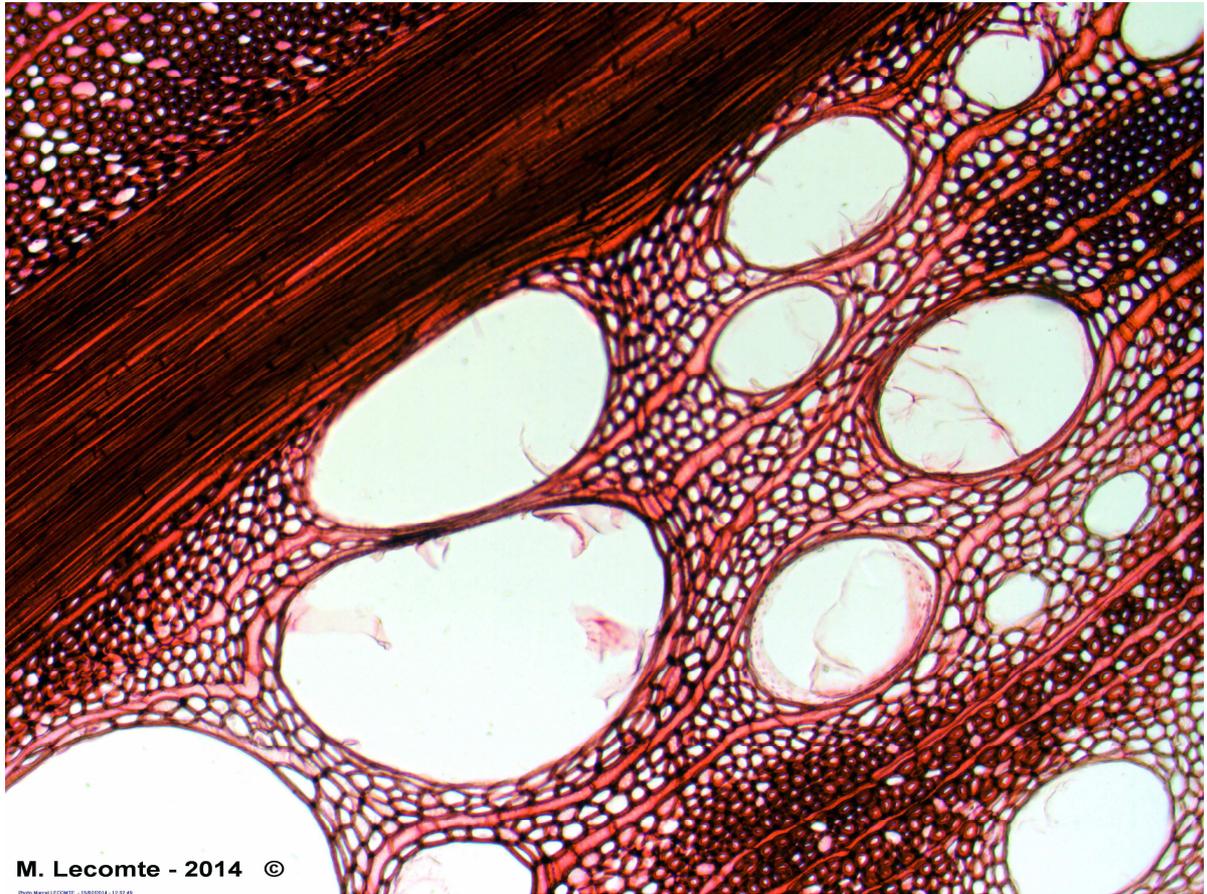


SÉMINAIRE de MICROSCOPIE 2014

Organisé par l'Association des Mycologues Francophones de Belgique



M. Lecomte - 2014 ©

Photo: Maxell/LECOMTE - 15/03/2014 - 12:32:43

Coupe dans une branche de chêne (*Quercus sessile*)

Photos de la page de couverture :



Cellules de l'épiderme d'un oignon, avec noyaux colorés - x10.



Coupe transversale dans un cône naissant de pin (*Pinus sylvestris*) - x10.



Puce du hérisson (*Archaopsylla erinacei*) - x2,5.

MANUEL DE MICROSCOPIE GENERALE

Tome II

Marcel Lecomte

Avec la collaboration de
G. Auderset, D. Biarrat, D. Crabbé, T. Hatt,
P. Leroy, O. Levoux

« Je suis toujours dévoré par la passion d'apprendre. »
(E. Delacroix)

Nous adressons nos 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.

Dominique Biarrat, Daniel Crabbé, Thierry Hatt, Olivier Levoux, Paul Leroy,
Qui ont accepté de partager leurs connaissances, chacun dans leur do-
maine de prédilection,

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

Guy Auderset, Dominique Biarrat, Jean-Claude Claes, Daniel Crabbé,
Christian Grassin, Antonio Guillén, Thierry Hatt, Paul Leroy, Olivier Levoux,
François Quinquet, Yann Sellier, Guido Verbrugghe, Christian Verpoorte,
Guido Verbrugghe,
pour les photos aimablement mises à notre disposition.

Guy Auderset, Didier Baar (†), Michel Blaise, Régis Courtecuisse, Jean-
Pierre Gaveriaux, Alain Henriot, Klaus Herrmann, Jean Lachapelle (†),
Claude Lejeune (†), Paul Leroy, Albert Marchal, Pierre-Arthur Moreau,
Serge Roelandts, Arthur Vanderweyen,
qui ont contribué à nos progrès en microscopie.

Le réseau Internet, et tous les auteurs (Pierre Cabrol, Entomart, Eynar,
François Graf, Joris M. Koene, Jean-Jacques Milan, Julien Pellet, Heinrich
Schulenburg, Rainer Zenz) qui ont accepté de partager gracieusement leur
expérience, leurs idées, leurs images, leurs croquis et leurs publications.

Préface

Insigne honneur que me fait Marcel de vous adresser cette préface. Préface précédant un second volume qui élargit notablement le champ de nos investigations générales. Un troisième est déjà rédigé, et traite des champignons, car la Mycologie mène à tout, à condition ... de persévérer ! A propos de Mycologie, et Marcel nous en a averti, ce n'est plus tout à fait ce que cela était : les bons vieux mildious ne sont plus des champignons, mais plutôt des algues ; d'autres sont devenus protozoaires et tout à l'avenant : les « moléculaires » sont passés par là (ont-ils jamais regardé dans un microscope ?) et comme dit Brassens «ils se mirent à frapper les cieux d'alignement et chasser les dieux du firmament. ». Saint ADN de l'Eglise de Phylogénie !

Heureusement, les Ascomycètes et Basidiomycètes ne bougent pas trop encore ... pour le moment !

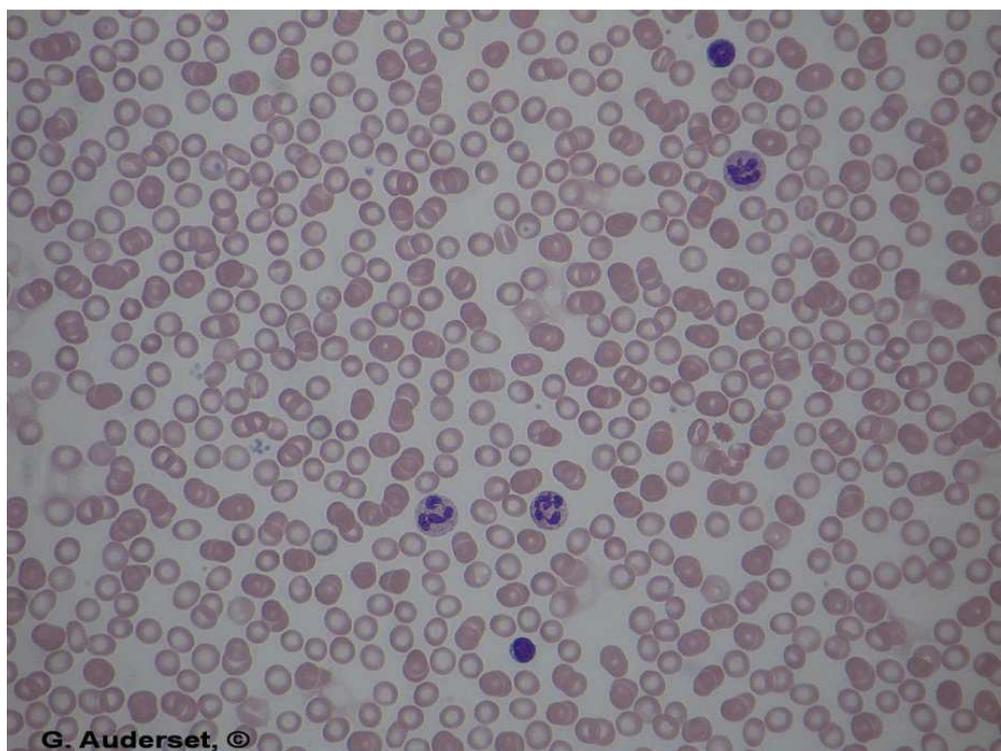
Dans ce second volume, Marcel nous indique un certain nombre de chemins vers la connaissance et surtout, nous donne les moyens de les suivre. De l'hématologie à l'histologie animale ou végétale, des structures cellulaires aux arcanes de l'entomologie, de la photographie à la polarisation, il me paraît certain que, statistiquement parlant, l'une ou l'autre de ces voies rencontrera l'intérêt de la majorité des participants.

Prenez, par exemple, un peu d'eau de mare et examinez-la au microscope : vous y passerez des heures et pourrez observer des manifestations de la vie autrement plus séduisantes que celle de l'Homo réputé sapiens !

Merci Marcel pour le temps que tu passes à toutes tes recherches et manipulations. Merci de nous faire partager tout cela. En pensant à ton travail, je ne peux m'empêcher d'évoquer Denis Diderot dont la capacité de travail et surtout la ténacité lui permit d'arriver, envers et contre tout, au terme de l'Encyclopédie.

A Massemble, donc, et à bientôt !

Guy Auderset
Docteur ès Sciences biologiques



▲ Frottis de sang humain, avec globules rouges et blancs - coloration au giemsa.

Introduction

Au début du mois de mars 2012, me retrouvant en face de 54 passionnés de microscopie, j'ai eu le bref sentiment d'avoir accompli du bon travail, un peu comme un artisan, fier de son ouvrage ... voire même, présomptueusement certes, comme un artiste contemplant une œuvre unique. Avant cela, j'avais consacré des centaines d'heures à rédiger un fascicule de 195 pages, qui fut accueilli avec beaucoup d'intérêt et nombre d'éloges par les participants. J'avais pris la décision d'en rester là, et de m'octroyer un repos bien mérité, ce qui fut clairement annoncé en début de session, considérant que j'avais atteint mes limites de connaissances et d'engagement, surtout physiques.

Et puis, il y eut cette fin de congrès fatidique, où je me suis entendu dire, par nombre de personnes, qu'on ne pouvait en rester là et qu'une telle organisation demandait au moins une suite. Mon ami Claude Quentin s'est alors proposé d'assumer la totalité des tâches administratives : logistique, intendance, gestion des réservations, ainsi que d'autres « détails » fastidieux et très chronophages. Je n'aurais plus, en principe, qu'à m'occuper de l'enseignement. Après avoir consulté mon équipe de fidèles, sans qui rien n'avait été et ne serait possible, et sans doute me trouvant dans un état second ou euphorique, j'ai laissé échapper un accord téméraire pour une dernière session en 2014.

Rentré chez moi, et revenu à la réalité, j'ai réalisé l'ampleur de cet engagement quelque peu fou... Mais trop tard pour faire marche arrière ! Et puis, voilà un nouveau défi à relever ! Quoi de plus excitant : j'adore ... J'ai commencé à élaborer la table des matières qui se trouve à la page suivante, et au fil du temps, je me suis rendu compte de la masse des lacunes dans ce qui était devenu « 2012, tome 1 ».

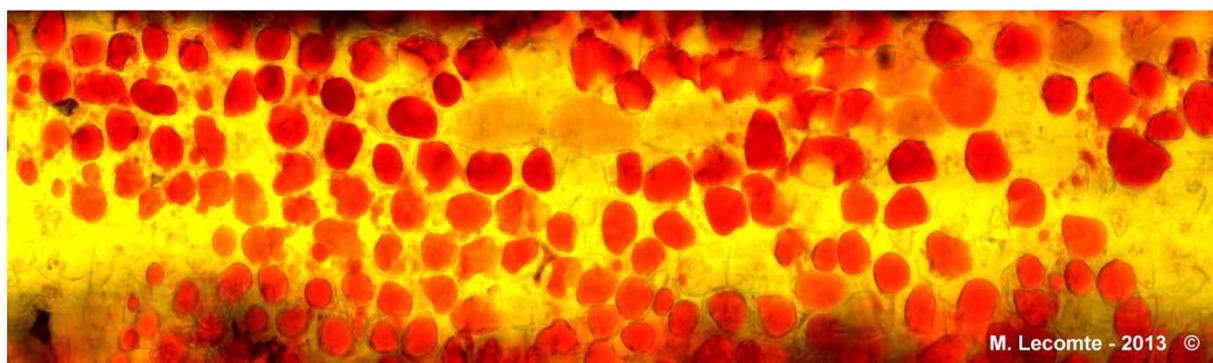
Et voilà ! Deux années passées à consulter et fouiller toute la littérature et les notes personnelles dont je dispose, à revoir pas à pas toutes les techniques anciennes ou récentes que je maîtrise avec un certain succès, à leur apporter les améliorations rendues possibles par les produits et matériaux modernes, à les actualiser et composer des modes opératoires illustrés, parfois à les simplifier afin de les rendre plus accessibles à des amateurs, ne disposant pas d'un laboratoire spécialisé, et encore moins de subsides plantureux. Et puis de nouvelles pistes à explorer, des milliers de préparations à réaliser, générant des centaines de photos à trier ... et puis la mise en page de tout cela pour arriver à « 2014, tome III », que vous êtes en train de consulter.

Avec surtout et prioritairement en arrière-pensée, la volonté de transmettre un bagage de connaissances, des tours de main, et contribuer à la formation de jeunes successeurs.

J'ai à nouveau une pensée émue et reconnaissante pour mes parents qui, malgré le manque de moyens et à force de privations, m'ont offert un microscope monoculaire dans ma prime adolescence, répondant à mon besoin de « voir ce que les autres ne voyaient pas », et grâce auquel le mot « ennui » n'a jamais fait partie de ma vie ; cela m'a permis, chaque fois que c'était nécessaire, d'oublier les vicissitudes et les déceptions du quotidien.

Mais surtout, mes remerciements les plus vifs et les plus chaleureux vont à Marité, mon épouse, qui a toujours encouragé ma passion dévorante pour la microscopie et l'étude de la nature, et accepté avec le sourire tout ce que cela impliquait : mes interminables soirées et mes veilles nocturnes avec un ordinateur posé sur les genoux, à rédiger encore et encore ... les milliers d'heures passées dans mon petit laboratoire, penché sur un microscope ou une loupe stéréoscopique ... les odeurs chimiques ou autres qui envahissaient souvent la maison, au fil de mes errements et expérimentations ... les dépenses parfois inconsidérées, même si elles me paraissaient justifiées, dans ma logique passionnée. Sans elle et son ouverture d'esprit, rien de ces 450 pages de littérature, fruit et synthèse de 55 ans de passion, n'aurait existé.

Cognelée, le 15 mars 2014



▲ Chromoplastes de fleur de capucine (*Tropaeolum majus*).

Table des matières

1. PRÉFACE
2. INTRODUCTION
3. TABLE DES MATIÈRES
5. ABRÉVIATIONS UTILISÉES
- 6. CHAPITRE 01 : MICROSCOPIE GÉNÉRALE**
7. MICROSCOPIE GÉNÉRALE : RAPPEL DE NOTIONS IMPORTANTES
8. LE LAVAGE DES PRÉPARATIONS
9. LES OBSERVATIONS PAR CONTRASTE
10. LES SOLUTIONS TAMPONS
11. MONTAGE DE PIÈCES POUR UNE CONSERVATION DE LONGUE DURÉE : PRÉPARATIONS SEMI-DÉFINITIVES
12. LES PRÉPARATIONS DÉFINITIVES ; DES MILIEUX DÉFINITIFS À SOLVANT AQUEUX ; DES MILIEUX DÉFINITIFS À SOLVANT BENZÉNIQUE OU CÉTONIQUE
13. LA TERMINOLOGIE EXACTE DES COUPES : UN SYSTÈME DE RÉFÉRENCE À RESPECTER
14. LE NETTOYAGE DES LPO ET DES LCO
15. DEUX TECHNIQUES SIMPLES POUR RÉALISER DES COUPES SUR DES OBJETS PLATS
16. ACTUALISATION DE LA TECHNIQUE COMPLÈTE DES COUPES À LA PARAFFINE : FIXATION ET DÉSHYDRATATION
- 17 : IMPRÉGNATION ET INCLUSION
18. UN CAS PARTICULIER : LES TRÈS PETITS PRÉLÈVEMENTS OU LES PIÈCES TRÈS FRAGILES - LA COUPE
22. LES ACCESSOIRES DU MICROTOME EN QUELQUES IMAGES
24. UNE MÉTHODE RAPIDE D'INCLUSION DANS LA PARAFFINE
25. MICROSCOPIE NUMÉRIQUE, NOUVELLES PERSPECTIVES
30. COMMENT INTÉGRER UNE ÉCHELLE GRAPHIQUE ?
33. LES ACCIDENTS DE MANIPULATION EN MICROSCOPIE
- 37. CHAPITRE 02 : BIOLOGIE GÉNÉRALE**
38. LA CELLULE, ÉLÉMENT DE BASE D'UN TISSU VÉGÉTAL OU ANIMAL
40. OBSERVATION DES HÉPATOCYTES (CELLULES DU FOIE)
42. CHROMATINE ET COLORANTS - LE TEST DE BRACHET
44. EXTRACTION DE L'ADN CHEZ L'OIGNON
46. LES NEURONES DU CORTEX
47. PROTOCOLE DE LA COLORATION DE GOLGI
49. LES FROTTIS PHYSIOLOGIQUES : SANG HUMAIN - SANG DE POISSON OU DE GRENOUILLE
51. CHEVEUX ET POILS
52. ÉTUDE RÉALISÉE SUR LES POILS DU LAPIN ANGORA
53. LES PLUMES
55. LES ECAILLES DE POISSONS ET LES CHROMATOPHORES
57. RADULAS ET DARD D'AMOUR CHEZ LES GASTEROPODES
59. LES ANGUILLULES DU VINAIGRE
61. LE TRICHROME DE MASSON
63. LA COLORATION NUCLEAIRE DE FEULGEN
- 64. CHAPITRE 03 : BOTANIQUE**
65. MICROSCOPIE GÉNÉRALE DES VÉGÉTAUX
68. CONSIDÉRATIONS À PROPOS DU NOYAU
69. LE CONTENU DES CELLULES VÉGÉTALES
70. LE PHÉNOMÈNE DE PLASMOLYSE
71. COUPE TRANSVERSALE DANS UNE TIGE DE MONOCOTYLEDONE
74. COUPE TRANSVERSALE DANS UNE TIGE DE DICOTYLEDONE
76. COUPE TRANSVERSALE DANS LA RACINE DE MONO- ET DICOTYLEDONES
77. LES TISSUS CONDUCTEURS (VAISSEAUX LIGNEUX)
78. LES INCLUSIONS DANS LA CELLULE VÉGÉTALE : LES CHLOROPLASTES DES FEUILLES
79. LES AMYLOPLASTES
81. LES CHROMOPLASTES
82. DES CRISTAUX DANS LES CELLULES VÉGÉTALES (DRUSES, MACLES, RAPHIDES, SCLÉRITES, CISTOLITHES)
85. OXALATE DE CALCIUM DANS LES FEUILLES DE LA PLANTE ZZ
86. CELLULES PIERREUSES DANS LA CHAIR D'UNE POIRE
88. CISTOLITHES CHEZ *FICUS ELASTICA*
89. LES STOMATES
91. LES POILS DES FEUILLES ET DES FRUITS
97. DES GRAINES PARTICULIÈRES CHEZ LES ORCHIDÉES
98. DES TISSUS EXCRETEURS : LATICIFÈRES

- 99. POCHE D'EXCRETION - DES BACTERIES QUI FIXENT L'AZOTE
- 101. LES GRAINS DE POLLEN
- 104. LE TEST D'ALEXANDER
- 105. LA MITOSE

109. CHAPITRE 04 : TOUT CE QUI VIT DANS L'EAU

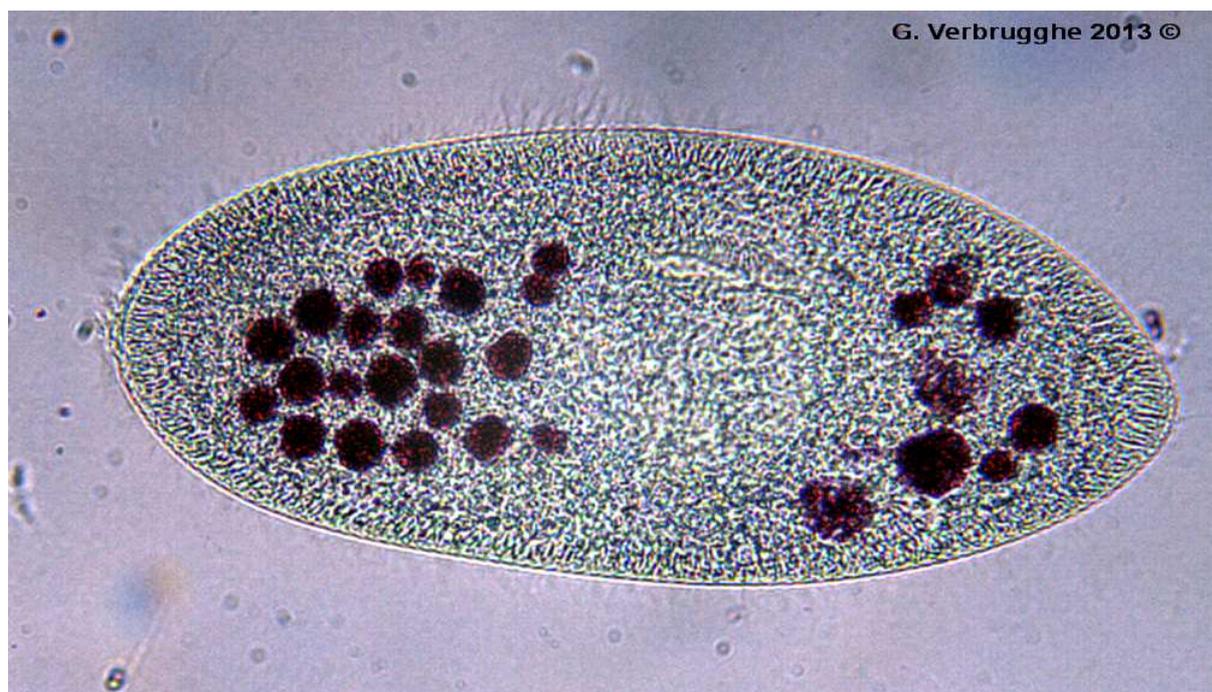
- 110. INTRODUCTION
- 111. GENERALITES
- 115. LES PROTOZOAIRES
- 117. LES PARAMECIES
- 119. LES METAZOAIRES
- 126. LE PLANCTON MARIN
- 128. LES ALGUES UNICELLULAIRES
- 130. LES ALGUES FILAMENTEUSES
- 131. LES ALGUES MULTICELLULAIRES
- 132. LA CONJUGAISON CHEZ LES SPIROGYRES

133. CHAPITRE 05 : ENTOMOLOGIE

- 134. ÉLÉMENTS ANATOMIQUES D'UN INSECTE COMPLET : PATTES, AILES, ANTENNES
- 137. ÉCAILLES D'UNE AILE DE PAPILLON
- 139. CHENILLE DEFOLIANTE
- 140. LE CHARANÇON DE LA ROSE TREMIERE
- 141. L'ARAIGNEE ROUGE (LES ACARIENS)
- 142. UN ACARIEN PHORETIQUE : *PARASITICUS FUCORUM*
- 143. LA LARVE DU MOUSTIQUE
- 145. CHROMOSOMES ET GLANDES SALIVAIRES
- 147. PROTOCOLE POUR LE MONTAGE AU BAUME DU CANADA
- 154. LES GENITALIA CHEZ LES PAPILLONS
- 158. MA TECHNIQUE SIMPLIFIEE

160. CHAPITRE 06 : DIVERS

- 161. FALSIFICATION DE SUBSTANCES ALIMENTAIRES : LE POIVRE MOULU
- 162. LES FIBRES TEXTILES NATURELLES OU ARTIFICIELLES, ET LE PAPIER
- 164. CRISTAUX ET POLARISATION
- 167. MA BIBLIOTHEQUE PERSONNELLE



▲ Paramécie ayant absorbé des grains de rouge carmin.

