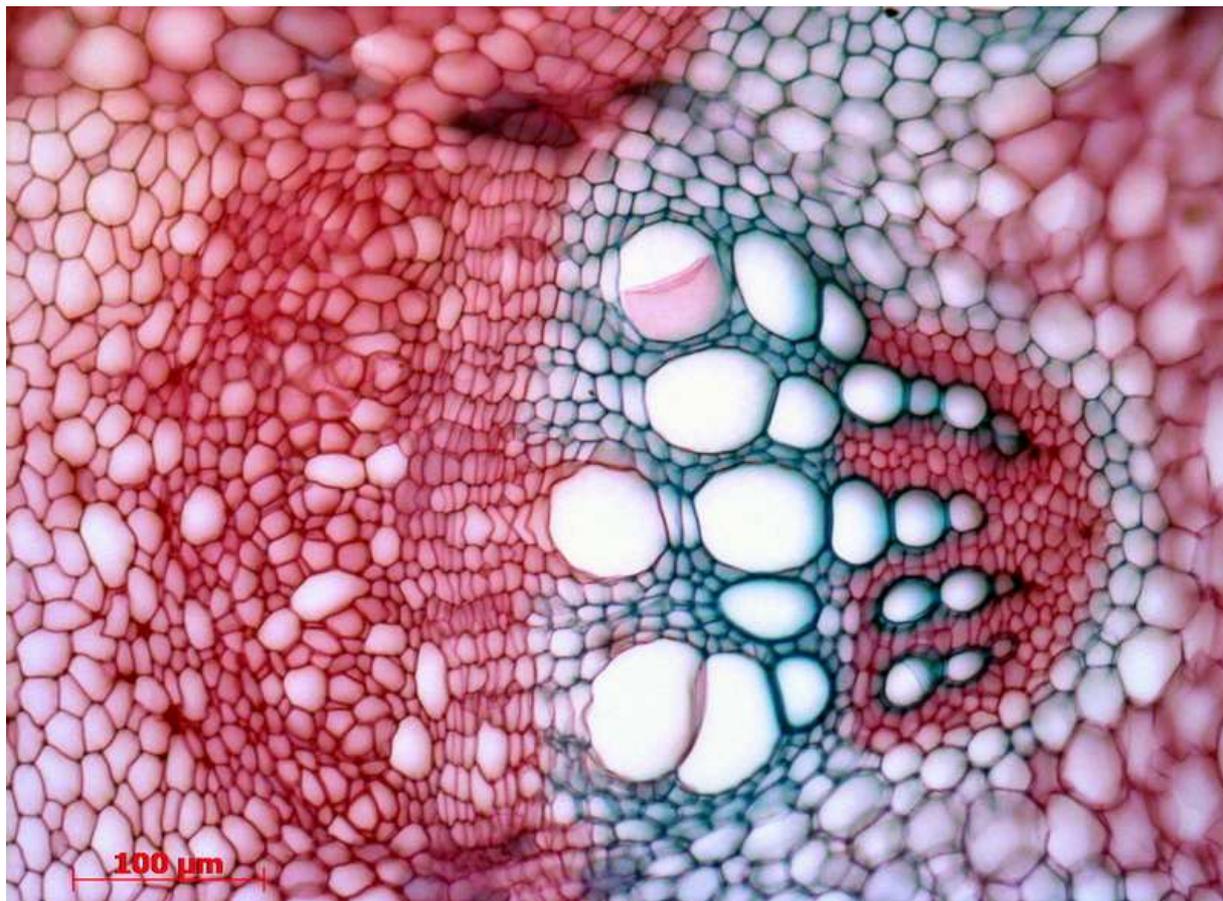
Inconvénient : aucune information sur le contenu cellulaire (noyaux, organelles, cytoplasme) qui est détruit pendant la préparation.

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.



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

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.

Pour une observation momentanée, les monter dans de l'eau ou de la glycérine entre LPO et LCO ; 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

Chapitre 06

TECHNIQUE COMPLETE de préparation d'une coupe de plante ou de champignon 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 manière la plus simple de contourner la similitude de réfringence, sera d'imposer des différences artificielles grâce à la coloration. Ce n'est pas si simple que cela, car l'application d'un colorant est soumise à certaines conditions très précises et est presque toujours létale (voir le texte 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 informa-

tion, 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.

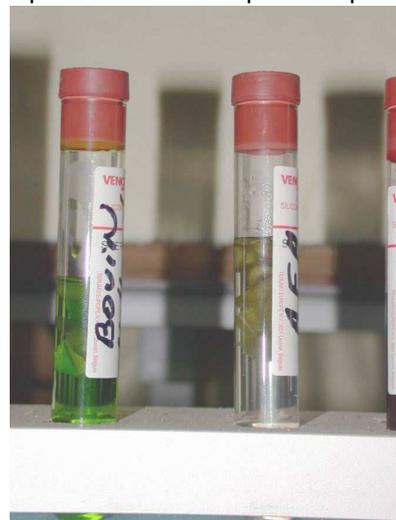
1. Généralités relatives à LA FIXATION

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 de gros sujets
- 2/ étude des 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 !

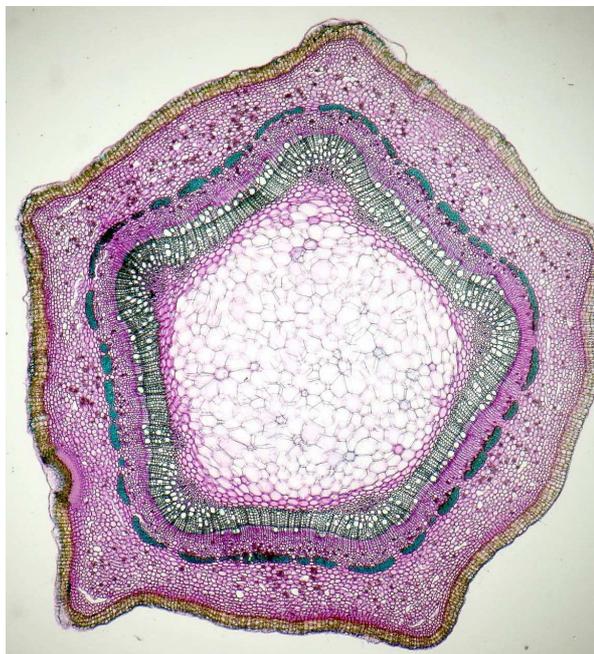
Nous avons d'ailleurs le sentiment que les techniques appliquées à ces deux disciplines sont sensiblement plus abordables et plus simples, car exigeant moins de manipulations et présentant moins de cas particuliers.

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 !

Coupe transversale de tige de peuplier - 25x – coloration au carmino-vert de Mirande – photo Guy Auderset

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'ÉTHANOL absolu ou ALCOOL ÉTHYLIQUE 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 déshydratant puissant, comme le sodium, et relève d'un laboratoire) → aussi, oublions le !

2/ L'ÉTHANOL ou ALCOOL ÉTHYLIQUE 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 TRINITROPHÉNOL ou ACIDE PICRIQUE : il est à la fois fixateur et colorant (jaune). A manipuler avec précaution, car il devient explosif lorsqu'il est chauffé. Il ne durcit quasiment pas les tissus.

Nous leur préférons cependant 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 FORMALDÉHYDE ou MÉTHANAL (dans le commerce, il est vendu sous le nom **de FORMOL** : attention, car la solution commerciale contient beaucoup d'impuretés ... voir la fiche technique à ce sujet sur notre site !

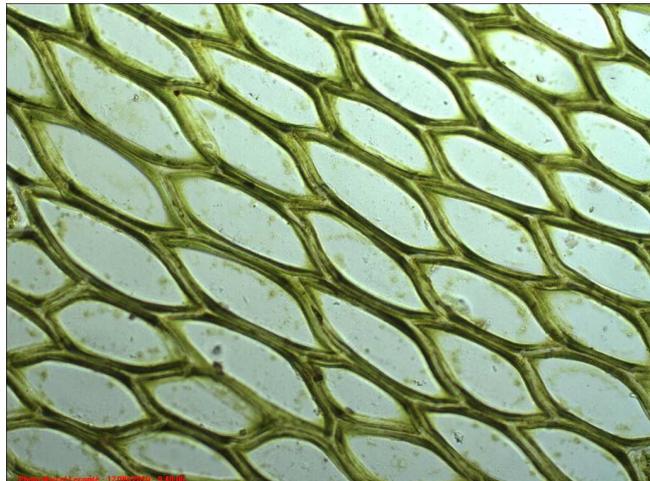
Il présente beaucoup de qualités à nos yeux :

- il fixe les lipides
- il ne contracte pas les tissus et il les durcit fortement
- 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 (forum Le Naturaliste) 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 ...».



Bryophyte : *Rhizomnium pseudopunctatum* – pas de coloration

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 deux parois latérales.

2/ L'ACIDE ACÉTIQUE (il est dit « glacial » lorsqu'il est anhydre) ; il cristallise dès qu'on descend sous 10°C ; 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...)
- **l'alcool formolé acétique = AFA** (formule passe partout)
- **le fixateur gala de W. Dioni** (Protozoaires, Rotifères, Algues...).

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.

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 cellulodiques) 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 Bêcher ; 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. RINÇAGE 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 cellulosique ; 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 deux colorants différents, qui vont se compléter, par exemple : safranine + vert de méthyle / safranine + astra blue / safranine + bleu de méthyle aqueux / carmin aluné + vert d'iode / rouge Congo + phloxine B / Etzold blau / Etzold grün / carmino-vert de Mirande

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. RINÇAGE de la coupe colorée

7. OBSERVATION : les parois cellulaires seront remarquablement colorées selon leur nature (ligneuse 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 avons travaillé durant 5 ans 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 semblaient 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.

Nous devons malheureusement reconnaître que les résultats sont relativement aléatoires et parfois décevants.

Technique opératoire de l'inclusion à la paraffine :

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

Utiliser des petits tubes de Borel 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 (voir p. 89) 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'IMPRÉGNATION 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'IMPRÉGNATION** dans un bain de paraffine chaude : (voir les détails ci-dessous)

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

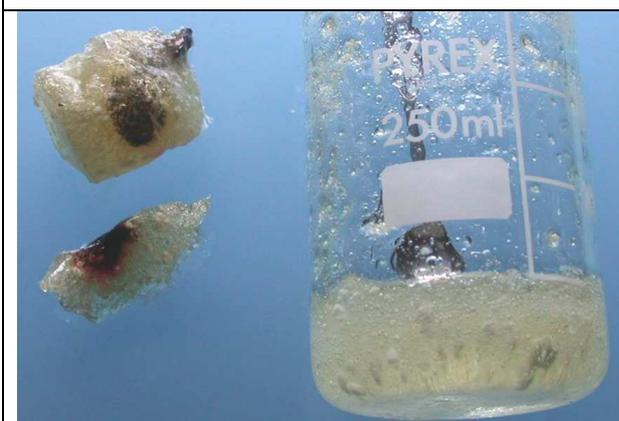
L' INCLUSION (tableau comparatif)	
Dans le PEG	Dans la paraffine
1. Les pièces ont été rincées 3 fois dans l'eau distillée, puis égouttées.	1a. Laver et placer dans l'alcool à 96°.
	1b. Répéter les bains d'alcool de 3 à 9 fois, selon la taille de l'objet à déshydrater.
	1c. Terminer par un bain de trichloréthylène, 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.
	N B : toutes ces opérations sont effectuées sur une période de 24 heures !
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).	
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.	2. Préparer un mélange de trichloréthylène (25%) et de paraffine (75%) et maintenir légèrement au-dessus du point de fusion (+/- 55 °).
3. Y laisser les pièces durant 6 heures afin de permettre une bonne imprégnation.	3. Y laisser les pièces au moins 24 heures, jusqu'à élimination complète du solvant.
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.	4. Transférer ensuite dans 1 bain de paraffine pure, bien fondue, durant le même laps de temps au moins.
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.	
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).	5. Verser la paraffine chaude dans un moule, y placer les pièces, et les orienter.
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.	6. Refroidir le moule à l'air puis à l'eau.
Ces opérations (2 → 6) seront effectuées en 7 heures !	Ces opérations (4 →7) vont demander au moins 48 heures !
7. Démouler et essuyer les blocs avec soin.	7. Démouler.



Un bloc de PEG qui vient d'être démoulé



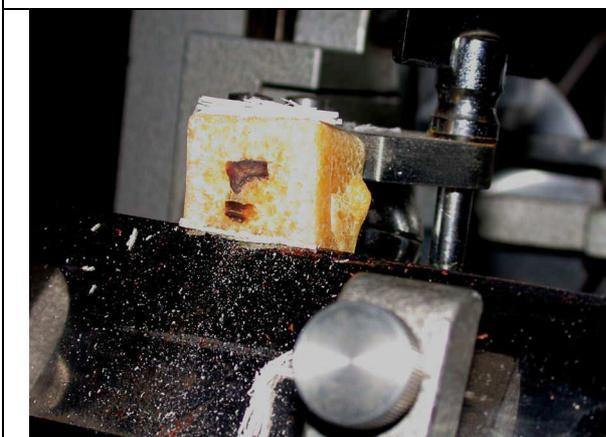
Le bloc de PEG est fixé à chaud sur le mandrin de support du microtome



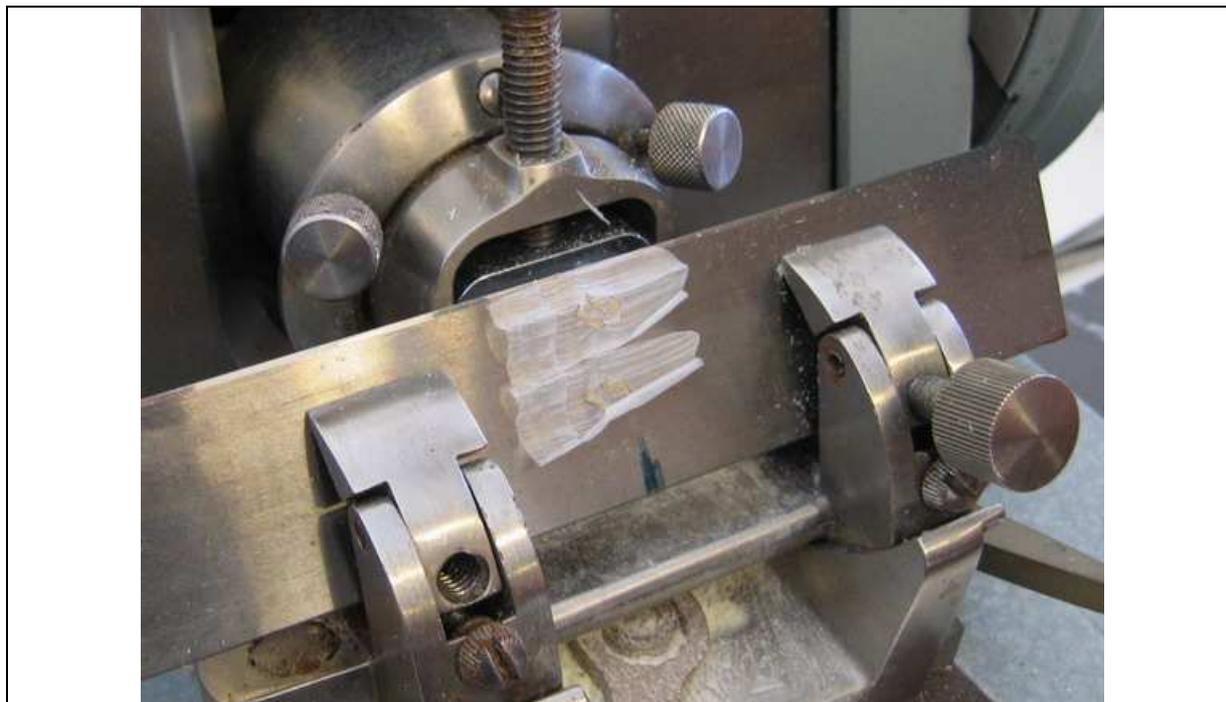
Des éléments inclus dans un bloc de PVA



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, sur des blocs de paraffine : les rubans se forment sur la lame, sont recueillis sur la main ou une feuille de papier ; on voit nettement la coupe au centre des tranches

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 qui se trouvent sur notre site.

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 Dean**: 10 % de glycérine, 89 % d'eau, 1 % d'agent mouillant (SDS).
- **Le liquide de Cléménçon** (1986) : 20 cc d'ammoniaque concentrée, 1 g de glycérine, 80 cc 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 : à nos yeux, il remplace avantageusement le suivant, car il ne contient pas de phénol.

Le bleu coton au lactophénol (ou bleu lactique de Guégen) : 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 ornements 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.



Macrocystides d'*Inocybe curvipes*, colorées au rouge Congo - photo Daniel Ghyselincx

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 : voir l'article détaillé en page 109.

Il s'utilise selon plusieurs démarches différentes.

- En solution aqueuse largement diluée, il permet soit une coloration uniforme des vacuoles, soit la mise en évidence de granulations fortement teintées.
- En solution aqueuse concentrée, il colore le protoplasme cellulaire en bleu foncé, ainsi que la paroi.

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.

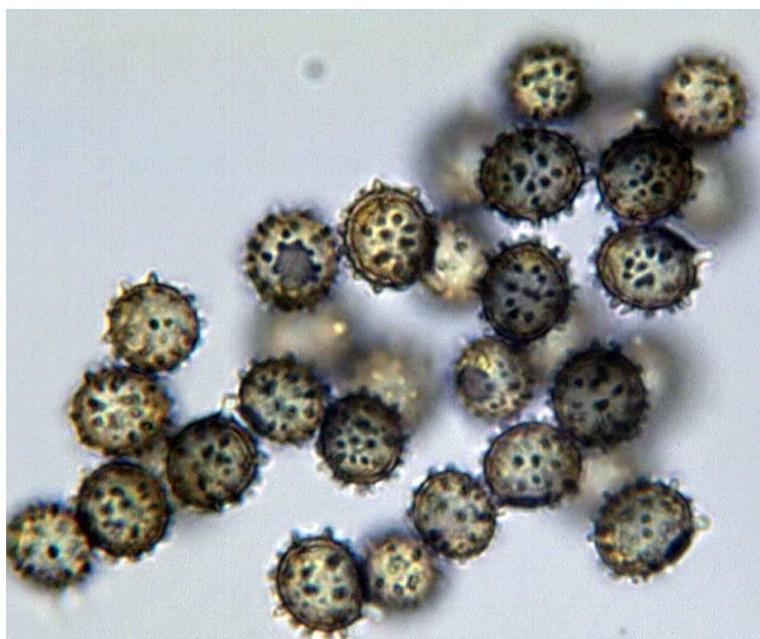
Il colore remarquablement les granulations carminophiles des basides des genres *Nyctalis*, *Tephroclybe* et *Lyophyllum*.

La fuchsine de Ziehl : (rouge de Ziehl, karbolfuchsin). Elle s'utilise conjointement avec de l'acide chlorhydrique en solution diluée ou du lactoglycérol. Elle est très utilisée pour l'étude des russules et particulièrement des hyphes cuticulaires présentant des incrustations dites acido-résistantes. 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.



Réaction amyloïde des spores de *Russula lilacea*

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.

INTERPRÉTATION :

- Aucune coloration d'éléments constitutants n'apparaît → non amyloïde : un élément non amyloïde aura un aspect jaunâtre ou hyalin.
- Une coloration orange à brun clair de certains éléments apparaît → dextrinoïde.
- 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 Aphyllophorales.

Sont amyloïdes, notamment :

- Les spores des genres *Amanita*, *Mycena*, *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 I+) 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).

Asques et ascospores avec réaction dextrinoïde ou nulle, au lugol – la nasse apicale est colorée en bleu - photo Françoise Draye



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 : 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** colore en brun sombre le contenu des cystides et des laticifères.
- ❖ **La sulfo-vanilline** 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** colore les piléocystides de certaines russules (dites alors SBA+).
- ❖ **Le sulfo-pipéronal** est à peine meilleur que le précédent (le noircissement des cystides de russules paraît plus prononcé) mais s'avère 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 !)

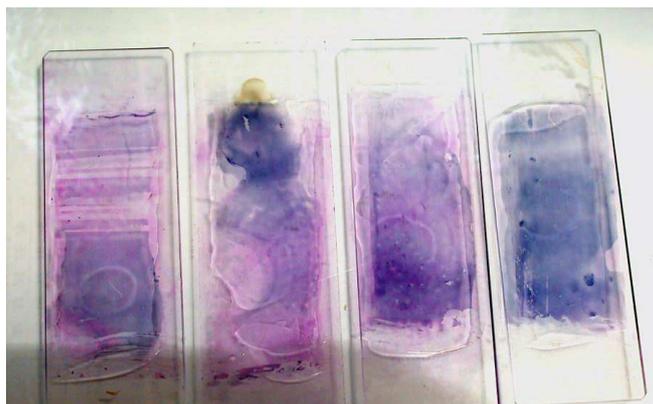
LE COLLAGE des spores et des coupes : la solution à beaucoup de problèmes de coloration !

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 LPO : 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 LPO 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 ou 95° 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).

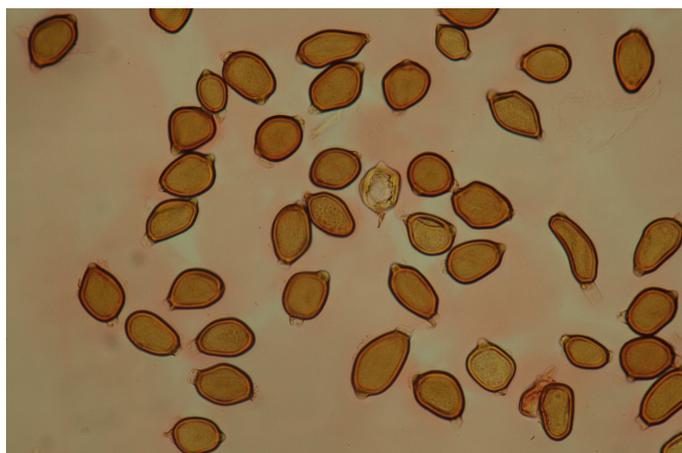
+++ Déposer sur la LPO dégraissée une goutte d'eau distillée (ou encore mieux d'eau albumineuse – voir ci-dessous) à environ 1,5 cm du bord gauche ou droit.

+++ 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 LPO (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.



Frottis de téléospores d'*Uromyces ficariae*

A ce stade, on peut vérifier au microscope (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 :

- + le frottis est trop mince et trop long
 - + le frottis est correct
 - + le frottis est trop court (goutte d'eau probablement pas assez volumineuse)
 - + 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.

La méthode de Dagron

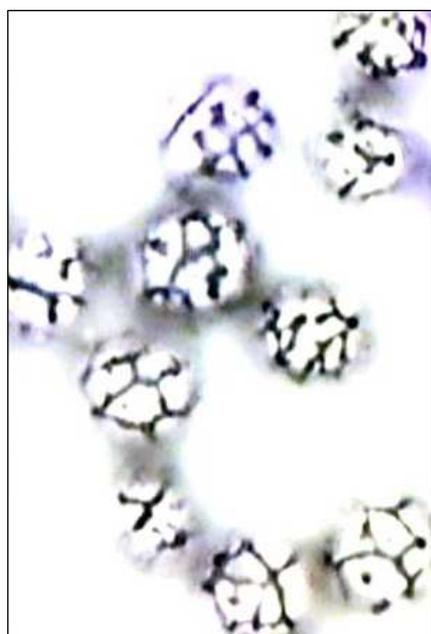
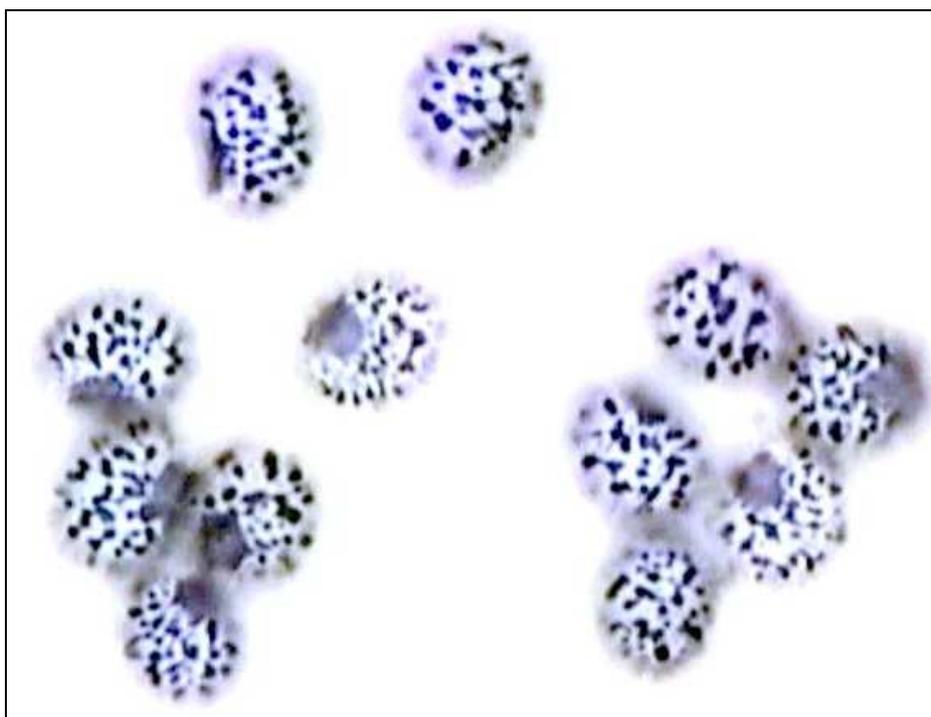
Christian Dagron, spécialiste des russules et perfectionniste à l'extrême, a trouvé une méthode de montage assez simple mais très judicieuse, qui consiste à étaler les spores sur du papier collant. Placer ensuite l'ensemble sur une LPO, face collante vers le haut, déposer une goutte de Melzer et puis couvrir avec une LCO.