Abréviations utilisées & conventions

AFA = alcool formolé acétique
 APN = appareil photo numérique compact (à objectif non amovible)
 BC = baume du Canada
 BCL = bleu coton lactophénolé (= bleu de méthyle au lactophénol)
 BDC = bleu de crésyl
 BP = boîte de Pétri
 BRN = boîtier réflex numérique
 CLP = chloral lactophénolé ou chloral-lactophénol
 CP = contraste de phase
 CVM = carmino-vert de Mirande
 DC = double coloration
 DIC = contraste interférentiel de Nomarski (Differential interference Contrast)
 GDS = glycérine + sodium Diméthyle Sulfoxyde
 Eau = lorsque nous la mentionnons, il s'agit toujours d'eau bidistillée
 Eau acétique : c'est un mélange d'eau bidistillée et d'acide acétique glacial (5 %)
 FAC= fuchsine acide, lactique
 GG = glycérine gélatinée
 IR = indice de réfraction
 LCO = lame couvre-objet
 Led = Light Emitting Diod
 LPO = lame porte-objet
 min. ou ' = minute
 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
 p. ex. = par exemple
 Phaco = contraste de phase
 PVA = alcool polyvinylique
 PVAL = alcool polyvinylique + acide lactique
 PVAL-BA = alcool polyvinylique lactique, coloré dans la masse au bleu d'aniline
 PVAL-BM = alcool polyvinylique lactique, coloré dans la masse au bleu de méthyle (bleu coton)
 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 au Sodium Dodécyl Sulfate
 SDS = sodium dodécyl sulfate, préconisé en mélange avec le rouge Congo aqueux par Cléménçon ; ce dernier est un mycologue et microscopiste suisse, qui constitue une référence incontournable en mycologie.
 sec. ou " = seconde
 µm = micron
 x10 ou 10x : nous écrivons indifféremment cette valeur, qui indique le grossissement d'un oculaire ou d'un objectif.
 30° : une température mentionnée est toujours exprimée en degrés Celsius.

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

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

MICROSCOPIE GÉNÉRALE

Objectifs recherchés

Rappel de notions importantes

Les observations par contraste

Les milieux d'observation et de montage

Les solutions tampon

L'inclusion dans la paraffine



Photo Marcel LECOMTE - 1/01/2002 - 1.02.53

M. Lecomte - 2013 ©

▲ Coupe transversale dans un ascaris (*Ascaris lumbricoides*), un ver Nématode, parasite de l'intestin du chien ▲
(mais aussi d'autres mammifères carnivores et de l'homme).

TRAVAUX PRATIQUES de microscopie générale

Nos objectifs pédagogiques :

- Élargir l'éventail personnel de prospection microscopique, et sortir des sentiers battus.
- Favoriser des techniques actualisées et des matériaux de montage modernes.
- Privilégier des milieux définitifs excluant l'utilisation du xylène et autres dérivés du benzène.
- Réaliser des préparations définitives chaque fois que c'est possible, afin de constituer une collection de lames de référence.
- Fournir à chaque participant un bagage de formateur potentiel.

Bref RAPPEL de notions importantes²

PRISE EN MAIN DU MICROSCOPE

- ++ Régler correctement l'écartement des oculaires.
- ++ Contrôle de dioptrie gauche et droite, avec correction éventuelle.
- ++ Vérifier la hauteur du condensateur.
- ++ Contrôle des diaphragmes de champ et d'ouverture (ce dernier est essentiel pour assurer le contraste de la préparation).

LES MILIEUX D'OBSERVATION EXTEMPORANÉE

Même si ce n'est pas le milieu idéal, la 1^{ère} observation doit être effectuée dans l'eau, car certains éléments disparaissent dans les autres liquides. Dans d'anciennes publications, il est possible de lire des auteurs qui préconisent des montages « à sec ». Sauf cas très particulier (observation de poudre en polarisation), nous déconseillons cela fortement, car un montage pareil présente un indice de réfraction très faible (n de l'air = 1).

Cela n'est possible qu'en utilisant des objectifs spéciaux, prévus pour ce cas particulier.

LES MILIEUX DE MONTAGE DÉFINITIFS

Malgré l'avènement de la photo digitale, qui constitue une solution de facilité à nos yeux, nous considérons que la constitution d'une collection de lames définitives représente un référentiel inégalable, et d'une richesse sans pareille qui, en outre, nous survivra longtemps.

Nos préférences :

- ++ **Des milieux à solvant aqueux**, pour la conservation d'éléments fragiles qui ne supportent pas la dessiccation (alcool, toluène et xylol) → Aquatex, PVALPh ou non, coloré dans la masse ou non, conservateur de Hoyer.
- ++ **Des milieux à solvant non aqueux**, pour des pièces supportant une déshydratation agressive → baume du Canada, Entellan, Néo Entellan, Euparal, Merckoglas, Histolaque, Zrax (nous ne mentionnons ici que ceux que nous utilisons).

LES COUPES : DU PLUS SIMPLE AU PLUS COMPLIQUÉ... LEUR MAÎTRISE EST IMPÉRATIVE.

- ++ Les coupes à main levée (elles doivent être réalisées sous la loupe binoculaire, afin de donner des résultats sérieux).
- ++ Utilisation préférentielle du microtome de Ranvier ; nous pensons que c'est un outil essentiel et incontournable pour la microscopie.
- ++ Le microtome automatique constitue un luxe coûteux et très chronophage ... Mais les résultats sont remarquables, voire exceptionnels, après assimilation et domestication de la technique.

LA COLORATION

Notre objectif est de sensibiliser une majorité de personnes à l'existence d'autres colorants que ceux qui sont utilisés de manière quasi conservatrice depuis des décennies, et d'ouvrir les esprits vers d'autres produits.

- ++ La double coloration s'avère très intéressante (végétaux, champignons).
- ++ Pour éviter la saturation de couleur, nous conseillons la dilution systématique (50/50) de tout colorant dans son solvant : eau, alcool à 50 %, ammoniaque ... voir nos fiches techniques à ce sujet³.

² Pour plus de détails, et d'illustrations, consulter le Manuel de microscopie, tome 1, 195 pages, en format A4, qui a été publié à l'occasion du séminaire de microscopie 2012 (auteur : Marcel Lecomte)

³ Voir <http://www.champignons-passion.be>

++ ATTENTION ! nombre de colorants ne sont pas compatibles avec les milieux de montage définitif, qui les font disparaître en quelques heures.

++ Un colorant acide (bleu de méthyle, éosine, fuchisine acide) colore le cytoplasme ou les parois cellulaires (rouge Congo).

++ Un colorant basique (bleu de méthylène, fuchisine basique) colore notamment les noyaux.

Quelques conseils de dernière minute !

FUCHSINE ACIDE

C'est un des colorants cytoplasmiques que nous apprécions le plus. Mais il est incompatible avec les bases fortes (potasse, soude, ammoniacque) car, à leur contact, il devient incolore. Un rinçage à l'eau ordinaire décolore rapidement les pièces colorées → laver à l'eau acétifiée (1 % d'acide acétique) ou au xylène phéniqué (xylol à 33 % de phénol). Nous l'utilisons en solution dans l'acide lactique, ou alors pour colorer le PVA et réaliser une coloration progressive définitive.

ROUGE CONGO

En même temps qu'un colorant, c'est un révélateur des milieux acides : en leur présence, il vire au bleu noir. Ne pas utiliser en présence d'acide lactique, chlorhydrique, acétique, sulfurique ... ou tout autre élément à pH inférieur à 7.

L'addition de 10 % de glycérine dans le colorant permet des observations prolongées... mais rend plus difficile le lavage de la préparation. Le RC glycérimé s'avère très intéressant pour l'observation des spores, qui se déplacent moins dans la préparation.

LE LAVAGE DES PRÉPARATIONS

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 d'arriver à un contraste maximum, et de pouvoir réaliser les meilleures prises de vues possibles, au départ d'un appareil photo numérique ou d'une caméra.

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.
- Déposer une goutte de colorant et laisser agir 1 à 5 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 virtement de couleur éventuels, ce qui arrive parfois avec l'eau de pluie, de source, de puits 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, et exige de travailler à faible grossissement.
- 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.

ASTUCES ET TECHNIQUES

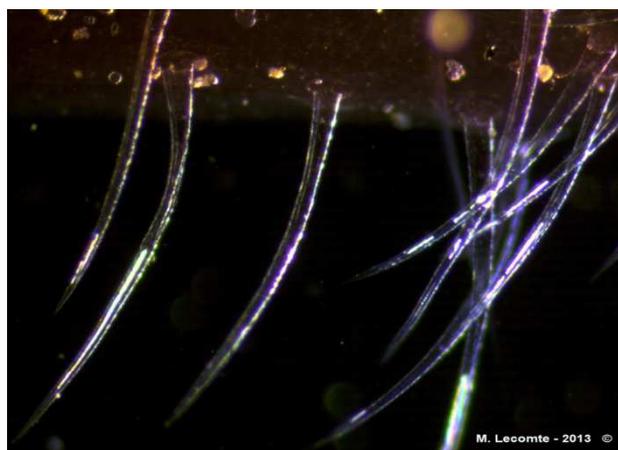
Améliorer la lisibilité de la préparation (c'est nécessaire quand on constate que la préparation est encombrée de spores qui roulent et qui se déplacent, alors qu'on s'intéresse aux basides et aux cystides).

- ++ 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 (très 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 p. ex.
- ++ 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.

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 énergétique à l'aide d'un objet non métallique et observation.

Les observations par contraste



◀ Les poils urticants de l'ortie, observés en fond noir.

Il s'agit de pouvoir observer des spécimens hyalins, dans un milieu non coloré, et malgré tout, de bénéficier du contraste nécessaire et suffisant.

Plusieurs possibilités s'offrent à nous :

- + **LE CONTRASTE DE PHASE** : nous sommes conscient que chacun ne dispose pas d'un microscope équipé d'un contraste de phase ou du DIC. Mais la « Flèche de Matthias » ou la « Pièce de Jalla » sont accessibles à chacun, car ils ne coûtent rien (voir le Manuel de Microscopie, tome 1, pp. 26 à 28).
- + **L'ÉCLAIRAGE EN FOND NOIR** : c'est un dispositif particulier qu'on rencontre sur des microscopes de bonne qualité et qui permet d'isoler le sujet sur un arrière-plan tout noir, par simple déviation des rayons éclairants.
- + **LES MILIEUX NATURELS DE CONTRASTE** : utiliser au choix la nigrosine, le noir chromogène ou le noir de chlorazol, par exemple,
 - sur les éléments fertiles d'une lame de Basidiomycète,
 - sur les éléments vivants d'une goutte d'eau.

Les solutions tampon

TAMPON PHOSPHATE SALIN

Le **tampon phosphate salin** (souvent abrégé **PBS**, de l'anglais *phosphate buffered saline*) est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium. La concentration de ces sels est très semblable à celle du corps humain (isotonicité). Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter.

Pour préparer 1 L de PBS :

Chlorure de sodium	NaCl	5 g
Chlorure de potassium	KCl	0,2 g
Phosphate disodique	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
Phosphate monopotassique	KH ₂ PO ₄	0,24 g

Pour certains usages, on ajoute à ce tampon un sel de calcium (CaCl₂) ou de magnésium (MgCl₂). La manière la plus simple de préparer ce tampon est d'utiliser des comprimés commercialisés, et prêts à l'emploi.

APPLICATIONS

Le tampon phosphate a de nombreuses applications de par son isotonicité et sa non-toxicité. Il peut être utilisé comme solvant, et comme solution de rinçage. Comme il structure l'eau autour des biomolécules (protéines, protéines enzymatiques, etc.) immobilisées sur des surfaces solides, le tampon phosphate peut aussi être utilisé comme diluant pour assurer le stockage de celles-ci. Ces couches minces d'eau permettent d'empêcher la dénaturation des biomolécules, ou des changements de conformation. Il est possible d'utiliser un tampon carbonate pour assurer la même fonction, mais celui-ci est moins efficace. Le tampon phosphate peut également servir de spectre de référence en ellipsométrie⁴ lors de la mesure de l'adsorption d'une protéine, dans le cas où les protéines sont par la suite mesurées diluées dans cette même solution de PBS.

Des additifs permettent d'étendre son champ d'application. Ainsi, un mélange d'EDTA⁵ et de PBS permet de détacher des cellules amassées. En revanche, son utilisation avec des métaux bivalents peut causer un précipité. Pour ce genre d'usage, un tampon de Good⁶ est souvent plus adapté.

TAMPON PHOSPHATE SACCHAROSE PH 6,5 (physiologie végétale)

Solution tampon utilisée en physiologie végétale pour l'extraction des chloroplastes et des mitochondries (conserver au froid à 4°C). Ce tampon est essentiellement utilisé pour la réaction de Hill⁷ ou pour la respiration des mitochondries de cellules végétales.

Pour préparer 1 L de TBS :

Dihydrogénophosphate de potassium	13,6 g
Dihydrogénophosphate de sodium	71,6 g
Chlorure de potassium	5,9 g
Saccharose	171 g
Eau distillée	Ajuster à 1 L

⁴ L'ellipsométrie est une technique optique de caractérisation et d'analyse d'une surface, fondée sur le changement d'état de polarisation de la lumière, par réflexion de celle-ci sur la surface aplanie de l'échantillon traité.

⁵ EDTA, ou acide éthylène diamine tétra-acétique ; utilisé notamment dans l'industrie alimentaire sous le sigle E385 (anti-oxydant), dans le traitement des eaux pour éviter la formation de calcaire, dans l'industrie du papier.

⁶ Série de tampons dits zwitterioniques, développés par Good et son équipe, et qui comptent une vingtaine de produits synthétiques, dont le pH varie de 6 à 8.

⁷ C'est une réaction d'oxydoréduction qui se passe au cours de la photosynthèse ; elle a été démontrée entre 1935 et 1940 par Robert Hill, un biochimiste anglais.

Le montage de pièces diverses destinées à une conservation de longue durée

Nous défendons fermement l'idée que, si on comptabilise le temps passé à tenter de réaliser une préparation correcte, on ne peut que déplorer de la voir finir à la poubelle, après examen ; il faut aussi imaginer que certaines observations sont rarissimes, et ne peuvent avoir lieu qu'une ou deux fois dans une vie.. 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 appelée 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 ou de cristalliser ; sa fonction secondaire sera également d'empêcher la LCO de se déplacer lors d'éventuelles manipulations (nettoyage notamment). Notre préférence va sans hésitation au vernis à ongle incolore.

Voici les milieux que nous utilisons (par ordre alphabétique).

- ++ Bleu coton lactophénoolé**
- ++ Chloral lactophénool**
- ++ Glycérine pure**
- ++ Glycérine gélatinée**
- ++ Lactoglycérol de Clémentçon**
- ++ Lactophénool de Amann**
- ++ PVA iodo-ioduré coloré au rouge Congo**
- ++ PVA lactophénoolé coloré dans la masse à la fuchsine acide, ou au bleu d'aniline**
- ++ PVA lactophénoolé incolore**

Le choix dépend de la nature des pièces à monter, de la facilité de manipulation du produit et de sa disponibilité.

LA GLYCÉRINE GÉLATINÉE présente le gros inconvénient de devoir être travaillée à chaud et génère très facilement des bulles d'air, néfastes à une bonne préparation.

Nous conseillons de conditionner la GG dans une BP en verre, de 6 cm de diamètre.

Deux manières d'utiliser ce produit :

++ Placer le conditionnement sur une plaque chauffante à 40° et prélever selon les besoins, à l'aide d'une petite baguette de verre (c'est la solution que nous préférons, car elle permet de mieux doser le produit).

OU

++ Prélever à froid une petite cube de GG ; le poser sur une LPO et placer celle-ci sur la plaque chauffante, jusqu'à fonte du bloc.

Placer la pièce dans le médium et poser la LCO avec beaucoup de précaution, afin d'éviter les bulles. Laisser refroidir, puis luter sans tarder.

LE LACTOGLYCÉROL ET LES DIFFÉRENTS PVA s'avèrent très intéressants car la chaleur permet de faire disparaître les éventuelles bulles d'air (chauffer puis refroidir brusquement en plaçant la LPO sur une surface froide).

Nous affectionnons beaucoup les PVA colorés dans la masse, car il suffit d'y placer les pièces, et elles « prennent » le colorant sans saturation, en quelques jours.

NOTRE CHOIX PERSONNEL

1. PVA sous diverses formes

2. Lactoglycérol

3. Glycérine

LES PRÉPARATIONS DÉFINITIVES

Elles pourront se conserver durant des dizaines d'années ! Le lutage n'est pas indispensable pour certains milieux, mais nous le conseillons vivement.

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

Des milieux définitifs à SOLVANT AQUEUX

CONSERVATEUR DE HOYER : ce médium est utilisé depuis longtemps ; c'est un bon produit à base de gomme arabique ; il convient donc très bien pour les pièces fragiles. Attention cependant : il décolore presque immédiatement la fuchsine de Ziehl. A long terme, on voit parfois apparaître des inflorescences de cristaux dans les préparations.

AQUATEX : ce produit de fabrication récente 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 plus de 6 ans, nous l'utilisons très fréquemment pour tous les montages fragiles, notamment en mycologie.

Des milieux définitifs à SOLVANT BENZÉNIQUE ou CETONIQUE

Ils ont tous la propriété commune d'être solubles dans des hydrocarbures aromatiques, tels que le xylène ou le toluène ; cependant, ils sont de plus en plus décriés car reconnus comme très nocifs pour l'homme en cas d'exposition de longue durée (dans les laboratoires p. ex.). Précisons cependant qu'il n'y a pas lieu de s'alarmer en cas d'utilisation ponctuelle ... à condition de ne pas fumer !

Leur utilisation implique une déshydratation complète des pièces à monter, sous peine de voir apparaître des « louches », sortes de précipités blanchâtres, provoqués par la présence d'eau résiduelle.

Nous ne parlerons ci-dessous que des milieux que nous connaissons, et qui possèdent tous un IR variant de 1,53 à 1,55.

BAUME DU CANADA : nous le considérons comme un des meilleurs médiums, 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, 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.

MERCKOGLAS : lorsqu'on réalise des frottis, ce produit de montage remarquable remplace avantageusement des LCO de grande taille (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 liquides physiologiques (sang, salive, sperme, prélèvements d'humeurs diverses).

ZRAX : c'est le produit de prédilection des diatomistes ; il possède un N supérieur à 1,7 et est un mélange secret de formaldéhyde et de naphthalène. Il a été mis au point par W.P. Dailey, professeur de chimie aux Etats-Unis (Pennsylvanie). Son solvant est le toluène, ou à défaut, le xylène ou l'acétone très pur.

Il est semblable à l'Hyrax (qui n'est plus disponible) et au Naphrax, mais ce dernier est instable dans la durée. A une époque, le concepteur du Zrax avait inventé le Pleurax, mais il a arrêté sa production car il provoquait des réactions allergiques graves semblables aux ampoules générées par le sumac vénéneux (*Toxicodendron radicans*).

S. Nagy & G.D. Hanna ont mis au point un autre produit, appelé STYRAX, qui a un IR de 1,58.

Cependant, l'utilisation d'un milieu d'observation, même possédant le meilleur IR qui soit, ne peut à lui seul garantir les résultats espérés ; il doit être associé à une mise en œuvre très rigoureuse du mode opératoire, à des manipulations soigneuses, à l'utilisation d'objectifs de qualité supérieure, et à un réglage fin du microscope.



NOTRE TIERCE PERSONNEL :

1. Aquatex
2. Baume du Canada et Euparal
3. Merckoglas

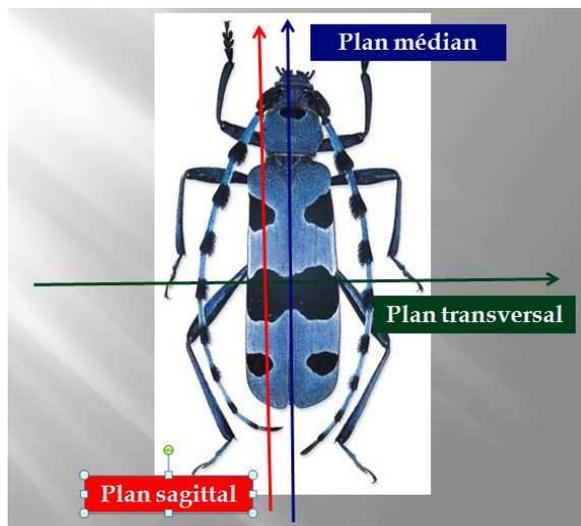
L'appellation des plans de coupe : un système de référence à respecter

En anatomie, une terminologie précise est utilisée pour se repérer dans la structure anatomique d'un organisme. Ce système de référence repose sur un ensemble de plans et d'axes définis par rapport à la position standard de la pièce décrite. On va utiliser cette terminologie pour indiquer l'orientation des coupes réalisées dans le sujet, lorsque celui-ci est face à l'observateur.

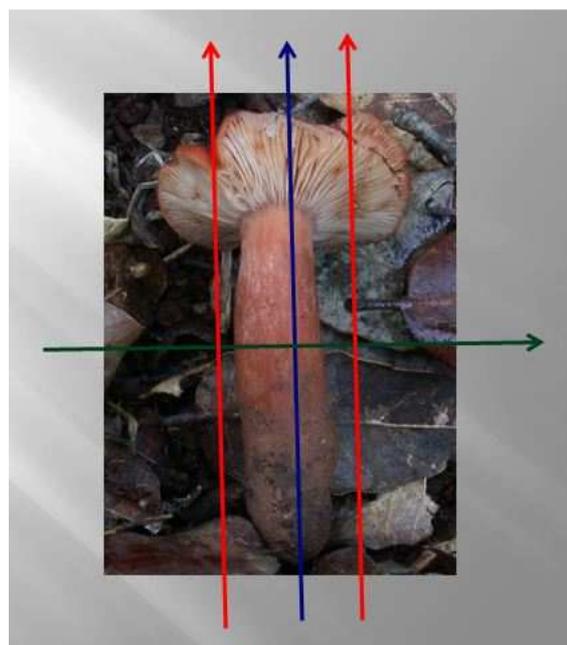
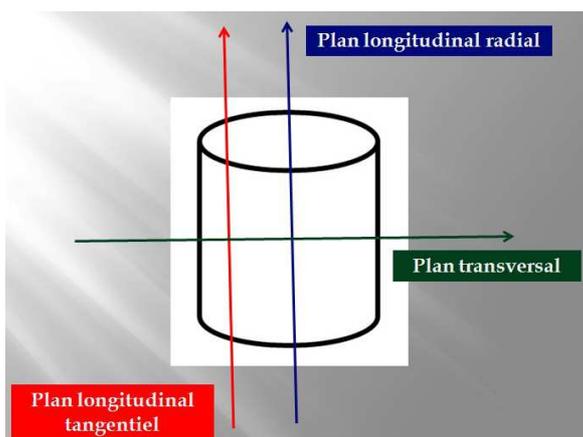
Le plan médian est celui qui sépare la moitié gauche de la moitié droite d'un organisme à symétrie bilatérale : il est unique. Il ne peut donc y avoir qu'une seule **COUPE MÉDIANE**.

Les plans sagittaux sont tous parallèles au plan médian : ils sont innombrables, et vont générer de multiples **COUPES SAGITTALES**.

Un plan transverse ou transversal est un plan horizontal, perpendiculaire au plan médian. Des coupes réalisées dans ce plan seront dites **COUPES TRANSVERSALES** ; elles sont également multiples.



En botanique et mycologie, la terminologie est quelque peu différente.



Le plan transversal est un plan de coupe perpendiculaire à l'axe longitudinal du sujet : la **COUPE TRANSVERSALE (CT)** est la seule qui permette de voir les stries du bois, dans un tronc d'arbre, p. ex.

Le plan longitudinal radial est un plan de coupe réalisé dans l'axe longitudinal ; la terminologie exacte est **COUPE LONGITUDINALE RADIALE (CLR)** ; nombre d'auteurs utilisent, de manière trop imprécise à notre avis, les termes de « coupe radiale, coupe longitudinale » (ce dernier peut être confondu avec le suivant).

Le plan longitudinal tangentiel est un plan de coupe parallèle à l'axe longitudinal. On parlera de **COUPE LONGITUDINALE TANGENTIELLE (CLT)** ; parler de « coupe tangentielle » nous paraît également imprécis.

Chez les champignons, on parle de **SCALP** lorsqu'on réalise un prélèvement au niveau de la cuticule du chapeau.

Le nettoyage des LPO et des LCO

Cette méthode a été initiée par Alain Bondu⁸ ; Michel Javayon y a apporté quelques améliorations mineures et nous l'a présentée lors du séminaire de Massembré 2012⁹ (Belgique). Nous l'avons utilisée durant 2 années avec encore d'autres modifications, pour arriver au protocole final simplifié, développé ci-dessous.



PRÉALABLE

++ Nous n'utilisons jamais une LPO sans la passer dans l'alcool.

++ Des LPO neuves sont sorties de leur emballage et placées dans un flacon hermétique contenant du méthanol pur.

++ Pour utilisation, les essuyer avec un vieux mouchoir en lin, dont il ne reste que la trame, afin d'éviter le dépôt de peluches.

++ Plonger la LCO choisie dans du méthanol pur et l'essuyer soigneusement de

la même manière.

En suivant ce protocole, le support est parfaitement mouillable, et les pièces adhèrent remarquablement.

SOLUTIONS DE STOCKAGE proposées pour les LPO usagées (dans un flacon hermétique de 250 cc), sans nettoyage préalable, et classées selon nos préférences :

++ Mélange 75/25 de méthanol pur et d'un liquide de nettoyage industriel pour jantes, contenant de l'acide phosphorique.

++ Eau (40 %), méthanol (30 %), HCl (30 %), détergent vaisselle (2 cc) ; l'utilisation d'acide chlorhydrique ne se justifie, à nos yeux, que si on travaille sur du matériel à risque, susceptible de générer des infections ou contaminations.

++ Méthanol pur + 5 g de SDS.

++ Méthanol pur + 10 cc de détergent pour vaisselle.

NOUS ÉLIMINONS LES LCO CARRÉES OU RECTANGULAIRES car trop fragiles à laver et générant une grosse perte de temps ; par contre, nous récupérons les lames rondes qui sont beaucoup plus solides.

FABRIQUER SOI-MÊME UN SUPPORT DE LPO adapté à la cuve de votre nettoyeur :

++ Disque diamanté de 12 cm de diamètre sur une petite disceuse (ou scie à métaux).

++ Tuyau PVC sanitaire de 5 cm de diamètre.

++ Le couper en deux sur la longueur choisie.

++ Le cranter sur 18-20 mm de profondeur, avec un espace de 2-3 mm entre chaque cran (voir photo ci-dessus).

MATÉRIEL ET INGRÉDIENTS UTILISÉS

Nettoyeur à ultrasons (le prix varie de 30 à 120 € selon la contenance et les performances) - eau tiède
- produit de vaisselle - support pour lames.

MODE OPÉRATOIRE

+ Ranger les LPO sur le support.



⁸ BONDU A., 2010 - « Le nettoyage des lames et lamelles de microscopie », (Bull. SMNF - Société Mycologique du Nord de la France), 2010 (2) - 88, 60-63.

⁹ LECOMTE M., 2012 - « Manuel de microscopie », tome 1, p. 192.

- + Déposer l'ensemble dans la cuve et couvrir d'eau tiède additionnée de 2 cc de détergent.
- + Selon les possibilités de votre nettoyeur, laisser agir 2x 3 ou 6 min.
- + Rincer les lames sous l'eau tiède courante (très facile avec le support).
- + Si nécessaire (mais c'est très rare si on utilise un bon liquide de stockage pour LPO usagées), nettoyer une seconde fois.
- + Laisser égoutter durant quelques secondes et replacer directement les LPO propres dans le méthanol pur. Elles sont de nouveau prêtes à l'emploi.

Deux techniques simples pour réaliser des coupes sur des objets plats

LA COUPE À MAIN LEVÉE, AVEC GUIDE D'APPUI



Afin de réaliser une coupe transversale régulière dans une pièce aplatie (feuille d'arbre, ou ici, tranche de cuticule de fruit), nous utilisons cette technique simple, qui est une version améliorée de la coupe à main levée.

- ++ Travailler sur une plaque de PVC rigide (afin de pouvoir réutiliser la lame de rasoir).
- ++ Utiliser une lame classique de rabot mécanique.
- ++ Une LPO sert de guide de coupe, avec l'idée de réaliser une « tranche » la plus fine possible (la seule limite est l'acuité visuelle, mais cela peut aussi se pratiquer sous la loupe).
- ++ Transférer ensuite la coupe dans une

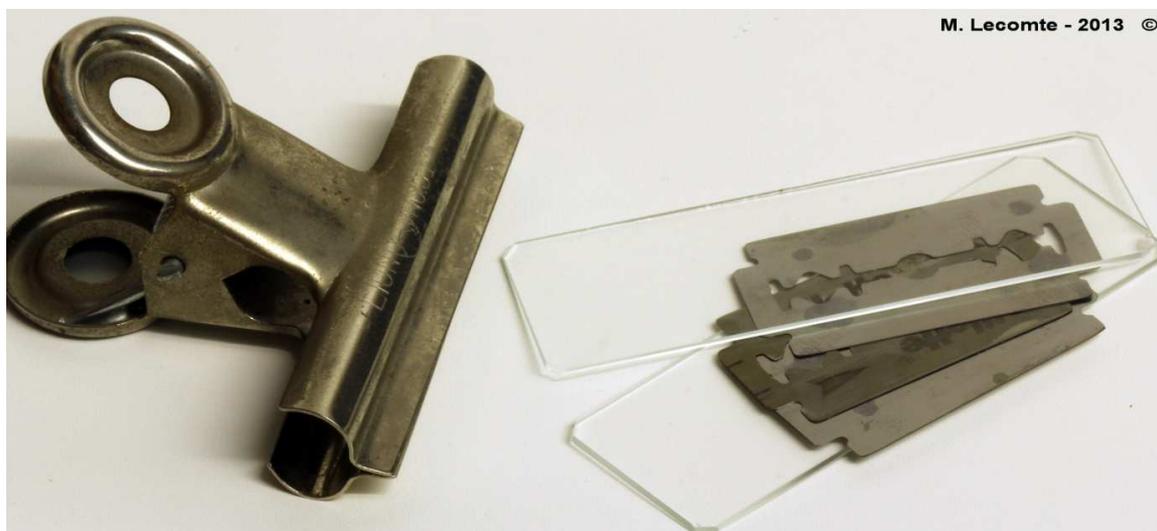
goutte d'eau déposée sur la LPO utile, afin d'éviter la dessiccation (on peut aussi la déposer dans un verre de montre).

- ++ Trier les coupes sous la loupe binoculaire, afin de choisir les meilleures.
- ++ Observer dans l'eau glycinée, le CLP ou l'acide lactique.

L'UTILISATION DE LA DOUBLE LAME DE RASOIR MÉCANIQUE, AVEC INTERCALAIRE

Ce dispositif permet de réaliser assez simplement des coupes transversales très fines, de l'ordre théorique de 10 μm . Une lame de rasoir mécanique de marque célèbre, mesurée au Palmer, est épaisse de 10 microns (0,01 mm). Si on l'intercale entre 2 autres lames, on aura donc un espace entre ces deux lames de 1/100ème de mm, ce qui représentera, en théorie, l'épaisseur de la coupe. On va maintenir l'ensemble solidaire grâce à une pince exerçant une forte pression, ou bien à l'aide de deux LPO fortement serrées entre les doigts. Cela s'avère très utile pour réaliser des coupes de cuticule en mycologie.

Deux inconvénients majeurs : à chaque coupe, il faut démonter et remonter le système pour récupérer la tranche incriminée ; toutes ces manipulations multiplient le risque de coupure.



Actualisation de la technique complète des coupes à la paraffine

Dominique Biarrat¹⁰

Une fois le prélèvement réalisé, et les parties à étudier choisies, le processus peut commencer.

La fixation

LES FIXATEURS sont très nombreux :

→ Pour les tissus animaux, nous conseillons vivement le FIXATEUR DE BOUIN (pas de limite de durée pour le bain).

→ Pour les végétaux : FIXATEUR À BASE DE FORMOL OU AFA, ou FAA (bain de 1 à 24 heures).
Alcool absolu (80 cc) - formol à 30 à 40 % (15 cc) - acide acétique glacial (5 cc).

→ Autre formule :

alcool à 70%¹¹ (90 cc) - formol à 30 à 40 % (5 cc) - acide acétique glacial (5 cc).

La déshydratation



Pour les pièces fixées au Bouin ou au formol, il faut compter environ 1 heure par mm d'épaisseur.

Selon Jean-Marie Exbrayat (France)¹² :

éthanol à 70 % : 4 heures - éthanol à 95 % : 2x 12 h - éthanol à 100 % : 2x 4 h.

Selon Yvan Lindekens (Belgique)¹³ :

éthanol à 70 % : 4 heures - éthanol à 95 % : 2x 4 h - alcool isopropylique pur : 3x 4 h (cette étape représente la transition entre la déshydratation et l'imprégnation, car la paraffine est soluble dans cet alcool).

Si la pièce est fragile, passer d'abord par 2 bains supplémentaires :

éthanol à 10 % : 4 heures - éthanol à 30 % : 4 h.

ASTUCE → La pièce à traiter sera placée dans un morceau de gaze attaché au sommet du flacon.

→ Toutes les parties du prélèvement seront ainsi en contact avec le liquide de déshydratation.

¹⁰ Dominique Biarrat, F-27330 La Barre-en-Ouche - biarrat.dominique@wanadoo.fr

¹¹ N'oublions pas que le titrage d'un alcool s'obtient par addition d'une quantité très précise d'eau bidistillée, selon les normes de la table de Gay-Lussac.

¹² Exbrayat J.M., 2000 - « Méthodes classique de visualisation du génome en microscopie photonique », collection « Techniques de visualisation moléculaire », 182 p.

¹³ Yvan Lindekens, voir le forum « Le Naturaliste ».

→ La manipulation du fragment en est aussi grandement facilitée, puisqu'on ne touche plus à celui-ci lors des changements de bains ou de flacons.

NB : Il faut se souvenir que si l'alcool a déjà servi plusieurs fois, la partie inférieure du flacon contient un alcool moins titré.

Préparation de la paraffine

LA PARAFFINE du commerce se présente souvent en granulés, et son point de fusion est toujours précisé (entre 45 et 70°). Le Paraplast est une paraffine de synthèse qui imprègne bien les pièces. Certains techniciens ajoutent parfois de la cire d'abeille, car elle confère à la paraffine une souplesse qui améliore la facilité de coupe et l'adhésion de la pièce au bloc de fixation (avec mon vieux microtome, les résultats sont nettement améliorés).

Paraffine : 100 g - cire d'abeille : 5 g.

L'imprégnation



Le remplacement de l'alcool par la paraffine doit se faire lentement.

Le tissu sera placé dans un bain de paraffine, dont la température est légèrement supérieure à celle du point de fusion, pendant plusieurs heures (entre 4 et 12 heures). L'alcool isopropylique utilisé dans la dernière phase de la déshydratation va rendre cette opération plus efficace.

Cette opération n'impose pas l'utilisation d'une étuve, et peut se réaliser avec un bain-marie ; il suffit d'enfermer le prélèvement dans une petite boîte, elle-même placée dans une plus grande, qui flotte sur l'eau du bain (voir les 3 illustrations ci-dessus).

L'inclusion

Le tissu imprégné va être inclus dans un bloc de paraffine.

Pour former le moule final, nous vous proposons 3 techniques : les cassettes (voir ci-dessous), les barre de Leuckart (voir photo p. 24), et pour les bricoleurs, la fabrication de petits moules en carton (ce dernier cas de figure laisse la possibilité de fabriquer ses moules sur mesure, en fonction de la taille des prélèvements).



MODE OPÉRATOIRE

- ++ Verser la paraffine dans le moule.
- ++ Attendre un peu avant de poser le prélèvement : le fond se refroidit plus vite, et le prélèvement sera ainsi placé plus haut.
- ++ Utiliser des pinces chauffées pour la mise en place.



ASTUCE → Ne pas oublier de placer dans la paraffine, sur le bord du moule, un petit morceau de papier (aide-mémoire) qui indique où se situe le prélèvement, et son orientation car, une fois la paraffine refroidie, on ne distingue plus rien.

◀ Versage de la paraffine entre des barres de Leuckart.

Cas particulier : **les très petits prélèvements ou les prélèvements très fragiles**

TECHNIQUE DE LA DOUBLE INCLUSION AGAR – PARAFFINE

++ Dans un 1er temps, confectionner un petit moule en carton.

++ Utiliser une plaque chauffante.

- ++ Mélanger 1,3 g de poudre d'agar-agar (gélose) avec 100 cc d'eau ; faire dissoudre la gélose en chauffant ; une fois dissoute, ajouter 2,5 cc de formol (il durcit la préparation).
- ++ Verser un fond de la préparation (2 à 3 mm) dans le moule ; attendre la prise en gel (maintenir le mélange initial au chaud pour éviter sa prise).
- ++ Sous la loupe binoculaire, positionner les pièces dans le moule.
- ++ Couvrir avec une nouvelle couche.
- ++ Attendre la prise.
- ++ Sortir les blocs du moule.

DÉSHYDRATATION

- + Placer le bloc de gel dans un film de gaze.
- + Tremper dans de l'alcool à 70° (30 minutes au moins), de façon à rendre le bloc plus dur.
- + Le tailler au plus près des pièces à étudier.
- + Replacer dans le film de gaze, et déshydrater comme pour une pièce normale (voir pager précédente).

IMPRÉGNATION

La paraffine remplace l'alcool isopropylique, ce qui a pour effet de réduire le volume du bloc dans une grande proportion (cette imprégnation sera de 12 à 24 h.).

INCLUSION

Pour inclure le petit bloc d'agar ainsi obtenu, le mettre en place dans un bloc de paraffine, comme pour une pièce normale (voir pager précédente).

Il est possible ainsi d'inclure et de couper des structures de très petite taille (moins de 1 mm), grâce au travail sous la loupe binoculaire).

Il est toujours possible de faire refondre le bloc si le positionnement de la pièce n'est pas satisfaisant.

La coupe

PRÉPARATION DE LA LAME DE COUPE

Avec les microtomes modernes à lame à usage unique, il n'y a pas de préparation spéciale (il faut simplement changer de lame chaque fois que cela s'impose).

Mais avec les microtomes anciens, il est nécessaire d'affûter¹⁴ régulièrement la lame¹⁵.

++ Passage sur la pierre (la meilleure est, sans hésitation, la pierre de coticule belge¹⁶ (page suivante), qui donne, à mon sens, un résultat parfait). La manière de faire est sujet à discussion. Sur la pierre

¹⁴ Entendons-nous bien ! Il s'agit simplement de maintenir le fil et le tranchant d'une lame en parfait état. Si cette dernière a été ébréchée, la réparer est affaire de spécialiste : un amateur ne peut y arriver.

¹⁵ Les anciennes lames de microtome sont lourdes et massives, et coûtent cher. Elles sont très dangereuses à manipuler, et requièrent une attention de tous les instants. Afin de devoir les aiguiser le moins souvent possible, nous utilisons une astuce, qui consiste à déplacer la lame, dans ses fixations, d'environ 1,5 cm, après une centaine de coupes, et de marquer la zone utilisée (voir photo en page 22).

maintenue en permanence humide, je pratique un mouvement régulier et lent, en suivant le dessin du symbole de l'infini (un 8 horizontal), chaque face de la lame subissant le même nombre de mouvements, et sans appuyer (le poids du couteau est suffisant).

++ Passage sur le cuir sec à la manière des barbiers anciens, avec des allers-retours, pour enlever le morfil.



TAILLE DU BLOC DE PARAFFINE

Rogner le front de coupe au plus près du prélèvement, et garder les bords supérieur et inférieur parallèles (seule manière d'obtenir un beau ruban).

FIXATION DU BLOC DE PARAFFINE SUR LA PORTE OBJET DU MICROTOME

++ Soit coller à la chaleur sur le porte-objet (PO) d'un microtome ancien : chauffer le PO, y placer fermement le bloc de paraffine et refroidir sous l'eau (voir les 3 photos ci-dessus).

++ Soit fixer dans les mâchoires de l'étau, sur un microtome récent.



La réalisation des coupes rencontre de nombreuses difficultés, toutes surmontables ; les principales causes sont :

++ Mauvaise qualité du tranchant (lame ébréchée ou émoussée : cela se remarque immédiatement, car on distingue des sillons dans la tranche de paraffine).

++ Angle de coupe trop faible ou trop prononcé.

++ Température ambiante trop élevée (le froid facilite la coupe).

++ Un prélèvement mal déshydraté ou mal imprégné.

◀ Frottis d'eau albumineuse.

COLLAGE DES COUPES

Les lames doivent être dégraissées, et conservées dans de l'alcool méthylique ; les sécher avec du papier absorbant ; passage rapide dans la partie inférieure de la flamme d'un brûleur à gaz ou d'une lampe à éthanol pur ; essuyer avec un linge non pelucheux, imbibé de méthanol.

¹⁶ Le coticule de Vielsalm dit « pierre à rasoir » ou « pierre beige » est une variété de schiste cristallin à grain très fin, composé de petits cristaux de grenat, d'un diamètre compris entre 5 et 20 μm . Vieille de 480 millions d'années, elle est d'origine sédimentaire, mais contient en outre, une part importante de manganèse. Sa dureté, associée à la finesse de son grain, lui confère un pouvoir abrasif exceptionnel, remarqué il y a plusieurs siècles déjà. Le gisement, dont il semble bien que ce soit le seul au monde, est quasi épuisé et son exploitation sera bientôt arrêtée.

Préparation d'une solution mère d'eau albumineuse (Formule de Mayer)

50 cc de blanc d'œuf frais + 50 cc de glycérine (d'autres formules proposent glycérine et blanc d'œuf frais à poids égal) ; mélanger et filtrer sur gaze (la filtration est très lente) ; ajouter un cristal de thymol ou de phénol pour la conservation.

Solution de travail : diluer 10 à 20 gouttes de la solution mère dans 25 cc d'eau bidistillée (ou encore 1cc de la solution mère dans 20 cc d'eau bidistillée.

Réaliser un frottis avec 1 goutte de la solution de travail sur les LPO.

Positionner les coupes sur les LPO.

L'étalement se fera doucement, mais si la coupe est très chiffonnée ou ondulée, l'étalement se fera mieux sur des lames tièdes.

Mise en réserve des lames sur une plaque chauffante (il existe des modèles de laboratoire, avec thermostat), mais il est possible d'utiliser un chauffe-plat de cuisine, dont la température de surface est ordinairement de 70°. Si on y place un carton et quelques feuilles de papier, la température de surface descend à la température voulue, c'est-à-dire largement en dessous du point de fusion de la paraffine utilisée.

Une bonne adhérence à la LPO n'est obtenue que si l'eau albumineuse sous la préparation est évacuée ; cela peut se faire en inclinant les LPO et en les laissant dans cette position durant 4 heures.

Préparation à la coloration

Pour ce genre de manipulation, l'utilisation de cuves à coloration s'avère très pratique car on peut traiter 10 lames à la fois. La coloration peut se faire aussi directement sur la LPO, en utilisant une pipette de Pasteur ; les quantités de couleurs utilisées dans ce cas sont très petites.

1) DÉPARAFFINAGE : 1er bain de toluène ou de xylène de 5' (pour chasser la paraffine) - 2ème & 3ème bain de toluène (5') ; on peut aussi terminer par 2 bains d'alcool isopropylique, ce qui améliore la dissolution de la paraffine (selon Langeron, le toluène durcit plus les pièces traitées). Employer des tubes de Borel (voir photo ci-dessous), ou de petits bocaux de récupération.



2) RÉHYDRATATION PAR L'ALCOOL : 1er bain d'alcool à 95°, durant 5', pour chasser le toluène - 2ème bain à 95° (5') - 3ème bain à 60° (5') - 4ème bain à 30° (5').



3) BAIN DANS L'EAU BIDISTILLÉE ou dans le PBS (tampon phosphate salin : comprimés dans le commerce).

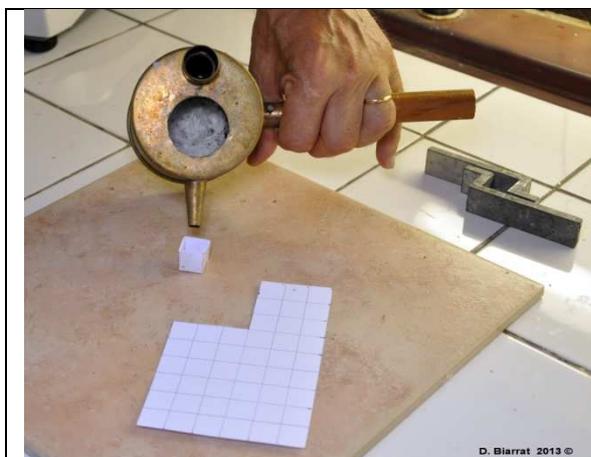
4) On passe ensuite aux différents PROTOCOLES DE COLORATION prévus.

◀ Différents modules permettant des colorations de pièces libres, en petite quantité (cela consomme peu de colorant). On peut ainsi appliquer 3, 4, 12 colorations différentes à un même échantillon, sur un espace très réduit.

2 modèles de cuve à coloration (en verre et en plastique), à utiliser pour des frottis ou des coupes déjà collées sur une LPO. Elles permettent de traiter 10 lames à la fois. On peut aussi les utiliser pour le rinçage, la déshydratation, ou autres opérations impliquant de travailler sur des séries de lames.



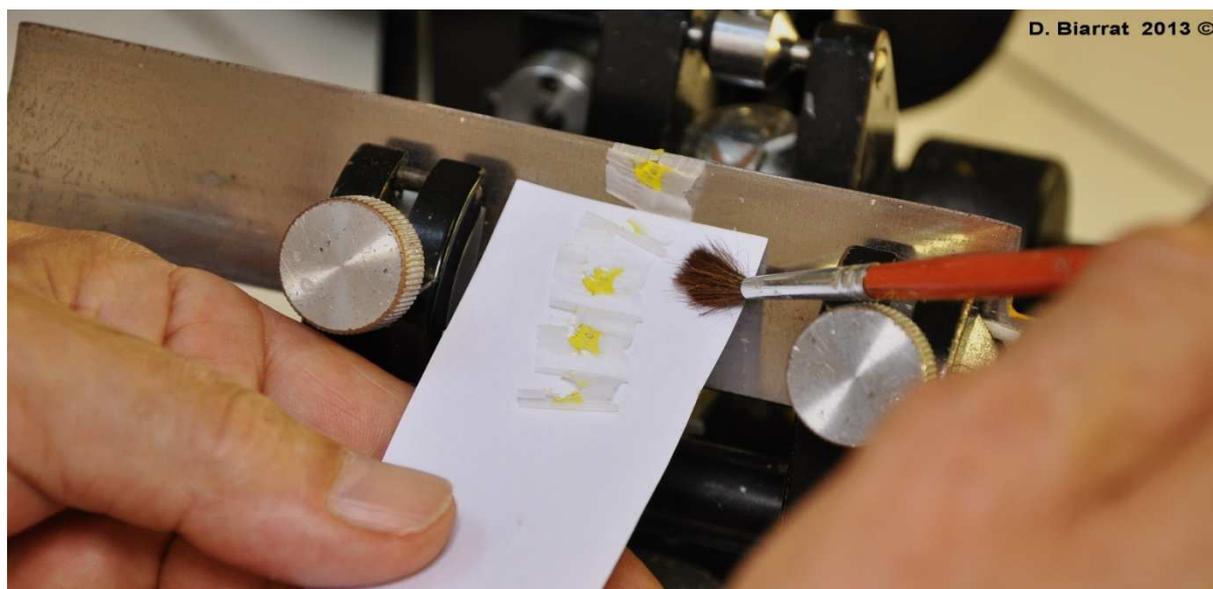
QUELQUES ILLUSTRATIONS COMPLÉMENTAIRES



▲ Versage de la paraffine dans des moules réalisés avec du papier rigide.