Cela présente beaucoup d'avantages.

- Pas de superposition des spores.
- Aucun mouvement de déplacement pour ces dernières.

Les inconvénients.

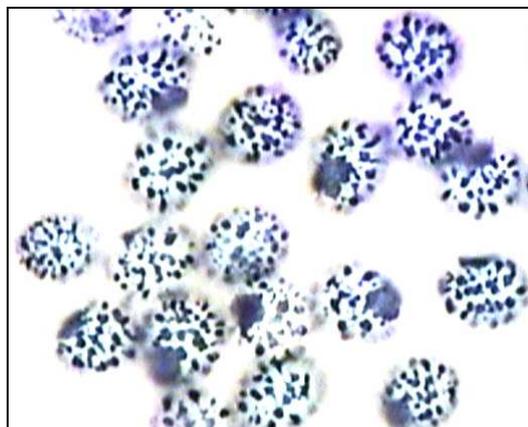
- La manipulation du papier collant est délicate, car les poussières s'y fixent également.
- Il faut réaliser les photos assez rapidement car la colle du papier apparaît très vite.



Spores de *Russula velenovskyi* ▲ ▼

◀ Spores de *Russula violeipes*

Ces deux photos ont été réalisées par Serge Prévost, qui utilise régulièrement cette technique, avec beaucoup de réussite.



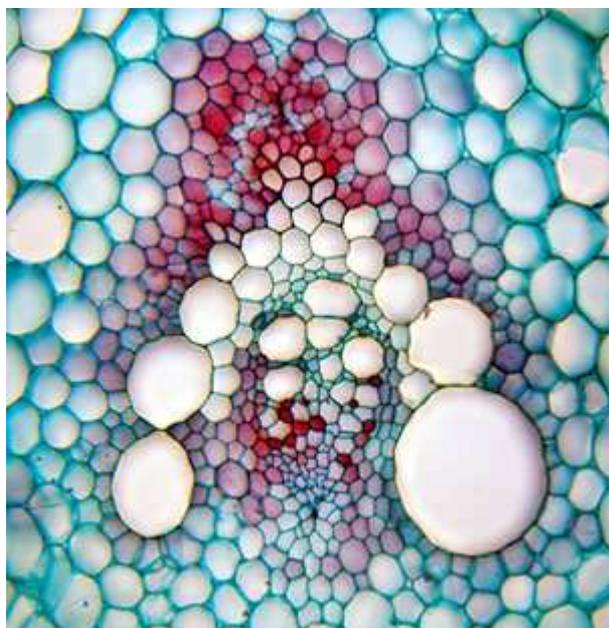
B. LES COUPES : COLLAGE POUR COLORATION

Cette technique a pour but de permettre la coloration de coupes en série, en utilisant des cuvettes à coloration, et de permettre le rinçage et (ou) la régression contrôlée à volonté ... voire d'autres colorations complémentaires !

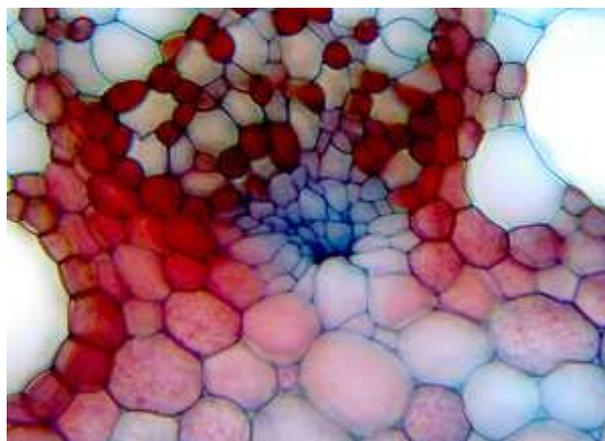
- Préparer une LPO propre et mouillable, et utiliser sans essuyer.
- Déposer sur la lame dégraissée une goutte d'eau albumineuse à environ 1,5 cm du bord.
- Placer le bord d'une deuxième LPO (rodée) à 45° en contact d'abord avec la goutte d'eau, puis ensuite avec la lame de support.
- La goutte doit 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.
- 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 les LPO 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 ?

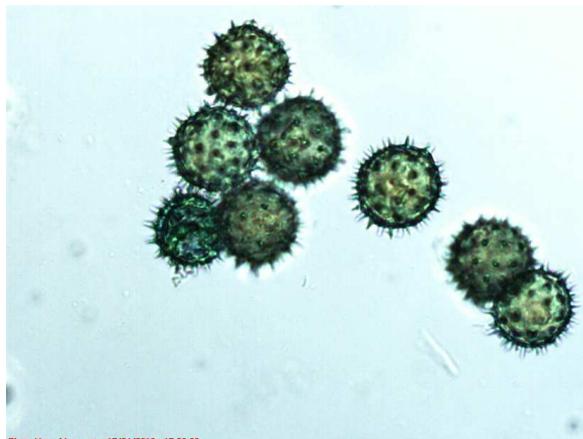


Coupes dans un turion d'*Asparagus sp.* – photos Christian Aubert



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 !

Grains de pollen de tournesol (*Helianthus annuus*), colorés au vert de méthyle acétique, x40

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 tenter de 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 en biologie végétale ; en effet, avant de tenter de colorer sélectivement ou de mettre en évidence les colpus, sporopollénine, intine, exine, endextine, extectine et autre aperture 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.

La fécondation étant 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 passion⁶⁸.

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.

⁶⁸ <http://perso.wanadoo.fr/pollens/>

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 dirigé vers la méthode de Wodehouse (1935)⁶⁹, 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....

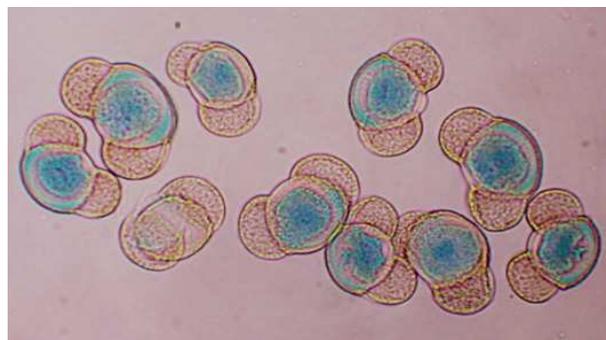
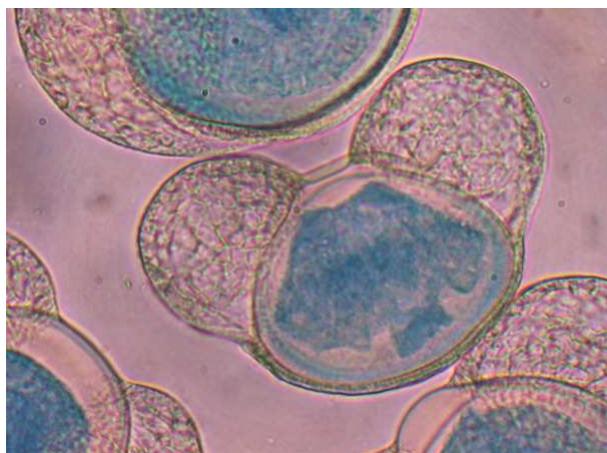


Modus operandi

- 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, dont le bouchon contient 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, imbibé 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 nous prenons tellement de soin à déshydrater).
- Poser la LCO 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.

⁶⁹ 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.

- 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 LPO). 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 BC, sont toujours impeccables).



Grains de pollen de *Pinus sp.* - montage au PVA bleu d'aniline

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.

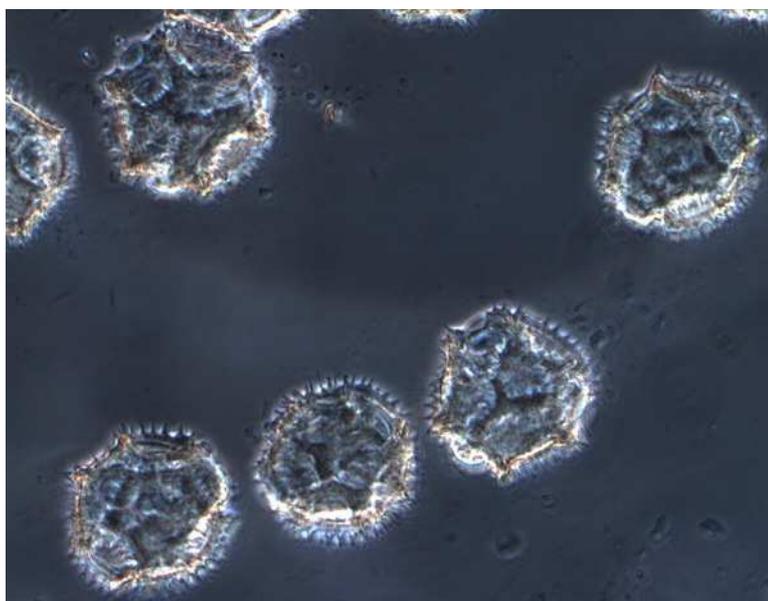
- La **safranine formolée de Sémichon** (elle colore en rouge +/- foncé).
- La **phloxine B alcoolique** (elle colore en mauve violet).
- Le **rouge Congo SDS** (il colore en rouge clair et met remarquablement en évidence le revêtement cuticulaire).
- Le **vert d'iode** (il colore en vert tendre).
- Le **vert de méthyle** (il colore en vert plus nettement émeraude).
- L' **éosine 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 %).

TRÈS 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, 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, des réactions inattendues, et les résultats ne sont pas constants !

Grains de pollen de *Cichorium intybus* - contraste de phase - 63x



Il faut savoir qu'un grain de pollen présente deux 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 deux 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'endextine** et **l'extectine**. Cette enveloppe doit sa remarquable capacité de conservation à une substance singulière : **la sporopollénine**.

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 parés 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, de passiflore par exemple, 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, si elle a été préalablement chauffée).
- Poser la LPO 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 LCO avec les précautions d'usage, afin d'éviter au maximum les bulles d'air.
- Luter au vernis à ongles transparent.
- Poser l' (les) étiquette(s) d'identification et la (les) vernir également.

Nous qualifierons cette préparation de semi-définitive, car elle va se conserver nettement moins longtemps qu'avec le BC 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 gélatinée, 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 :

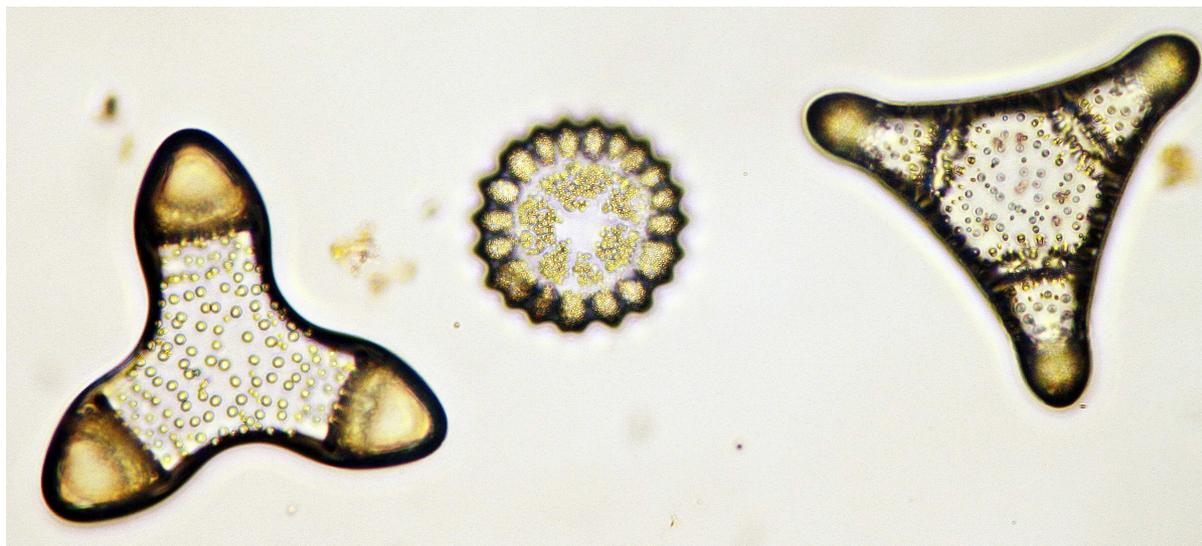
- **La safranine formolée de Sémichon.**
- **Le vert de méthyle.**
- **L'éosine aqueuse à 2 %.**

Grains de pollen de fritillaire impériale (*Fritillaria imperialis*) - coloration bleu d'aniline - 40x

Un univers captivant : les Diatomées

Il nous paraît intéressant de consacrer quelques pages à la biologie des diatomées, qui ne sont pas nécessairement connues de chacun, même si cela n'a pas un rapport direct avec leur microscopie ... mais ce bref résumé permettra de mieux les cerner... et peut-être de faire naître des vocations.

Description : les diatomées, scientifiquement appelées *Bacillariophyta*, sont des algues brunes et jaunes, unicellulaires, planctoniques, de très petite taille (de 2 µm à 1 mm), Elles sont entièrement enveloppées par un squelette externe composé de silice, appelé *frustule* ; cette enveloppe, transparente et rigide, est caractéristique et typique de chaque espèce. Les échanges avec le milieu extérieur se font au travers de nombreux orifices très fins qui traversent la frustule et qui sont disposés en lignes (droites ou courbes) ou en réseau, selon un motif propre à l'espèce. Ces alignements vont constituer l'élément essentiel pour aider à leur détermination.



Des frustules de diatomées fossiles

La frustule : elle est composée de deux parties, appelées thèques, s'emboîtant l'une dans l'autre, à la manière d'une boîte, et présentant une symétrie remarquable ; la silice qui la compose est faiblement cristallisée, et semblable à du verre.

Description trouvée sur internet : « Chacune de ces deux parties est elle-même composée de deux éléments. Le premier, la valve, plus ou moins bombée (rarement plate), correspond à la face du « couvercle » ou du « fond » de la « boîte » ; à sa périphérie peut se situer une zone oblique ou verticale, le manteau, qui fait la liaison avec le second élément. Ce second élément, le cingulum, est une paroi verticale entourant la valve, qui peut être formé d'une simple bande siliceuse ou comporter plusieurs bandes ou segments cingulaires. On parle d'épithèque (ou épivalve ou hypovalve) pour désigner la partie de la frustule correspondant au « couvercle », et d'hypothèque (ou épicingulum ou hypocingulum) pour désigner le « fond ». Le volume interne de la frustule, occupé par la cellule, peut être partiellement subdivisé par des cloisons, perforées ou incomplètes, portées par les valves ou par les bandes cingulaires.

Chez de nombreuses diatomées pennales, une fente, de longueur variable, parcourant les deux valves ou une seule, souvent en leur milieu, est appelée raphé ; elle constitue un canal de communication avec l'extérieur et sert à la locomotion, par excrétion du mucilage. Le raphé est interrompu en son milieu par un épaississement siliceux, le nodule central, et possède un nodule terminal à chaque extrémité. Si le raphé est en position médiane, il est situé dans une zone sans ornements, l'aire longitudinale. Le nodule central est, lui, localisé dans l'aire centrale. Les diatomées dites monoraphidées sont dépourvues de raphé sur la valve supérieure et présentent une ornementation différente sur les deux valves. Les diatomées centrales⁷⁰ et certaines diatomées pennales sont dites araphidées car elles ne possèdent aucun raphé.

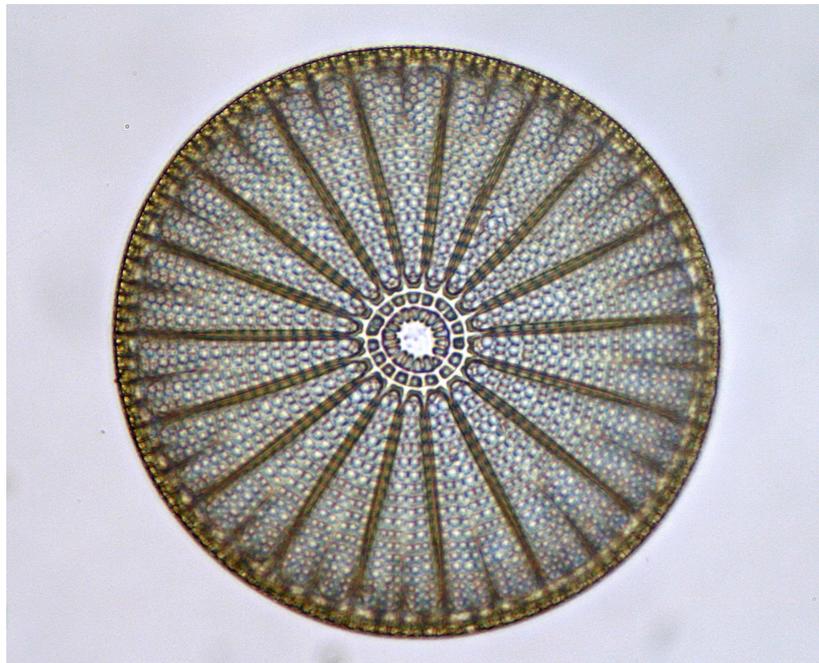
C'est notamment dans les familles des *Surirellaceae* et des *Nitzschiaceae* que l'évolution du raphé a abouti à la création d'une structure en forme de tuyau, le canal-raphé. À l'opposé du côté où s'ouvre le raphé, la paroi du tube est percée d'orifices débouchant à l'intérieur de la frustule (pores internes) et séparés par des piliers siliceux, les fibules. Souvent, le canal-raphé est situé au faîte d'une carène valvaire plus ou moins développée.

La paroi des valves est constituée d'une seule couche siliceuse ou de deux couches superposées, entre lesquelles se trouvent des espaces délimités par des cloisons transversales. Les diatomées pennales tiennent leur nom du fait que les ornements de leurs valves sont souvent disposés à la ma-

⁷⁰ Parfois appelées diatomées centriques.

nière des dents d'un peigne alors qu'ils sont souvent radiaux chez les diatomées centrales. Ces ornements sont propres à chaque espèce et sont donc gouvernés par les gènes. Les bandes cingulaires sont souvent dépourvues d'ornements. Ces ornements de la frustule, qui apparaissent comme des stries, des côtes, des perles ou une dentelle, présentent une esthétique d'une extrême finesse dont la beauté attire de nombreux diatomistes.

Ces « ornements » correspondent en fait à des regroupements de fines perforations ou aréoles avec un diamètre de l'ordre du micromètre. Ces perforations ont souvent une extrémité (du côté soit externe soit interne de la paroi valvulaire) partiellement obturée par une fine dentelle siliceuse qualifiée de crible. Ces orifices servent aux échanges entre la cellule et le milieu extérieur. Chez certaines diatomées, il existe des pores très fins (porcelles) regroupés dans des structures limitées par un anneau marginal épaissi, les ocelles. Les diatomées pennales peuvent posséder des pores de plus gros diamètre à l'extrémité des valves permettant l'écoulement de substances mucilagineuses secrétées par la cellule.



À la surface des valves se trouvent de petites structures silicifiées, tubulaires : les « processus ». Il en existe quatre ou cinq types. C'est à leur niveau que certaines espèces extrudent des filaments de chitine. »

Biologie : elles ont besoin de lumière car ce sont des organismes photosynthétiques ; elles sont donc autotrophes. Elles utilisent l'énergie de la lumière par photosynthèse, grâce à la « chlorophylle a » et la « chlorophylle c » contenues dans leurs chloroplastes. Cependant, certaines espèces sont capables de s'en passer, en utilisant des sources organiques de carbone, adoptant ainsi, de façon provisoire ou définitive, un mode de vie saprophytique.

La frustule est transparente, et donc difficilement visible *in vivo* ; mais elle s'observe dans de bonnes conditions, après élimination de la matière vivante et montage dans des résines spéciales. À l'intérieur, on peut trouver un noyau entouré d'une masse cytoplasmique, contenant des inclusions de petite taille (chondriome, appareil de Golgi, gouttelettes lipidiques) ; des chloroplastes granuleux (jaunâtres, brunâtres ou verdâtres⁷¹), parfois de grande taille, qui servent à la photosynthèse.

Reproduction : la multiplication végétative est la principale méthode de multiplication des diatomées ; elle ne fait pas intervenir de processus sexué. Lorsque les conditions sont favorables à leur prolifération, les diatomées se multiplient selon un mode de bipartition particulier (la cellule mère donne deux cellules filles), ce qui peut se faire de manière très rapide. A chaque fois, une des cellules filles est plus petite que la cellule mère, et cela induit une diminution progressive de la taille des générations successives. A partir d'une taille minimale, une reproduction sexuée va se substituer à la bipartition. Chez les diatomées centrales, les gamètes mâles sont munis d'un flagelle avec lequel ils s'introduisent dans les diatomées gamètes femelles. Dans tous les cas, l'œuf résultant de la fusion des gamètes s'entoure d'une épaisse paroi mucilagineuse et grossit considérablement avant de sécréter une frustule, et donc devenir une nouvelle diatomée de grande taille. Si les conditions environnementales sont défavorables, de nombreuses espèces de diatomées centrales (surtout planctoniques) et quelques diatomées pennales, forment des structures de résistance, appelées hypnospores (ou spores de résistance), qui peuvent tenir un état de vie ralenti durant quelques semaines.

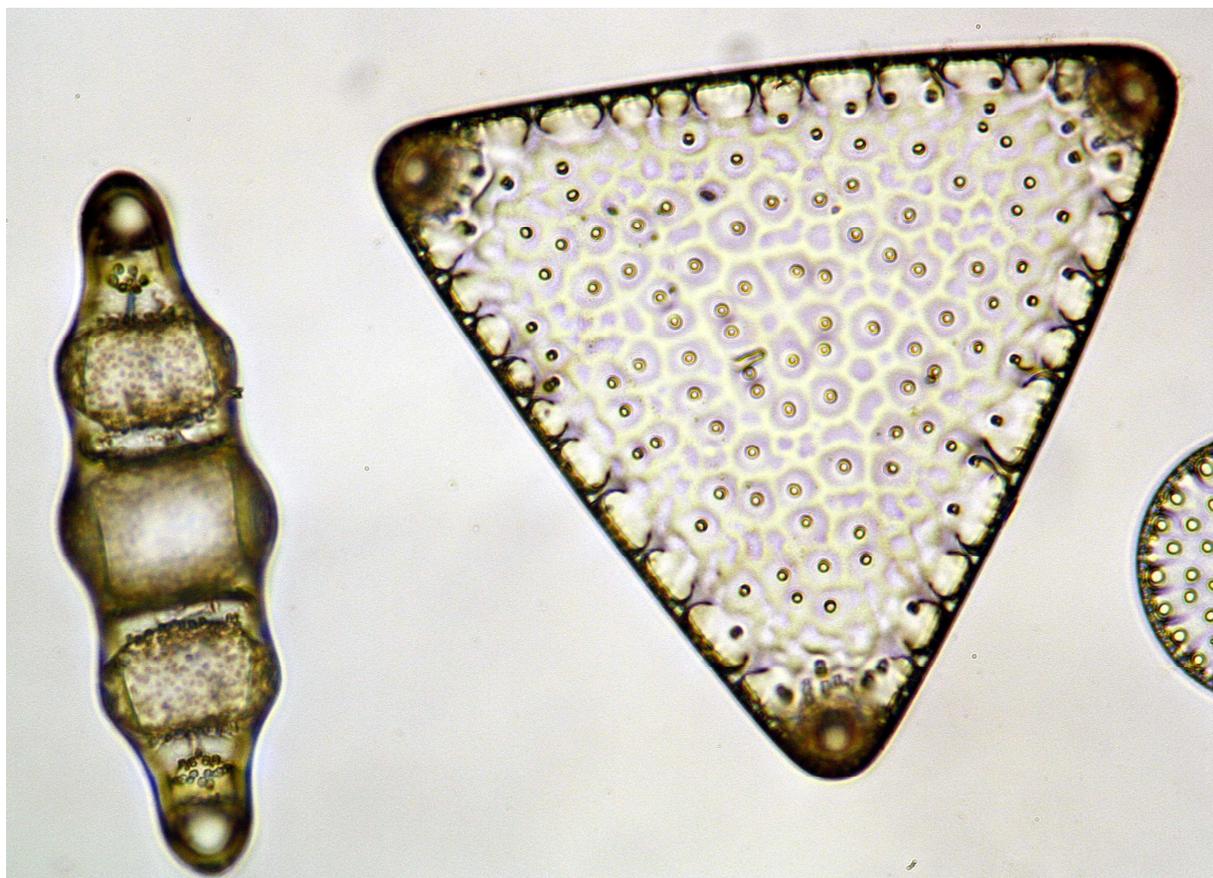
Écologie : elles sont présentes dans tous les milieux aquatiques, avec une préférence évidente pour les eaux froides, douces, saumâtres ou marines (les océans Arctique et Antarctique ont une flore diatomique particulièrement riche), et peuvent se développer partout où elles trouvent un minimum de lumière et d'humidité. On peut aussi en rencontrer dans le sol et en milieu aérien. La présence des

⁷¹ La couleur dépend de la présence de pigments caroténiques et xanthophylliques (dont la fucoxanthine).

diatomées dans un milieu est liée à plusieurs paramètres : lumière, sels minéraux, mais aussi le pH, la salinité ainsi que la teneur en oxygène et en matière organique.

Certaines diatomées vivent en colonies, et d'autres sont isolées ; certaines sont libres, et d'autres sont fixées. On peut rencontrer des espèces pélagiques⁷², qui appartiennent au phytoplancton, dans lequel elles sont présentes en très grand nombre et font partie de l'alimentation de nombreuses espèces ; d'autres espèces sont dites benthiques⁷³.

À moins de posséder un raphé sur la valve en contact avec le support, les diatomées pennales peuvent se mouvoir de manière autonome. Elles sont notamment attirées par la lumière, sauf si cette dernière est trop intense. Les diatomées centrales n'ont pas de raphé et ne peuvent donc se déplacer sur un substrat.