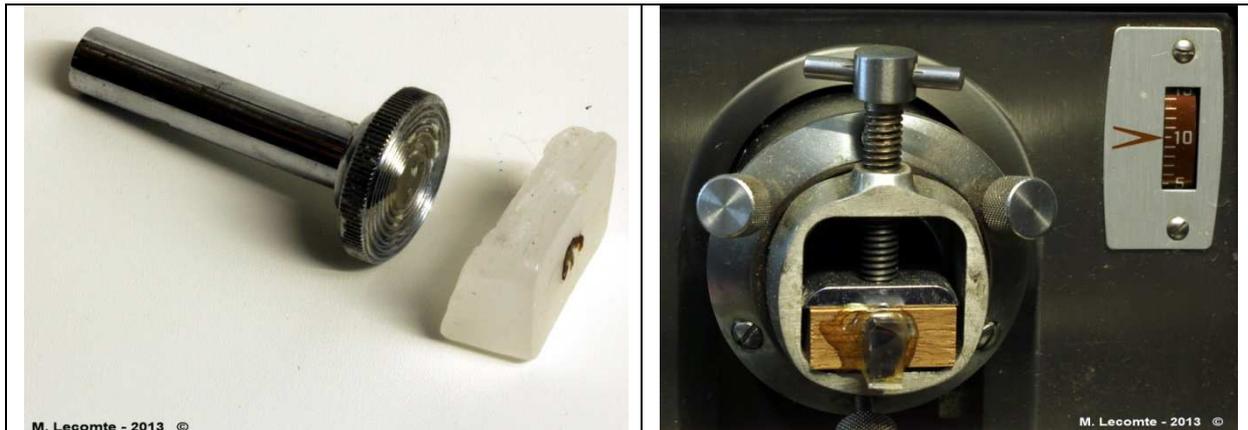


▲ Mise en réserve des lames portant les coupes et séchage, sur un chauffe-plat, en position inclinée.



Transfert des coupes sur un support rigide, à l'aide d'un pinceau.

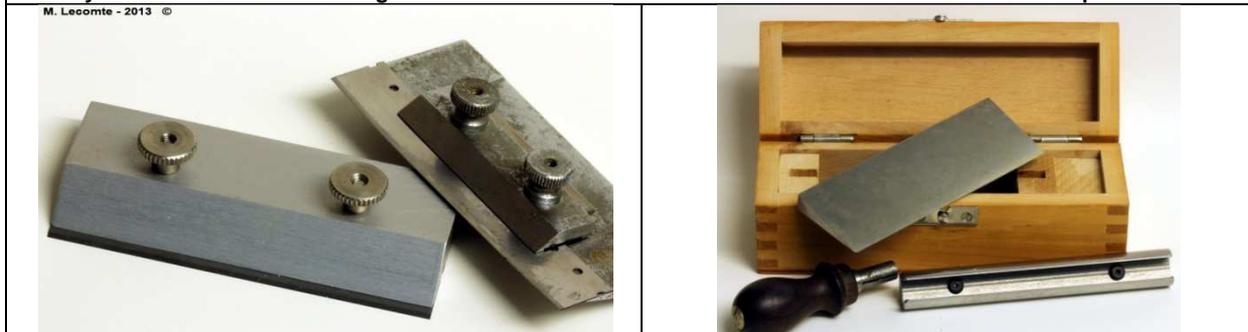
LES ACCESSOIRES DU MICROTOME EN QUELQUES IMAGES



M. Lecomte - 2013 ©

M. Lecomte - 2013 ©

2 systèmes de fixation : le collage à chaud sur un ancien microtome et les mâchoires sur un modèle plus récent.

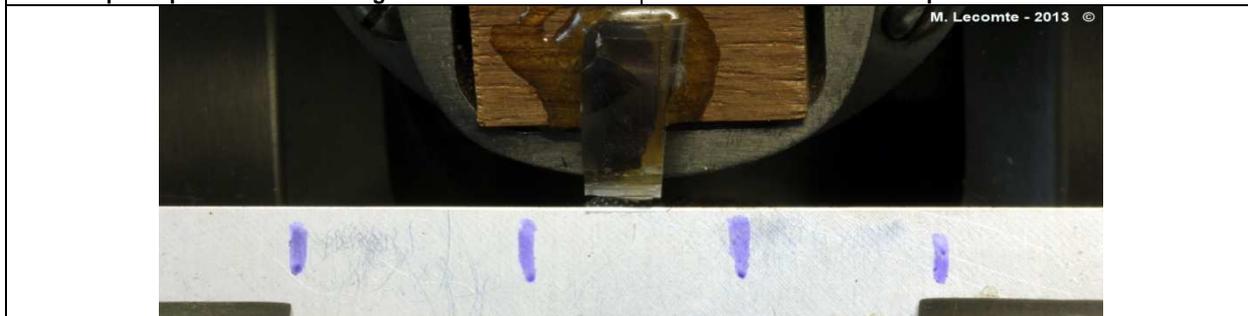


M. Lecomte - 2013 ©

M. Lecomte - 2013 ©

▲ Système avec lames à usage unique remplaçables.
Repères pour réduire l'affûtage au maximum. ▼

Lame traditionnelle avec son coffret et deux outils de manipulation.



M. Lecomte - 2013 ©



M. Lecomte - 2013 ©

M. Lecomte - 2013 ©

Kit complet d'affûtage vendu par Euromex ▲ avec détail ▼ ; belle pierre de coticule (20x10 cm) et son cuir. ▲

M. Lecomte - 2013 ©



Vers une méthode rapide de traitement d'une pièce à inclure dans la paraffine

Nous étudions le problème des coupes histologiques depuis nombre d'années, et pensons avoir expérimenté quasi toutes les méthodes existant à l'heure actuelle. Tout cela a demandé beaucoup de temps, nécessité un investissement financier pour le moins conséquent, multiplié les « essais et erreurs » infructueux durant longtemps, faute d'un mentor, mais généré au fil des années des réussites de plus en plus encourageantes. Grâce aux enseignements de Guy Auderset et d'Albert Marchal, nous obtenons maintenant des résultats spectaculaires.

Une constante : tout cela est (très) coûteux, très chronophage, demande beaucoup de rigueur et d'organisation ; en outre, les avantages majeurs sont souvent contrariés par des inconvénients importants.

Domaines explorés

- Histologie animale et végétale
- Mycologie

Matériel testé (avec coupes variant de 2 à 30 µm, selon les appareils)

MÉTHODES MANUELLES

- Coupes à main levée avec un rasoir classique de coiffeur, avec et sans loupe.
- Coupes à main levée avec une lame de rasoir mécanique, avec et sans loupe.
- Divers modèles de microtome de Ranvier avec rasoir « spécial », à une face plate, ou avec monture à lames interchangeable, avec pièces enfermées dans de la moelle de sureau ou du polystyrène extrudé.

Avantages

- Rapidité de mise en œuvre.
- Résultats instantanés.

Inconvénients

- Irrégularité du travail.
- Coupes souvent trop épaisses.
- Zone exploitable très (trop) réduite.

MÉTHODES AUTOMATISÉES

- Divers microtomes à manivelle, modèles Minod, American Spencer, Leitz, E. Jung.
- Microtome à glissière (Reichert).
- Microtome à congélation (Reichert).
- Ultra-microtome (pour coupes proches du micron).



◀ Un microtome à glissière, à congélation directe par électricité.

MATÉRIAUX D'INCLUSION TESTÉS

- ++ Alcool polyvinylique (PVA).
- ++ Polyéthylène glycol (PEG) de diverses consistances.
- ++ Paraffine.
- ++ Résines synthétiques (méthode de G.H. Cléménçon).

Avantages

- ++ Finesse et régularité des coupes.
- ++ Constance et facilité de répétition.
- ++ Très grand respect des structures cellulaires fongiques (dans le seul cas de la méthode de Cléménçon).

Inconvénients

- ++ Mise en œuvre très longue (quelques jours à 3 semaines).

+ Matériel et produits chimiques assez (à très) coûteux.

L'objet de cet article n'est pas de décrire tous les milieux d'inclusion : cela a été développé dans d'autres publications.

Voici une technique rapide (TROIS heures) de mise en œuvre pour inclure des pièces d'origine animale ou végétale dans la paraffine.

- Prélever un fragment de 1 à 2 mm d'épaisseur **au maximum**.
- Plonger durant ½ heure dans le fixateur de Duboscq-Brasil ou dans le Hollande.
- Rincer rapidement dans l'eau bidistillée.
- Bain de 10 minutes dans l'alcool à 95°.
- 2 bains successifs de 10 minutes dans l'alcool absolu.
- 2 bains successifs de 15 minutes dans le toluène.
- Passer la pièce dans un 1^{er} bain de paraffine, pour imprégnation, durant 15 minutes.
- Plonger ensuite dans un second bain pour inclusion, durant 15 minutes.
- Verser ensuite dans une forme adaptée (cassette d'inclusion), pour former un bloc (ou encore mieux, entre deux barres de Leuckart, si on a la chance d'en disposer), le tout posé sur une plaque de verre épaisse.
- Après refroidissement, retailler éventuellement le bloc, pour faciliter la coupe.

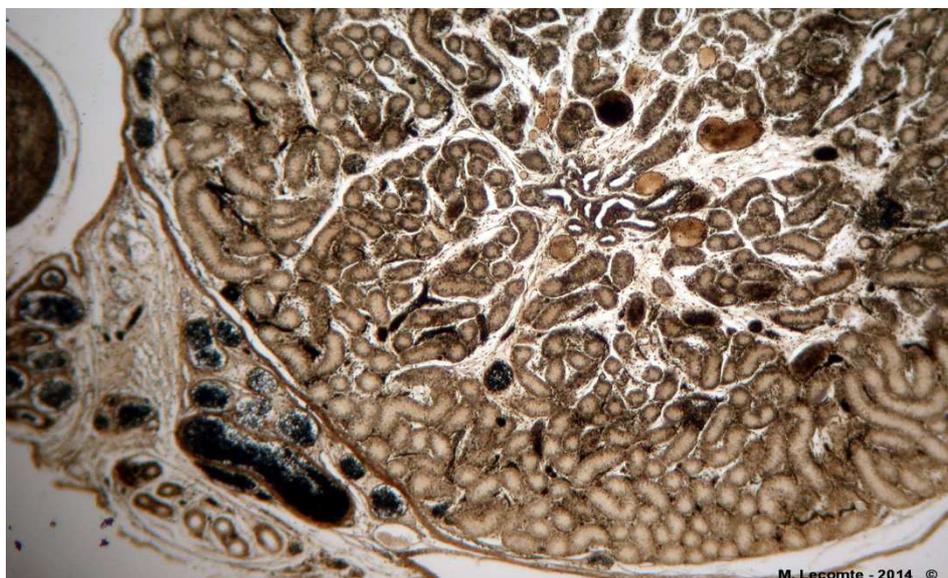
Cela signifie qu'en moins de 3 heures, on peut disposer de blocs prêts à l'emploi.



M. Lecomte - 2013 ©

Les barres de Leuckart : ce dispositif coulissant est blocable par 2 vis et permet de proportionner la taille du bloc d'inclusion à la taille de la pièce à inclure. Il suffit de poser le tout sur une surface froide (plaque de verre).

Conseils : verser d'abord 3 mm de paraffine dans la forme et laisser figer avant de remplir la forme ; bien orienter la pièce en la déposant dans le moule.



M. Lecomte - 2014 ©

Coupe dans un testicule de souris

Microscopie numérique : nouvelles perspectives. Remarques d'un praticien

Thierry Hatt¹⁷

Introduction : beauté des images, difficultés et méthodes d'approche

L'image est le résultat d'un très grand nombre de transformations et de choix techniques qui conditionnent sa saisie, son traitement et sa restitution. Ces choix ont des incidences importantes à toutes les étapes et le résultat est une représentation parmi d'autres de la « réalité », de la mesure initiale. La maîtrise de ces étapes, en fonction du résultat souhaité, est fondamentale. Un des grands intérêts du numérique est sa reproductibilité qui rend possible une expérimentation raisonnée. C'est ce que nous allons essayer de montrer.

Deux lois de l'imagerie numérique :

1. Ce que vous voyez dans une image, ce n'est pas ce que vous avez, mais ce que vous avez choisi d'y voir.
2. L'art du traitement de l'image est d'en afficher les parties que vous voulez voir.

Ces deux lois impliquent des connaissances techniques sur la puissance et les limites de l'imagerie ainsi qu'une connaissance du sujet traité. La loi « 2 » implique un gros risque d'erreurs d'interprétation si on ne connaît pas bien le sujet traité. Il reste que les images agrandies en micro ou macroscopie sont d'une beauté fascinante et parfois effrayante.

« Il n'y a pas d'images justes, il y a juste des images », J. L. Godard, dans « Sauve qui peut la vie »

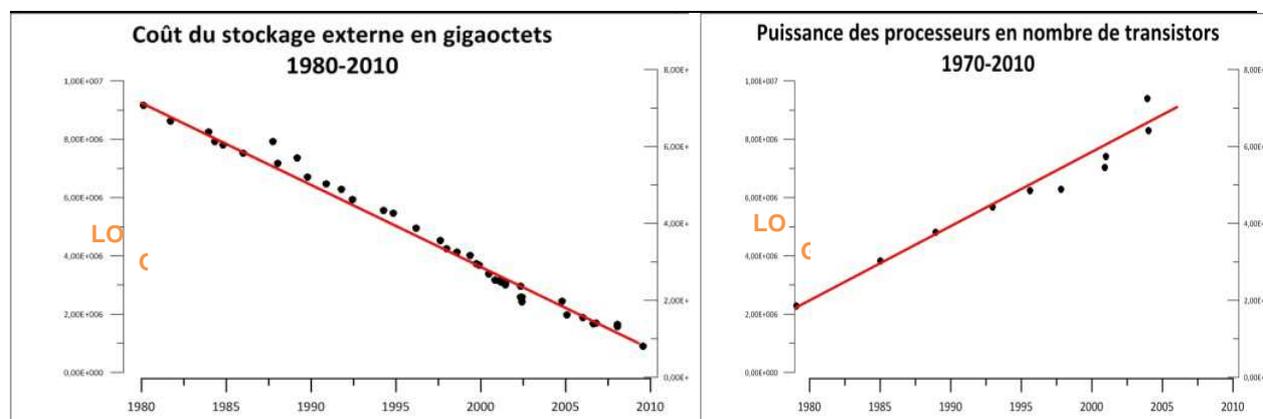
Cette affirmation de J. L. Godard est fondamentale : une conséquence directe des deux premières lois.



▲ Figure 1 : pseudo scorpion domestique (lumière polarisée) et tête de mouche (épiscopie et assemblage) ▲

I. Atouts et contraintes du matériel « adéquat » nécessaire

1. Le débat argentique versus numérique est clos ; la maturité des matériels et logiciels est complète.



▲ Figure 2 : 1980-2010, coût de stockage et évolution des performances des processeurs ▲

¹⁷ ancien professeur agrégé de géographie en lycée, membre associé de l'équipe universitaire Arche 3400 de l'Université de Strasbourg - thatt@gmail.com

La situation en 2014, pourvu qu'on y mette les moyens, est une situation de rêve pour le traitement numérique de l'image ; des opérations impossibles ou réputées très difficiles il y a quelques années, peuvent être envisagées sur des machines de prix abordable aux amateurs :

1. Puissance des machines multiprocesseurs, nécessaires pour le traitement d'images.
2. Capacités en mémoire vive et volumes de stockage externes presque sans limite.
3. Puissance des logiciels 64 bits ; aisance de gestion des couleurs RVB 3 * 16 bits.
4. Appareils photos numériques à prix « bas », avec puissance informatique et technique installée extraordinaire ; définition des images 24 x 36 supérieure à l'argentique.
5. Expérimentation instantanée à coût quasi nul, sauf le temps passé.
6. Reproductibilité et souplesse des procédures de saisie, de traitement et de restitution.
7. Echanges, transferts et tirages « maison » immédiats et faciles – assez - peu coûteux.

La difficulté est de trouver l'équilibre entre, d'une part, les possibilités personnelles d'investir du temps (alors un matériel assez coûteux peut être justifié), et d'autre part, le risque de commettre une dépense inutile, faute d'avoir le temps d'utiliser et contrôler sérieusement les instruments. C'est pourquoi le concept de « bon » matériel s'impose : c'est un matériel adéquat à l'effort qu'on va consentir. On peut très bien avoir une approche moins exigeante et moins coûteuse, mais les résultats seront de qualité moindre, dans un domaine où les exigences sont élevées.

2. Des plaisirs et des contraintes : informatique partout : matériels ; logiciels, et ...transpiration

Une première nécessité incontournable : il faut apprendre à utiliser un logiciel de traitement d'images assez puissant, disposant du système des calques, en maîtriser quelques fonctions nécessaires, ne pas en changer pour en avoir l'habitude. Il ne faut pas se cacher l'effort nécessaire pour maîtriser ces outils.

Deux logiciels libres très puissants et très complets, mais d'une complexité certaine :

Gimp 2.8 : <http://www.gimp.org/>

ImageJ 1.47 : <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, avec des modules spécialisés en microscopie (mini manuel en français : <http://ufe.obspm.fr/offreFP/miniMan-IJ.pdf>)

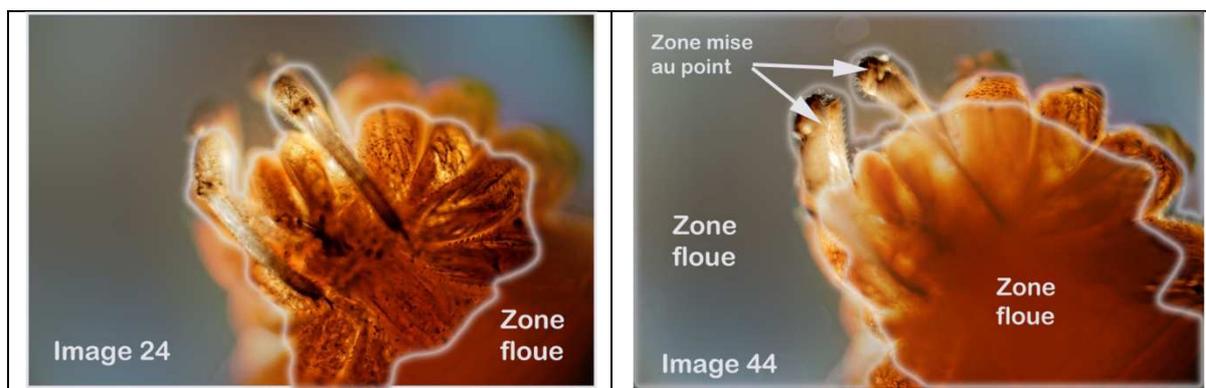
Adobe Photoshop version CC n'est plus recommandable avec sa nouvelle stratégie de location qui ne garantit aucune pérennité aux travaux effectués ! (Sites vérifiés en février 2014).

L'informatique est présente partout : associée aux matériels, aux procédures ; apprivoiser toutes ces procédures prend du temps.

II. Mettre tous les atouts de son côté pour réussir une image de microscopie

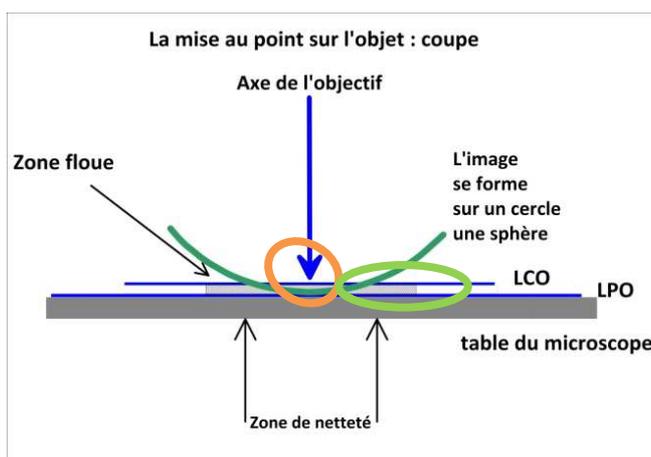
Un certain nombre de problèmes sont à résoudre : profondeur de champ, poussières, paramétrage des logiciels, reflets.

1. Résoudre les problèmes posés par la profondeur de champ et les déformations des objectifs



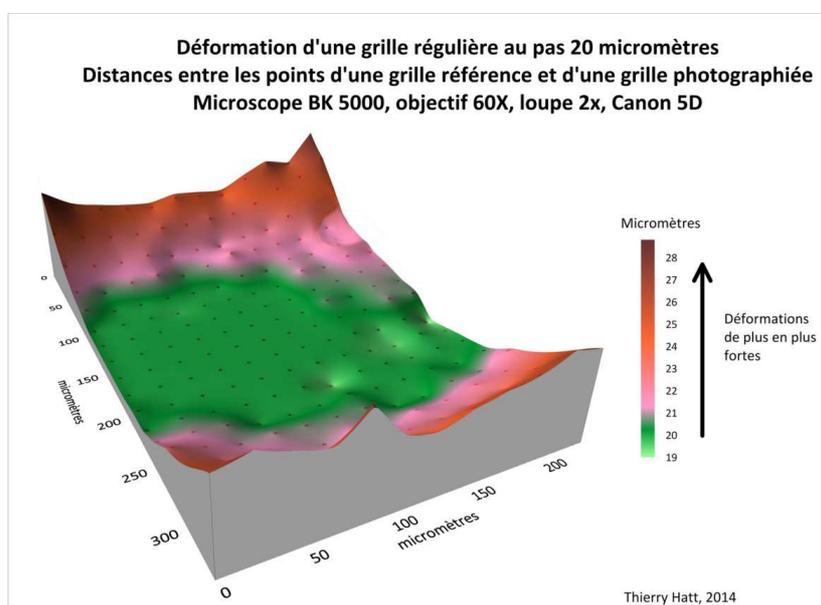
▲ Figure 3 : zones de netteté et zones de flou sur deux images, la n° 24 et la 44 ▲

Tous les objets sont toujours trop épais pour une vue complète, quel que soit l'objectif utilisé, et les zones de netteté sont toujours de largeur insuffisante. Il est donc nécessaire de combiner, fusionner, « composer » toutes les images nécessaires pour obtenir une image complète.



▲ Figure 4 : problème des zones de netteté et de flou en coupe ▲

Les objets que l'on voit sur les bords de l'image sont des artefacts complets : allongés de 40% par rapport à la « réalité », ils mesurent 28 micromètres au lieu de 20 !



▲ Figure 5 : vue 3D des zones de netteté et déformation optiques sur les bords de la zone observée, la zone verte est la seule qui limite les déformations de l'objet.

2. Utiliser et paramétrer les logiciels de combinaison d'images

Trois ou quatre logiciels seulement émergent d'une bonne dizaine : les softwares d'astronomie, parfois extraordinaires, sont inadéquats ici.

Helicon Focus****, 6.0.18, 2013, rapide comme l'éclair : <http://www.heliconsoft.com/>

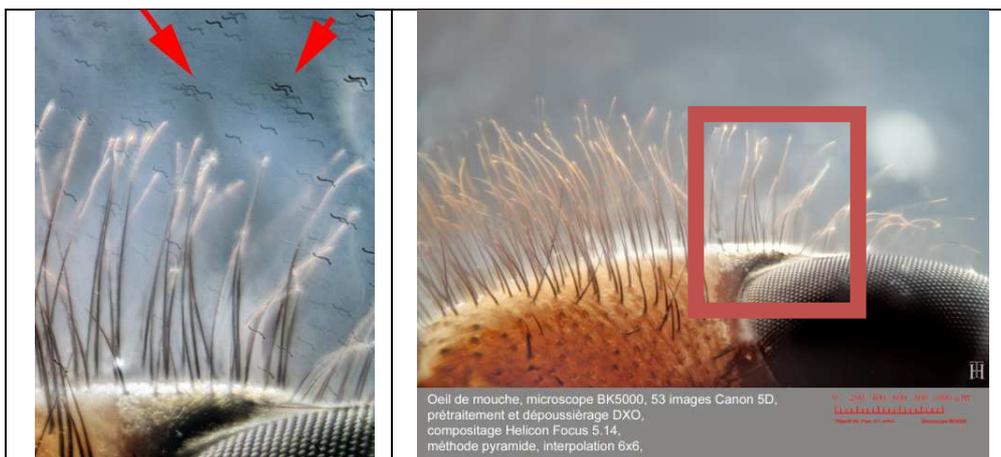
Zerene Stacker*** 1.04, 64bits, 2013 : <http://zerenesystems.com/cms/stacker>

Combine ZP**, 2010 : <http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk/>

Picolay**, 27/10/2014 : <http://www.picolay.icbm.de/>

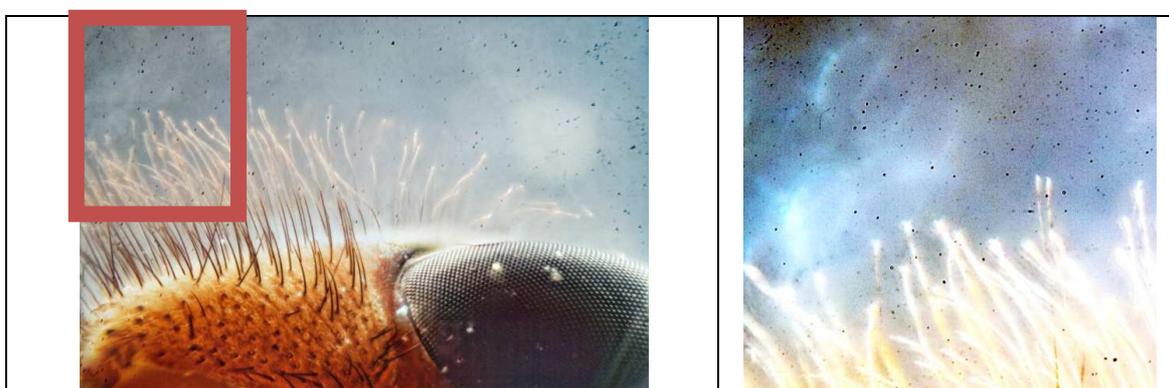
Situation analysée en 2014 mais qui change rapidement : Picolay n'était pas du tout bon au début, mais il est très efficace en 2014 ; de même Combine ZP a récemment implémenté la méthode pyramide, très efficace.

Le compositage permet d'empiler les images en ne gardant pour chacune que la zone de netteté. Les essais doivent être nombreux ; les paramétrages peuvent être délicats car ils créent parfois des artefacts : ici, artefacts des paramètres par défaut (!) de Hélicon (voir la figure 6).



▲ Figure 6 : compositage d'une partie d'œil de mouche, 54 images, avec et sans artefacts de paramétrage ▲

3. Résoudre les problèmes posés par les poussières et le bruit de fond



▲ Figure 7 : images avec les poussières du capteur, vue d'ensemble et détail, voir figure 6 b sans les poussières ▲

Il existe plusieurs solutions :

- ++ travailler « à la main », poussière après poussière ;
- ++ même procédure, mais une fois pour toutes, avec un logiciel *ad hoc* qui va traiter toutes les images ;
- ++ enfin, la « carte de poussière » appelée plage de lumière uniforme en astronomie.

Pour cette dernière démarche le succès n'est pas toujours au rendez-vous. Le bruit de fond peut être soustrait par l'appareil photo.

4. Intégrer une échelle graphique à l'image sans calcul

Cette démarche est explicitée dans un autre article. Piximètre a fortement progressé : c'est devenu un outil remarquable d'analyse. Image J possède des fonctions identiques, mais moins facilement accessibles que Piximètre.

5. Problèmes non ou mal résolus

Les reflets, le nettoyage du fond dans les zones où poils et cheveux sont présents.



▲ Figure 8, les reflets sur une tête de sauterelle ; à droite solution grâce à la lumière polarisée ▲

III. Conclusion : belles images, atouts et contraintes du numérique

L'engagement en matière de traitement d'image numérique, peut être important du point de vue financier comme du point de vue du « temps passé » mais le résultat en vaut la peine ; il est devenu à la portée de l'amateur, du début à la fin de la chaîne.

Le matériel indispensable, à mon avis :

Un microscope « adapté » ; avec :

- une tête trinoculaire ;
- capacités en transmission, épiscopie et lumière polarisée.

Un « bon » appareil photo Reflex, avec :

- capteur 24x36 ;
- mode raw (pas de mode jpeg avec pertes trop conséquentes) ;
- soustraction du bruit programmable ;
- blocage du miroir ;
- priorité à la vitesse ;
- télécommande.

Des programmes bien choisis :

- un « bon » traitement d'image : Image J, Gimp ou Photoshop ;
- un « bon » logiciel de prétraitement pour l'extraction des raw ; Raw Therapee, Camera Raw, DXO, etc ...,
- un des trois « bons » logiciels de compositage, Helicon Focus, Zerene Stacker, Combine ZP.

Beaucoup de transpiration ... Et la « belle image » est au bout du chemin.



Figure 9 : compositage de 120 images, en épiscopie ; microscope obj. 4x

Ces cinq pages constituent un résumé de l'exposé présenté à l'occasion du séminaire de Massembre, en mars 2014.

La version Powerpoint, plus complète en imagerie que cet article, est disponible sur Internet à l'adresse : <http://bit.ly/Hatt-Massembre-2014>.

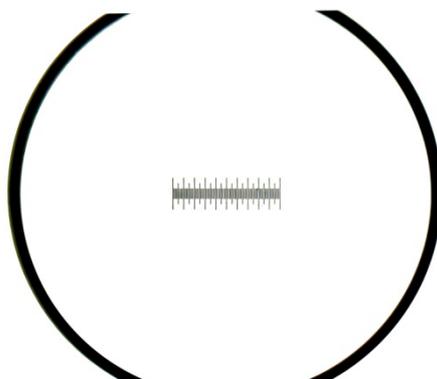
Les illustrations sont toutes issues des travaux personnels de l'auteur.

Une collection des images réalisées entre 2010 et 2014 est disponible à l'adresse : <http://bit.ly/Hatt-Microscopie-2010-2014>

Comment intégrer une échelle graphique à l'image de microscopie, sans aucun calcul

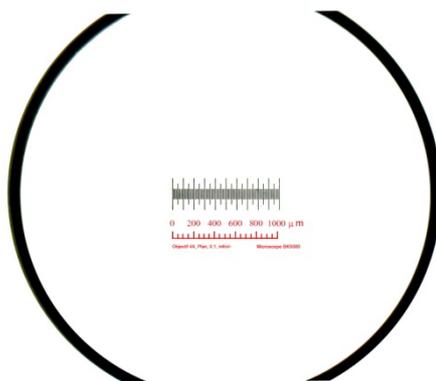
Thierry Hatt

1. Photographier la lame étalon avec chaque objectif du microscope



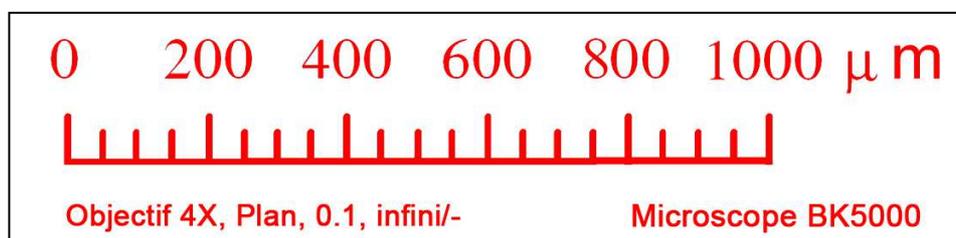
▲ Figure 10 : photographie de la lame étalon avec l'objectif 4x ▲

2. Dessiner l'échelle dans un logiciel à couches sur un calque séparé



▲ Figure 11 : dessin sur un calque séparé de l'échelle graphique ▲

3. Sauvegarder l'échelle graphique comme une « imagerie » séparée

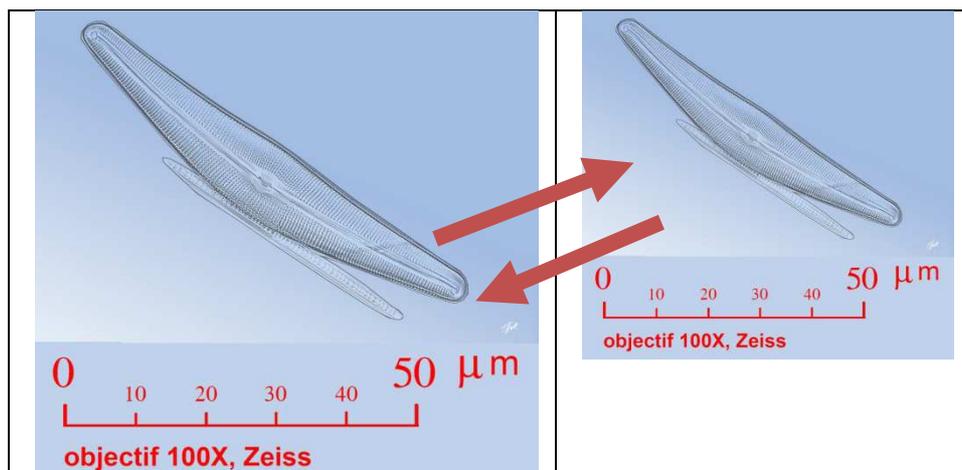


▲ Figure 12 : imagerie de l'échelle 4x ▲

L'échelle de 1000 micromètres, photographiée avec le Canon 5D à travers l'objectif 4x et une loupe 2x, représente 839 pixels, une fois collée sur toutes les images suivantes :

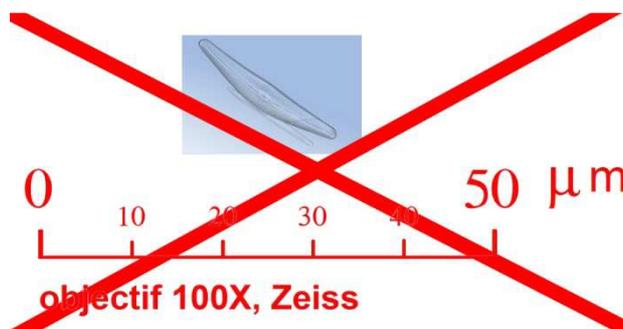
1. sous réserve de ne PAS changer séparément la taille ni de l'image ni de l'échelle ;
2. on peut modifier la taille de l'image en même temps que celle de l'échelle après avoir collé celle-ci dans l'image ;
3. extraction de parties de l'échelle ou de l'image : cela ne change rien.

4. On peut réduire/augmenter **SIMULTANEMENT** échelle graphique et image



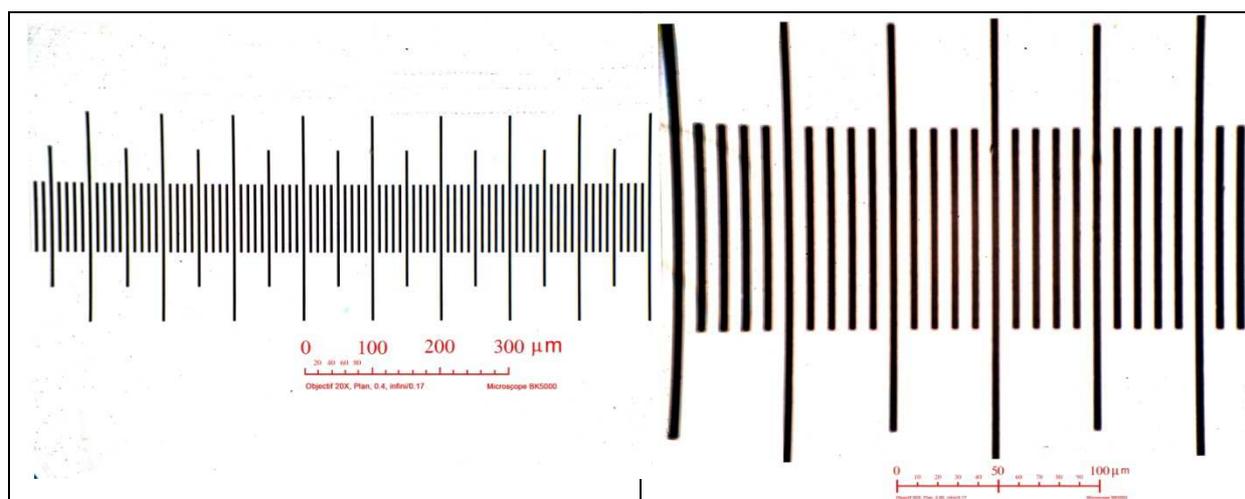
▲ Figure 13 : changement d'échelle par changement de taille simultané de l'échelle graphique ET de l'image ▲

4. On ne peut **PAS SEPARÉMENT** réduire/augmenter échelle et image



▲ Figure 14 : interdiction de changer séparément la taille de l'échelle graphique et de l'image ▲

5. Faire le même travail de dessin pour tous les objectifs

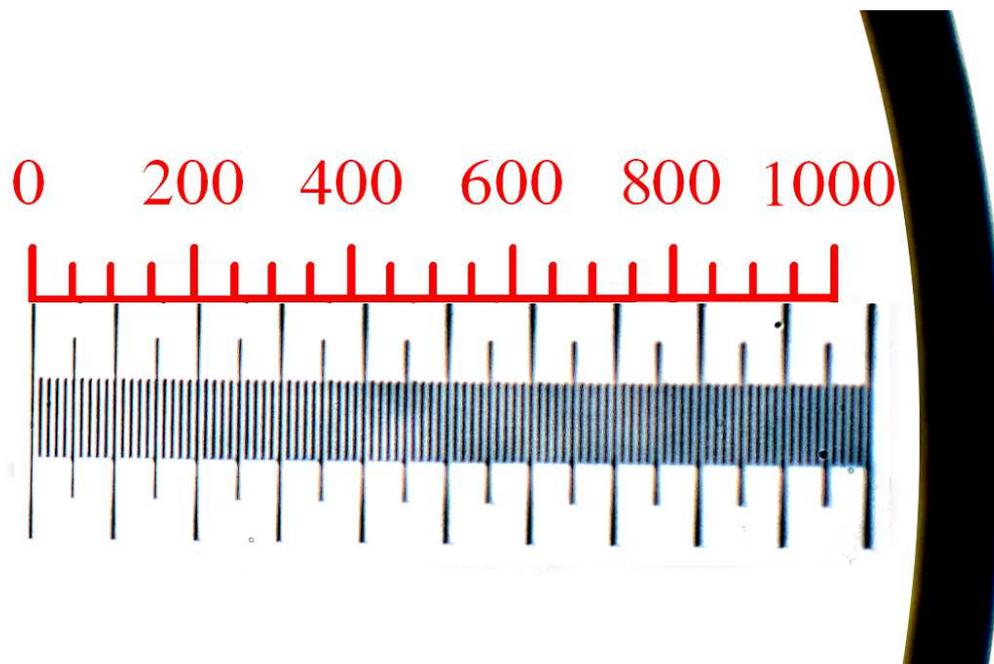


▲ Figure 15 : exemple des objectifs 20x et 60x : remarquer la déformation de l'image sur les bords en 60x ▲

Les échelles, stockées sur disque, sont disponibles une fois pour toutes.

6. Problème sur les bords de l'image : l'échelle n'est exacte qu'au centre

Sur les bords, la lame étalon photographiée est trop longue de près de 40 micromètres par rapport à l'échelle au centre. Exemple de l'objectif 4X, on parle de « non linéarité ».



▲ Figure 16 : déformation sur les bords de l'image ▲

7. Pour calculer des longueurs, on peut poser des calculs ou bien utiliser PIXIMETRE !

Règle de trois, quatrième proportionnelle, produit croisé selon votre éducation initiale....

Calcul d'une longueur quelconque à partir de l'échelle graphique

L = longueur de l'objet à mesurer
 R = longueur connue de l'échelle graphique

$$L (\mu\text{m}) / L (\text{pixels}) = R (\mu\text{m}) / R (\text{pixels})$$

$$L (\mu\text{m}) / 303 \text{ pixels} = 50 \mu\text{m} / 1386 \text{ pixels}$$

$$L (\mu\text{m}) = (R(\mu\text{m}) * L(\text{pixels})) / R (\text{pixels})$$

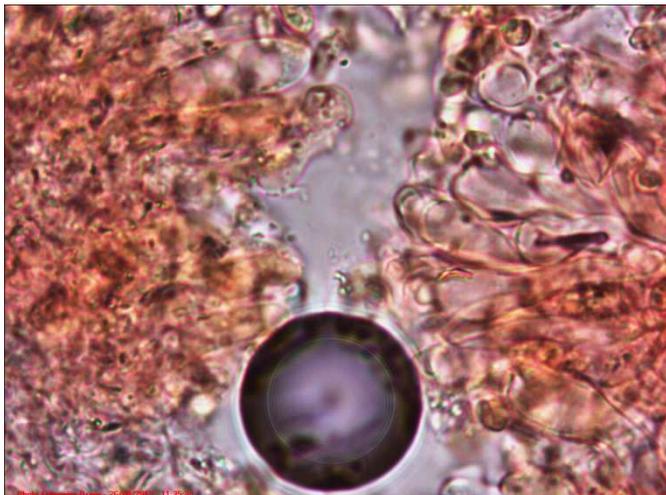
$$L (\mu\text{m}) = (50 \mu\text{m} * 303 \text{ pixels}) / 1386 \text{ pixels} = \mathbf{10.93 \mu\text{m}}$$

OU BIEN **PIXIMETRE**

Cet exposé constitue la mise à jour de l'article qui avait été publié à l'occasion du séminaire précédent.

Voir, **LECOMTE M.**, 2012 - Séminaire de *Microscopie tome 1*, AMFB, pp. 55 - 57.

Les « accidents » de manipulation en microscopie



◀ LA BULLE D'AIR

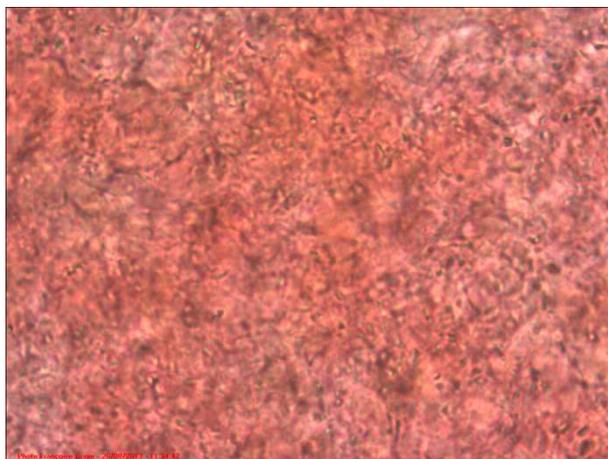
Il s'agit d'un problème très fréquent, qui se présente souvent dans les divers cas suivants :

- + La pièce étudiée est trop épaisse.
- + Certains éléments de la pièce contiennent naturellement de l'air.
- + Il y avait des bulles dans le colorant ou le milieu d'observation.
- + La LCO a été mal déposée (ne jamais la laisser tomber sur la LPO mais la déposer délicatement en biais).

Il est possible d'éliminer une partie de ce problème en utilisant un milieu d'observation moins fluide que l'eau ; nous conseillons l'eau glycérinée, l'hydrate de chloral,

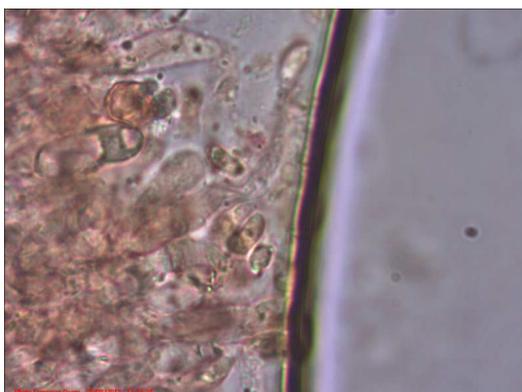
l'acide lactique, le CLP, le PVAL, le lactoglycérol ... ; si le problème persiste, il suffit alors de chauffer avec précaution et les bulles vont s'évacuer +/- facilement (ATTENTION : ne pas laisser bouillir !).

Pour les milieux de montage définitif, la difficulté est plus grande : seul le PVAL, coloré ou non, permet d'évacuer les bulles par chauffage. Dans le baume du Canada, les petites bulles se réduisent naturellement au fil des semaines, car ce produit est très avide d'oxygène. Dans les autres milieux synthétiques (Entellan, Aquatex, Histolaque), il n'est pas possible de les faire disparaître, et leur manipulation demande des précautions extrêmes.



UNE COUPE OU PRÉPARATION TROP ÉPAISSE ▶

La préparation est alors illisible, empâtée, peu transparente, et doit être impérativement recommencée.



Cette ligne continue apparaît lorsque le milieu d'observation disparaît par évaporation, provoquée notamment par la chaleur dégagée par l'éclairage, ou simplement par évaporation naturelle, après quelques dizaines de minutes.

Pour éviter ce problème, il faut choisir un milieu plus visqueux. Cette situation peut se présenter également quand un des composants du milieu est volatile (alcool dans certains colorants, ou ammoniac dans le RC p. ex.).

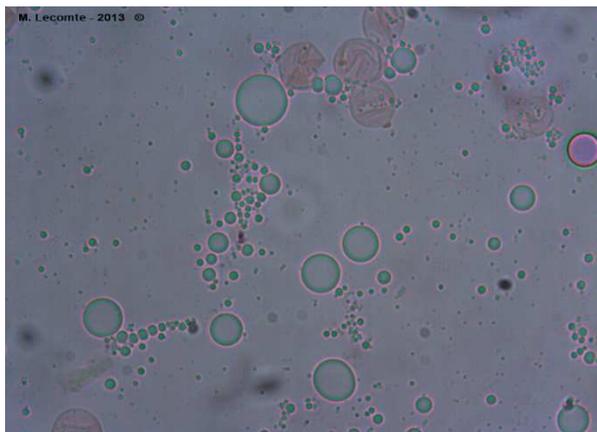
◀ ◀ DES ZONES DE RETRACTION



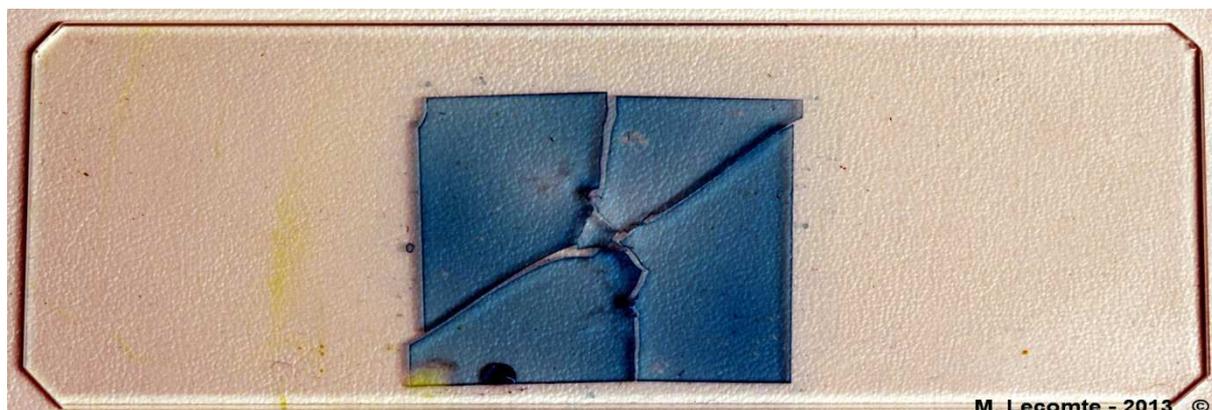


Cette zone de retrait peut également apparaître sur des préparations définitives, réalisées avec des milieux à solvant aqueux (PVA, conservateur de Hoyer), pour diverses raisons :

- ++ Le milieu a été trop dilué.
- ++ Le séchage a été trop rapide (ne pas exposer en plein soleil ni forcer le séchage sur une plaque chauffante).
- ++ Le produit de lutage est trop avide d'eau.



LA POLLUTION PAR L'HUILE D'IMMERSION ▲ ▲ est assez fréquente lorsqu'on travaille avec des LCO non adaptées à l'objectif utilisé (voir explication en bas de page). Si on dispose d'objectifs classiques, il est d'usage d'employer des LCO de 18x18 ou 20x20 mm. Il est alors impératif de placer la pièce à observer bien au centre de la LPO et de la LCO afin de placer la goutte d'huile au même endroit. Si par inadvertance, on déplace l'ensemble vers la bordure de la LCO, l'huile va pénétrer inmanquablement sous la lame, avec le résultat désastreux illustré ci-dessus.



BRIS DE LA LCO ▲ : cette mésaventure survient généralement lorsqu'on étudie des objets prélevés dans la nature et non suffisamment nettoyés ; il suffit qu'un grain de sable subsiste sur le spécimen pour voir la LCO se briser lors de la délicate opération de dissociation (toujours pratiquer avec un objet non métallique : gomme, crayon, manche plastique ...).

RAPPORT ENTRE LCO ET OBJECTIFS

Les microscopes de fabrication standard sont munis d'objectifs à immersion présentant un diamètre relativement petit (1 à 1,5 cm), à surface de contact réduite (2 à 3 mm) et lentille frontale de 1 ou 2 mm de Ø ; l'usage est d'utiliser avec eux des LCO 18x18 ou 20x20, sans problèmes, et cela sans inconvénient notable.

Par contre, sur des microscopes haut de gamme, dont les objectifs à immersion présentent des ouvertures numériques supérieures à 1,25, on va se trouver devant d'autres cas de figure. Le Ø des objectifs varie de 3 à 5 cm et la surface de contact est beaucoup plus grande, avec une lentille frontale de 5

à 10 mm. En outre, le fabricant conseille d'utiliser une huile nettement moins fluide que l'huile synthétique classique.