Systématique et classification : la dénomination « diatomée » a été retenue après que le naturaliste A. De Candolle eut, en 1805, baptisé *Diatoma* un genre de diatomées d'eau douce. En grec, *diatomos* signifie « coupé en deux ». De Candolle a sans doute fait allusion au fait que la frustule peut se dissocier en deux (ou plus exactement, à l'aptitude de la diatomée mère à se diviser pour donner deux diatomées filles identiques).

A l'heure actuelle, les scientifiques ont répertorié près de 100.000 espèces, mais elles sont certainement plus nombreuses. Le groupe, vraisemblablement polyphylétique, se divise en deux ordres : les diatomées centriques (**Biddulphiales**) à symétrie nettement radiale, qui sont connues depuis le Jurassique, et les diatomées pennées (**Bacillariales**) à symétrie bilatérale, qui ne sont apparues qu'au début du Tertiaire. Elles sont réparties en 180 à 200 genres.

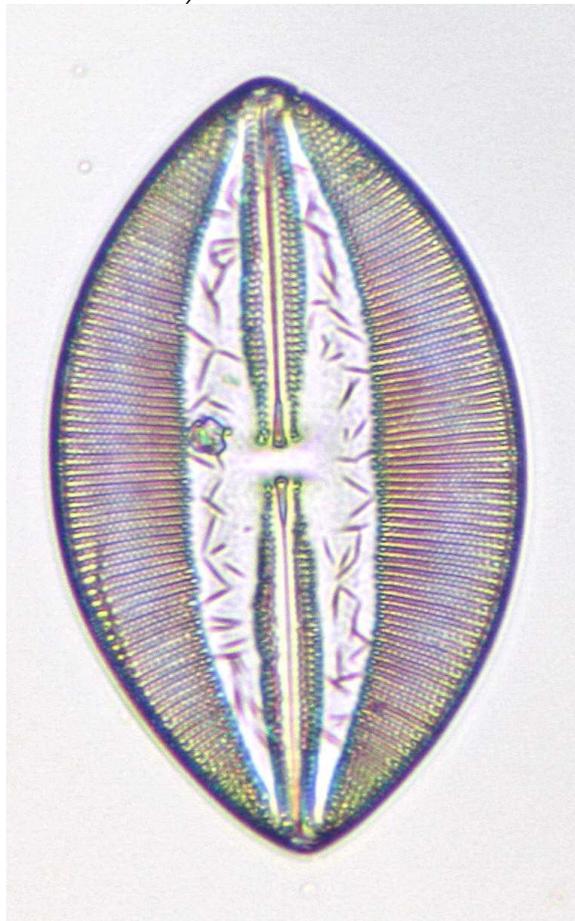
Utilisation : la diversité remarquable des diatomées est notamment utilisée pour indiquer la qualité des cours d'eau : les diatomées constituent un excellent bioindicateur. Elles sont utilisées en routine dans tous les pays d'Europe, afin de chiffrer le niveau de pollution.

Notes techniques trouvées sur Internet : « Les frustules de diatomées étant imputrescibles, leur prolifération intense et leur accumulation pendant des millions d'années, ont formé des gisements parfois considérables de tourbe siliceuse ou de roches appelées diatomite (constituée à plus de 80 % par les frustules). La diatomite (connue aussi sous le nom de tripoli, de farine fossile ou de Kieselguhr) est de couleur claire, tendre, légère et à porosité élevée. La diatomite possède un intérêt économique : elle

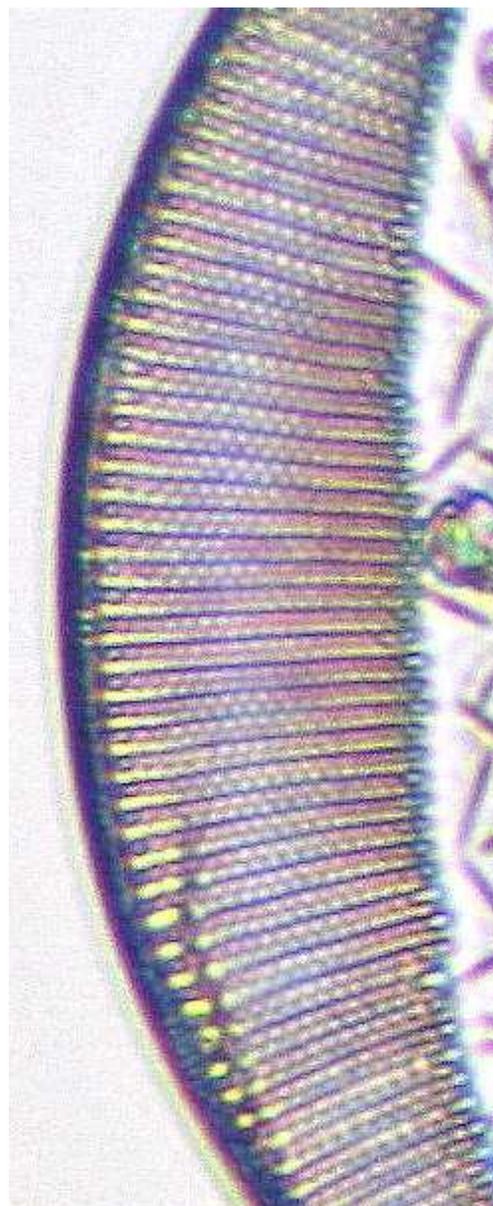
⁷² Se dit d'un organisme vivant dans la mer, en eau vive, et constituant le pélagos, c'est-à-dire l'ensemble des organismes vivant entre le fond et la surface (on parle aussi de plancton).

⁷³ Le benthos est constitué par tous les organismes vivant au fond de la mer, d'un lac ou d'un cours d'eau.

est utilisée, une fois nettoyée et réduite en poudre, comme support dans certaines techniques de filtration et de clarification (raffinage du sucre, filtration du vin), où les micropores des frustules servent de tamis ultrafin (0,7 à 2 microns). Elle est également utilisée comme adjuvant dans de très nombreux produits : peintures, bitumes, détergents, décolorants, désodorisants, engrais... Lors du grattage d'une allumette, c'est grâce à l'ultrastructure microperforée des frustules de diatomées que les gaz issus de la combustion du soufre s'échappent sans que le bout de l'allumette explose ! Alfred Nobel utilisa la diatomite pour stabiliser la nitroglycérine, afin de fabriquer de la dynamite. A cause de leur faible densité, ces roches servirent à bâtir le dôme de la Cathédrale Sainte-Sophie à Constantinople en 532 (32 mètres de haut).



Cette diatomée est utilisée pour tester la qualité des objectifs d'un microscope, et notamment leur pouvoir de séparation ; sur un objectif à faible pouvoir séparateur, les alignements de petites sphères visibles ici, apparaissent simplement comme des lignes épaisses.



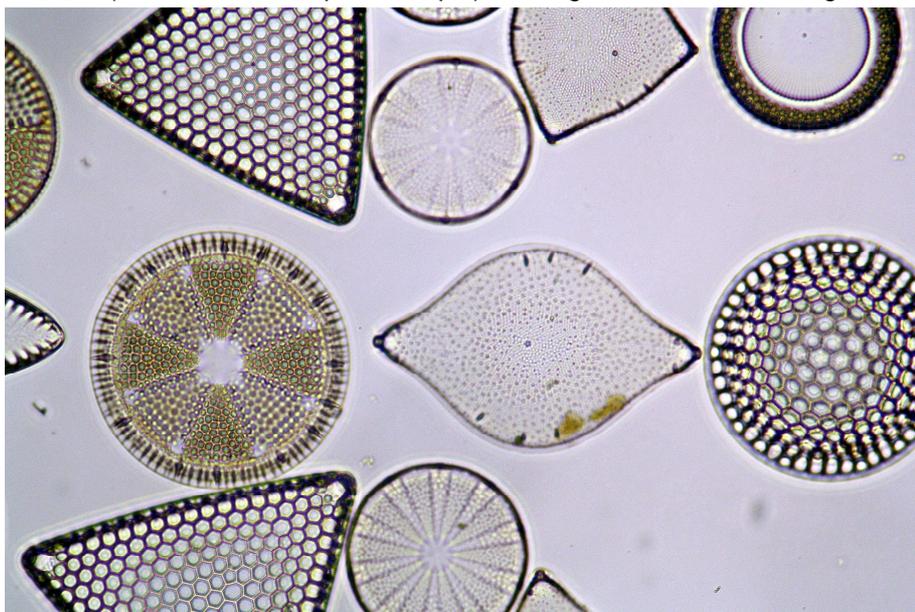
Les gisements les plus importants se situent aux États-Unis : ceux de l'ouest, d'origine marine, s'étendent de San Francisco jusqu'au sud de la Californie, ceux de l'est, du Maryland à la Virginie. En France, des gisements d'origine d'eau douce sont exploités en Auvergne et dans le Gard. Actuellement, des boues à diatomées, futures diatomites, se déposent dans les mers, notamment en mer froide mais aussi, en plus faible quantité, dans les grands lacs comme le lac de Lugano, le lac Pavin ou le lac Léman.

Dans des conditions géologiques différentes, les diatomées ont également participé à la formation du pétrole, issu de la substance accumulée durant des millions d'années par des animaux qui vivaient dans la masse d'eau, ainsi que celle des végétaux dont les diatomées constituaient une grande partie. Des gisements pétrolifères, en Californie et en Roumanie, ont ainsi une roche composée quasi uniquement de frustules. Diatomite et pétrole permettent de saisir combien les diatomées, malgré leur taille microscopique, ont joué un rôle non négligeable dans la mise en place des roches sédimentaires ».

Exploitation par l'homme : en mytiliculture et en ostréiculture traditionnelles, les diatomées participent à la croissance des moules et des huîtres, qui se nourrissent de celles que la mer contient. Des systèmes d'élevage intégrés sont à l'étude pour en améliorer le rendement.

Certaines espèces de diatomées produisent des molécules intéressantes telles que des antibiotiques et des substances antitumorales (*Haslea ostrearia* par exemple). Elles génèrent des acides gras nécessaires aux animaux et aux humains qui ne peuvent pas les produire eux-mêmes.

Dans le domaine de la médecine légale, les diatomées sont utilisées quand une victime est retrouvée dans un cours d'eau ou un lac, pour déterminer s'il y a eu noyade ou immersion du corps après le décès, en fonction de leur concentration dans les poumons. De même, leur examen et la détermination de leurs espèces, permet de localiser avec précision le lieu du décès.



Échantillonnage de diverses diatomées ; il s'agit d'une partie d'une « rosette de salon », réalisée par un artiste en la matière : Dominique Prades (voir la vue d'ensemble en p. 7). Depuis le début du 20^{ème} siècle, certains diatomistes se sont pris à un jeu qui demande une précision et une minutie extrêmes : à savoir réaliser des compositions artistiques et figuratives, en utilisant des diatomées. La rosette évoquée ci-dessus a demandé 25 heures effectives de travail.



Cette composition de mon nom, également réalisée par D. Prades, s'avère évidemment beaucoup plus simple, mais montre qu'il est nécessaire, en plus de la manière de faire, de disposer de matériaux variés.



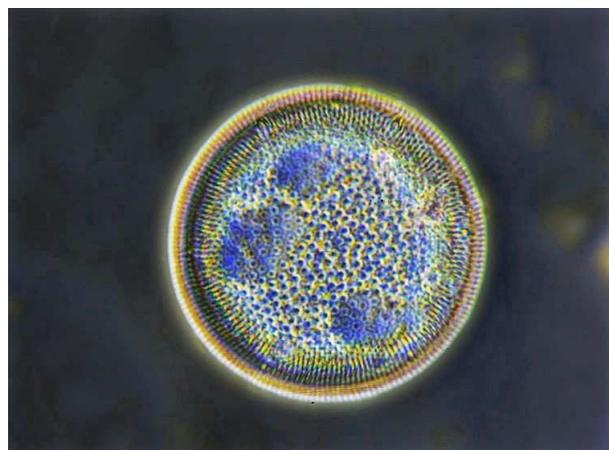
Une préparation semblable, observée en lumière polarisée (le N est le résultat d'une faute d'orthographe, non de la disparition d'une branche du M, suite à la polarisation).

Le nettoyage des diatomées

Jean-Pierre Claes⁷⁴

Les diatomées recueillies en eau douce ou eau marine sont des algues microscopiques unicellulaires, donc de nature végétale ; elles comportent une enveloppe externe en silice, transparente et rigide, qu'on appelle frustule.

Pour la biologie de ces organismes, voir les pages précédentes.



20 µm obj.x63 R=1,4,23
Actinocyclus octonarius var. crassus Réf 24486
Contraste de phase - Prép : Zrax - Colo : Aucune - Obj 63x NA 1,40 oil
Mer littoral breton - J.P.Claes - 30/10/2011
Micro / Bino : LEITZ - Photo : Canon EOS 40D

Traitement : au préalable, s'il s'agit de diatomées recueillies dans de l'eau de mer, il convient de remplacer complètement l'eau salée par de l'eau douce. Cela demande de multiples décantations où on ne recueille que le fond. Durée : 45 minutes par cm de hauteur d'eau.

Si la récolte contient beaucoup de déchets, mousses, algues etc. il convient de les séparer des diatomées ; pour cela, deux façons de faire pour éliminer les gros débris :

+ ébouillanter au four à micro-ondes durant quelques instants et laisser reposer plusieurs heures ;

+ se munir d'une passoire en plastique à mailles fines et avec les doigts, bien mélanger le contenant pour que les diatomées se détachent de leur support, et tombent au fond d'un récipient,

sous éventuellement un filet d'eau. Et puis laisser décanter.

A partir de ce moment, on peut commencer la chimie.

Il existe de nombreuses « recettes » qui ont été publiées pour cela, et qui bien souvent se recourent.

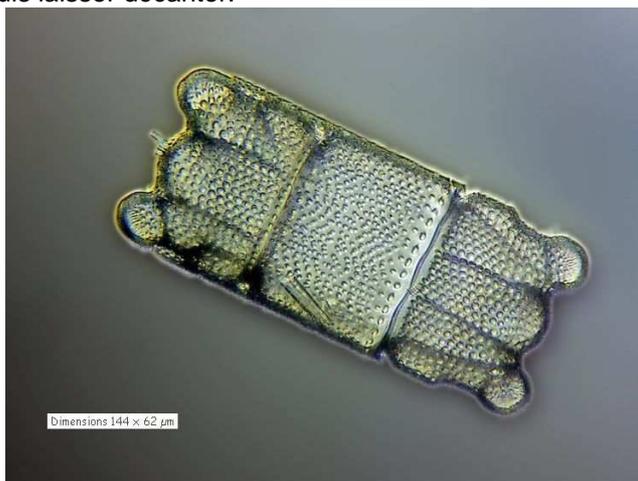
Voici celle que nous utilisons :

1.- Laisser la suspension (avec ou sans addition de formol) au repos pendant plusieurs heures, pour que toutes les diatomées se déposent sur le fond.

2.- Ôter le maximum d'eau avec une pipette et remplacer par de l'eau de javel. Laisser séjourner de 1 à 3 jours ; remplacer éventuellement l'eau de javel, si les frustules ne sont pas propres. Puis rinçage 6x à l'eau du robinet. Si c'est propre, passer au n°4.



20 µm obj.x20 R=1,4,1
Navicula bomboides (A.Schm) Réf 14626
Eclairage oblique - Prép : Zrax - Colo : Aucune -
St Laurent la Verrière - J.P.Claes - 22/01/2011
Micro / Bino : LEITZ - Photo : Canon EOS 40D



50 µm obj.x20 R=1,4,5
Biddulphia pulchella Gray réf.16465
Eclairage oblique - Prép : Zrax - Colo : Aucune - Stack 14 images
Mer - Côte Bretonne - J.P.Claes - 28/02/2011
Micro / Bino : LEITZ - Photo : Canon EOS 40D

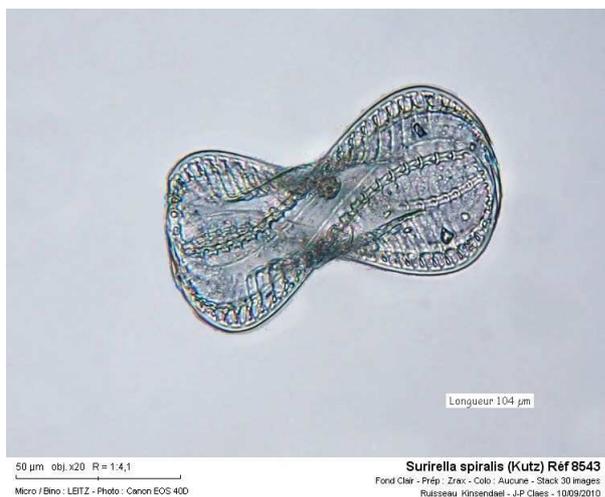
3.- Si les diatomées contiennent encore beaucoup des déchets, procéder à des bains d'eau oxygénée. Prélever 4 cc du fond de la suspension, y ajouter 20 cc d'eau oxygénée à 30% et laisser séjourner pendant 1 h ; ou chauffer à 90° pendant ½ h. avec seulement 10 cc d'eau oxygénée. Cette opération est suivie de 4 lavages à l'eau du robinet et 2 lavages en eau décalcarisée. Après la dernière décantation, recueillir le fond.

4.- Ajuster le volume avec de l'eau décalcarisée par moitié et de l'alcool à 90° pour l'autre moitié, afin d'obtenir une suspension qui soit légèrement trouble, ni trop dense ni trop diluée : une concentration qui permette de placer une goutte du prélèvement sur une lame, avec une densité appropriée de diatomées.

tomées.

5.- Procéder au montage sous médium.

⁷⁴ Jean-Pierre Claes, avenue Arnold Delvaux, 20 – B-1180 UCCLE/BRUXELLES – jpclaes@infonie.be



sable, il faut faire un prélèvement de la suspension au bout de quelques 10 à 20 secondes pour séparer le fond non désiré, des diatomées. Cela demande un contrôle des rejets sous micro-scope, tant du fond que de la suspension. Cette opération doit se répéter souvent plusieurs fois sur le fond restant, car certaines grosses diatomées se déposent aussi rapidement que le sable !

Le montage des diatomées

Nous avons constaté à maintes reprises qu'il était difficile d'avoir une bonne répartition des diatomées sur la lame : on a soit des agglomérats localisés soit une concentration excessive sur le pourtour de la goutte déposée.



NB : si malgré le traitement décrit ci avant, le prélèvement s'avérait encore insuffisamment purifié, il faudrait continuer le traitement avec de l'acide chlorhydrique pour éliminer les déchets restants. Pour ce faire, mettre 50 % d'acide et laisser bouillir pendant 2 heures. Ensuite procéder à 6 lavages consécutifs, comme décrit au n° 3 ; et terminer le traitement comme indiqué au n° 4.

Ce traitement est relativement long ; il demande toujours 6 lavages intermédiaires d'une durée de 45 min. par cm de hauteur du liquide, afin que toutes les diatomées puissent se déposer sur le fond, les plus grosses se déposant en premier lieu.

Pendant, dans certains cas où le prélèvement est fort chargé en particules lourdes telles que du



Voici la façon dont nous procédons et qui nous donne de bons résultats.

- Utiliser de grandes LCO de 22 x 22 mm, nettoyées à l'alcool à brûler.
- Placer les LPO sur une plaque chauffante froide (nous utilisons une petite plaque à griller électrique avec thermostat, achetée pour quelques euros, dans une grande surface).
- Déposer 2 gouttes d'eau déminéralisée et ensuite poser dessus 3 gouttes d'alcool :

cela provoque une réaction qui étale la grosse goutte obtenue sur une plus grande surface.

- Enfin, sur cette grosse goutte, déposer une goutte de « concentré » de diatomées.
- Les diatomées se répartissent bien sur toute la surface de cette grosse lentille (pour rappel, cette goutte de diatomée est composée pour moitié d'eau déminéralisée et pour moitié d'alcool).
- Ensuite, activer la plaque chauffante doucement, en jouant sur le thermostat, de sorte que la plaque chauffe très lentement au début (on voit que les diatomées s'agitent et se déplacent un peu) ; porter la température, pendant quelques instant seulement, aux environs de 70 à 80°C ; (ici, les diatomées ne bougent plus ... mais attention ! l'eau ne peut pas bouillir).



- Laisser refroidir doucement et répéter cette procédure jusqu'au séchage complet (cela dure environ une dizaine de minutes).



La suite du montage est comme il est d'usage :

- La LPO, nettoyée à l'alcool, reçoit 2 à 3 gouttes de Styrax, Zrax ou Naphrax en son centre et on y dépose avec soin la LCO.
- On chauffe la lame doucement à environ 50°C., jusqu'à bullage de la résine et donc évaporation du diluant (Xylène, Xylol, etc.).
- Placer un petit poids sur la LCO pour assurer une épaisseur minimum de résine (notre expérience avec le Zrax nous permet, après 3 ou 4 jours, de manipuler la lame sans risque sous le microscope. Avant cela, il faut être très prudent lors de l'utilisation d'objectifs à fort

grossissement, très proches de la lamelle.

- Garder les lames bien à plat pendant plusieurs semaines jusqu'à durcissement complet du médium.



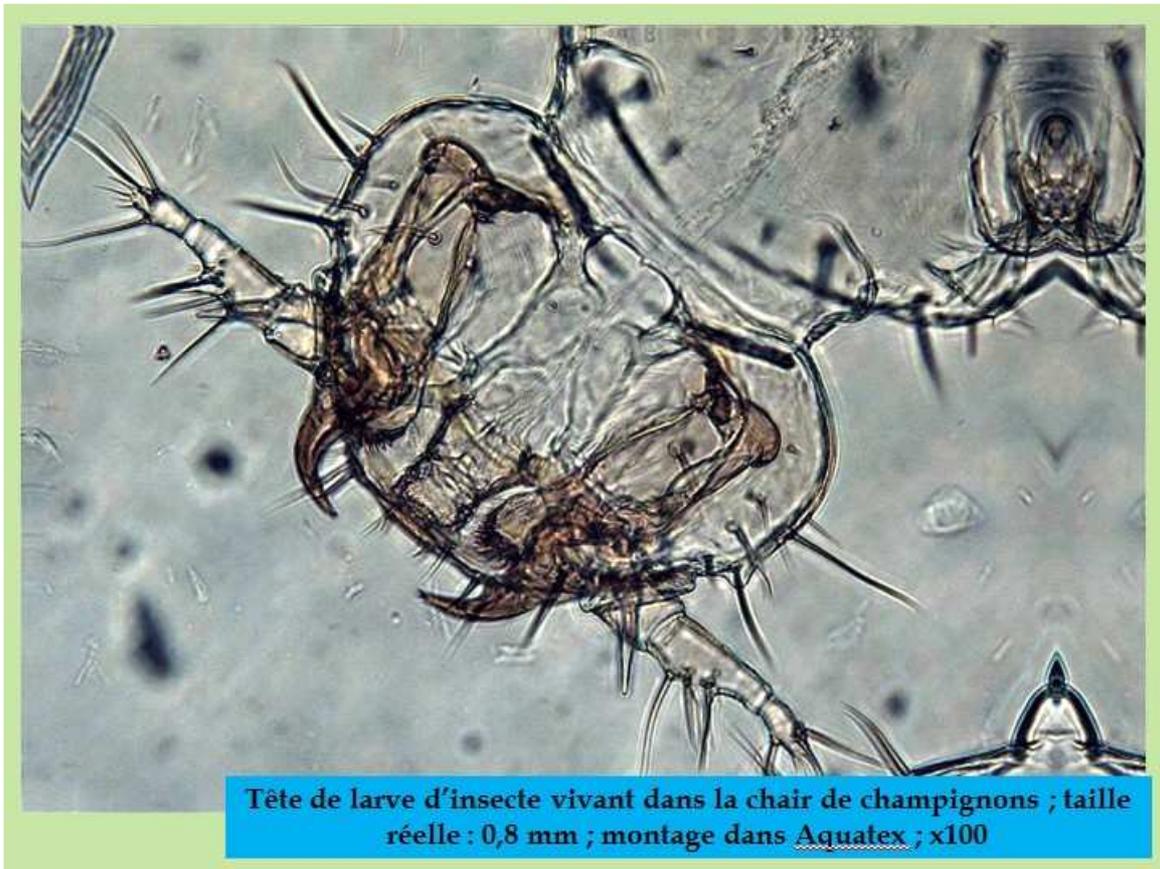
20 μm obj. x40 R=1:5,2

Micro / Bino : LEITZ - Photo : Canon EOS 40D

Navicula Szontaghii (Nov) spc Réf 12931

Fond Noir - Prép : Zrax - Colo : Aucune

St Laurent la Vernède (Fossile) - J-P Claes - 25/12/2010

Chapitre 07**MICROSCOPIE****ET****ARTHROPODES**

Tête de larve d'insecte vivant dans la chair de champignons ; taille réelle : 0,8 mm ; montage dans Aquatex ; x100

A propos du PVA, de son utilisation, de ses limites, et du montage des Champignons et des Arthropodes

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

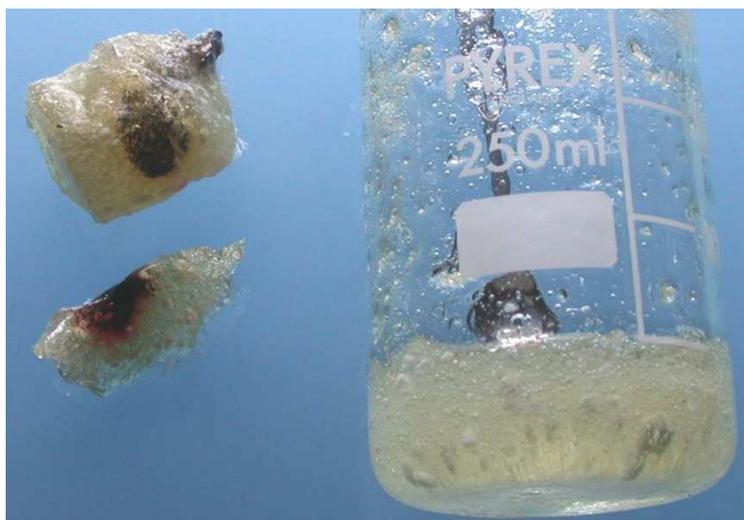
UTILISATION pour l'INCLUSION de champignons

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'épaisseur⁷⁵, mais je n'ai pas essayé.