M. Lecomte - 2013 ©



M. Lecomte - 2013 ©

Dans ce cas, si on utilise des LCO de 18² ou 20², on va rencontrer 2 problèmes majeurs, vu la très forte adhérence sur la LCO :

++ ▲ Avec un milieu d'observation fluide, la LCO va glisser sur la LPO, en suivant les mouvements XY du chariot, rendant toute observation impossible.

++ ◀ La LCO va se détacher de la LPO, en suivant le mouvement vertical de la vis micrométrique.

Il existe deux possibilités de contrer ces inconvénients :

++ Utiliser des LCO plus grandes : 22x22, 24x24, 24x32 ou 24x40.

++ Déposer une goutte de paraffine aux 4 coins de la LCO lorsque la préparation, est finalisée. ▼



M. Lecomte - 2013 ©

◀ **FORMATION DE CRISTAUX** de formes diverses.

Ce phénomène est assez fréquent avec nombre de colorants à solvant non aqueux (ammoniacal ou alcool), lorsqu'on laisse la préparation se dessécher, notamment suite à une exposition prolongée à la chaleur de la lampe. Cela arrive beaucoup moins souvent avec un éclairage LED.

Mentionnons encore la **POLLUTION DES OBJECTIFS A SEC PAR L'HUILE D'IMMERSION.**

Cet accident arrive assez fréquemment sur les nouveaux microscopes à objectifs parafofocalisés à 45 mm, qui sont tous exactement de la même longueur. Si on touche la goutte d'huile avec la lentille frontale d'un objectif

non à immersion en tournant le révoluer, l'image devient floue et de mauvaise qualité. Il faut alors

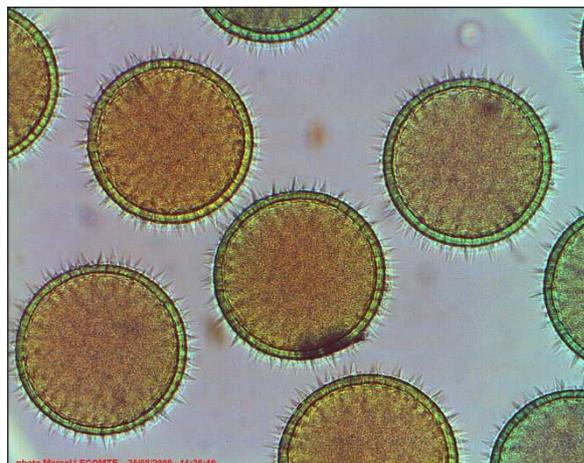
nettoyer soigneusement avec, par exemple, un mélange 50/50 d'éther sulfurique et d'alcool pur (conseillé par Zeiss) appliqué à l'aide d'un bâtonnet à oreilles.

POLLUTION DES OBJECTIFS PAR UN COLORANT

Cela arrive si on presse la lame montée avec un objectif non rétractable ; le milieu d'observation déborde et vient salir l'optique. Nettoyer comme ci avant.



Préparation intéressante de grains de pollen de rose trémière, où la LCO a été déposée avec prudence : les grains font près de 50 µm, mais n'ont pas éclaté. ▼



Apparition d'éléments étrangers dans la préparation due à une pollution du support ou des outils (ici, une écaille de papillon dans une sporée de *Laccaria proxima*). ►



◀ EJECTION DU CYTOPLASME DE LA SPORE OU DU GRAIN DE POLLEN.

Cette « bulle » de liquide cytoplasmique se produit sur du matériel frais, lorsqu'on presse trop sur la LCO.



◀ POLLUTION DE LA SPORÉE

Ce phénomène est fréquent si on ne prend pas la peine et le temps de séparer les récoltes dans un panier (utilisation de boîtes individuelles). Lors des manipulations et des chocs du transport, les spores se disséminent partout, et notamment sur les lames des champignons voisins. Ici, on a manifestement à faire à deux espèces différentes : une russule et un lactaire.

BIOLOGIE GÉNÉRALE

La cellule, élément de base d'un tissu végétal ou animal

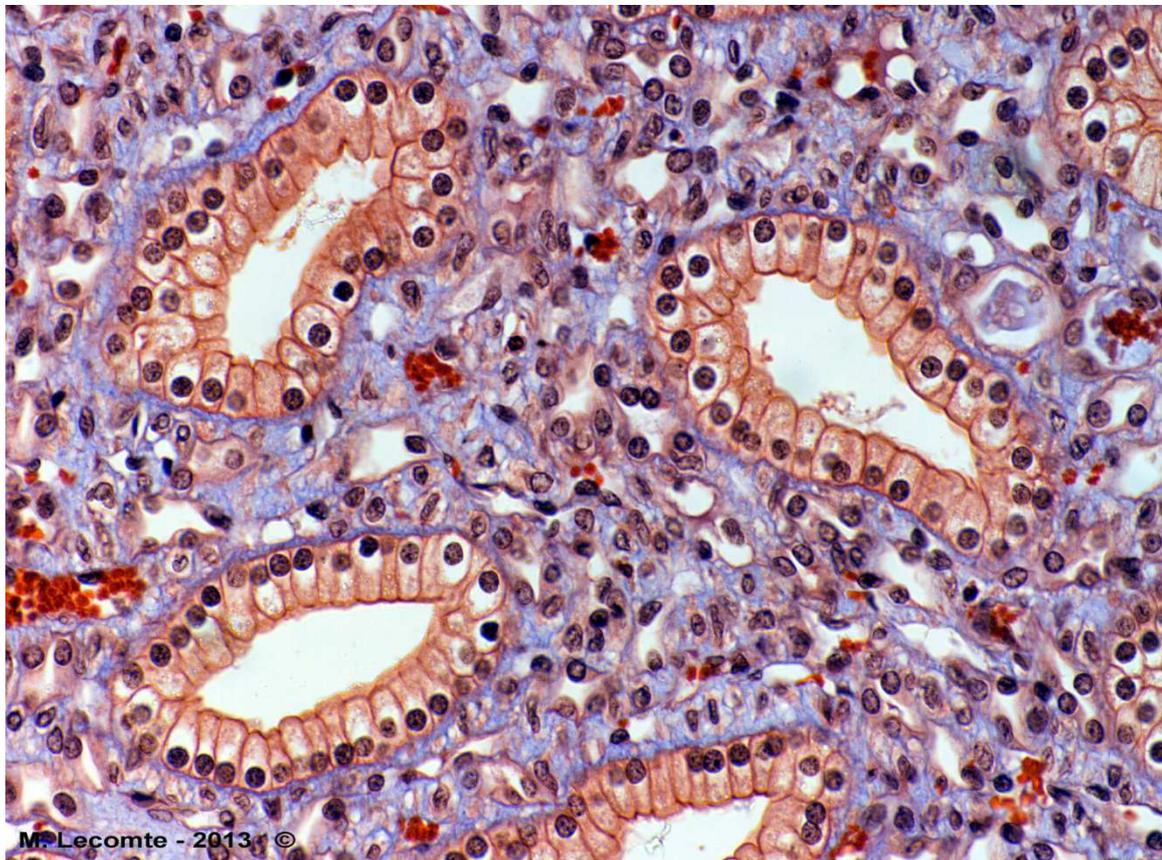
Chromatine et colorants

Épithéliums et téguments

Sang et phanères

Animalcules divers

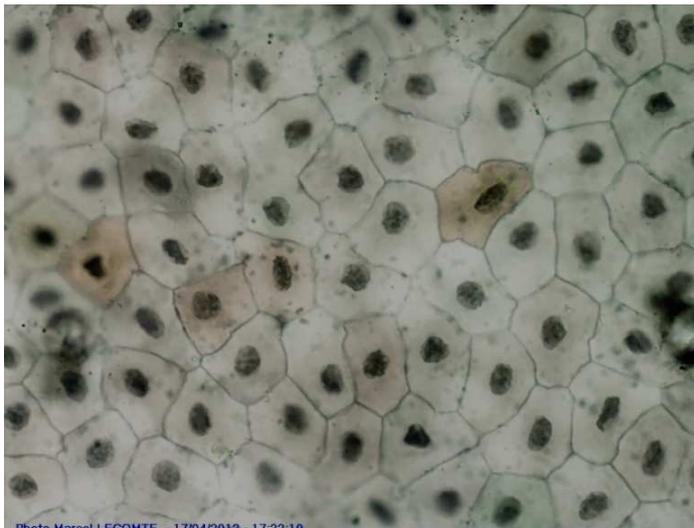
Colorations diverses



M. Lecomte - 2013, ©

Coupe dans un foie de lapin, avec hépatocytes (en bleuâtre) et canalicules biliaires, bordés par un épithélium massif.

La cellule, élément de base d'un tissu végétal ou animal



La cellule est l'élément basique qui constitue tous les tissus animaux ou végétaux. Elle est le centre d'une chimie très complexe ; elle est dite « eucaryote » lorsqu'elle contient un noyau.

LA CELLULE ANIMALE diffère sensiblement de la cellule végétale. Elle est de taille assez petite (50 μm en moyenne). Voici ses éléments ou organes constitutifs :

++ Un cytoplasme circonscrit par une membrane (c'est un milieu semi-liquide - le cytosol - qui baigne tous les organites cellulaires).

++ Une noyau, souvent bien visible (siège du patrimoine génétique) : il contient un ou des nucléoles, ainsi qu'un amas diffus de chromosomes, appelé chromatine.

++ Un réticulum endoplasmique lisse, ou granuleux (il « fabrique » des protéines).

++ Un appareil de Golgi (c'est une centrale de transformation, de tri et de réexpédition des protides et lipides).

++ De nombreuses mitochondries (elles produisent l'énergie de la cellule et sont responsables de la « respiration » cellulaire).

++ Des ribosomes (ils assemblent les acides aminés pour former des protéines).

++ Des lysosomes (ils contiennent des enzymes digestives servant à dégrader les macromolécules).

++ Des peroxysomes (ils assurent des réactions d'oxydation et sont alimentés par de l'oxygène moléculaire, qui joue le rôle de carburant).

++ Un centrosome (responsable de la formation du fuseau mitotique).

L'ensemble de ces cellules va former des tissus bien différenciés, assurant des rôles très précis.

- Le **tissu épithélial** : c'est un tissu de revêtement interne (muqueuse intestinale ...) ou externe (la peau ...) des organes et de l'organisme.
- Le **tissu musculaire**, lisse ou strié : il est composé de cellules contractiles et permet le mouvement.
- Le **tissu nerveux** : il transmet les informations diverses (influx) et est agencé en réseau très complexe de neurones et de cellules gliales (elles forment l'environnement de ces derniers, les soutiennent, les protègent, et produisent la myéline – voir p. 47).
- Le **tissu conjonctif** : il a un rôle de soutien et de « remplissage », comme le collagène, la graisse, le cartilage, les os, le sang...

LA CELLULE VÉGÉTALE est plus grande (200 μm en moyenne). En plus des organites mentionnés dans la cellule animale, elle comporte :

++ Des chloroplastes (ils contiennent la chlorophylle, élément essentiel de la photosynthèse, permettant de dégrader le carbone) .

++ Une grande vacuole (c'est la « poubelle » de la cellule, dont elle occupe 90 % de l'espace en fin de vie ; elle gère la turgescence de cette dernière). Sa membrane est appelée tonoplaste.

++ Une paroi extra cellulaire rigide et épaisse (composée de cellulose et de protéines, elle est tapissée par la membrane cellulaire et joue le rôle d'un squelette externe).



- ++ Des plasmodesmes, qui établissent un système de communication entre cellules adjacentes.
- ++ Il n'y a pas de centrosomes.

L'ensemble de ces cellules va former des tissus bien différenciés, assurant des rôles très précis.

Le **tissu épidermique**, ou épiderme : il constitue l'enveloppe externe de la plante et joue un rôle de protection des couches cellulaires internes.

- Le **tissu vasculaire** : il assure le transport de la sève dans toute la plante.
 - Celui qui transporte la sève brute est appelé xylème.
 - Celui qui distribue la sève élaborée est le phloème.
- Le **tissu assimilateur**, ou parenchyme : il s'occupe de la photosynthèse et du stockage des réserves (amidon).
- Le **tissu de soutien** :
 - Le collenchyme assure le soutien des parties en croissance de la plante.
 - Le sclérenchyme, à parois épaisses, sert de soutien général.



Photo M. Lecomte - 2012 ©

Cellules animales chez le ver de vase. ▲

▼ Cellules végétales d'épiderme d'oignon.

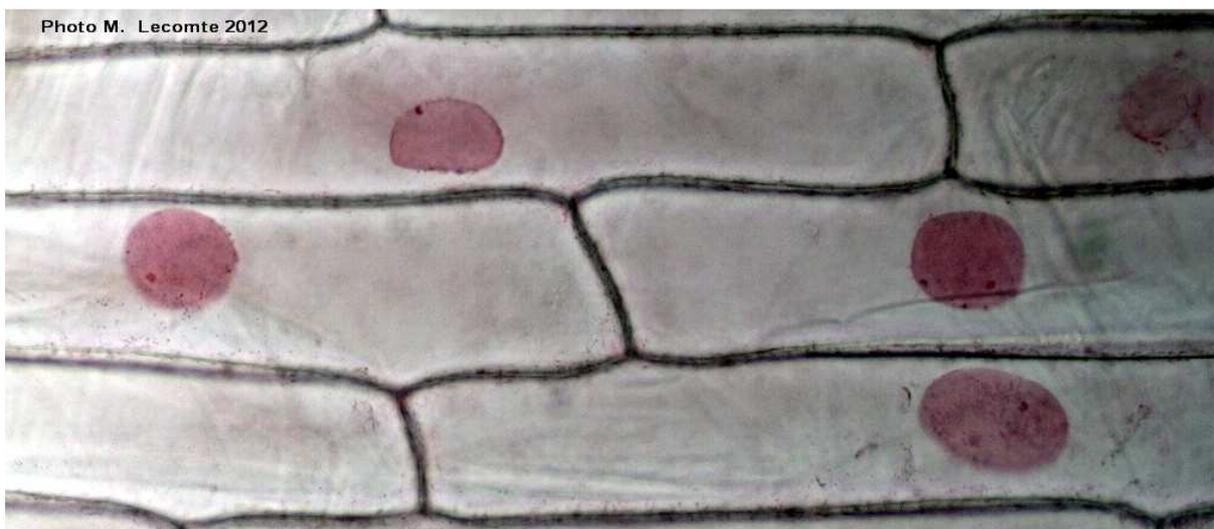
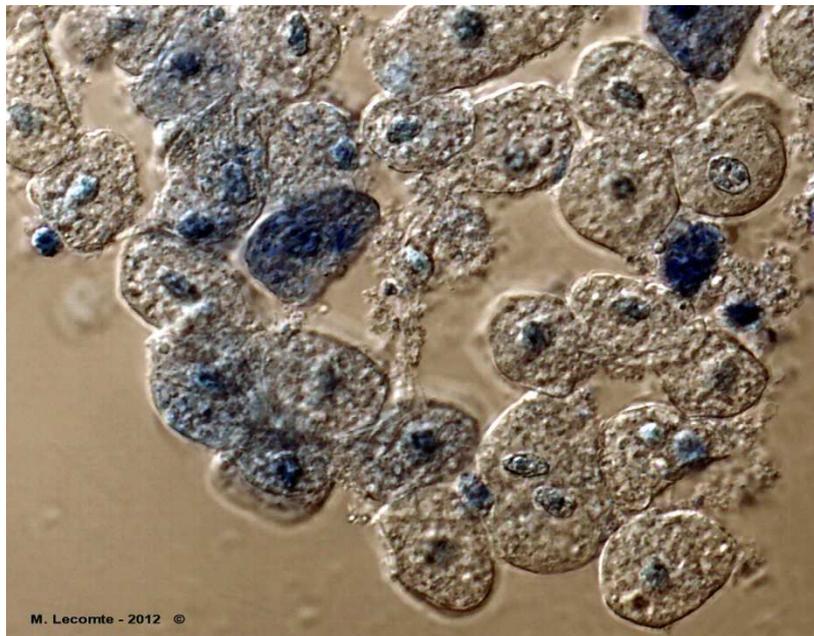


Photo M. Lecomte 2012

Observation des hépatocytes (cellules du foie)

Le foie frais constitue un matériel pratique pour l'observation microscopique des cellules animales. On peut utiliser indifféremment du foie de mouton, de porc, de veau ou de poulet. Une seule contrainte : le foie ne doit pas avoir été congelé, sous peine de voir les cellules exploser par cryolise.



◀ Cellules hépatiques observées en DIC 400x, avec noyaux colorés en bleu.

PRÉALABLE

Préparer du bleu de méthylène aqueux à 1% (dissoudre 1 g de bleu de méthylène en poudre dans 100 cc d'eau distillée). C'est un excellent colorant nucléaire.

MODE OPÉRATOIRE

+ Couper une tranche de foie et gratter la surface de la section avec une lame, de manière à obtenir un prélèvement de quelques mm³, permettant de couvrir une zone de 5 mm de côté sur une LPO.

+ Dissocier légèrement les cellules et couvrir d'une goutte

de bleu de méthylène, à laquelle nous ajoutons une goutte d'eau bidistillée.

La même préparation observée en lumière transmise. ►

++ Laisser agir pendant environ 3 minutes.

++ Pencher la LPO et l'égoutter sur un papier absorbant.

++ Rincer et faire de même pour évacuer le surplus aqueux.

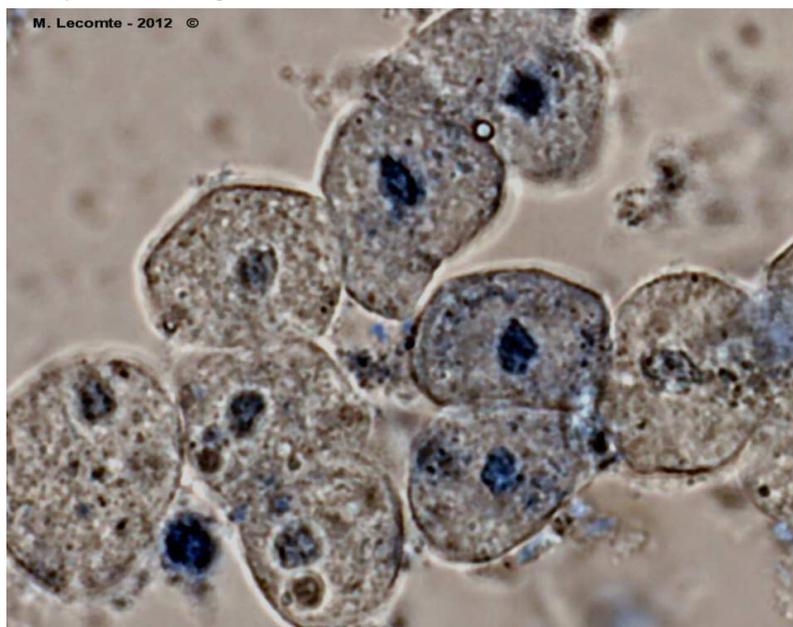
++ Éponger soigneusement les dernières traces d'eau.

++ Poser une 2^{ème} LPO ; bien écraser le prélèvement afin de le dissocier correctement, et permettre ainsi une bonne observation avec des objectifs à fort grossissement.

++ Séparer les deux LPO : vous obtenez ainsi 2 préparations exploitables, car des cellules sont présentes sur les deux lames.

++ Déposer une goutte d'eau glycinée (observation extemporanée) ou de glycérine pure (elle permet l'observation de la préparation pendant très longtemps, sans risque d'évaporation du milieu de montage) ; dans ce dernier cas, on peut luter au vernis à ongle afin de conserver le montage.

++ Poser une LCO de grande dimension 24x32 ou 24x40.



RÉSULTATS

Une multitude de cellules de forme irrégulière sont présentes dans la préparation : en effet, elles ne possèdent pas une paroi rigide, contrairement aux cellules végétales. Observer la forme et la taille des hépatocytes, la forme et le nombre de noyaux par cellule, vérifier la présence d'un nucléole, de granulations ... et chercher d'autres composants de la cellule (leur perception va dépendre fortement de la qualité de votre préparation, et ne sera possible qu'à fort grossissement).

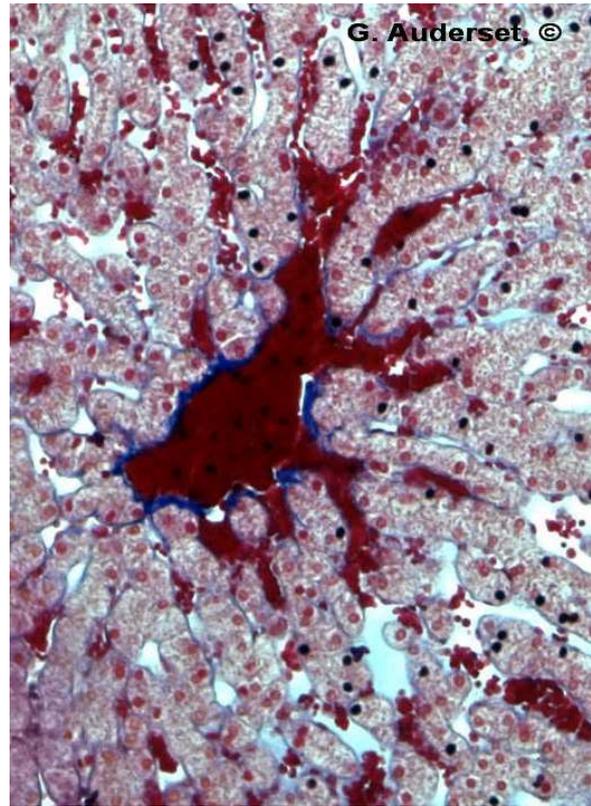


Photo M. Lecomte - 2012 ©

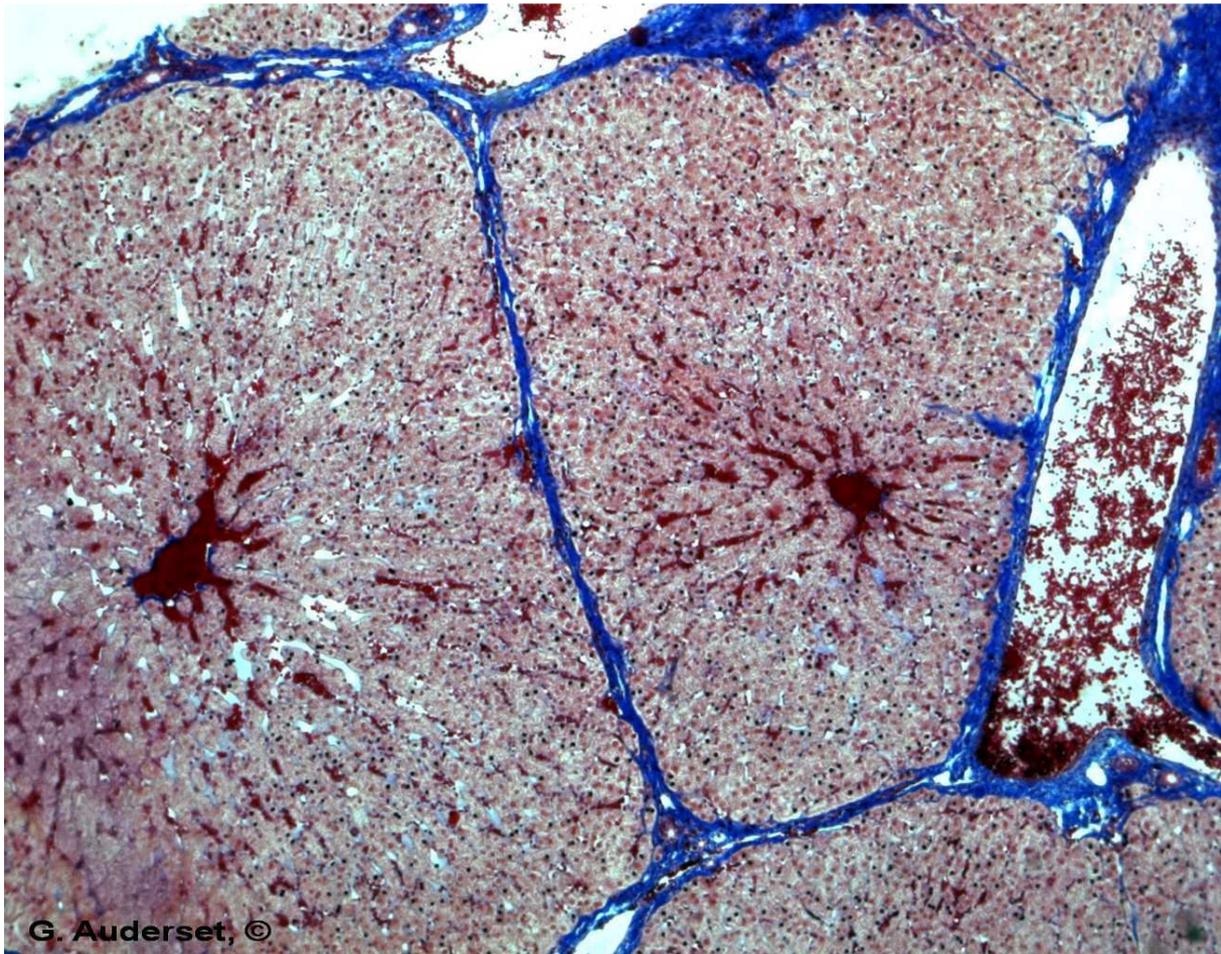
Photo d'un capillaire sinusoïde. ►►
Ces derniers sont peu visibles et bordés par un endothélium très discret ; on les identifie surtout par la présence d'hématies (globules rouges) qui circulent en direction de la veine centrolobulaire.

Photo de foie de porc montrant deux lobules (x50) - coloration trichrome de Mallory. ▼▼

◀ Une cellule avec deux noyaux, et filaments de chromatine bien visibles, de même que des granulations cytoplasmiques.



G. Auderset, ©



G. Auderset, ©

Chromatine et colorants

Un noyau cellulaire qui n'est pas en phase de mitose (duplication non sexuée d'une cellule) - on dit aussi « interphasique » - contient une substance qui peut être colorée très facilement par des colorants basiques : la chromatine.



◀ Chromatine bien visible dans le noyau d'une cellule épidermique de poireau.

En général, elle se présente sous la forme d'un réseau, d'un enchevêtrement de fibres ; mais parfois, elle peut prendre un aspect plus condensé ; les zones plus denses sont appelées "chromocentres". Elle contient environ 50% d'ADN et 50% de protéines.

Lors de la mitose, la chromatine disparaît et les

chromosomes apparaissent : ils sont vraisemblablement issus de sa condensation.

On peut la mettre en évidence par la coloration de Feulgen (voir page 63) ou par le test de Brachet.

La chromatine a une forte affinité pour de très nombreux colorants, comme l'hématoxyline par exemple, qui la colore en noir ; les colorants basiques comme le bleu de méthylène, le bleu de toluidine, le vert de méthyle acétique, le violet de gentiane ou la pyronine, génèrent une coloration en bleu-violet.

Le test de BRACHET

PRINCIPE EXPÉRIMENTAL

Le test de Brachet est basé obligatoirement sur la réalisation de deux préparations en parallèle :

++ Le Brachet « A » : c'est une préparation témoin, à laquelle on va appliquer une double coloration, en utilisant le vert de méthyle (colorant basique vert) et la pyronine (colorant basique rouge) : le nucléole et les granules du cytoplasme sont colorés en rouge et la chromatine en vert. L'ADN (acide désoxyribonucléique) est coloré en vert par le vert de méthyle, et l'ARN (acide ribonucléique) est coloré en rouge par la pyronine.

++ Le Brachet « B » : c'est une préparation identique, à laquelle on va appliquer le test.

→ Faire agir une ribonucléase (une enzyme hydrolysant l'ARN), ce qui va supprimer son affinité pour la pyronine ; en effet, cette enzyme dépolymérise les macromolécules d'ARN, et la substance résultante n'est plus pyroninophile.

→ Appliquer la double coloration vert de méthyle - pyronine.

→ Comparer la coloration obtenue avec celle du témoin. Suite à l'action de la ribonucléase, la coloration rouge a disparu du cytoplasme et du nucléole, tandis que la chromatine reste colorée en vert.

PRODUITS À PRÉPARER

1. Préparer une solution tampon acétate : mélanger 75 cc d'acide acétique glacial + 25 cc d'acétate de sodium. Ajuster à pH 4,1 avec de la soude.

2. Purifier le vert de méthyle dans ce tampon : dissoudre 0,5 g de colorant dans 100 cc de tampon. Laver au chloroforme dans une ampoule à décantation jusqu'à ce que toute couleur violette ait disparu. Laisser la solution ainsi purifiée dans un récipient ouvert, toute la nuit, jusqu'à élimination des vapeurs de chloroforme.

3. Préparer la solution définitive de double colorant : dissoudre 0,1 g de pyronine Y dans 100 cc de la solution tamponnée de vert de méthyle. Conserver au frigidaire dans un flacon bien fermé : la solution se conserve des mois. Porter à la température de la pièce avant usage.

MODE OPÉRATOIRE

- Réaliser des coupes les plus fines possible (l'idéal serait de travailler sur des coupes réalisées au microtome de Minod, après inclusion à la paraffine (voir le détail du processus en page 16 ou 23).
- Fixation avec le fixateur de Carnoy, ou à l'alcool méthylique absolu.

Test de Brachet A :

- Colorer la coupe dans le mélange vert de méthyle-pyronine Y pendant 2 à 5 minutes.
- Rincer à l'eau distillée durant 10-15 secondes.
- Sécher rapidement au papier absorbant.
- Plonger immédiatement dans un mélange alcool butylique tertiaire-alcool absolu (3-1) en agitant constamment pendant 30 secondes.
- Rincer rapidement au xylol.
- Passer dans 2 bains successifs de xylol pendant 5 minutes chacun.
- Monter avec BC, Eukitt, Néo-Entellan ...

Test de Brachet B :

- Plonger une coupe dans une solution à 0,1% de ribonucléase dans l'eau distillée, à la température de la pièce, pendant 1 heure. Puis on effectue le test A comme précédemment.

RÉSULTATS

ADN : coloration verte.

ARN : coloration rouge. Si cette coloration rouge n'apparaît pas après action de la ribonucléase, il s'agit certainement d'ARN.

REMARQUES

- ++ Attention ! Les parois des cellules végétales fixent également la pyronine.
- ++ Le vert de méthyle n'est pas un colorant spécifique de l'ADN. Utilisé seul sur des cellules non altérées, il colore à peu près tout, et en particulier la paroi, qui contient de la cellulose, et d'autres sucres non celluloses comme les hémicelluloses, les pectines et la lignine. C'est pour cela qu'il faut lui associer un colorant complémentaire, afin de le rendre plus spécifique, plus « électif »... ou alors, utiliser un extrait dans lequel on suppose qu'il n'y a que de l'ADN.
- ++ Un exemple : si on expérimente in vivo sur des cellules d'épiderme végétal (épiderme interne des écailles d'oignon), le vert de méthyle, associé à la fuchsine basique, ne colore électivement que les noyaux : pas la paroi, ni le cytoplasme, ni les nucléoles.
- ++ Il existe des méthodes de mise en évidence très spécifiques, mais elles nécessitent des moyens d'investigation plus élaborés, comme la coloration par le DAPI¹⁸ et l'observation avec un microscope à fluorescence, ou l'utilisation d'un spectrophotomètre UV (inaccessible pour nous).

¹⁸ Le DAPI ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole est une molécule fluorescente, capable de se lier fortement à l'ADN. Quand le DAPI absorbe la lumière UV, il émet une fluorescence bleue brillante, ce qui permet de détecter l'ADN et de le quantifier.

Extraction de l'ADN chez l'oignon (*Allium cepa*)

L'extraction de l'ADN est une manipulation +/- complexe (selon l'utilisation qui en sera faite) qui permet d'isoler et de mettre en évidence l'ADN de cellules animales ou végétales. La technique utilisée permet de mettre assez simplement en évidence une masse d'ADN, communément appelée « méduse » par les laborantins et les biochimistes, et qui peut être colorée avec différentes techniques, telles la méthode de Feulgen, ou l'utilisation du vert de méthyle acétique.

On peut également réaliser cette expérience avec les extrémités des pommes d'un chou fleur.



1ÈRE TECHNIQUE (la plus simple)

→ Peler l'oignon avec soin et retirer toutes les écailles sèches ou défraîchies.

→ Couper l'oignon en petits dés.

→ Placer ces derniers dans un mortier avec 10 cc d'eau bidistillée.

→ Ajouter 5 g de chlorure de sodium (on peut le remplacer par du gros sel de cuisine) : cela va faciliter le broyage et augmenter la dissolution de l'ADN.

→ Broyer avec le pilon jusqu'à obtention d'un mélange homogène et limpide (l'ADN est soluble dans l'eau).

Une solution rapide et efficace consiste à utiliser un mixer à hélice.

→ Ajouter 1 g de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), un détergent industriel et bien mélanger avec le pilon ; on peut aussi utiliser quelques gouttes de détergent pour vaisselle. Ces produits vont détruire les membranes des structures cellulaires et l'enveloppe des noyaux.

→ Placer 1 compresse de gaze dépliée dans un entonnoir.

→ Verser le broyat pâteux et filtrer afin de recueillir quelques cc du filtrat dans une éprouvette graduée (on peut faciliter la chose en pressant doucement les compresses pour faciliter la filtration).

→ Estimer avec précision le volume de filtrat dans l'éprouvette et y ajouter un volume double d'éthanol à 95°. Cette opération s'avère délicate : faire couler lentement l'alcool éthylique le long de la paroi (l'utilisation d'une pissette est conseillée) ; surtout, ne pas agiter le tube.

→ Après quelques dizaines de secondes, une pelote blanchâtre nacréée apparaît dans l'éthanol : c'est l'ADN qui précipite dans l'alcool. C'est cela qu'on appelle la méduse.

→ Récupérer délicatement la pelote d'ADN à l'aide d'une baguette de verre, et la placer dans un verre de montre.

→ Ajouter quelques gouttes de vert de méthyle, et laisser agir durant une minute.

→ Rincer à l'eau bidistillée pour éliminer le surplus de colorant. La méduse est colorée en bleuâtre.

→ Prélever un fragment et observer au microscope.





Photo 1 (page précédente) : le mortier avec le broyat en cours.

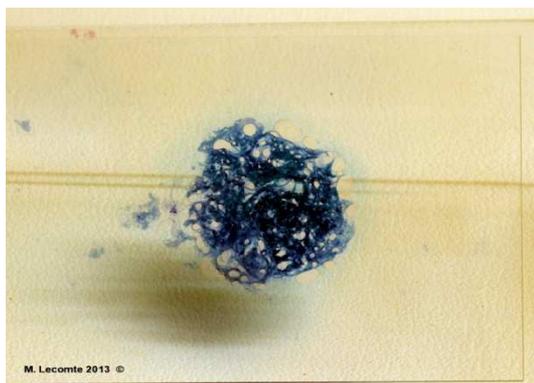
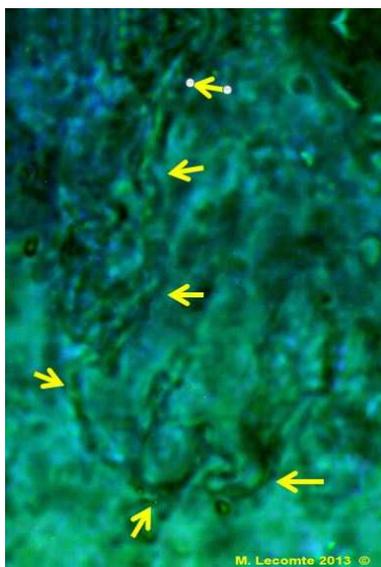


Photo 2 (page précédente) : l'éprouvette avec la zone de séparation très distincte entre le filtrat et l'éthanol à 95° ; la méduse s'est formée et a migré vers la surface.

Photo 3 : la méduse en formation dans la zone de contact des deux liquides.

Photo 4 : les filaments d'ADN, colorés en bleu, et étalés sur une LPO.



◀ le filament d'ADN, sinueux et tortueux, est nettement visible.

2ÈME TECHNIQUE (plus longue, mais plus efficace)

PRÉALABLE

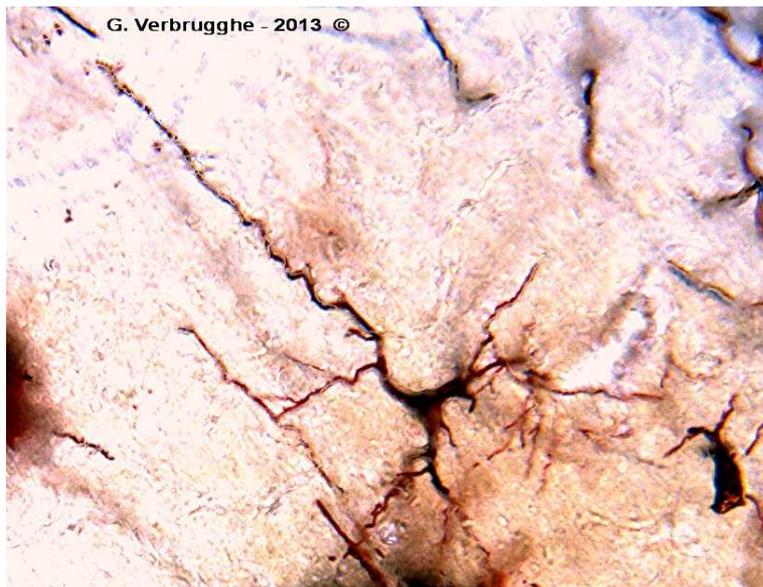
- ++ Placer un mortier et un pilon au surgélateur durant plusieurs heures (le froid a la propriété de neutraliser fortement la molécule responsable du larmolement provoqué par l'oignon).
- ++ Préparer 20 cc de liquide d'extraction (solution aqueuse d'acide acétique glacial à 25 %, additionnée de 10 g de chlorure de sodium), et le conserver au frigidaire, à 4°C.
- ++ Préparer 40 cc d'éthanol à 95° (liquide de précipitation).
- ++ Se procurer un oignon de belle taille.

MODE OPÉRATOIRE

- + Enlever la cuticule sèche du bulbe.
- + Trancher l'oignon en petits dés.
- + Passer le tout au mixer.
- + Verser la mixture dans le mortier très froid.
- + Avec le pilon, terminer éventuellement de broyer le contenu jusqu'à obtention d'une purée épaisse.
- + Ajouter les 20 cc du liquide extracteur (il est fortement conseillé de travailler sous hotte, vu la présence d'acide acétique).
- + Bien mélanger le tout.
- + Verser le contenu du mortier sur un morceau de gaze, en double couche, placé sur un grand entonnoir.
- + Récolter le liquide dans un flacon étroit (cela va prendre quelques minutes).
- + Presser avec les mains (gants fortement conseillés) la gaze contenant la purée, de façon à bien extraire tout le liquide.
- + Verser lentement les 40 cc d'éthanol, en inclinant le flacon, afin que les deux liquides (on va parler de « phases ») se mélangent le moins possible.
- + Un précipité se forme entre les 2 phases.
- + A l'aide d'une tige en verre, récupérer la méduse blanchâtre et gluante qui apparait entre les deux phases, et la placer dans un verre de montre → elle contient des filaments d'ADN.
- + Ajouter quelques gouttes de vert de méthyle, et laisser agir durant une minute.
- + Rincer à l'eau bidistillée pour éliminer le surplus de colorant. La méduse est colorée en bleuâtre.
- + Prélever un fragment et observer au microscope.

NB : les amas récoltés contiennent également des protéines et d'autres constituants cellulaires, en plus des filaments clairement visibles.

Les neurones du cortex



◀ Neurone pyramidal.

PRÉALABLE

Se procurer une cervelle de porc ou de mouton.

ATTENTION : cela se corrompt en quelques heures, même au frigidaire.

MODE OPÉRATOIRE

++ À l'aide d'un scalpel, inciser les membranes fines qui entourent la substance grise, c'est-à-dire la partie externe du cerveau, appelée cortex.

++ Prélever un petit fragment, de l'ordre de 1 mm³.

++ Déposer sur une LPO et écraser délicatement.

++ Colorer au bleu de méthylène (1 à 2 gouttes), durant 2 à 3 minutes.

++ Poser une LCO et dissocier à nouveau.

++ Éliminer l'excès de colorant autour de la LCO avec du papier absorbant (éventuellement, rincer en introduisant une goutte d'eau par capillarité, sur le côté de la LCO).

++ Observer à 100x.

RÉSULTATS

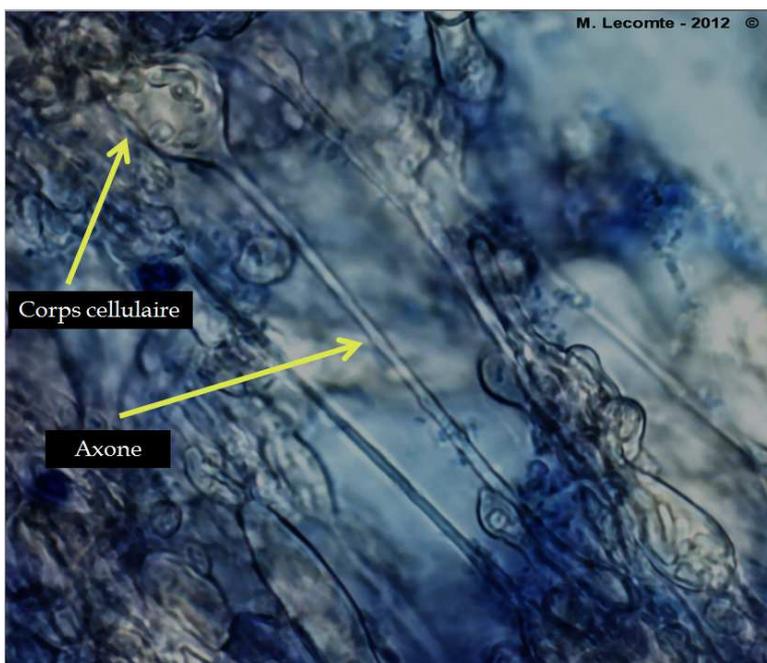
++ Le corps cellulaire est souvent de forme pyramidale, caractéristique du cortex.

++ A l'intérieur des cellules nerveuses, on trouve un gros noyau présentant un nucléole très coloré.

++ Dans le cytoplasme, on observe des granulations de densité variable : les corps de Nissl, riches en ARN.

++ On observe également des prolongements cylindriques : les axones ; et d'autres qui vont en s'amincissant : les dendrites.

++ Entre les neurones se trouvent des petites cellules de soutien, environ 10x plus nombreuses : les cellules de la névroglie¹⁹, ou cellules gliales.



¹⁹ Tissu interstitiel du système nerveux situé entre les neurones (cellules nerveuses), qui joue un rôle de soutien et d'isolation à leur égard ; elle intervient dans les échanges entre le sang et le milieu cérébral, afin de lui fournir des nutriments.

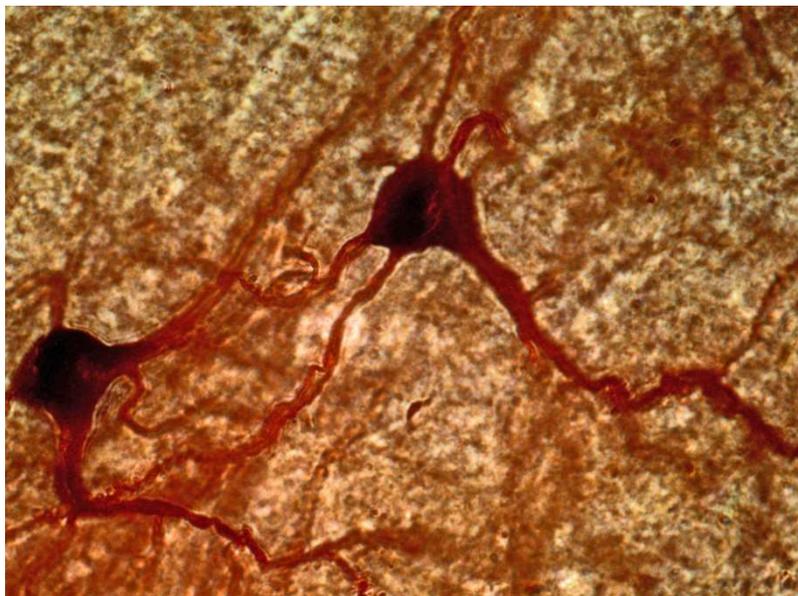
« La névroglie est un tissu de soutien situé à l'intérieur de l'encéphale et de la moelle épinière. Quatre types de cellules la constituent : les cellules épendymaires, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales.

Les cellules épendymaires tapissent l'intérieur des cavités contenant le liquide cébrospinal. Les astrocytes, cellules en forme d'étoile, assurent une fonction de soutien, de protection et d'isolement des neurones, contribuant aussi à la cicatrisation du tissu nerveux. Les oligodendrocytes, petites cellules, sont responsables de la formation des gaines de myéline autour des prolongements des neurones. Les cellules microgliales sont des monocytes (variété de globules blancs) qui sont entrés dans le tissu nerveux et se sont transformés en s'adaptant à leur nouveau milieu. En cas d'agression du tissu nerveux, ces cellules microgliales sont activées et se muent en macrophages (gros globules blancs), capables de nettoyer le tissu par phagocytose. » (Définition donnée par l'Encyclopédie Larousse).

Protocole de la coloration de Golgi (silver chromate method)

La méthode de Golgi, ou méthode du nitrate d'argent, est une technique permettant de mettre en évidence les neurones du système nerveux. Elle a été initiée en 1873 par Camillo Golgi (1843-1926), un neuropathologiste italien qui, au départ, l'avait appelée « reazione nera » (la réaction noire) ; ce dernier (associé à Santiago Ramón y Cajal) a reçu le prix Nobel de médecine en 1906.

Cette remarquable technique de traitement des chaînes nerveuses m'a été enseignée par Guido Verbrugghe²⁰ ; si elle ne présente guère de difficultés de mise en œuvre, elle demande cependant beaucoup de méticulosité et de soin. L'auteur pratique cette méthode depuis 2008 ; selon ses propos : « elle donne des résultats très satisfaisants à condition de respecter rigoureusement le protocole et de réaliser des coupes très fines ».



◀ Neurones dans le cortex d'un cerveau de lapin (photo G. Verbrugghe).

MODE OPÉRATOIRE

1. Fixation dans du formol à 10%.

Le tissu est débité en petits blocs d'une épaisseur de +/- 2 cm ; fixés et coupés ainsi, les pièces se gardent bien pendant plusieurs mois.

2. Placer dans une solution de 2% de bichromate de potassium pendant 6 jours.

Température constante de 20° (l'idéal étant d'utiliser un incubateur) : changer la solution tous les 2 jours et protéger de la lumière.

3. Enlever les pièces de la solution et éponger sur du papier absorbant. Rincer dans une solution de nitrate d'argent à 1% jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipité.

4. Baigner dans une solution de nitrate d'argent à 1% durant 6 jours et hors lumière (temp. 20°). Changer de produit au moins 2 fois et brosser chaque jour avec un pinceau (pour éliminer le dépôt sur l'extérieur des pièces) afin de faciliter la pénétration du produit.

5. Déshydrater de façon classique en tenant compte de l'épaisseur de la préparation.

6. Inclure dans la paraffine (méthode classique) ou trancher directement (*) et passer les coupes dans du toluène (bain de transparence) avant de monter à l'entellan.

(*) Après le passage au dernier bain de 98% d'EtOH (éthanol ou alcool éthylique), la pièce est suffisamment dure pour être coupée au microtome de Ranvier, sans passer par l'inclusion. A cette fin, l'auteur conserve ses préparations au moins 2 jours dans de l'EtOH à 98%, après application du protocole de déshydratation.

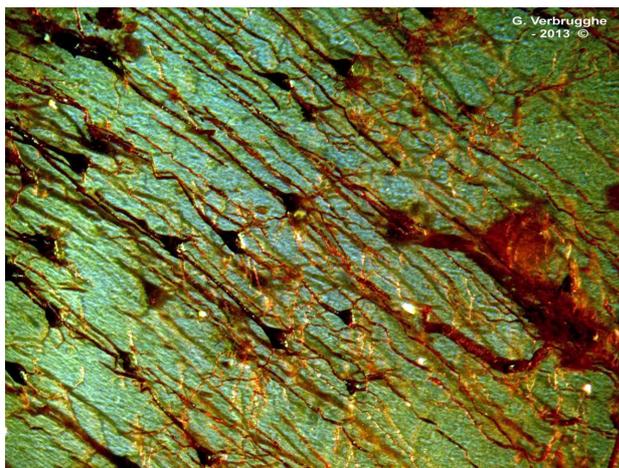
NB : raccourcir la durée des bains diminue le taux de pénétration des produits dans le tissu.