Pour pratiquer des coupes sur cette inclusion à l'aide d'un microtome à main du type Ranvier, 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 (dans ce cas particulier), 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 LPO, 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 d'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 solu-

⁷⁵ (ML) : depuis cette correspondance avec Paul Leroy, nous avons expérimenté 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, dans une eau chauffée à 60-70°C. Cela permet d'obtenir des blocs d'inclusion plus épais, ainsi qu'un milieu de montage présentant beaucoup moins de phénomènes de rétraction.

tion 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 sommes⁷⁶.

Utilisation pour le montage de préparations définitives

Le PVALPh (Alcool PolyVinylique Lacto Phénolé) présente des avantages certains pour le montage de coupes ou de dissociations de champignons. Nous considérons le lutage comme un problème mineur : en ce qui nous concerne, nous lutons 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 BC 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'eau⁷⁷.

Il n'est évidemment pas question de déshydratation à l'alcool absolu. C'est tout à fait déconseillé, simplement parce qu'il y a incompatibilité totale 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 du préparateur 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 BC, 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 basique, 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 masse⁷⁸. Sinon, le bleu coton et le bleu de méthyle en 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 glycinés sans acide (gélatine glycinée, PVA glyciné) 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

⁷⁶ (ML) Depuis ce courrier, nous utilisons avec succès l'inclusion dans la résine Epoxy, très chère au professeur H. Clémenson, qui nous a été enseignée par Albert Marchal, il y a peu de temps (voir l'article complet, dans cette publication). Cependant, il faut savoir qu'elle est coûteuse, car elle exige l'utilisation d'une étuve, d'un microtome à lame au widia et de produits peu courants.

⁷⁷ (ML) : depuis 2002, la situation a bien évolué, et dans le sens de la facilité, car les Laboratoires Merck (VWR International) commercialisent AQUATEX, un nouveau produit de montage qui polymérise remarquablement bien, mais dont le solvant est l'eau ; donc le solvant ne génère plus de déformation des pièces fragiles.

⁷⁸ (ML) Nous obtenons également de remarquables préparations avec la fuchsine acide et le bleu d'aniline.

comment, il n'est pas envisageable de ne pas protéger ces milieux car ils sont d'une très grande sensibilité aux champignons surtout⁷⁹.

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

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 lactique, 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 BC est à mon avis supérieur quant à la netteté.

On trouve dans le commerce du BC au xylool, prêt à l'emploi. Personnellement, je ne le trouve pas de très bonne qualité car trop fluide (le xylool 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 xylool car il est prévu à d'autres fins que les montages microscopiques ; il a la consistance et l'aspect du miel liquide.



Larve d'insecte, trouvée dans un champignon en décomposition – montage au PVALPh coloré dans la masse à la fuchsine acide

⁷⁹ (ML) Pour l'instant, nous utilisons du thymol en cristaux ; nous envisageons d'y inclure des antibiotiques à large spectre, tels 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.

BAUME DU CANADA : Arthropodes et Invertébrés

Marcel Lecomte & Paul Leroy

Même si le PVALPh, le conservateur de Hoyer, et l'Aquatex sont incontestablement très pratiques, et les montages qui en résultent très convenables, le BC est, à notre avis, supérieur quant à la netteté.

Avant d'aborder la méthode de montage, nous allons citer quelques milieux qui sont solubles dans les hydrocarbures. Il en existe un certain nombre, mais nous ne parlerons que de ceux que nous avons utilisés :

- le BC (résine naturelle extraite du sapin baumier)
- des résines de synthèse : Eukitt, Entellan, Néo-Entellan, Histolaque
- Merckoglas (ce dernier est conçu spécialement pour tous les types de frottis - nous l'employons notamment pour des spores ou des grains de pollen).

Aucun de ces milieux n'est miscible à l'eau. Les pièces à monter dans ces milieux devront être parfaitement déshydratées. Les solvants sont le xylène ou le toluène, aussi le benzène, mais il vaut mieux éviter ce dernier, qui est très toxique. 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. Toutes ces marques commerciales sont sans doute peu différentes de composition. Leurs qualités et défauts sont identiques.

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

Le reproche mineur qu'on peut lui adresser 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), il restera « pâteux » pendant plusieurs années au centre de la préparation.

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 ». (P. Leroy)

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, étalements de sang et coupes histologiques très minces. Avec ces milieux, attention aux bulles : elles ne se résorbent pas, même les plus petites. Une fois incluses, c'est définitif et elles risquent même de s'amplifier au séchage. C'est justement là que le séchage rapide devient un inconvénient. Nous supposons que c'est la prise rapide du produit qui provoque les retraits et les vides sous la LCO dans le cas d'objets épais, et aussi la non-résorption des bulles.

Pour combler les vides, il faudra d'abord « ramollir » au xylène avant de déposer une goutte de résine sur le bord de la LCO. 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 LCO et l'objet. À cause de ces désagréments, nous employons donc rarement ces résines et seulement pour de très petits arthropodes.

Avec le BC, ces incidents sont bénins et on les répare facilement même s'ils se sont produits longtemps après le montage.

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

Les Arthropodes ne peuvent être montés à l'état brut.

Si les Insectes sont d'une certaine taille, ainsi que les acariens hématophages gorgés de sang, **ils doivent être vidés**⁸⁰. 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 nous n'y sommes pas favorables. P. Leroy 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 de Paul Leroy, x4

La pièce, une fois vidée, devra impérativement passer dans un bain acidifié (HCl à 3 % ou acide acétique à 5-7 % par exemple) pour arrêter l'effet de la potasse. Ensuite, rincer 2 à 3x à l'eau pour éliminer les traces d'acide.

Le montage de pièces épaisses

Malgré l'utilisation de compresseurs, il est difficile de réduire l'épaisseur de certains spécimens à quelques microns, ce qui risque de poser un problème au montage.

1. Préparation du spécimen

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.

Une fois la bestiole vidée et désacidifiée :

- + L'installer sur une LPO dans une goutte d'eau, sans quoi elle colle à la lame et le risque de casser les appendices, ou de la déchirer, est fortement augmenté.
- + À l'aide d'aiguilles très fines, nous agençons tout ce qui doit être mis en évidence et nous la recouvrons d'une LCO.
 - Celle-ci sera maintenue en place par deux petits compresseurs de notre fabrication (nettement moins puissants qu'une pince à linge), assez serrés pour bien aplatir la pièce sans l'éclater.
 - Le tout sera immergé dans un bain d'alcool à 90 ou 95 °(nous utilisons pour cela le méthanol), pendant 24 heures. Ce bain va durcir l'objet qui restera rigide après enlèvement de la LCO.

2. Imprégnation du spécimen

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). Mais il est indispensable, pour un montage correct, de les aplatir tout en leur donnant de la rigidité.

Pour les vers ou arthropodes non vidés, le séjour dans l'alcool va les durcir mais aussi rendre la cuticule imperméable au BC et cela constitue un problème majeur. Lorsque l'objet sera placé dans la goutte de BC, le xylène, très fluide, va en sortir et le BC environnant n'y pénétrera pas, car il est 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 BC 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 BC fluide doit les imprégner progressivement et s'épaissir suite à l'évaporation du solvant. S'il s'épaissit trop vite et que

⁸⁰ « **Le vidage des Arthropodes est une opération assez délicate** : toujours opérer avec précaution pour ne pas retrouver une guenille informe. À nos débuts, nous procédions par pression de l'index, mais ne voyant pas ce que nous faisons, le résultat n'était pas toujours concluant, plutôt en dessous de la moyenne.

Étant donné que ce sont les échecs qui instruisent, nous avons vite compris qu'il fallait procéder autrement. Nous avons 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 pouvoir 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, nous les façonnons en petites spatules étroites, de tailles différentes selon l'usage qui en sera fait » (P. Leroy).

les pièces ne sont pas parfaitement imprégnées, rajouter du xylène et prolonger le bain. Lors du montage, le BC du bain et celui où la pièce sera installée ayant plus ou moins la même consistance, le phénomène ne se reproduira pas. Lors du montage, éviter toutefois d'appuyer sur la lame à l'aplomb de l'objet, le BC risquant de sortir sous la pression.

3. Préparation de la lame de montage

Pour contourner l'inconvénient d'un objet assez épais, nous préparons notre lame de montage définitive de cette manière :

- Bien dégraisser la LPO (dimensions : 26x76 mm) à l'alcool à 95°
- À l'extrémité gauche et droite de la LPO, coller une LCO de 20x24 sur la largeur (avec du BC), en laissant une marge de 5 mm, afin de pouvoir placer les préparations dans les boîtes de rangement ad hoc.
- Un petit calcul rapide nous indique que $[76 \text{ mm} - (2 \times 5 \text{ mm}) - (2 \times 20)] = 26 \text{ mm}$, ce qui correspond à une plage de montage utile de 26 x 26 mm et 0,20 mm d'épaisseur (LCO de 0,17 mm + épaisseur de la colle).
- Cette épaisseur utile de 0,2 mm permettra de ne pas écraser le sujet à monter : le sortir du BC d'imprégnation et le déposer au centre de la zone de montage.

4. Montage proprement dit

- Déposer une grosse goutte de BC sur la LCO de 24x40 mm ; la retourner d'un mouvement brusque → la goutte pend donc en-dessous de la LCO ; déposer délicatement le tout sur la pièce imprégnée et bien centrer l'ensemble.
- Le BC 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.
- Laisser sécher durant une semaine.
- Nettoyer les éventuels débordements de BC avec du xylène (il est possible que cette opération doive être répétée plusieurs fois).
- Il est important de savoir que le BC va durcir assez vite en bordure de la préparation, qui sera donc stabilisée ; mais le centre de la préparation restera souple durant des années encore.

Schéma d'une lame terminée :



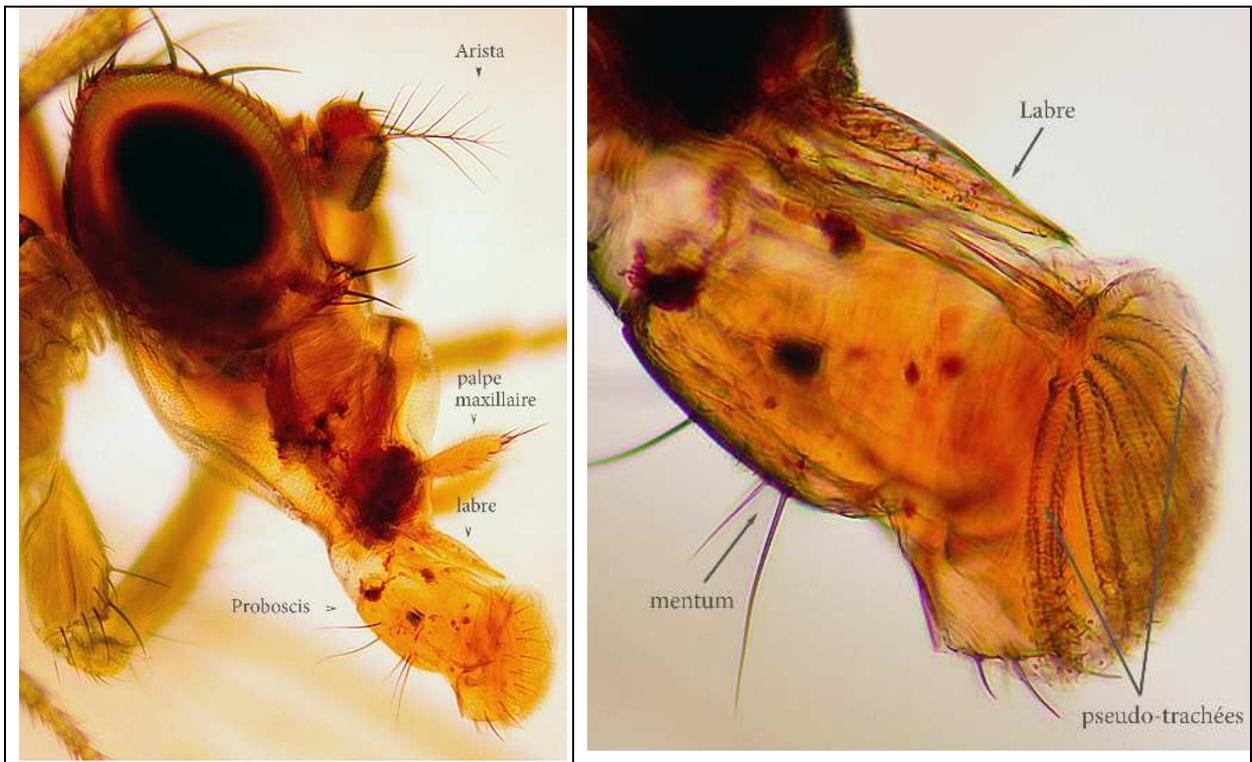
(1) lame porte-objet de 26 x 76 mm

(2) espace de 5 mm / lame couvre-objet de 20 (x24) mm / espace utile de 26 mm / lame couvre-objet de 20 (x24) mm / espace de 5 mm

(3) lame couvre-objet de 24 x 70 mm



Ver Nématode trouvé dans une préparation mycologique, 40x



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



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

J'ai testé le PVA pour le montage des Arthropodes

Olivier Levoux⁸¹

Il faut rappeler que le PVA est connu depuis longtemps, même si son usage ne s'est guère répandu en microscopie (voir l'extrait de texte ci-dessous).

250

N.Z. Science Congress, 1947.

NEW METHODS IN MICROSCOPY FOR THE STUDY OF SMALL INSECTS AND ARTHROPODS

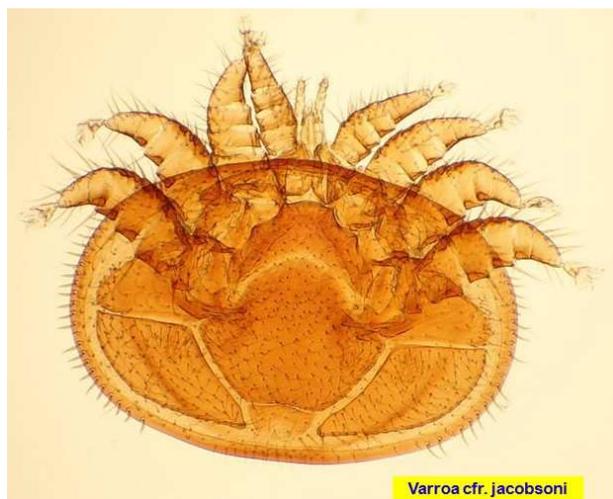
By J. T. SALMON, Dominion Museum.

THE main purpose of this paper is to introduce to you some new mounting media for microscopy based on the use of polyvinyl alcohol; but, before dwelling in detail on these I should like to make some general observations on media and methods generally advised in standard texts on microbiology.

When making a taxonomic study of small Arthropods under the microscope it is necessary, in order to be able to see the outlines of fine setae or hairs and the structure of delicate sense organs etc., to select a mounting medium of relatively low refractive index. On account of its rather high refractive index, slow rate of setting and the necessity for thorough dehydration Canada Balsam has long been regarded by taxonomists as unsuitable and resort has generally been made to gum arabic-chloral hydrate mixtures, such as the well-known Berlese's Fluid. These media invariably suffer from the disadvantage that

Since taking up the study of Collembola I have, for several years, been experimenting with mounting methods in an endeavour to perfect a technique capable of giving a preparation which, under the microscope, would render the finest structural details clearly visible without suffering from the bugbear of crystallisation and which, at the same time, would be less time consuming than conventional methods. Although the reduction of time spent in the preparation of a mount to half-an-hour is a great advantage the potash technique is always tedious and fraught with a certain amount of risk to the specimen, particularly when the latter are of the order of 0.1 mm. long. I was rather interested, therefore, in an article which appeared in *Science* some time ago advocating the use of polyvinyl alcohols as mounting media. Later, I learned from Mr. H. Womersley, of Adelaide, that he had used a medium prepared from medium viscosity polyvinyl alcohol with great success as a mountant following treatment with potash. I was fortunate in securing some

Après avoir monté nombre de sujets dans le BC, selon la technique préconisée par P. Leroy & M. Leconte, nous nous sommes tournés vers ce médium afin d'éliminer les manipulations d'alcools forts ou de xylol.



Nous avons choisi d'utiliser ce milieu de montage pour nombre de petits arthropodes : acariens, tiques, araignées, insectes (puces, collembolles, mouches), crustacés (copépodes, cladocères, daphnies). Tous ont des points communs : très petite taille, fragilité des appendices et téguments, squelette composé de chitine, nécessité de visualiser de fins détails afin d'identifier l'espèce. Nous l'avons également testé sur des spores, des grains de pollen, des nématodes... Et tout cela avec un succès certain !

Rappelons simplement que le PVALPh est un mélange d'alcool polyvinylique (liant), d'eau (solvant), d'acide lactique (éclaircissant et conservateur) et de phénol (antiseptique et antifongique).

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser les proportions conseillées par J.T. Salmon (1947) qui avait constaté que le n pouvait varier de 1,438 à 1,469 selon le dosage d'eau, d'acide lactique et de phénol (voir tableau, page suivante).

⁸¹ Olivier Levoux, 29, rue du Petit Marais - F-35510 CESSON-SEVIGNE - olivier.levoux@orange.fr ; Olivier a participé au séminaire de microscopie, à Masurel, en 2009 ; il a été un élève assidu de Paul Leroy durant toute la semaine, et depuis cette époque, il s'est passionné pour le montage des Arthropodes.

N (indice de réfraction)	PVA	Eau	lactophéno ⁸²
1,438	2,5 g	10 cc	15 cc
1,447	2,5 g	15 cc	25 cc
1,458	2,5 g	10 cc	25 cc
1,469	2,5 g	6 cc	30 cc

Milieu d'observation	Indice de réfraction moyen
Air	1
Eau distillée	1,33
Lactophéno ^l	1,44
Acide lactique	1,44
Glycérine	1,47
PVALactophéno ^l	1,44 à 1,47
Huile de cèdre	1,51
Chloral phéno ^l	1,52
Verre	1,52 (bleu-vert)
Baume du Canada	1,53

Une des particularités qui nous intéresse le plus dans le PVALPh est la valeur de l'indice de réfraction, qu'il est intéressant de faire tendre le plus possible vers celui du BC.

La préparation des objets

Cela peut se résumer en quelques mots : « Rien à faire, ou presque ! ». On peut monter directement une pièce séjournant dans l'eau ou l'acide lactique. Aucune manipulation à fin de déshydratation.

Attention aux âmes anthropomorphiques : on peut monter à vif de petits spécimens, afin de préserver les appendices fragiles.

Cependant, si le sujet est opaque et épais, il est nécessaire de l'éclaircir et de le ramollir, car l'épaisseur est l'ennemi n°1. On peut envisager également une coloration.

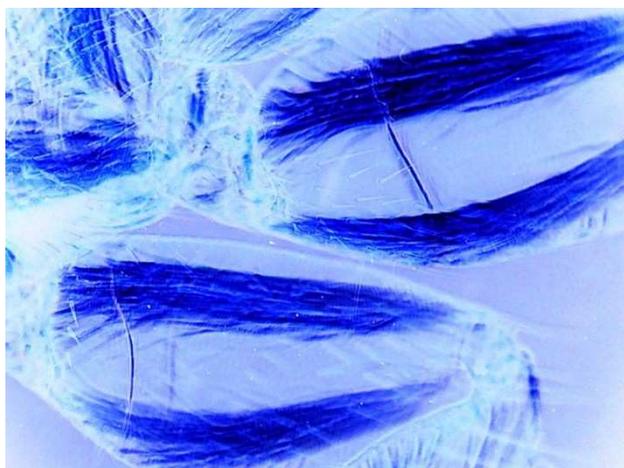
L'éclaircissement

++ Méthode rapide, avec de la potasse (ou de la soude) de 5 à 20 % ; mais c'est très agressif et les fibres musculaires sont détruites, ce qui fragilise le sujet.

++ Notre méthode préférée, même si elle demande du temps et de la patience consiste en une solution faible d'acide lactique, qui préserve les tissus musculaires.

++ Pour les parasites hématophages, qui s'avèrent très résistants, se tourner vers le percarbonate de sodium ou l'eau oxygénée.

Fibres musculaires dans les pattes d'une tique – inversion des couleurs, avec traitement d'images – photo Olivier Levoux



La coloration

Retenez que le phéno^l détruit la plupart des colorations, sauf :

- si le PVA est coloré dans la masse (avec fuchsine acide, bleu d'aniline, bleu de méthyle, noir de chlorazol (particulièrement indiqué pour la chitine))
- si on supprime le phéno^l (PVA + glycérine) ou qu'on le remplace par de l'iode⁸³ (quelques gouttes de lugol par exemple).

On peut aussi utiliser du rouge Congo, mais il faut alors éliminer l'acide lactique, car ce colorant noircit quand il se trouve dans un milieu acide.

Le montage de la lame

⁸² A partir du phéno^l aqueux (formule ML)

Eau bidistillée :	100 cc
Phéno ^l en cristaux :	3 g

Préparer d'abord le phéno^l aqueux et agiter énergiquement jusqu'à dissolution complète. Ensuite, effectuer le mélange suivant :

Phéno ^l aqueux :	22 g
Glycérine :	40 g
Acide lactique (commercial concentré) :	20 g
Eau bidistillée :	9 cc

⁸³ (ML) : l'iode n'est bien soluble dans l'eau qu'en présence d'une quantité double d'iodure de potassium.

- + Travailler sous la loupe binoculaire (impératif pour obtenir un bon résultat).
- + Déposer la « bonne » quantité de PVALPh, afin d'anticiper l'importante rétraction⁸⁴ du milieu.
- + Enlever ou écarter impuretés et bulles avec une pince, ou une aiguille montée.
- + « Égoutter » l'objet, avant de le poser, pour ne pas ramener d'impuretés.
- + Ensevelir l'objet pour qu'il ne flotte pas et ne dérive pas à la pose de la LCO.
- + A nouveau enlever ou écarter impuretés et bulles amenées par l'objet.
- + Donner la meilleure attitude possible (alignement des appendices).
- + Pose très délicate de la LCO, à la pince.
 - C'est à ce moment que le risque d'amener des bulles est le plus important.
 - Ne jamais laisser tomber la LCO !

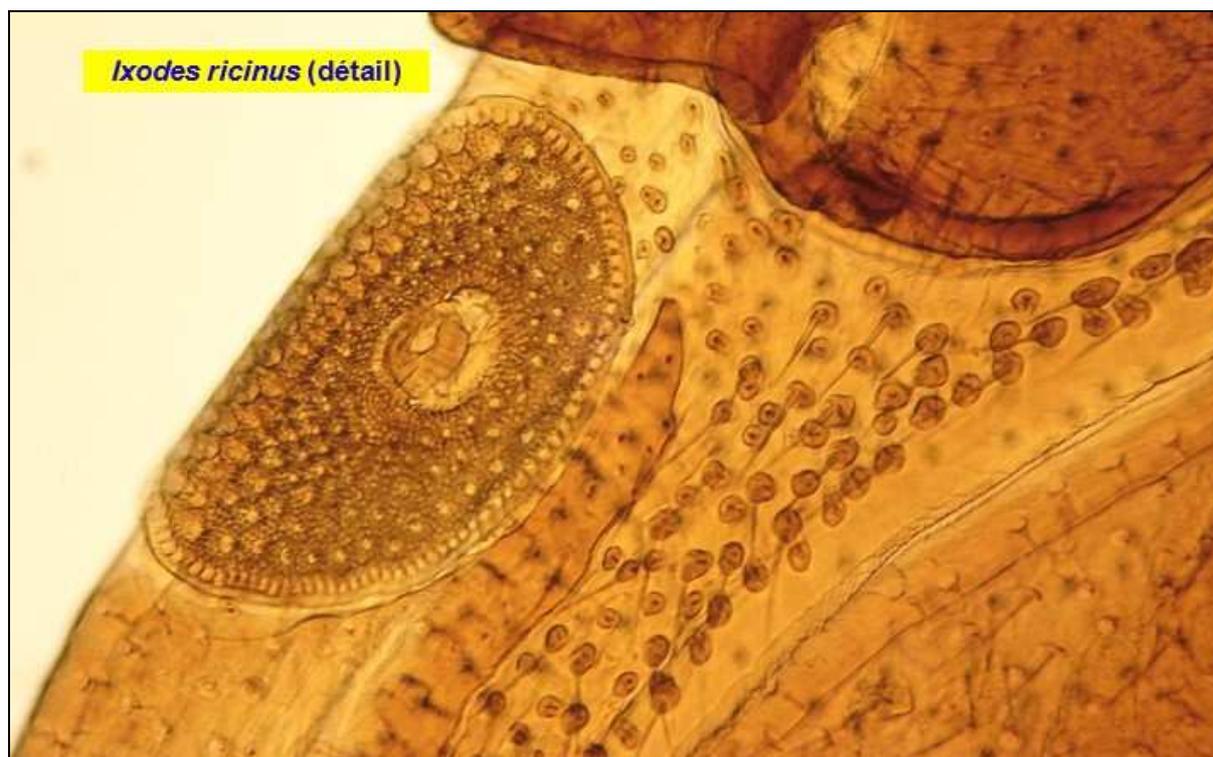


Photo Olivier Levoux

Séchage, nettoyage et lutage de la préparation

- + Laisser sécher à température ambiante (l'usage de l'étuve, suivant température, peut générer des bulles).
- + Si l'objet est épais, le milieu va se rétracter, du côté où la LCO est la plus soulevée : il faut remettre du PVALPh sans emprisonner de bulles... surveillance requise, tout un art !
- + Laisser sécher à l'horizontale : risque de dérive de la LCO et perte de l'alignement des bords de lame.
- + Laisser sécher à l'abri de la poussière (le PVALPh est collant) et pas dans une pièce de vie (toxicité du phénol dégagé)
- + Nettoyer soigneusement la préparation après séchage, car elle est normalement couverte de micro cristaux de phénol.
- + Luter impérativement du fait de la solvabilité du médium à l'eau ou à l'alcool (recommandation : attendre au moins 2 mois de séchage avant de luter, afin qu'il n'y ait plus de risque de rétraction).

Le séchage du PVALPh entraîne une compression de l'objet, qui contribue à la faible profondeur de champ, recherchée en microscopie.

Comparaison entre PVALPh et BC

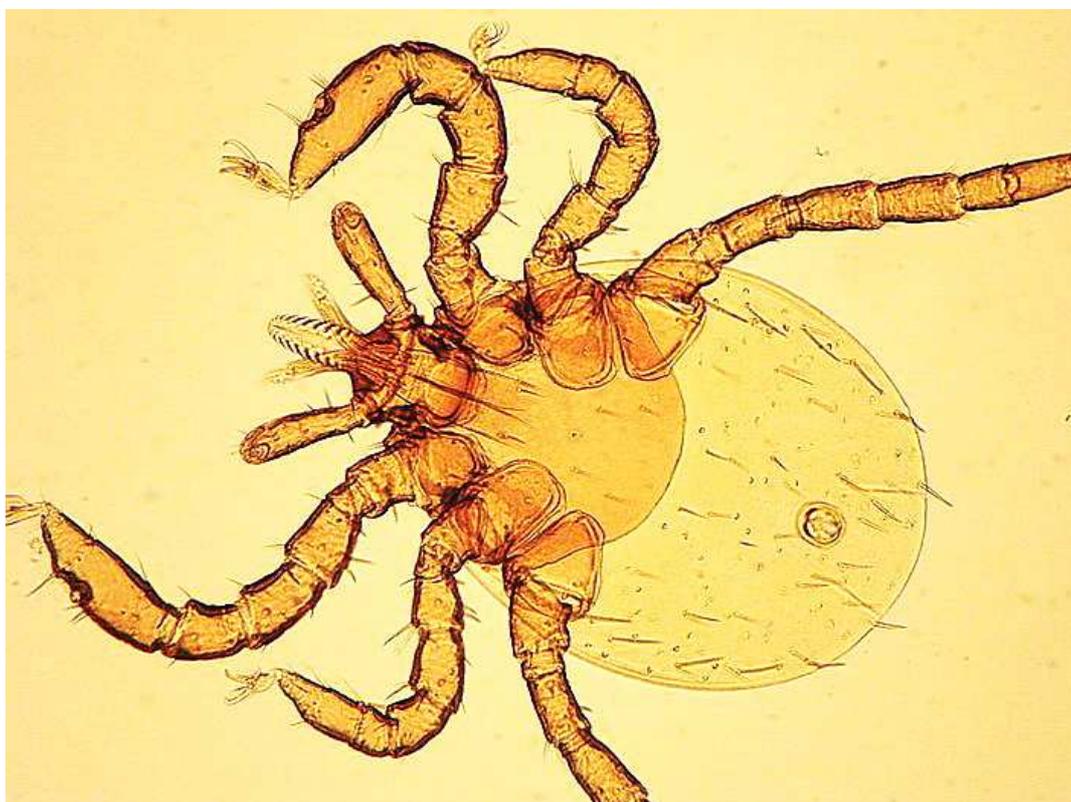
⁸⁴ (ML) : nous avons expérimenté des concentrations beaucoup plus importantes de PVA (39 %), avec comme avantage une rétraction souvent minimale, et même inexistante pour des objets de faible épaisseur.

Caractère comparé	Baume du Canada	PVALPh
Toxicité	Xylène	Phénol
Bulles	Presqu'aucun problème	Gros problème
Rétraction	Infime	Importante (voir rf. 75)
Compression	Nécessaire au montage	Auto compression
Temps de séchage	Très, très long	Long
Lut	Superflu	Nécessaire
Difficulté de préparation de l'objet	Elevée (déshydratation)	Faible
Difficulté de montage	Idem PVALPh	Idem baume
Tenue dans le temps	Légendaire	Elevée, des décennies pour les bons montages
Contraste des détails pour les micro-arthropodes	Inférieur au PVALPh	Supérieur au baume
Risque d'attaque fongique	Nul, à cause du xylène	Nul grâce au phénol

Les causes possibles d'échec

- + Un « tombé de LCO » qui apporte son cortège de bulles indélogeables⁸⁵.
- + Un passage exagéré de la préparation à l'étuve, qui peut générer des bulles irrécupérables, après polymérisation.
- + Un mauvais dosage du PVALPh (dans le pire des cas, ceci peut provoquer, suite à la mise sous tension et puis le relâchement de la LCO, un appel d'air jusqu'au centre de la préparation).
- + Un objet trop épais.
- + Un nettoyage avant séchage parfait du PVALPh, ou un oubli du lut.
- + Un PVALPh de mauvaise qualité : certains ont plus d'aptitude à générer des bulles.

Mais, si cela peut vous rassurer, il y a aussi des échecs avec le BC.



Larve de tique (le stade larvaire est aisément reconnaissable, car elle n'a pour l'instant que 6 pattes).

⁸⁵ (ML) Il est possible d'éliminer facilement les bulles en utilisant la technique suivante :

- + Chauffer la préparation sur un réchaud à alcool pur, jusqu'aux premiers bouillons.
- + Déposer le plus rapidement possible la préparation sur une surface froide (une plaque de verre par exemple), et les bulles vont migrer vers l'extérieur de la LCO, et disparaître, comme par magie.

La lumière polarisée transmise se révèle d'une belle efficacité et évite de longues préparations des insectes.

Thierry Hatt⁸⁶

L'auteur, un ami Strasbourgeois, s'est attaché à l'étude de son environnement proche, que ce soit la poussière qui envahit toute maison, ou les insectes et autres invertébrés qu'on côtoie chaque jour, et la plupart du temps sans les voir.



Ce coléoptère appartient à la famille des *Curculionidae* (Charançons), caractérisés par un rostre plus ou moins long et des antennes coudées (ML).

Techniquement voici les étapes de travail :

1. Montage de l'insecte en "position" la plus naturelle possible, tué très récemment, fixé sur une goutte de vernis à ongle, sans LCO.

2. Montage d'un Canon 7D 24x36 sur le BK5000 (avec tête trino) sur un tube allonge, avec adaptateur T 2x sans marque (qualité pas extra mais prix bas, acheté sur eBay).

3. Adaptation de verres polarisants, ou d'un kit de polarisation.

4. Tous diaphragmes ouverts, lumière à pleine puissance, tourner le verre de polarisation (ou le polariseur) jusqu'à obtenir un fond bien noir. Cela ne marche pas avec tous les insectes : la tête de la fourmi est transparente, pas celle de la guêpe.

5. Choix d'un grossissement adapté, Iso du Canon à

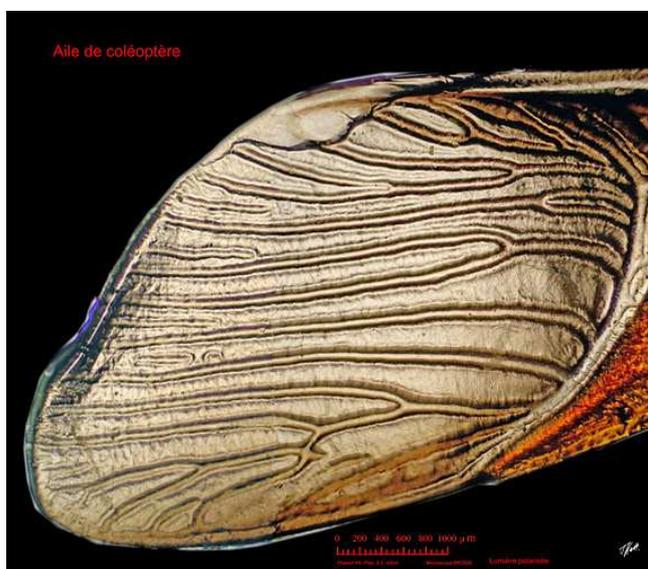
100, images RAW 16 bits, réglage de vitesse jusqu'à avoir un "bon" histogramme.

6. Partir d'une mise au point floue depuis le bas (ou le haut, c'est indifférent) et déplacer "lentement" la zone de mise au point ; prendre, selon la taille de l'insecte, entre 30 et 50 images.

7. « Dérautisation » avec DXO pro 6 en mode "accentuer les détails fins".

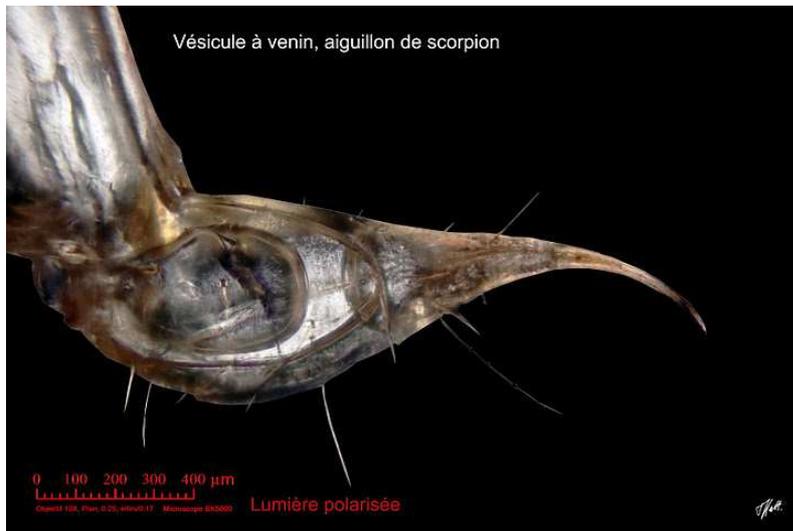
8. Reconstruction de l'insecte avec le très remarquable programme Helicon Focus 5.2 qui se paie le luxe, en plus de ses qualités de reconstruction, d'être 10 fois plus rapide que Combine ZM (mais ce dernier a l'avantage d'être gratuit).

J'ai essayé une bonne dizaine de produits de "stacking" ; HF est de loin le meilleur, mais cela a un prix : 200 à 250 \$, selon la version.



9. Détourage laborieux avec Photoshop. Double problème posé par les poils : ils changent de place relativement à l'objectif, quand on change la zone de mise au point et créent une "zone" difficile à neutraliser.

⁸⁶ Thierry Hatt, 3, Boulevard de la Dordogne – F-67000 STRASBOURG – thhatt@gmail.com



Le détourage est une opération très lourde ; tout ce qui est proposé comme outils sur le net est toujours pénible et peu efficace, (j'ai acheté DEUX logiciels spécialisés dans le détourage et j'ai renoncé à les utiliser) ; il faut générer beaucoup de sueur pour obtenir des résultats pas très parfaits.

Comble de la frustration : les "meilleurs" outils sont toujours dans la version de Photo Shop qu'on n'a pas !

9. Insertion de l'échelle selon la méthode développée ci-dessous.



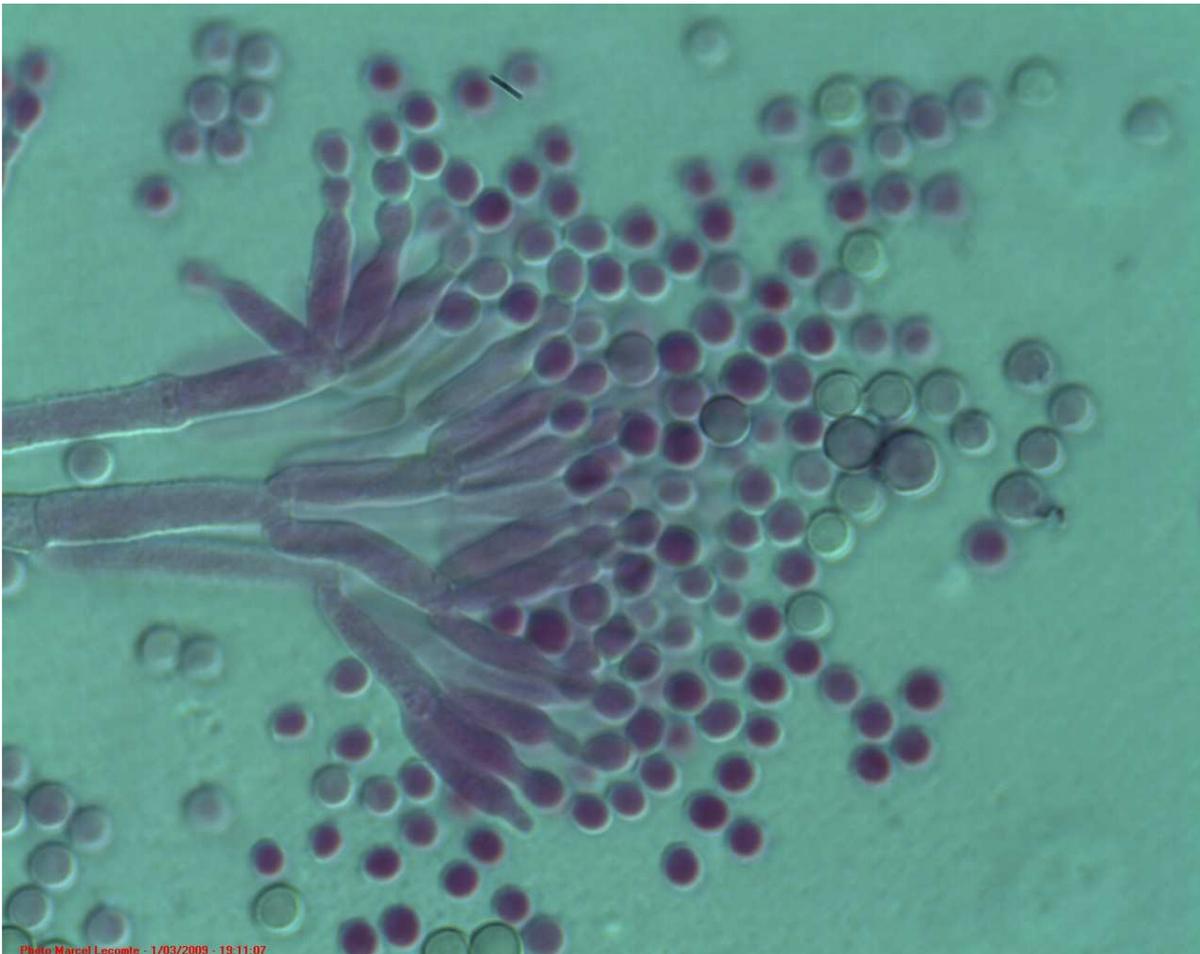
Écailles d'aile de Lépidoptère Rhopalocère (papillon de jour) – observation dans l'eau

Chapitre 08

MICROSCOPIE

ET

MOISSISSURES



Penicillium sp. DIC x63 planapo

LES MILIEUX DE CULTURE

Un milieu de culture est un support qui permet la culture d'éléments vivants, tels des cellules, des bactéries, des levures, des moisissures, afin d'en effectuer l'étude et d'obtenir des souches pures. En principe, les cellules trouvent dans ce milieu les composants indispensables à 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'oxydoréduction pour permettre de formuler des hypothèses sur le genre. Souvent, il contiendra un antibiotique, lorsqu'il s'agit de limiter la croissance de bactéries.

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'exigences particulières.

- 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 à 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 – culture Marcel Lecomte

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 (BP) stérilisées. Il

nous paraît préférable d'utiliser des BP 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 dessiccation⁸⁷ 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 E-406) dans certaines pâtisseries, des flans, des gelées de fruits, des confitures où il remplace la gélatine animale (E-441). Il a l'avantage d'être acalorique, mais doit être utilisé à doses modérées sous peine de provoquer des problèmes gastro-intestinaux.



Penicillium sp. sur milieu mixte gélose-agar - culture Marcel Lecomte

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

Il est 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 qui sont 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.

⁸⁷ 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 malt-agar - culture Marcel Lecomte

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 BP 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 champignons⁸⁸.

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

Souches test et qualité de croissance :

- Trichophyton mentagrophytes* Bonne
- Trichophyton rubrum* Moyenne/bonne
- Microsporium gallinae* Bonne
- Trichophyton ajelloi* Bonne
- Microsporium canis* Bonne
- Geotrichum candidum* Bonne
- Candida albicans* Bonne
- Aspergillus niger* Bonne
- Penicillium commune* Moyenne/bonne



BP avec milieu de Sabouraud, placée (ouverte) dans une pièce d'habitation durant 24 heures, puis incubation à 30°, durant 96 heures ; le résultat est étonnant !

⁸⁸ C'est le résultat de l'étude in vitro de la sensibilité d'un germe à différents antibiotiques. Cela permet d'induire et de guider la thérapeutique de l'infection déterminée par ce germe.

LES MOISSURES (généralités)

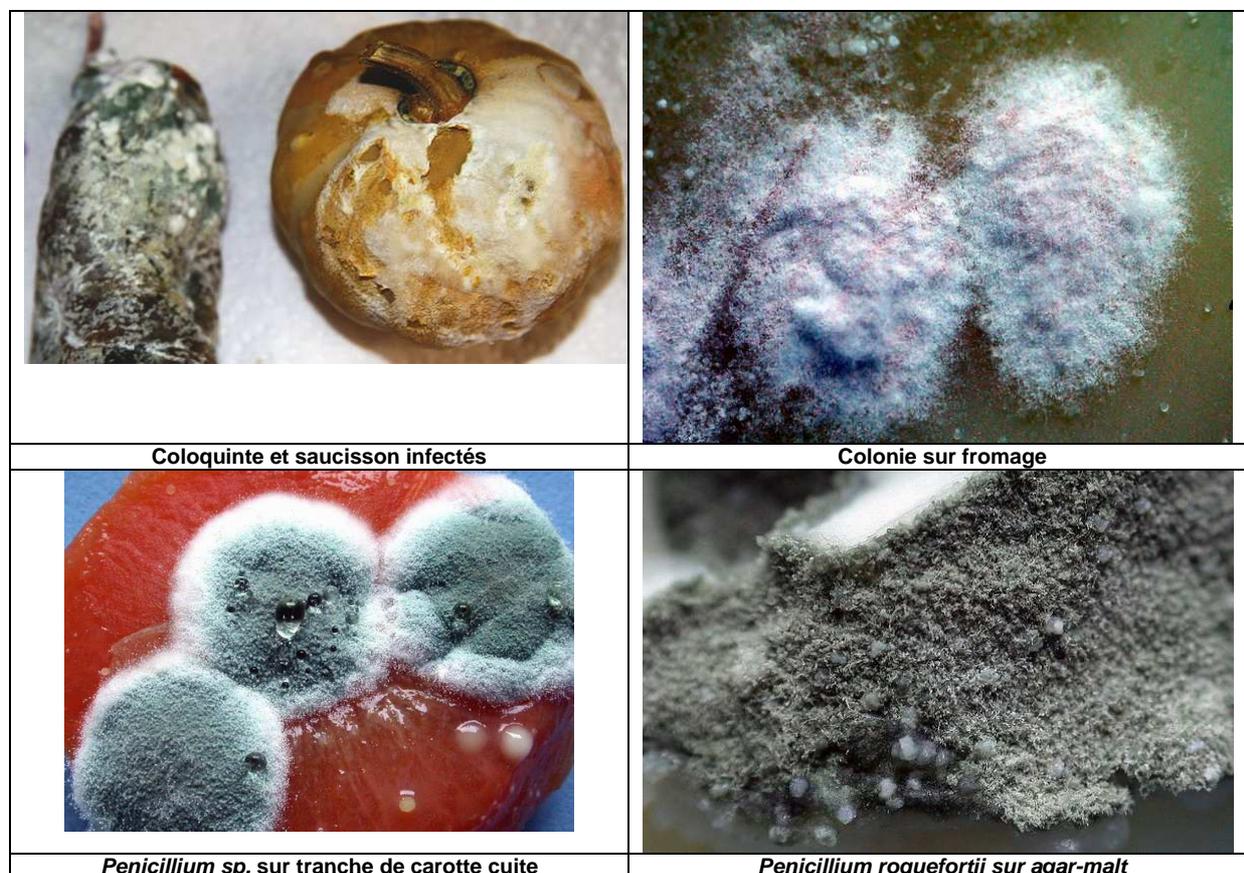
(ML) : adaptation personnelle d'après un texte de base (1997) de M.F. ROQUEBERT, professeur au Muséum, à Paris.

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 asexuée⁸⁹ (simple mitose correspondant à un clonage naturel), par des conidies. Le **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 à proximité 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.

⁸⁹ (ML) : en parcourant toute notre 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.

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 moisis. 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.

Penicillium sp. sur courgette, photo André Février

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.



Trichoderma sp. sur milieu de Sabouraud – culture ML

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.

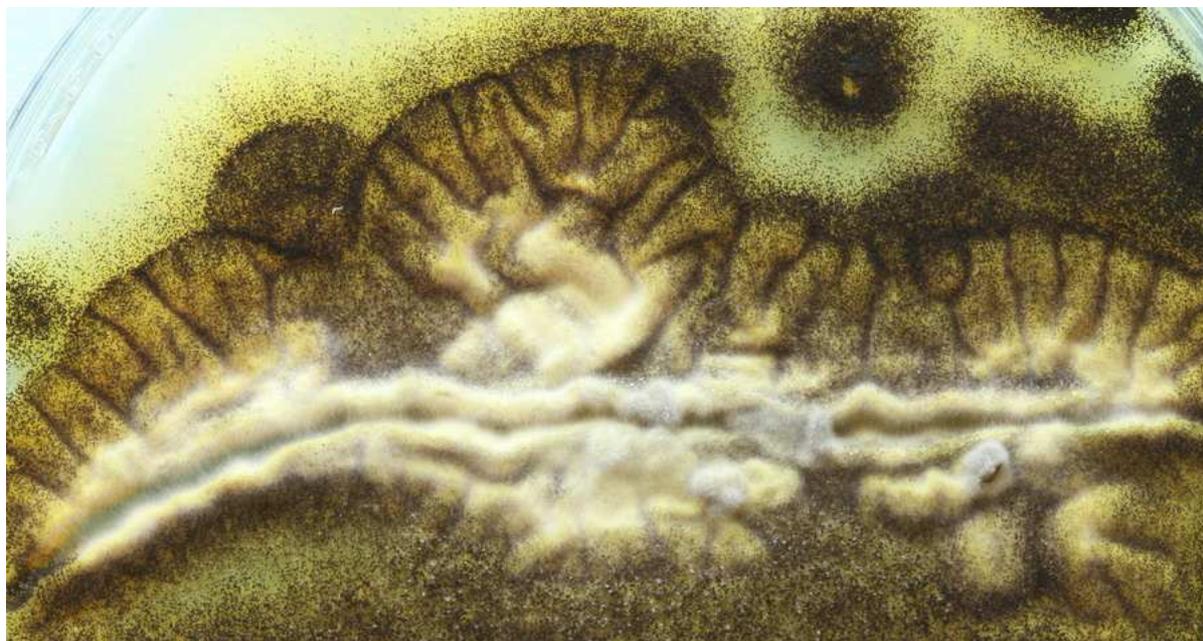
Certains produits, comme les acides aminés par exemple, peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation, tandis que d'autres tels l'amidon,

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 environnementaux

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 – culture M. 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 sont très importantes 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 – culture M. Lecomte

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 pré digèrent 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, etc.) 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 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'air ambiant, 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	Cuirs	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 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 provoquées par *Aspergillus* sont appelées des aspergilloses. Certaines espèces peuvent aussi produire des mycotoxines comme les aflatoxines (*Aspergillus flavus*) ou l'ochratoxine (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*).

Certaines espèces 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 provoquées par *Aspergillus* sont appelées des aspergilloses. 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 moisiss, fourrage, produits laitiers). Il est très utilisé dans l'industrie agroalimentaire 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 aspergilloses de l'homme). Responsable d'aspergillose broncho-pulmonaire, d'asthme aspergillaire, d'aspergillomes, d'aspergilloses profondes.

+ *Aspergillus glaucus* est 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* est très fréquent dans le sol, sur divers substrat végétal, dans l'air. Il peut provoquer des atteintes respiratoires (asthme, aspergillose bronchopulmonaire).

+ *Aspergillus ochraceus* est 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'intoxications mortelles chez des animaux d'élevage (ochratoxines). Elle peut aussi attaquer des vers à soie, mais 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* est 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 Shochu, un alcool distillé de fécula de patate.
- + *Aspergillus awamori* est utilisé dans la fabrication du Shochu 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.



Penicillium sp. – DIC x63 planapo

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. Elle 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 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, pêches 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 marneffeii* 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 et une adaptation personnelles 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), grâce à l'intervention de Christian Lechat.

LES MOISSURES SOUS LE MICROSCOPE

Il y a beaucoup de bons textes sur la théorie et l'utilisation du microscope et nous allons considérer que le lecteur a un peu de connaissances en microscopie, ou qu'il peut les acquérir. Notre 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 pas 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



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 nécessaires pour l'identification.

Si la colonie a été dans une BP 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 LPO. 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-agar.

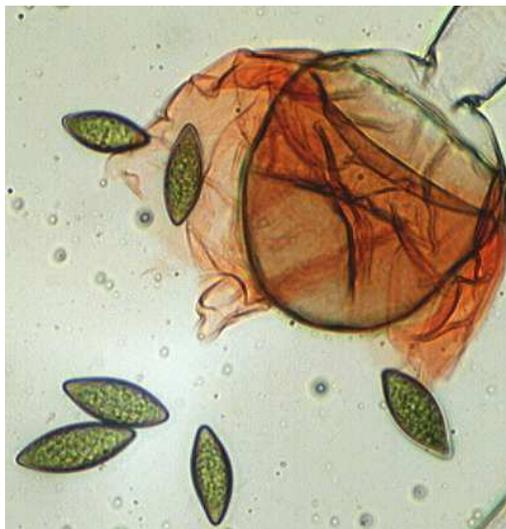
Si la colonie est épaisse et laineuse, il n'est pas nécessaire de prendre l'agar, mais dans un type plus étranglé ou plus compact, c'est essentiel. Placez le morceau de colonie dans le milieu de montage et, avec une deuxième aiguille, faites en sorte que les filaments sont bien étendus. Un support qui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

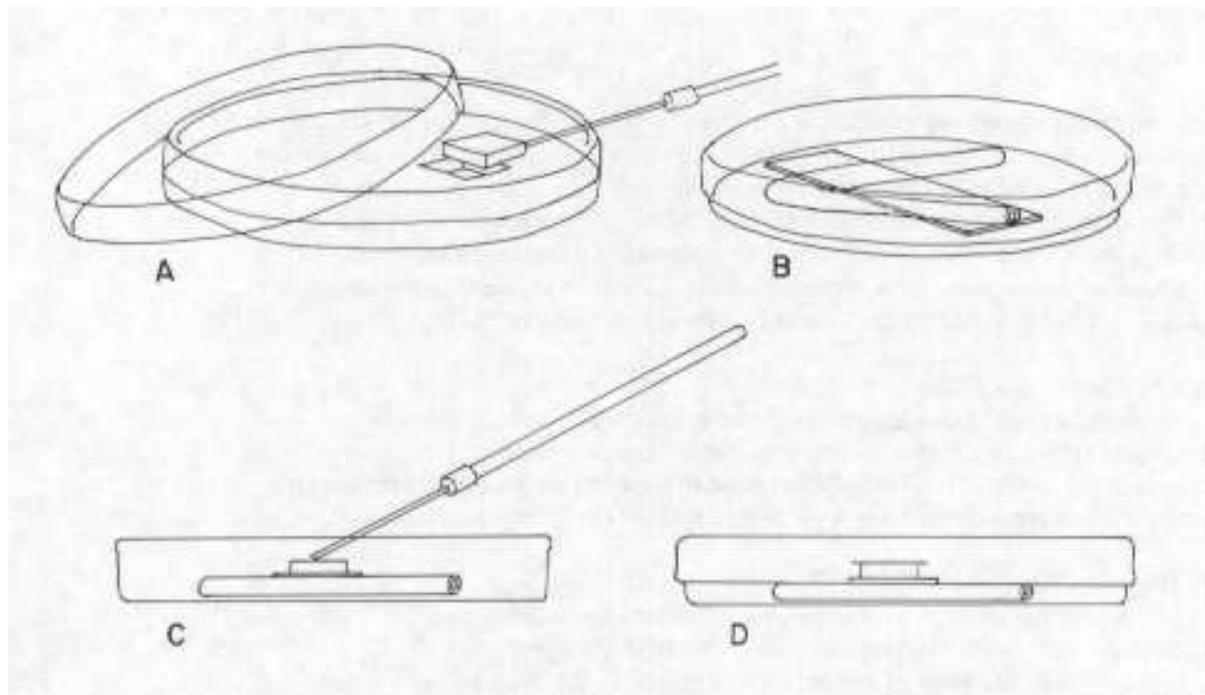
Une technique intéressante utilisée par certains mycologues pour préparer des montages microscopiques consiste à coller la moisissure sur un petit morceau de papier adhésif. La bande est appuyée légèrement contre la colonie pour qu'un peu d'hyphes et de spores y adhèrent. Placer alors le film, côté collant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

Cette technique n'est pas limitée aux colonies en BP ; 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.



Technique de culture sur LPO. Un bloc d'agar stérile est coupé d'une BP (A) et est placé sur une LPO stérilisée à la flamme, reposant sur un tube de verre plié en V dans une autre BP stérile (B). Quelques spores d'un champignon sont inoculées aux 4 coins du bloc d'agar stérile (C) puis on couvre le bloc avec une LCO (D) pour l'incubation. Un disque de papier filtre humidifié, placé sous le tube de verre, maintient l'humidité pour la chambre de culture. La BP est fermée par un couvercle stérile.

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. ci-dessus). Les cultures sur lame sont réalisées en utilisant une BP comme chambre d'incubation.

Après quelques jours, la LPO 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 des LPO et LCO, 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 probablement moins se casser.

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



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. Nous l'utilisons 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 LPO 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 brillant 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 LCO pour que la couleur de fond soit beaucoup plus neutre afin d'améliorer le contraste (utiliser un morceau de papier absorbant).

Lactofuchsine

acide lactique	100 cc
fuchsine acide	0,1 g

La lactofuchsine ne séchera pas sous la LCO 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 lactofuchsine est un colorant puissant qui est particulièrement utile pour les montages d'anamorphes et autres structures.

Réactif 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

Ce milieu d'observation est utilisé largement dans la mycologie. Certains éléments 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 une solution personnelle sans iode, ce qui génère un milieu très clair.

ATTENTION : 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 potassium	6 g
eau distillée	300 cc
glycérine	120 cc
éthanol	180 cc
encre bleue Watermann (ou bleu d'aniline)	0,1 à 0,2 %

C'est un milieu de montage très bon, polyvalent, qui ne sèche pas sur la lame pendant plusieurs semaines. Comme avec la lactofuchsine, 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 elle 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. Toutes les moisissures n'ont cependant pas le même seuil de tolérance au stress, 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, du bois, etc., et les 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 spécimens fongiques qui ne pourraient pas apparaître autrement. Après le traitement, la substance peut être traitée de manière normale, en BP, ou en chambres moites. Le docteur B. Scott (1968) a décrit une méthode de ce type pour isoler des espèces *d'Eupenicillium* (un ascomycète) du sol. Environ 2 grammes de terre 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.



Conidiophore d'un *Aspergillus*, disséminant son contenu, observation dans l'eau, x40

Un exercice pratique, assez facile à réaliser.

Matériel nécessaire

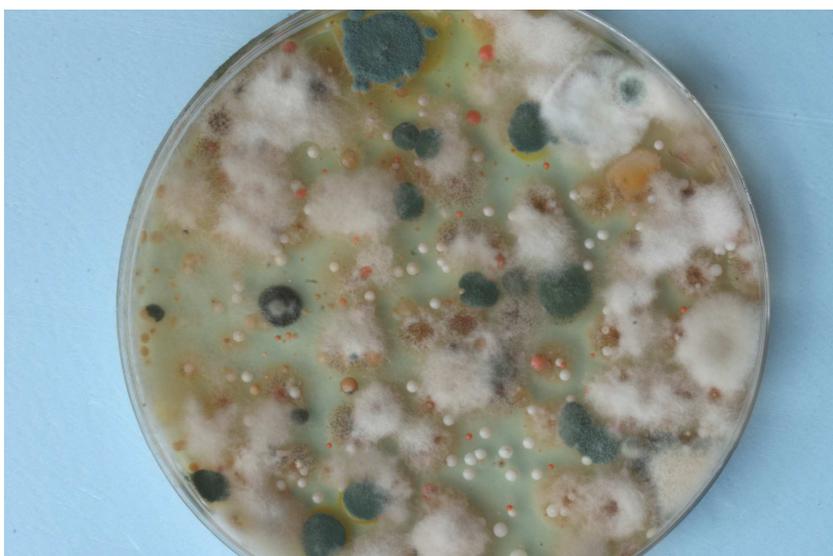
BP de 10 cm de diamètre – agar-agar - eau distillée.

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 BP.

Application :



Envisageons d'effectuer une prospection générale au niveau de l'air d'une maison, par exemple ! Il suffit de poser une BP 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 BP et les placer dans un incubateur à 25° C durant quelques heures.

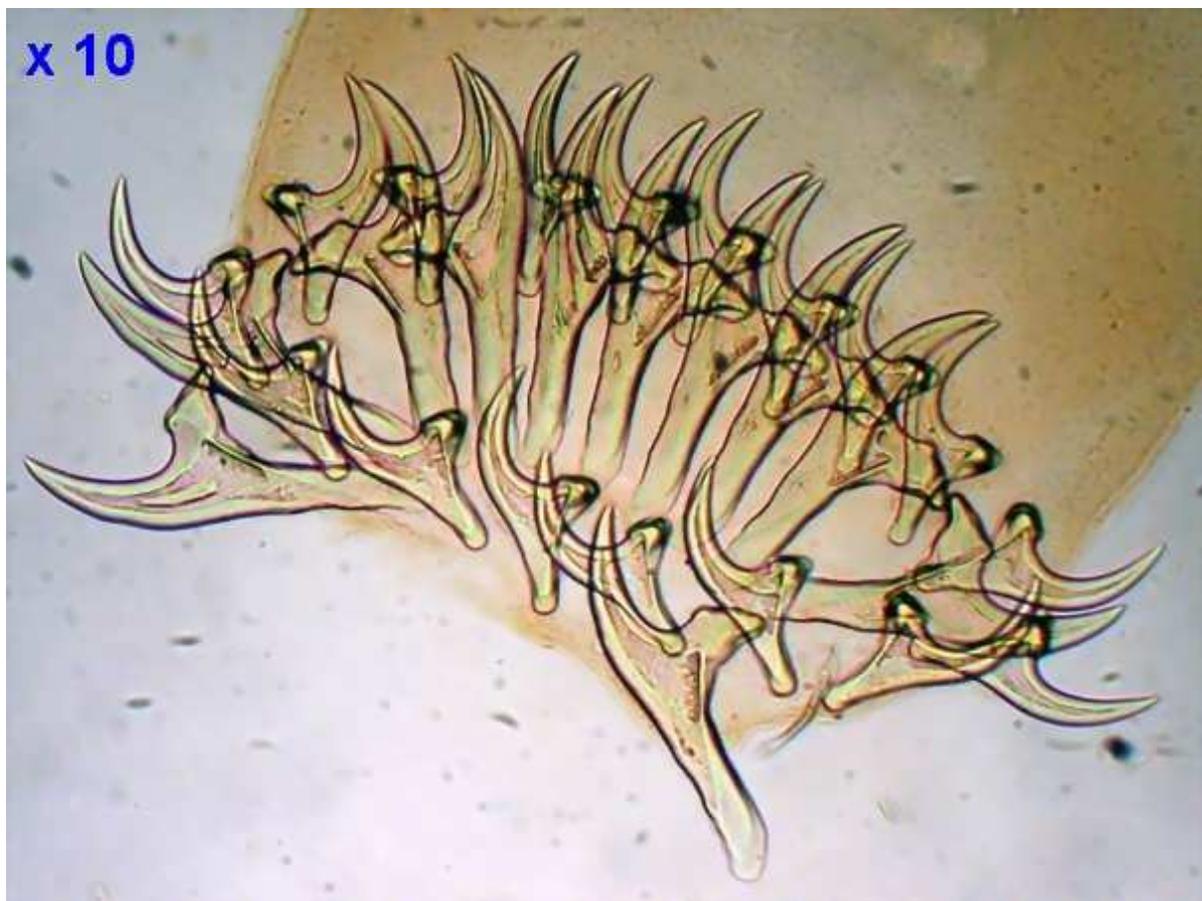
Voici un exemple de ce que vous obtiendrez !

L'incubateur n'est pas nécessaire, mais la croissance sera nettement plus lente à température froide et variable.

BP déposée durant 24 h dans la cuisine d'une maison particulière

Chapitre 09

UNE SYNTHÈSE DE DIVERSES TECHNIQUES

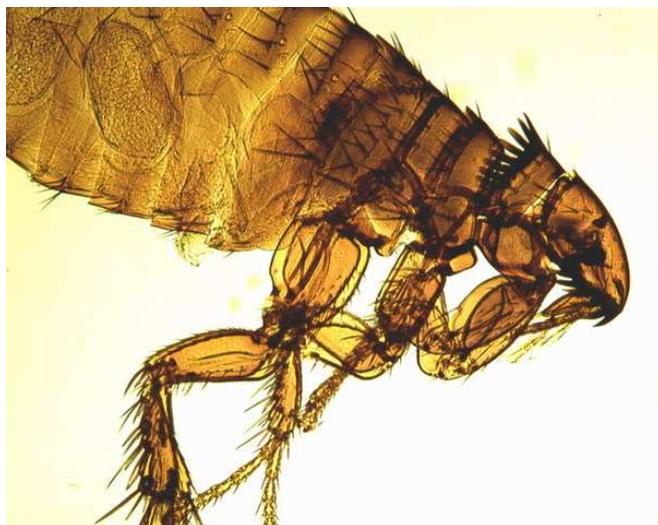


Armature de ténia du chat (observation dans l'eau)

Synthèse de DIVERSES TECHNIQUES DE MONTAGE personnelles

Les différentes techniques explicitées ci-dessous n'ont pas la prétention de faire école ni de servir de modèle de référence. Elles sont le résultat de longues années d'expérience personnelle et des judicieux conseils apportés par notre ami Paul Leroy.

Pour le montage définitif, nous sommes convaincus de la supériorité des lames rondes (jusque 22 mm de diamètre). Pour les grandes pièces, utiliser des LCO de 24x40 mm.



La puce du chat (elle est également commune sur le chien) : *Ctenocephalides felis*, 40x

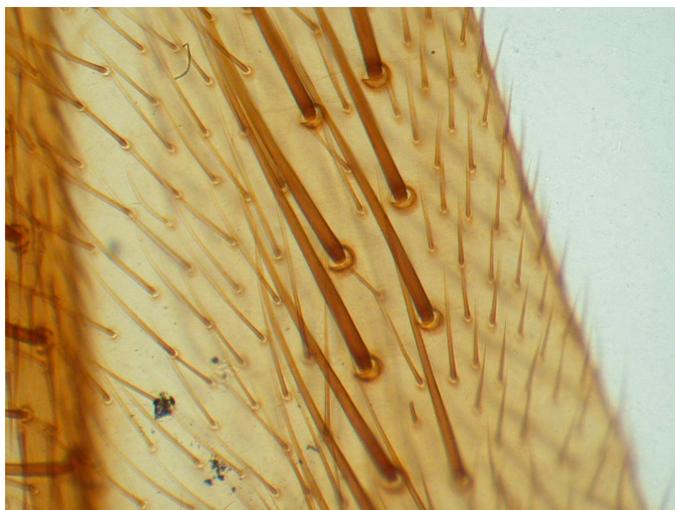
Montage des INSECTES de petite taille : les TIQUES ou les PUCES

1. Bain de 48 heures, voire plus, dans l'acide lactique.
2. Rinçage à l'eau du robinet.
3. Poser sur une LPO dans une goutte d'eau et étaler les appendices.
4. Poser une LCO et placer 2 compresseurs de faible force (surtout, ne pas écraser la pièce).
5. Plonger dans l'alcool à 90 ou 95° (24 heures).
6. Vider éventuellement l'abdomen du sujet et le placer dans le xylol (12 heures).
7. Placer dans un récipient très plat avec du BC très dilué, durant 4 à 5 jours, pas hermétique pour permettre l'évaporation du xylène (si elle est trop rapide, rajouter du xylol).
8. Montage ensuite dans le BC.

Montage des INSECTES de taille moyenne

1. Bain dans du KOH (hydroxyde de potassium, ou potasse) à 30 %.
2. Rincer à l'eau acidifiée, pour neutraliser la potasse (solution à 30 % d'acide acétique), puis rinçage à l'eau du robinet.
- 3, 4, 5, 6, 7, 8 comme ci-dessus

Montage d'éléments d'INSECTES de taille encore plus grande : PATTES ou AILES



Fragment d'aile de mouche domestique, 10x

1. Tuer l'insecte dans l'alcool à brûler.
2. Sectionner les pattes (ou les ailes), les faire glisser dans un tube à essais, recouvrir de picroformol de Bouin, et laisser séjourner durant 2 ou 3 jours.
3. Laver à l'eau du robinet.
4. Remettre dans le tube et recouvrir de potasse à 10 %. Passer à la flamme cinq ou six fois en l'espace d'une heure ; recommencer cette opération trois fois en changeant la potasse.
5. Laver à l'eau du robinet, puis avec de l'eau acétifiée à 5 %.
6. Recouvrir de chloral lactophénol ; passer à la flamme ; changer le produit trois fois en l'espace de 48 heures ; vérifier l'éclaircissement définitif au microscope.
7. Laver à l'eau du robinet.
8. Passer à l'alcool à 60°, puis à 90°, et deux fois dans l'alcool absolu.
9. Recouvrir de xylol. Si le xylol reste limpide, la déshydratation est bonne ; s'il y a des louches (traces blanchâtres), replonger les pattes dans l'alcool absolu, et recouvrir à nouveau de xylol.
10. Préparer une LPO avec une petite goutte de BC au centre.

11. Avec la pince, saisir une patte et la porter, bien enduite de xylol, au milieu de la goutte de BC.
12. Attendre quelques minutes pour que le xylol soit presque évaporé, à ce moment recouvrir la patte avec trois gouttes de BC, placer dessus la LCO.
13. Laisser sécher.

Montage de larves d'INSECTES de taille plus grande : VERS DE VASE



**palpes maxillaires de
larve de moustique**

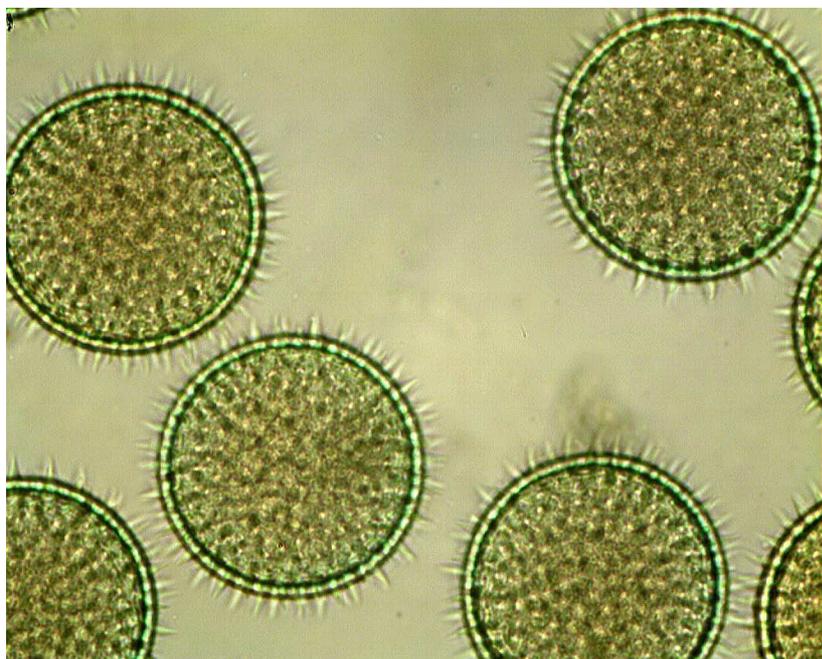
Montage au baume du Canada

1. Mettre quelques vers de vase dans un tube de verre, recouvrir avec du picroformol de Bouin durant 1 heure.
2. Laver à l'eau du robinet rapidement en vidant et remplissant le tube plusieurs fois.
3. Recouvrir par la potasse à 10 %, laisser agir durant 2 heures.
4. Laver avec de l'acide acétique à 5 %.
5. Laver à l'eau du robinet.
6. Mettre dans le chloral lactophénol jusqu'à bon éclaircissement.
7. Laver à l'eau du robinet.
8. Coloration à la safranine formolée de Sémichon à 1 % : laisser agir 1 heure.
9. Laver à l'eau du robinet.
10. Passer à l'alcool à 45°, durant 5 min. deux fois ; puis à l'alcool à brûler à 90°, durant 5 min. deux fois.
11. Deux bains d'alcool absolu, durant 20 minutes chacun.
12. Vider le sujet et recouvrir de xylol.
13. Placer dans un récipient très plat avec du BC très dilué, pendant 8 à 12 heures, pas hermétique pour permettre l'évaporation du xylène (si elle est trop rapide, rajouter du xylol).
14. Sur une LPO, mettre une toute petite goutte de BC.
15. Avec le pinceau, saisir un ver de vase et le porter sur la goutte de BC ; laisser évaporer quelques minutes.
16. Faire tomber 2 ou 3 gouttes de BC sur le ver, recouvrir avec la LCO ; appuyer, si nécessaire, très légèrement sur la LCO.
17. Laisser sécher à plat.

Montage de GRAINS DE POLLEN : rose trémière, lys, etc...

Montage au baume du Canada

1. Détacher avec la pince les étamines de quelques roses trémières, les mettre dans un tube de verre, recouvrir de picroformol, agiter, laisser reposer, retirer à la pince les plus grosses parties.
2. Laver à l'eau du robinet.
3. Recouvrir de bleu de méthylène phéniqué (bleu de Kühne) durant 15 minutes.
4. Laver à l'eau du robinet.
5. Recouvrir rapidement d'alcool faible, puis d'alcool à brûler.



6. Laisser sécher.
7. Avec l'aiguille lancéolée, déposer au milieu d'une LPO une petite pincée de pollen, éparpillez-la légèrement.
8. Faire tomber doucement sur le pollen une goutte de xylol, laisser évaporer.
9. Avant qu'il ne soit complètement évaporé, faire tomber sur le pollen 2 ou 3 gouttes de BC, recouvrir avec une LCO.
10. Laisser sécher.

Grains de pollen d'*Althaea rosea*, colorés au vert de méthyle, 10x

Montage à la glycérine gélatinée

- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, même opération que ci-dessus.
8. Faire tomber une goutte d'eau glycinée sur le pollen, éponger l'excédent avec un buvard, laisser évaporer une heure ou deux à l'abri de la poussière.
9. Faire tomber 2 ou 3 gouttes de glycérine gélatinée chaude sur le pollen, recouvrir avec une LCO.
10. Laisser refroidir.
11. Luter.

Réalisation et montage définitif d'un FROTTIS SANGUIN

1. Prendre une LPO, le tremper dans l'alcool chlorhydrique à 10 %, bien l'essuyer avec un chiffon ne peluchant pas ; faire la même opération avec la LCO.
2. Opérer rapidement pour les étapes 3, 4 & 5, afin d'éviter que le sang coagule.
3. Faire flamber une épingle et se piquer le doigt au-dessous de l'ongle.
4. Déposer sur la droite de la LPO une goutte de sang grosse comme une tête d'épingle.
5. Faire entrer en contact avec une LCO le sang du côté gauche de la goutte ; le sang va filer le long de la tranche de la LCO.
6. Pousser la LCO sur votre gauche, cette dernière entraînera le sang. Le sang doit être entraîné mais non poussé, c'est pourquoi il faut placer la LCO sur le côté gauche de la goutte.
7. Agiter rapidement la LPO de façon à ce que le sang sèche à l'air.
8. Fixer avec une goutte d'alcool absolu, laisser sécher.
9. Colorer au bleu de méthylène.
10. Laver à l'eau distillée.
11. Faire tomber sur le sang une goutte d'alcool absolu ; par un mouvement brusque de la LPO, rejeter le maximum de liquide ; laisser sécher.
12. Déposer une goutte de BC, couvrir avec une LCO, laisser sécher.

Montage définitif de MOISSURES

Les moisissures sont faciles à obtenir. Prenez une tranche de pain imprégnée d'eau que vous déposerez dans une assiette ; recouvrir avec une cloche de verre. Au bout de quelques jours les champignons seront formés.

1^{ère} méthode : montage à la gélatine

Inconvénient de cette technique : il est impossible de transférer les conidiophores complets et on n'a que des fragments noyés sous une multitude de conidies.

1. Avec l'aiguille lancéolée, prélever des fragments de moisissure ; les déposer sur une LPO.
2. Recouvrir de 2 gouttes d'alcool à 95° ; laisser évaporer : les moisissures adhéreront au verre.
3. Recouvrir de 2 gouttes de bleu lactique, éponger l'excédent du produit avec un buvard.
4. Monter directement dans la gélatine glycinée.
5. Luter.



Moisissure sur cerise, montage au PVA fuchsine acide, DIC 63x

2^{ème} méthode : montage au PVA lactophénolé, coloré dans la masse, à la fuchsine acide (PVAL-FA).

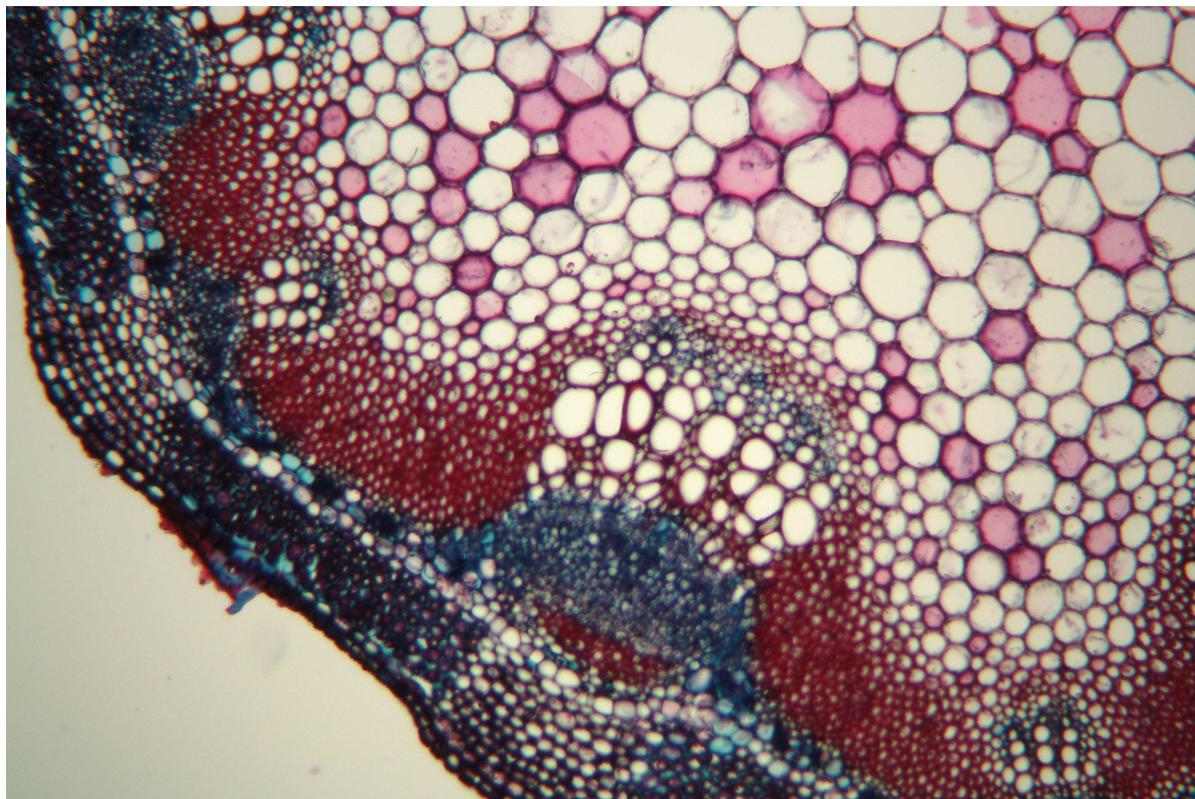
Avantage de cette technique : les conidiophores restent complets ; ils sont indispensables à la détermination.

1. Déposer sur une LPO une goutte de PVAL-FA.
2. Prélever un morceau de papier collant cristal de 2 cm de long.
3. L'appliquer légèrement sur la moisissure.
4. Découper avec précaution la partie centrale (5-7 x 5-7 mm).
5. La déposer sur le PVAL-FA, face collante vers le bas.
6. Éliminer au maximum les bulles d'air, en appuyant légèrement du centre vers l'extérieur.
7. Déposer à nouveau une petite goutte de PVAL-FA sur le papier collant.
8. Poser la LCO.
9. Observer avec un 40x au maximum, car ce type de préparation s'avère relativement épaisse.
10. Il est toujours possible d'éliminer les bulles d'air par la chaleur, avec refroidissement rapide, mais cela va briser les chaînes de conidies : n'utiliser donc qu'en cas de force majeure.
11. Laisser sécher durant 48 heures.
12. Luter au vernis à ongle incolore.

Montage de coupes de tissus végétaux, selon Klaus Herrmann⁹⁰

Des expériences préliminaires ont montré qu'il est peu intéressant de travailler sur du matériel frais, non fixé.

Ci-dessous, coupe dans le pétiole d'une feuille de carotte



1. Fixation de la pièce avec du AFA → 2 à 3 jours pour une pièce complète ou 2 à 3 heures pour des coupes réalisées sur du matériel frais.
2. Rinçage à l'eau, deux ou trois fois successivement.
3. Destruction du contenu cellulaire avec de l'eau de javel (2 à 5 minutes).
4. Deux ou trois rinçages successifs.
5. Coloration avec Étzold blau ou Étzold grün (laisser agir durant 10 à 20 minutes).
6. Plusieurs rinçages successifs.
7. Déshydratation avec de l'alcool isopropylique (isopropanol ou propanol-2) → il faut effectuer cette opération très rapidement au départ sous peine de provoquer une décoloration.
8. Montage à l'Euparal, qui est un milieu à base d'isopropanol, ce qui permet d'éviter l'utilisation du xylène, nécessaire pour d'autres milieux, comme le BC.

Observation de mitoses (divisions cellulaires)

Il s'agit d'observer des méristèmes de racines (le bout de celles-ci est une zone privilégiée de prolifération cellulaire) sur divers bulbes, tels jacinthe, tulipe, amaryllis, oignon, ail ... On va pouvoir y retrouver les différentes étapes de la mitose⁹¹ et observer le comportement des chromosomes durant la division cellulaire. Cela s'avère très intéressant car cette division n'est pas synchrone entre les cellules, et avec un peu de chance, on va pouvoir visualiser les différents stades sur une même préparation.

⁹⁰ Klaus Herrmann - Silberstrasse, 12 – D-75242 NEUHAUSEN-HAMBERG – klausbigi.herrmann@t-online.de

⁹¹ La mitose est un simple dédoublement des cellules, avec une reproduction similaire (un clonage) ; il n'y a pas échange de patrimoines génétiques (cela n'a lieu que dans la méiose). C'est un phénomène continu, et selon les espèces, elle va durer entre 1 et 3 heures. Les biologistes ont décrit des phases caractéristiques :

- INTERPHASE : les chromatides (molécules d'ADN) se dédoublent, avec un accroissement du volume cellulaire.
- PROPHASE : les chromatides s'organisent en structures bien ordonnées, les chromosomes.
- MÉTAPHASE : les chromosomes se rassemblent à l'équateur de la cellule, et forment la plaque équatoriale.
- ANAPHASE : les chromosomes identiques se séparent et migrent vers les pôles opposés de la cellule.
- TÉLOPHASE : la cellule se sépare en deux en suivant le sillon de division ; on a maintenant 2 unités possédant le même patrimoine génétique.

Préalable : 8 à 10 jours auparavant, poser un bulbe sur un verre rempli d'eau ; cela va générer l'apparition des racines. 2 jours avant d'expérimenter, placer l'ensemble au réfrigérateur ; les mitoses vont être ralenties et les métaphases seront plus nombreuses.

1. Faire bouillir du carmin acétique de Sémichon dans un petit flacon (travailler sous hotte ou dans un local bien aéré).
2. Prélever le dernier centimètre de quelques racines, avec une lame de rasoir.
3. Les placer dans un morceau de gaze ; fermer le « sachet » à l'aide d'un bon fil à coudre et laisser dépasser un morceau de 15-20 cm.
4. Plonger le petit sac dans le carmin bouillant, durant une minute, en coinçant le bout du fil avec le bouchon du flacon.
5. Transférer immédiatement dans du carmin acétique frais, durant 5 minutes.
6. Monter dans l'eau et dissocier fortement → à 40 ou 63x, les différents stades de mitose seront nettement visibles.



Mitoses dans un méristème de jacinthe – x63



Déshydrater à l'isopropanol et monter à l'Euparal, ou déshydrater au xylène et monter au BC, Eukitt, Néo-Entellan, Histolaque ..., ou monter directement dans Aquatex ou PVA lactique non phénolé.

Il est possible de remplacer le carmin acétique par de l'orcéine acétique (hydrolyser durant 5 minutes dans une solution d'HCl - rincer soigneusement - Poser la LPO - déposer une goutte d'orcéine : laisser agir de 5 à 20 minutes - éliminer le colorant - observer dans une solution acétique à 50 % ou dans l'eau – dissocier délicatement – observer).

Chapitre 10

ENCORE

QUELQUES

COMPLÉMENTS

D'INFORMATION

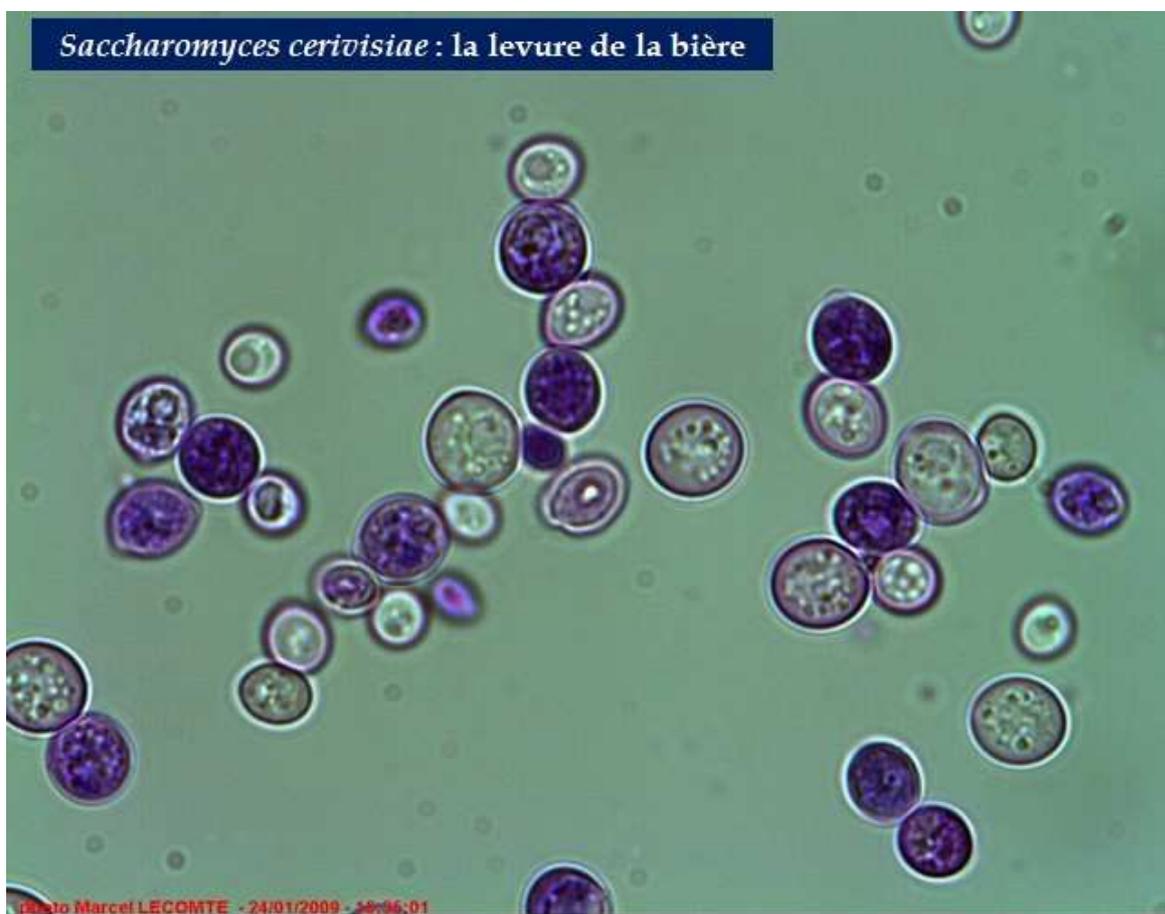


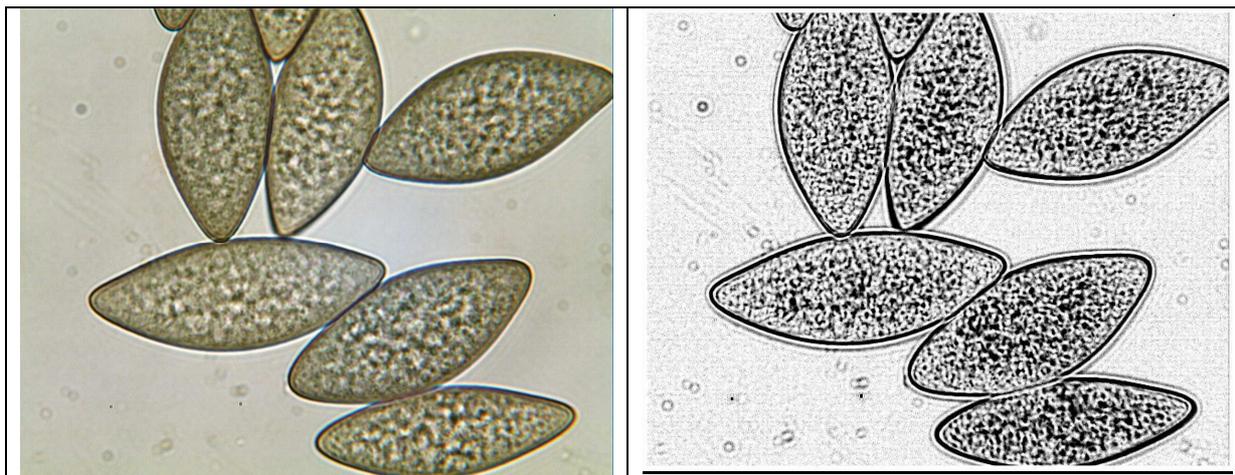
Photo to Sketch

Ce logiciel fait partie des logiciels gratuits (freewares) qu'on peut trouver sur Internet. Il permet de transformer (en quelques secondes) une photo en un dessin au trait, avec des résultats souvent très spectaculaires (cela dépendra évidemment de la qualité de la photo de départ).

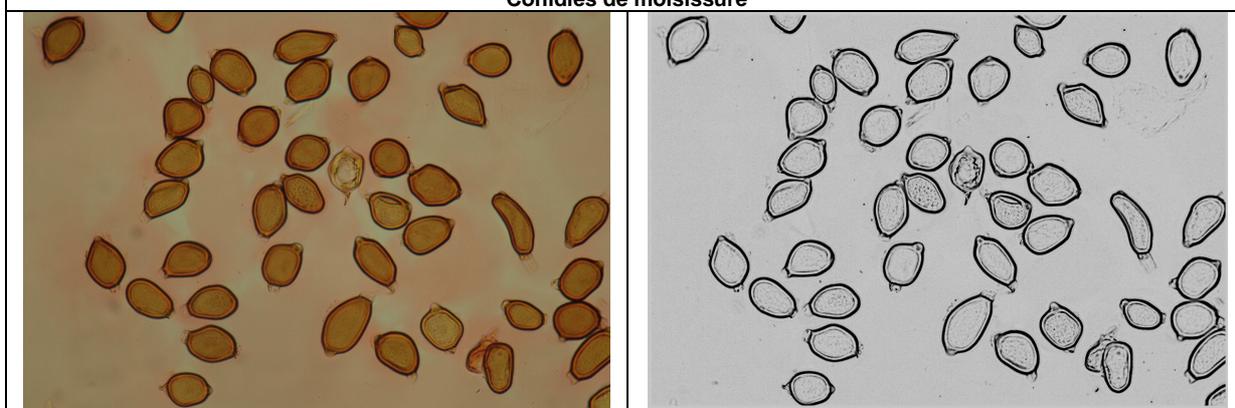
Cette technique s'avère très intéressante pour des publications en noir/blanc.

Plusieurs choses nous paraissent évidentes :

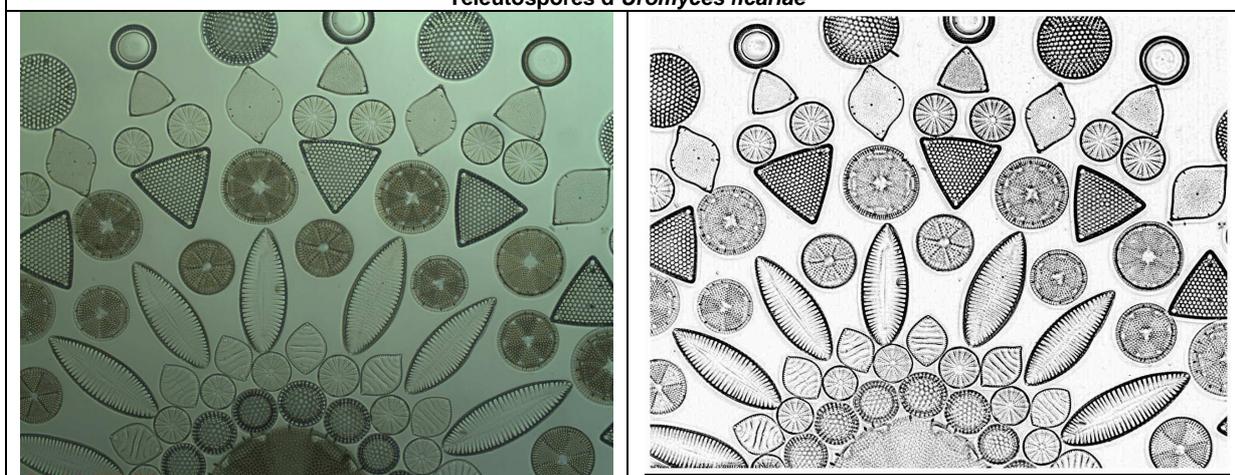
- le résultat ne subit aucune déformation ;
- la reproduction au trait est parfaitement fidèle ;
- le dessin n'est influencé en aucune manière par le dessinateur, qui a souvent tendance à idéaliser et schématiser ce qu'il observe (cela explique qu'on ne retrouve quasi jamais sur un dessin ce qui se voit au microscope) ;
- nous sommes à l'abri d'une erreur de dessin ou d'interprétation.



Conidies de moisissure



Téleospores d'*Uromyces ficariae*



Rosette de diatomées (montage décoratif)

Des LOGICIELS disponibles gratuitement 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 nous utilisons pour les documents pdf de notre 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.

Micro Cartouche

Ce logiciel a été conçu par Christian Aubert, excellent microscopiste suisse, que nous connaissons personnellement. Micro Cartouche, MC pour les intimes, est un petit utilitaire gratuit qui vous aidera à préparer vos photos et à 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>

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, informaticien professionnel, qui met gracieusement le fruit de son travail à la 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, et nombre d'autres paramètres. Cela 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 PowerPoint, 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. Il permet de retravailler une image de manière assez avancée, d'y placer du texte, entre autres, comme une version simplifiée de Photoshop, avec beaucoup moins de fonctions évidemment.

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 nous paraît assez simple d'emploi, avec une présentation agréable et conviviale.

FastStone

L'outil idéal pour réaliser des captures d'écran ou sélectionner des parties de n'importe quel fichier : images, textes, tableaux, diagrammes.

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 avec micro et écouteurs. Le must est évidemment d'utiliser une 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.

De la longévité des réactifs et colorants chimiques en mycologie et microscopie

La question nous est souvent posée de déterminer la longévité d'un produit chimique que nous préparons, et surtout de savoir pourquoi n'y figure pas une date de péremption.

La manière la plus simple d'y répondre, est constituée par une lapalissade : chaque réactif ou colorant va durer « un certain temps » ... pour faire référence au refroidissement du fût du canon, si cher à Fernand Raynaud.

En effet, nous choisissons de ne pas indiquer des délais précis pour diverses raisons.

- Chaque produit présente une durée de vie différente.
- La longévité dépendra des qualités de stockage (exposition ou non à la pleine lumière, température de la pièce, flacons hermétiquement fermés).
- Elle sera également directement proportionnelle au soin de manipulation apporté par l'utilisateur ; pour les réactifs macroscopiques par exemple, il est impératif d'essuyer la petite palette fournie avec le flacon après chaque utilisation, sinon vous risquez d'introduire dans le produit des éléments qui vont précipiter, et le dégrader (c'est particulièrement fréquent quand on teste le lait des lactaires : après quelques mauvaises manipulations, la potasse contient des précipités qui se manifestent sous forme de traînées blanchâtres).
- Il est très important de ne pas laisser le flacon ouvert en cas d'utilisation prolongée, car les solvants risquent de s'évaporer très vite (acide acétique, ammoniac ou éthanol).

Il est possible cependant de déterminer certaines constantes ou généralités :



Le TL4, qui contient des acides forts (acide nitrique et acide chlorhydrique, solvants de l'oxyde de thallium) peut se conserver plus de 10 années.

Les acides forts cités ci-dessus, et **l'acide nitrique**, se conservent de 5 à 10 ans, même s'ils noircissent.

L'aniline brunit après 1 an, mais reste efficace durant nombre d'années.

La soude et la potasse se conservent durant deux à trois ans, et restent efficaces si le liquide n'est pas troublé par des précipités.



L'ammoniac peut durer quatre à cinq ans (il suffit de tester son efficacité en le respirant avec beaucoup de précaution), ou alors d'ouvrir le flacon en présence rapprochée de *Lactarius necator* : les lames vont réagir immédiatement en mauve sous l'action des vapeurs d'ammoniac.

Le phénol est très sensible à la lumière et il doit être scellé dans un flacon en verre brun ; nous vous conseillons en outre de l'entourer de papier aluminium. Il vaut mieux le remplacer après 2 ou 3 ans. Pour le tester, vérifier sa réaction sur le stipe de *Russula olivacea* : il donne une réaction pourpre violet vive (couleur groseille ou framboise), alors qu'elle est banalement brun chocolat.

A gauche, du melzer « fatigué » ; à droite du melzer bien frais, en contact avec une feuille de papier

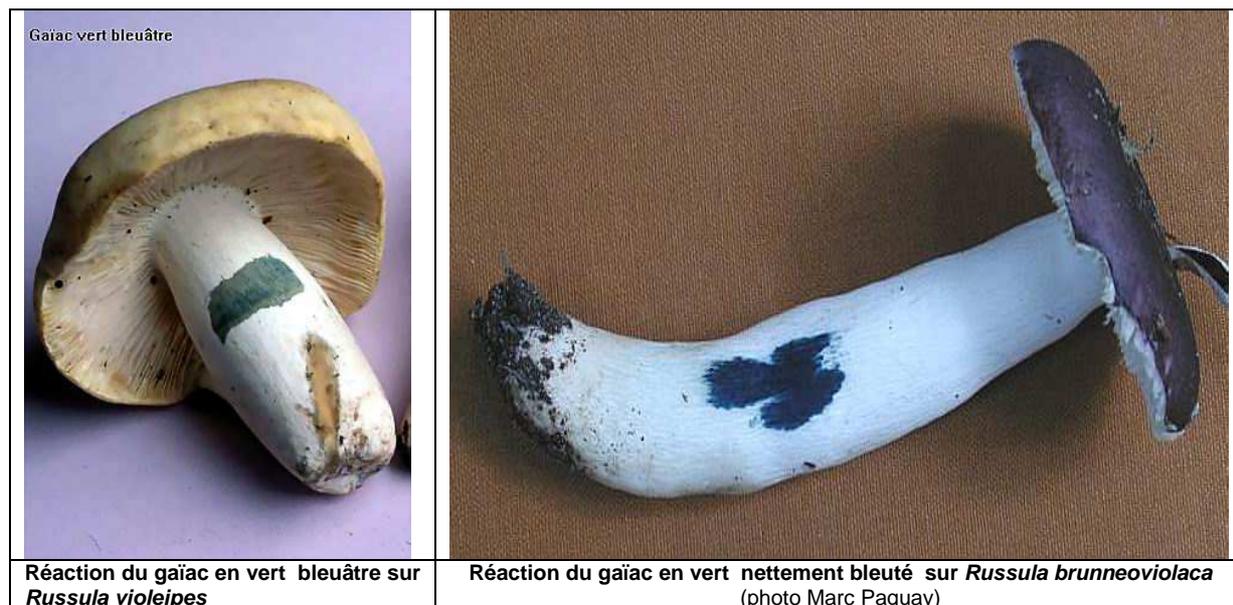
Le formol forme assez vite des précipités et a tendance à polymériser s'il fait trop froid dans le lieu de stockage : conservation 2 à 3 ans, dans de bonnes conditions.

Le Lugol et le réactif de Melzer doivent être contrôlés régulièrement après un an de vie, car la réaction amyloïde risque d'être faussée (et donc également la réaction dextrinoïde). Les produits iodés se dégradent facilement en milieu trop chaud, à la lumière, ou encore dans des flacons mal fermés ou laissés ouverts ... et l'iode est très volatile.

Deux moyens simples pour les tester.

- Passer la palette sur du papier ou du sopalin (essuie-tout), et la tache doit devenir brun foncé au minimum ; si la tache reste brun clair ou orangée, lugol et melzer ne sont plus efficaces (voir la photo à la page précédente).
- Passer la palette sur les lames de russules ou de lactaires, et la réaction amyloïde apparaît immédiatement.

Le soluté de gaïac est vraisemblablement le produit qu'il faut remplacer le plus souvent, car il « fatigue » au bout d'une saison, et l'utilisation d'un produit trop vieux peut générer de fâcheuses erreurs de détermination.



- L'efficacité du réactif peut être évaluée en l'essayant sur *Russula ochroleuca* : la réaction bleue doit être immédiate et très intense.
- Roland Hanon (Mycologues du Luxembourg Belge), conseille un essai sur *Russula fellea* qui, au contraire, doit donner une réaction faible et très lente. Ce dernier test, très précieux, permet de s'assurer que la concentration du réactif en résine de gaïac n'est pas trop élevée.
- Voici ce que préconisait H. Romagnesi : le réactif doit être positif sur les lames de *Russula velutipes* (= *rosea* = *aurora*) et quasi nul sur le pied. S'il réagit sur le pied, c'est qu'il est trop fort ! S'il ne réagit pas sur les lames, c'est qu'il est trop faible ! Mais cette différence de réaction se marque également sur d'autres russules (René Chalange, Société Mycologique de France – travail en préparation).

Le cristal de sulfate de fer présente de grosses difficultés de préparation et le pourcentage de réussite est faible ; en outre, il a tendance à se dégrader assez vite s'il n'est pas enfermé dans une boîte hermétique, sur un lit d'ouate hydrophile.

Par contre, **la solution aqueuse de sulfate de fer**, stabilisée en milieu acide, peut se conserver plus de 5 ans, et donne les mêmes réactions que le cristal, à condition de blesser la chair du champignon, avant de le tester.

Il est impossible de conserver certains mélanges qui doivent se préparer de manière extemporanée, c'est-à-dire au moment de l'utilisation, sans possibilité de les stocker ensuite. Ce sera le cas notamment de tous les réactifs sulfoaldéhydiques, tels **la sulfovanilline, le sulfoformol, le sulfo-benzaldéhyde, et le sulfopipéronal**. Ou encore, **le métol** et **le paraphénylène diamine**.

Il en sera de même pour **le rouge de ruthénium**, et pour **le réactif R56** de Dagrón, qui noircit complètement en quelques jours.



Les différents **milieux de montage** vont se conserver durant très longtemps (quasi indéfiniment) s'ils sont stockés dans des flacons spéciaux, à bouchon en verre rodé, comme celui figuré à côté, et contenant du BC. Enduire la partie rodée de vaseline assure encore plus l'étanchéité du récipient.

C'est une sage précaution, car les solvants de ces différents milieux sont souvent très volatiles.

Ce récipient est assez coûteux, mais le remplacement régulier des différents milieux l'est encore plus. En outre, la baguette de verre permet de déposer une petite goutte avec beaucoup de précision sur la LPO.

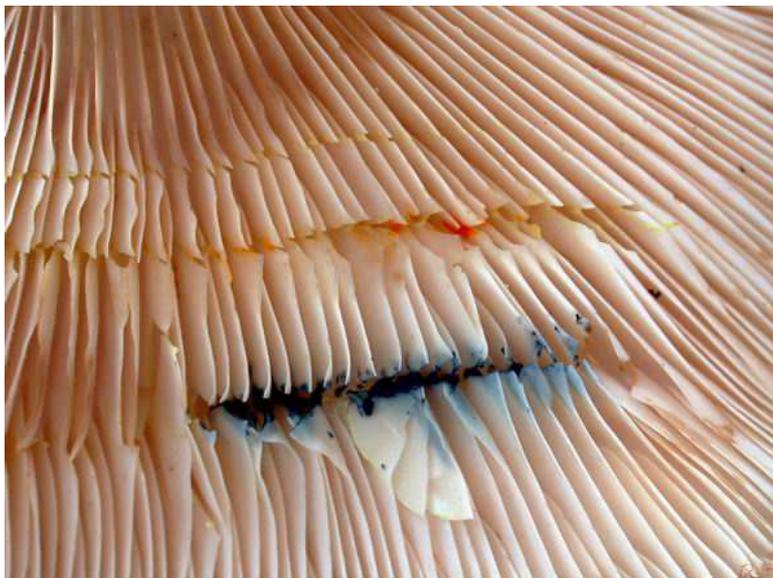
En ce qui concerne les colorants microscopiques classiques, la plupart des produits conventionnels peuvent se conserver durant plusieurs années (de 5 à 10, et souvent plus) en flacons bien fermés.

Nous parlons ici de :

- **bleu d'aniline**
- **bleu coton lactophénolé** ou bleu de méthyle lactophénolé
- **bleu coton lactique** ou bleu de méthyle lactique
- **bleu de crésyl** sous diverses formes
- **bleu de toluidine**
- **carmin acétique** de Sémichon
- **carbolfuchsin** de Cléménçon
- **fuchsine de Ziehl**
- **phloxine B**
- **lactofuchsin**.

Il s'agira cependant de se montrer prudent avec le **rouge Congo ammoniacal** (il perd ses qualités en cas de dégradation de l'ammoniaque), et encore plus avec le **rouge Congo SDS**, qui bien souvent doit être remplacé chaque année (cela ne constitue pas un problème majeur, car un microscopiste quelque peu travailleur consomme largement un flacon durant une saison).

Nous accorderons également une attention toute particulière à **l'huile d'immersion synthétique**. Elle peut être avantageusement remplacée par le **glycérol** « spécial microscopie » qui possède un indice de réfraction exceptionnel, de l'ordre de 1,7 ; il a l'avantage d'être soluble dans l'eau et donc de présenter une grande facilité de nettoyage au niveau des lames ou des objectifs à immersion ... et les autres, qui sont souvent pollués par une fausse manœuvre.



Sur les lames de *Lactarius aquizonatus*, la potasse à 10 % réagit en donnant du jaune orangé, tandis que le TL4 donne une réaction d'un beau bleu noirâtre.

La conservation du matériel frais

La technique classique, 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 de spécimens séchés, consacré aux lactaires

Cependant, nous avons le sentiment que ce type de conservation présente **quelques inconvénients** à côté de nombre d'avantages.

- Il s'avère très difficile de réaliser des coupes ou d'observer certaines structures fines et délicates qui peuvent disparaître lors de la dessiccation.
- La conservation de petites espèces (*Hemimycena*, *Mycena* par exemple) nous semble très compromise.
- La conservation de certaines espèces (*Coprinellus*, *Coprinus*, *Coprinopsis* par exemple) nous paraît impossible, vu leur déliquescence et leur fragilité.

Il apparaît alors 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 :

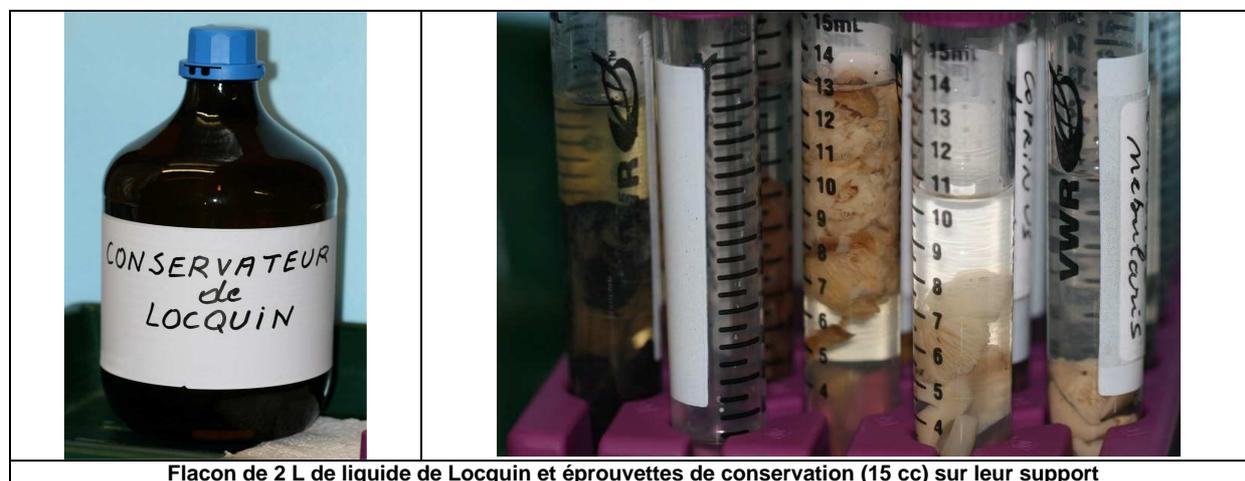
- produit peu coûteux
- formule qui va altérer le moins possible les formes et les couleurs
- composition qui va bloquer au maximum la diffusion des pigments, qu'ils soient solubles dans l'eau ou dans l'alcool.

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 glycéринé	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	(Éthanol 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 70° + 20 cc eau bidistillée + 10 cc formol + 5 cc acide acétique + 10 g de saccharose pur.	Conserve mal 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 Locquin⁹², car il est d'une préparation accessible à tout un chacun ; nous avons entrepris une collection en milieu liquide depuis près de cinq ans, avec un succès très encourageant. Bart Buyck l'utilise depuis 20 ans au Muséum de Paris, et se montre totalement satisfait. Quelques essais d'étude microscopique, réalisés sur de très petites espèces, se sont révélés vraiment convaincants : nous avons l'impression de travailler sur du matériel frais.

Nous avons pu constater que nombre de pigments cuticulaires sont solubles, soit dans l'eau, soit dans l'alcool du mélange.

Nous avons réalisé 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.

⁹² (ML) Mais contrairement à ce qui est affirmé dans le texte original, notre expérience personnelle nous conduit à affirmer qu'il ne conserve pas bien les couleurs.

Le traitement des exsiccata

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 antimites, ou paradichlorobenzène, ou thymol, dans la boîte, ou dans 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'utilisation du lindane est à proscrire, car le niveau de toxicité est très élevé.*
- *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).*

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 en 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 lactophénolé	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 kératinés (ongles, poils, cheveux)		
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 à 95° + 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 BC. 		

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 lactophénolé.

Pour éclaircir des sujets fortement lignifiés et colorés, nous utilisons du chloral lactophénolé 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 RCA.
- **Le ramollisseur GDS de Cléménçon** : il permet d'utiliser, après rinçage, du RC 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 RCA ; 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'introduire 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 2 à 12 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.
- Éponger 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 très imprudent d'utiliser plusieurs fois le même liquide de ramollissage pour des espèces différentes, car la pollution du milieu utilisé est réelle (spores, débris d'hyphes et impuretés).

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

A propos du marquage des objectifs Leitz ou Zeiss, qui posent souvent des problèmes d'interprétation

Compilation réalisée par Frédéric (Bret) Dubois, membre du forum Mikroskopia

Voici une liste non exhaustive d'abréviations utilisées (elles peuvent être étendues à nombre d'autres marques célèbres). Objectifs pour tubes de 160, 170 mm ou à l'infini.

A : Apertur – Ouverture numérique.

Apo : Apochromat – Apochromatique.

DIC : Differential Interferential Contrast, ou contraste interférentiel de Nomarski.

FL : fluotar pour fluorescence en général avec un plus grand NA et meilleure luminosité.

FI : Fluoritsystem – Lentille en **fluorite**, objectif semi-apochromatique.

Glyz. Ou **Glyc** : Glycerinimmersion – Objectif à immersion dans la glycérine.

Fu : Fluoreszenz – Objectif pour la lumière UV, lentille en quartz en général.

H : Heiztischobjektiv – Objectif pour utilisation avec une platine chauffante.

HD : Hellfeld-Dunkelfeld – Objectif pour fond clair ou fond noir. En réflexion (épiscopie).

HI = Homogeneous Immersion, c'est à dire immersion à l'huile dans pratiquement tous les cas.

ICR : interferential contrast reflexion.

ICT : interferential contrast transmission.

IK : interferenzial Kontrast ou DIK.

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.

NPL : Neo plan, ou semi plan. Plan sur 22,4 mm de champ.

NPL : plan sur un champ de 20 mm.

Oel ou **Öl** ou anneau noir : Objectif à immersion dans l'huile.

PL : plan (aberrations de planéité corrigées).

PL : Planobjektiv - Objectif plan, champ de 28 mm maximum (Avec oculaire adapté : GW tubes de diamètre 30mm).

P ou **Pol** : Polarisation – Objectif pour polarisation, sans contrainte mécanique sur les lentilles.

(P) : Polarisation – Objectif pouvant être utilisé pour la polarisation dans certaines limites.

Phaco : Phasen Kontrast – Pour contraste de phase selon Zernicke.

PHAKO : Phase nKontrast.



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

Pv : Phasen Kontrast – Pour contraste de phase selon Heine.

Q : Quarzglas -- Objectif pour la lumière UV (fluorescence), lentilles en quartz.

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.

A cela on peut ajouter les indications classiques :

Longueur du tube : **160 mm**, **170 mm**, **215 mm**, **infini**.

Epaisseur 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

A propos du nettoyage des LPO et LCO usagées

Suite à la lecture d'un excellent article paru dans le bulletin de la S.M.N.F. (Société Mycologique du Nord de La France) et signé Alain Bondu⁹³ (2010), nous avons pris contact avec l'auteur, qui traitait de la rénovation des lames microscopiques usagées à l'aide d'un nettoyeur à ultra-sons, initialement destiné à l'entretien des bijoux, lunettes et autres pièces de monnaie.

Cela nous a paru tellement intéressant que nous avons décidé finalement, face à son enthousiasme communicatif, de faire l'acquisition de cet appareil afin de tester son efficacité.

Cet achat était vraiment très tentant car, si nous consommons sans compter une quantité faramineuse de lames suite à une pratique journalière assidue, nous repoussons toujours le plus loin possible le moment du nettoyage, tâche fastidieuse et inintéressante, s'il en est.



En respectant le modus operandi mis au point par notre confrère, les premiers essais se sont avérés très concluants, à savoir :

+ Une solution de stockage, qui héberge les lames sales : eau (40 %), méthanol (30 %), HCl (30 %), détergent vaisselle (2 cc).

+ 1^{er} lavage dans le nettoyeur : eau chaude (50 à 60°C.) + 5 gouttes de liquide vaisselle, durant 5 minutes.

+ Rinçage prudent sous un filet d'eau.

+ Rinçage à l'eau dans la machine : l'eau doit rester limpide ...sinon recommencer !

+ Dernier rinçage avec eau distillée (50 %) et méthanol (50 %) ; ce liquide de rinçage peut être récupéré et utilisé 5 à 6 fois dans le futur.

+ Sécher entre des feuilles de papier absorbant (« essuie-tout »).

L'auteur ne mentionne pas comment il stocke les LPO et les LCO propres par la suite. Personnellement, et jusqu'à preuve du contraire, nous continuons à stocker lames et lamelles dans du méthanol pur, afin d'éviter toute contamination par la poussière ou des traces grassieuses.

Lors du récent séminaire de microscopie à Massembré (mars 2012), un autre collègue français, Michel Javayon⁹⁴, nous a présenté la synthèse actuelle de leurs recherches communes et annonce un nouveau MO encore plus efficace apparemment que celui décrit dans la première publication.

Par respect pour leur travail, qui n'est pas encore publié, nous n'en dirons pas plus ici et nous attendons avec impatience que ce nouveau MO soit mis à disposition des lecteurs, car cela risque d'en séduire plus d'un.

Si vous êtes impatient, vous pouvez les contacter directement (voir adresses ci-dessous).

⁹³ Alain Bondu, 178, rue du Général de Gaulle – F-59139 Wattignies – alain.bondu@numericable.fr

⁹⁴ Michel Javayon, 4, rue des Closeaux – F-91790 Boissu-Sous-Saint-Yon – michjava@gmail.com

J'aurais voulu vous en parler aussi ...

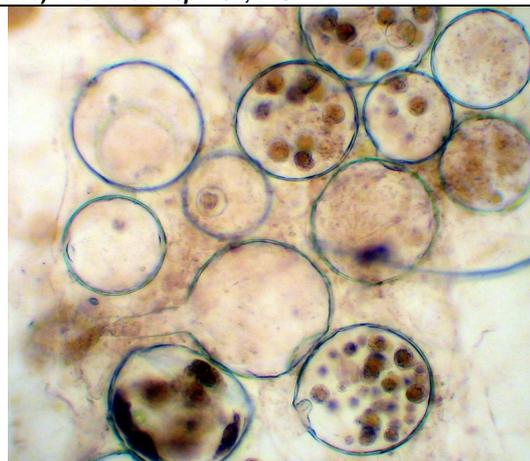


Photo Marcel Lecomte - 28/02/2009 - 16:14:25

Un Infusoire cilié (Eucaryote unicellulaire) : *Peritricha* sp. 40x, DIC



Ovaires de la petite douve du foie (ver parasite de la classe des Trématodes) : *Dicrocoelium dendriticum* 40x



Saprolegnia sp., champignon parasite, dans un élevage de carpes Koi



Téleutospores de *Puccinia artemisiae*, la rouille d'*Artemisia vulgaris* (armoïse commune, de la famille des Composées)

Inventaire de ma BIBLIOTHÈQUE personnelle

- ANOFEL**, 1998 - *Parasitologie Mycologie*, France, Format Utile, 480 p.
- AUDERSET G.**, 1987 - *Biologie végétale*, Genève, Florimontaines, 268 p.
- AYEL A. & MOINARD A.**, 2007 - *Microscope. Constitution, fonctionnement, emploi en mycologie*, Bull. spécial n°3a, S. M. du Poitou, 125 p.
- BAAR D.**, 1996 - *Observation microscopique des Macromycètes*, 43 p.
- BAILLENGER J.**, 1973 - *Coprologie parasitaire et fonctionnelle*, Bordeaux, Drouillard, 373 p.
- BAILLENGER J.**, 1952 - *Atlas de travaux pratiques de parasitologie humaine*, Bordeaux, 75 p.
- BASSO M.T.**, 1999 - *Manuale di Microscopia dei Funghi*, Mykoflora, 302 p.
- BATAILLE F.**, 1948 - *Les réactions macrochimiques chez les champignons*, supplément au tome LXIII de la Soc. Myc. De France, 172 p. (seconde édition en 1969)
- BETTON G.**, 1969 - *Photographie au microscope*, Paris, De Francia, 174 p.
- BEUGNIES A.**, 1969 - *Microscopie des milieux cristallins*, Paris, Dunod, 190 p.
- BONDU A.**, 2010 - *Le nettoyage des lames et lamelles de microscopie*, Bull. Soc. Mycol. Nord France, 88 - 2, 60 : 63.
- BOTTON B. & AL.**, 1990 - *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, Paris, Masson, 512 p.
- BRACEGIRDLE B. & MILES P.H.**, 1978 - *An atlas of plants structure*, (2 volumes), Londres, 253 p.
- BRUMPT E.**, 1936 - *Précis de parasitologie* (2 volumes), Paris, Masson, 2.138 p.
- BRUMPT E & NEVEU-LEMAIRE M.**, 1951 - *Travaux pratiques de parasitologie*, Paris, Masson, 317 p.
- BULLIARD & CHAMPY CH.**, 1947 - *Abrégé d'histologie*, Paris, Masson, 366 p.
- CARNOY J.B.**, 1880 - *Manuel de microscopie*, Louvain, 218 p.
- CAHAGNIER B. & AL.**, 1998 - *Moisissures des aliments peu hydratés*, Paris, Tec Doc, 225 p.
- CERCLE DE MYCOLOGIE DE BRUXELLES.**, 2004 - *La détermination des champignons par leurs caractères microscopiques*, D. Ghyselincq, Bruxelles, 72 p.
- CHABASSE D., GUIGUEN CL., & CONTET-AUDONNEAU N.**, 1999 - *Mycologie médicale*, Paris, Masson, 324 p.
- CHAMPY CH.**, 1947 & 1948 - *Précis d'histologie générale*, Paris, Baillièrre, 406 p.
- CHARBONNEL J.**, 1995 - *Les réactifs mycologiques. Tome 1 : Les réactifs macrochimiques*, édité à compte d'auteur, 344 p.
- CHARBONNEL J.**, 2004 - *Les réactifs mycologiques. Tome 2 : Les réactifs microchimiques, aide pratique à l'étude microscopique des champignons*, David-Rogeat, 289 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2004 - *Citology and Plectology of the Hymenomycetes*, Berlin, Cramer, 488 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2009 - *Methods for working with Macrofungi*, IHW Verlag, 88 p.
- COLLIN A. & DEMANY J.M.**, 2002 - *Préparation aux oraux des concours de biologie cellulaire : colles biocell*, Ellipses, 286 p.
- COUDERD J.**, 1955 - *Guide pratique de mycologie médicale*, Paris, Masson, 364 p.
- COUJARD & COUJARD**, 1941 - *Atlas de travaux pratiques d'histologie animale*, Paris, Vigot, 118 p.
- COUPIN H.**, 1964 - *Ce qu'on peut voir avec un petit microscope*, France, Photo Revue, 134 p.
- DAUFRESNE A.**, 1900 - *Guide pratique de microscopie agricole*, Paris, 604 p.
- DAVET P. & ROUXEL F.**, 1997 - *Détection et isolement des champignons du sol*, France, INRA, 203 p.
- DEFLANDRE G.**, 1947 - *Microscope pratique*, Paris, Lechevalier, 441 p.
- DE IZARRA Z.**, 2007 - *Introduction à l'étude microscopique des champignons*, Bulletin spécial n°5 de la Société mycologique du Poitou, 81 p.
- DELARUE J., GAUTHIER-VILLARS P., BUSSE F & GOUYGOU CH.**, 1957 - *Microscopie : pratique d'anatomo-pathologie*, Masson, 337 p.
- DELBURG M.**, 1977 - *Microscopie : initiation et leçons*, France, Photo Revue, 128 p.
- DOORLY E.**, 1944 - *Un homme et les microbes (vie de Pasteur)*, Londres, 96 p.
- DOP & GAUTIE**, 1930 - *Manuel de technique botanique, histologique et microscopique*, Paris, Lamarre, 594 p.
- EHRMANN E.**, 1922 - *Traité des matières organiques colorantes et de leurs diverses applications*, Dunod
- GANTER & JOLLES**, 1969 & 1970 - *Histochimie normale et pathologique*, (2 volumes), Paris, Gauthier Villars, 2.013 p.
- GIROD P.**, 1895 - *Manipulations de botanique*, Paris, Baillièrre, 170 p.
- GUILLERMOND A.**, 1912 - *Les levures*, Paris, Doins, 565 p.
- GUILLERMOND A.**, 1928 - *Clé dichotomique pour la détermination des levures*, Paris, Lefrançois, 121 p.
- JAHIER J.**, 1992 - *Techniques de cytologie végétale*, Paris, INRA, 183 p.
- JOLY P.**, 1964 - *Le genre Alternaria*, Paris, Lechevalier, 250 p.
- KAYSER E.**, 1905 - *Les levures, caractères morphologiques et physiologiques*, Paris, Masson, 212 p.
- LANGERON M.**, 1942 - *Précis de microscopie*, Paris, Masson, 1.340 p.

- LAROCHE G. ET LAROCHE C., 1949 - *Examens de laboratoire du médecin praticien*, 5^{ème} édition, Masson
- LARPENT-GOURGAUD, 1985 - *Manuel pratique de microbiologie*, Paris, Hermann, 230 p.
- LEITZ E., sans date - *Optique du microscope : objectifs, oculaires, condenseurs*, Allemagne, Leitz Wetzlar, 119 p.
- LOCQUIN M. ET LANGERON M., 1978 - *Manuel de microscopie*, Paris, Masson, 352 p.
- LOCQUIN, M., 1984 - *Mycologie générale et structurale*, Masson, 549 p.
- MAGA Y.A., 2003 - *150 exercices d'histologie*, France, Pradel, 78 p.
- MARSAN C., 2006 - *Précis de techniques cytologiques*, France, Bioformation, 117 p.
- MARTOJA & MARTOJA, 1967 - *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Paris, Masson, 345 p.
- MEYBECK J., 1963 - *Les colorants*, 3^{ème} édition, Presses Universitaires de France
- MONTEL P., 1974 - *Toute la photographie*, Paris, Larousse, 365 p.
- MOREAU CL., 1968 - *Moisissures toxiques dans l'alimentation*, Paris, Lechevalier, 371 p.
- NAUMOV N.A., 1939 - *Clé des Mucorinées*, Paris, Lechevalier, 173 p.
- PASTAC I.A., 1942 - *Les matières colorantes chez les champignons*, Paris, Muséum, 88 p.
- PÉRÉ J.P., 1994 - *La microscopie, techniques d'étude en biologie*, Paris, Nathan, 128 p.
- PERELLI V., 1964 - *Macrophotographie et microphotographie*, Milan, P. Fotografico, 531 p.
- PICAUD J.L., BAEHR J.C., MAISSIAT J., 2004 - *Biologie animale, Vertébrés*, Dunod, 298 p.
- PICAUD J.L., BAEHR J.C., MAISSIAT J., 2005 - *Biologie animale, Invertébrés*, Dunod, 2^{ème} éd., 239 p.
- POIRIER & RIBADEAU, 1979 - *Atlas d'histologie (travaux pratiques)*, Paris, Masson, 128 p.
- POLICARD A., 1934 - *Précis d'histologie physiologique*, Paris, Doin, 895 p.
- RAWN J. D., 1990 - *Traité de biochimie*, De Boek
- RICHARDS O.W., 1942 - *The effective use and proper care of microtome*, Nex-York, 84 p.
- ROLLAND M., 1937 - *La féerie du microscope*, Mercure de France, 266 p.
- SARTORY A., sans date, circa 1930 - *Guide pratique des manipulations de mycologie parasitaire, à l'usage des pharmaciens*, Paris, Le François, 341 p.
- SÉGUY E., 1923 - *Les moustiques de France*, Paris, Lechevalier, 225 p.
- SÉGUY E., 1924 - *Les insectes parasites de l'homme et des animaux domestiques*, Paris, Lechevalier, 422 p.
- SÉGUY E., 1949 & 1951 - *Le microscope. Emploi et applications* (2 tomes), Paris, Lechevalier, 1.200 p.
- SÉGUY E., 1954 - *Initiation à la microscopie*, Paris, Masson, 251 p.
- SÉGUY E., 1954 - *Initiation à la microscopie*, Paris, Boubée, 253 p.
- SÉGUY E., 1979 - *Initiation à la microscopie*, Paris, Boubée, 4^{ème} éd., 253 p.
- SENEVET G, 1937 - *Ixodoidés*, Paris, Lechevalier, 101 p.
- STREET H.E., 1977 - *Plant tissue and cell culture*, London, Blackwell, 614 p.
- TERRIEN J., 1968 - *Le microscope*, Presses Univ. De France, 126 p.
- TROUSSERT E., 1885 - *Les microbes, les ferments et les moisissures*, Paris, Imprimeries Réunies, 282 p.
- ULRICH R., 1943 - *Les constituants de la membrane chez les champignons*, Paris, Muséum, 44 p.
- VOLLHARDT K. P. C. ET SCHORE N. E., 1995 - *Traité de chimie organique*, 2^{ème} édition, De Boek
- WASTIAUX G., 1994 - *La microscopie optique moderne*, France, Paris, 269 p.
- WASTIAUX G., 2000 - *Initiation au microscope. Bases pratiques et utilisation*, France, Burillier, 51 p.
- WASTIAUX G., 2006 - *Précis de microscopie*, France, Bioformation, 67 p.

« Celui qui aime apprendre est bien près de savoir » !

Association des Mycologues Francophones de Belgique

(A.M.F.B. asbl)

Créée le 16 mai 2007

Siège social : Allée des Ecureuils, 6, à 6280 - LOVERVAL
Arrondissement judiciaire de Charleroi
Numéro d'entreprise : 892.031.004

<http://www.amfb.eu>

Le site est géré par Emile VANDECASTEELE

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

Françoise DRAYE

Jean-Pierre LEGROS

Camille MERTENS

Joseph PELLICANI

Jean-Marie PIRLOT

Claude QUINTIN

David VALLEE

Nous publions un bulletin annuel de 72 pages en format A4.
Pour tout renseignement consulter Alfred Loss par mail, ou notre site.

Éditeur responsable : A.M.F.B. (Association des Mycologues Francophones de Belgique)
Rédacteur en chef : Marcel Lecomte
Publié le 01 mars 2012

Lers articles signés engagent uniquement la responsabilité de leurs auteurs.