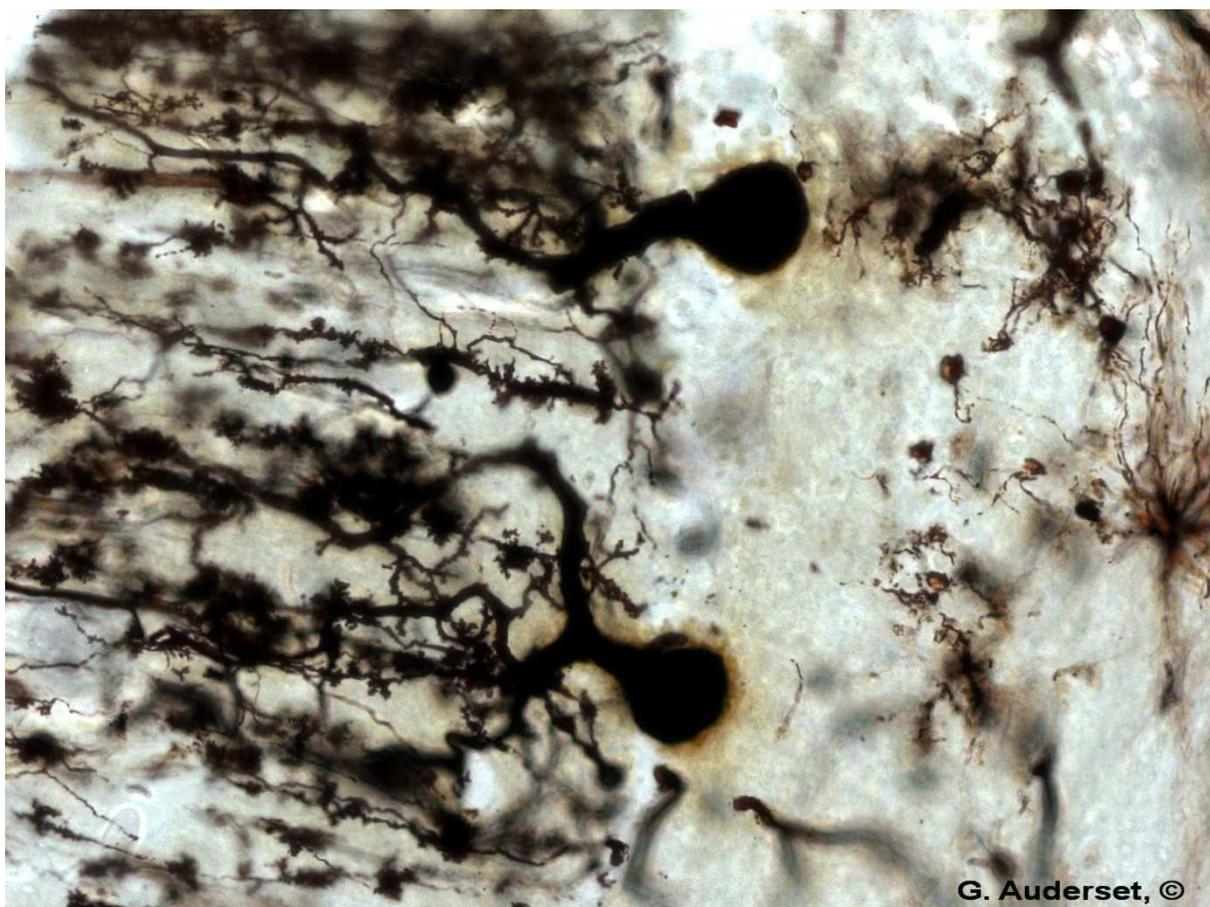
Coupe à la paraffine dans un cervelet humain, ▲ avec coloration de Nissle.

²⁰ Microscopiste passionné et autodidacte, auteur de remarquables photos de microscopie, qui ont été exposées à Namur ; nous avons fait connaissance par le biais d'internet, alors que nos habitations sont séparées d'à peine 5 km...

Cela donne des résultats médiocres (tissu trop imprégné à la surface et trop peu coloré à l'intérieur, d'où l'intérêt aussi du broyage de l'échantillon). Il vaut donc mieux laisser un ou deux jours de plus, plutôt que le contraire.



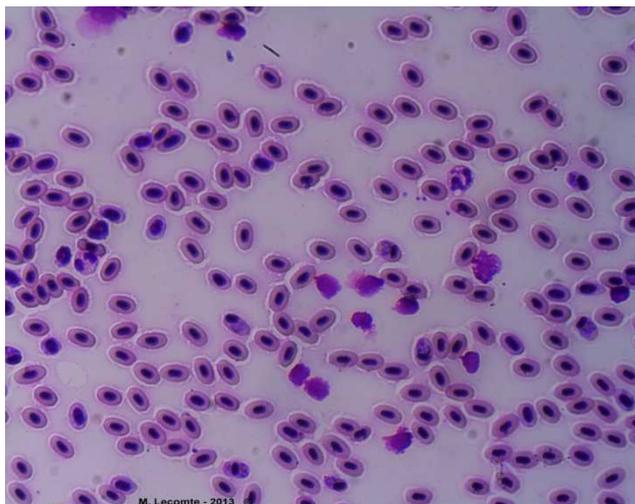
Grosses cellules de Purkinje, avec arborescence de dendrites ramifiées. ▶
▼



▲ Coupe réalisée dans un cervelet humain, et traitée par la méthode de Golgi (il est remarquable de noter que cette photo a été réalisée avec une caméra numérique Axiocam, au départ d'une préparation datant de 1920).

Les frottis physiologiques

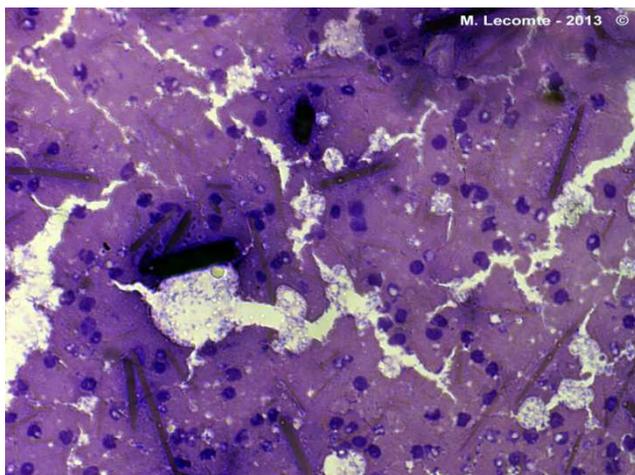
Sang humain - sang de poisson, de poulet ou de grenouille



colorant de May-Grünwald.

3 préparations colorées au Giemsa ▲ ▼ ►

Éléments en suspension dans le plasma : globules rouges (hématies) et globules blancs (leucocytes).

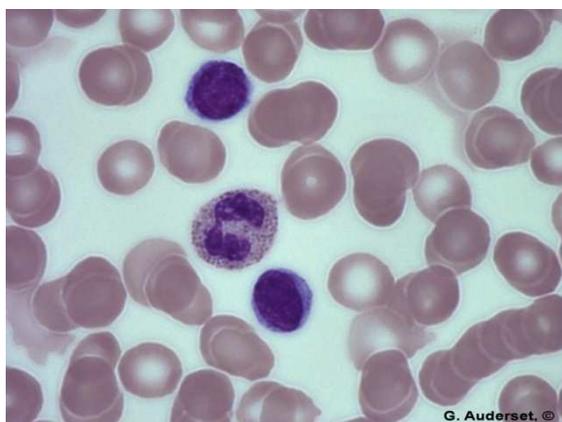


◀ Frottis de sang de poulet.

Les globules rouges des Mammifères n'ont pas de noyau ; ceux des Poissons, Batraciens, Reptiles et Oiseaux en sont pourvus.

MODE OPÉRATOIRE

- Prélever une goutte de sang.
- Étaler par frottis.
- Sécher par vive agitation de la lame.
- Fixer avec du méthanol à 95° (5 minutes) ou avec un mélange méthanol-éther éthylique et laisser sécher.
- Diverses possibilités de coloration : hémalum/éosine, hématoxyline ferrique, bleu de méthylène polychrome, colorant de Giemsa,



◀ Ce frottis réalisé sur du sang coagulé d'un poisson mort montre clairement que le résultat est mauvais, et qu'il faut travailler sur du sang frais, dans lequel on verse obligatoirement un anticoagulant (Héparine) ; on distingue encore les noyaux, mais l'enveloppe des hématies a « explosé ».

Pour les recherches avancées et précises, il est possible d'employer un kit spécial de coloration des frottis sanguins (utilisé

actuellement dans les laboratoires professionnels) : HEMACOLOR.

PRINCIPE

La couleur typique des noyaux, principalement rouge violet, repose sur l'interaction entre l'éosine G et un complexe ADN azur B.

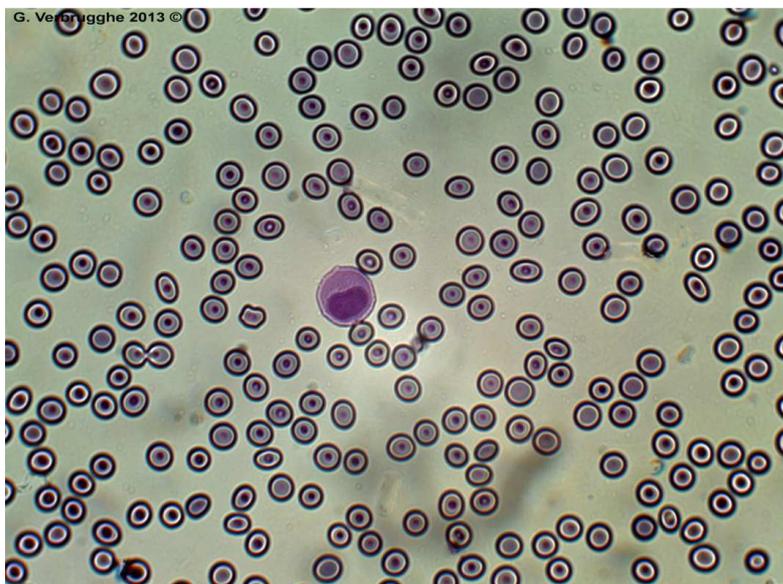
Les deux colorants forment un complexe. L'intensité de la coloration dépend de la teneur en azur B et du rapport azur B/éosine G. Le résultat peut être influencé par divers facteurs comme le pH de la solution tampon, les temps de coloration et de fixation.

MODE OPÉRATOIRE sur frottis séchés à l'air (travail en cuvettes à coloration).

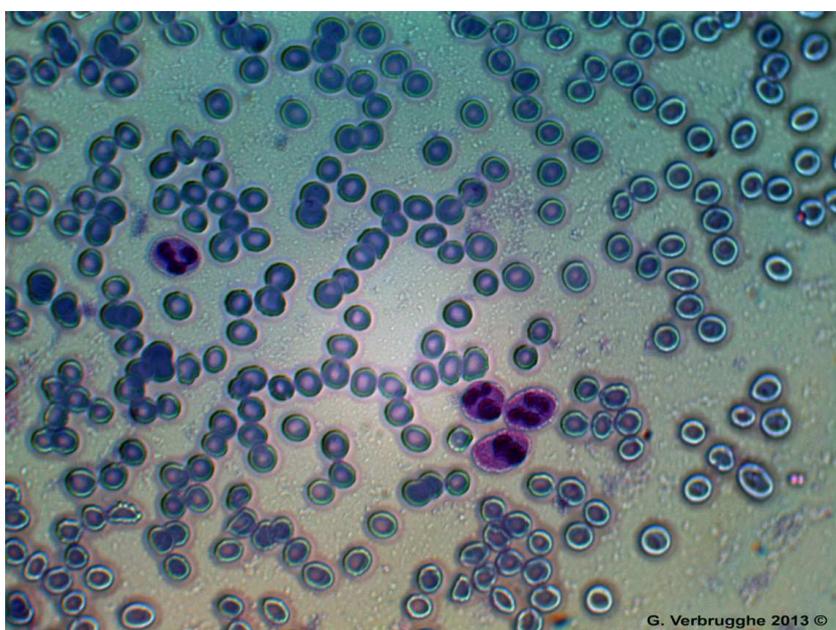
Coloration	Durée
Solution 1 Hemacolor	5 x 1''
Solution 2 Hemacolor	3 x 1''
Solution 3 Solution tampon pH 7.2	6 x 1''
Sécher	45''

RÉSULTATS

Noyaux cellulaires	rouge à violet
Lymphocytes	plasma bleu
Monocytes	plasma principalement bleu pigeon
Granulocytes neutrophiles	granules violet clair
Granulocytes éosinophiles	granules rouge tuile à brun rouge
Granulocytes basophiles	granules violet foncé à noirs
Thrombocytes	violet
Erythrocytes	rougeâtres



▲ Lymphocyte du sang humain - coloration au May-Grünwald + Giemsa (dite MGG).

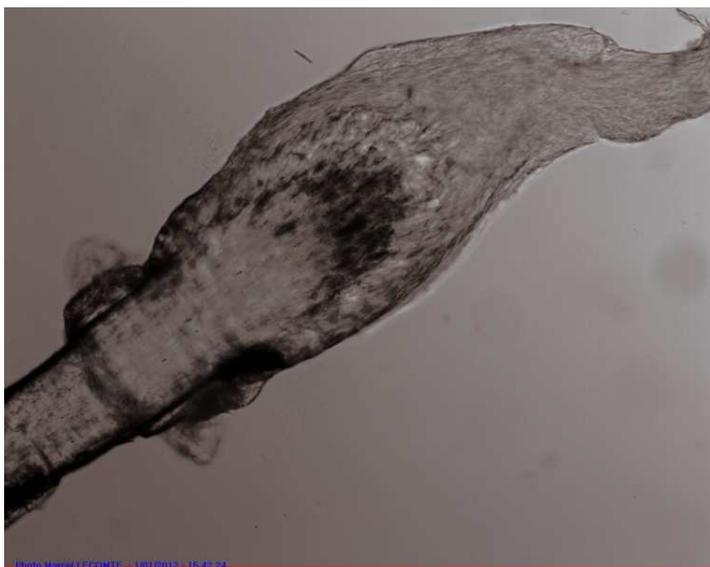


▲ Polynucléotides du sang humain - coloration au May-Grünwald + Giemsa.

MODE OPÉRATOIRE de G. Verbrugghe

- ++ Réaliser un frottis.
- ++ Recouvrir le frottis avec du May-Grünwald durant 3 minutes.
- ++ Eliminer doucement le colorant sous un faible jet d'eau distillée (à utiliser durant tout le protocole).
- ++ Recouvrir le frottis par un mélange d'une goutte de Giemsa pour 10 gouttes d'eau durant 15 minutes.
- ++ Eliminer doucement le colorant sous un faible jet d'eau.
- ++ Laisser sécher hors poussière.

Les cheveux (le même MO est applicable à des poils)



◀ **Follicule pileux, après arrachage** : c'est une structure particulière de la peau qui génère des cellules, les assemble et les transforme en kératine, la matière composant poils et cheveux ; le follicule est entouré d'une ou deux glandes sébacées produisant du sébum, un lubrifiant (c'est ce qui rend les cheveux gras).

MODE OPÉRATOIRE

→ Éclaircir la pièce dans du CLP (5 à 10 minutes à chaud, ou 24 h à froid).

→ Changer 2x le CLP.

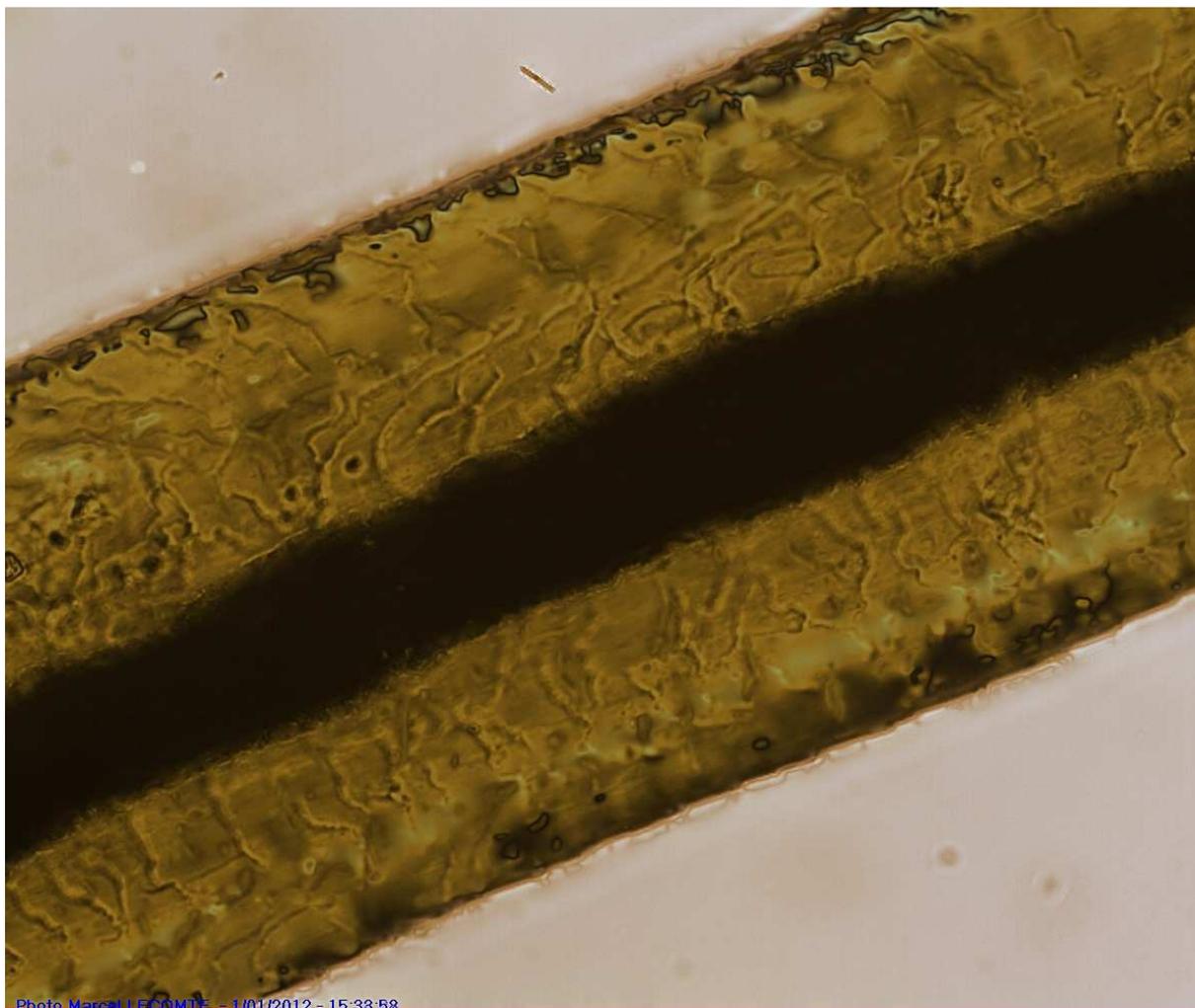
→ Déshydrater au xylol.

→ Placer sur une LPO et monter dans le BC.

OU

→ Laver à l'eau puis éponger.

→ Monter dans l'Aquatex.



▲ **Le canal médullaire du cheveu est bien visible** – montage dans le baume du Canada.

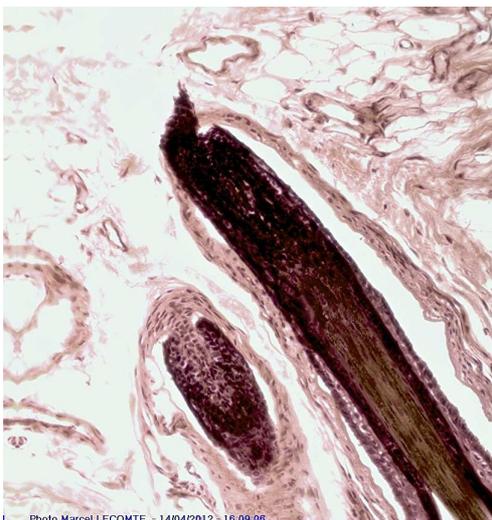


Photo Marcel LECOMTE - 14/04/2012 - 16:09:06

◀ Coupe transversale dans le cuir chevelu humain, montrant un cheveu bien formé (à droite), avec la kératine nettement visible.

A gauche (et sur détail ci-dessous), le follicule, avec les cellules bien reconnaissables (de même que les noyaux). Ces cellules se concentrent de plus en plus et deviennent de la kératine.

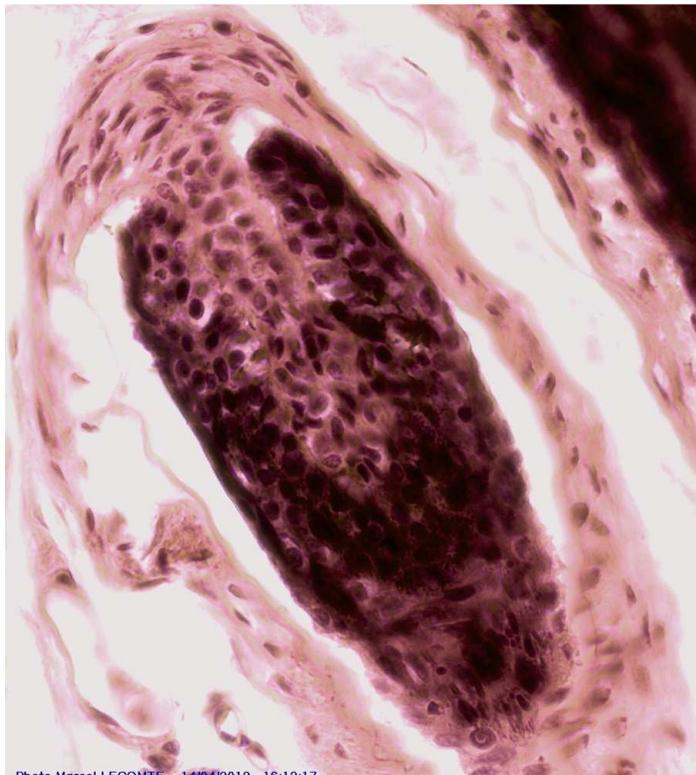
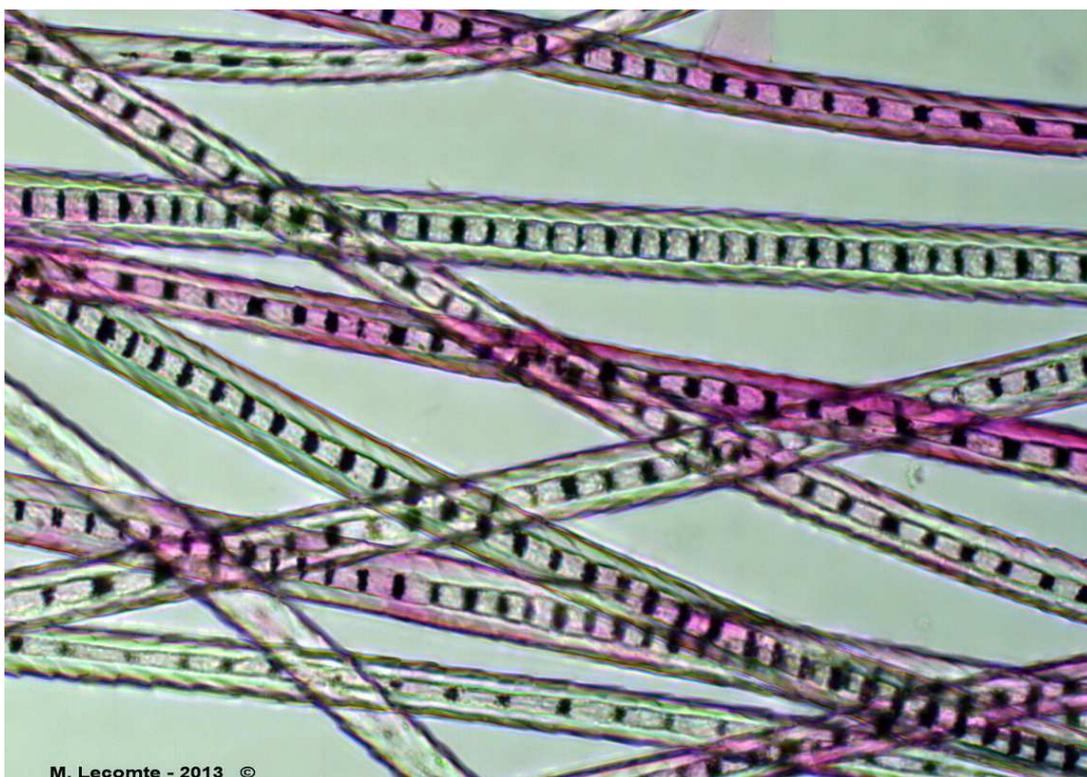


Photo Marcel LECOMTE - 14/04/2012 - 16:12:17

Étude réalisée au départ de poils de lapin angora



M. Lecomte - 2013 ©

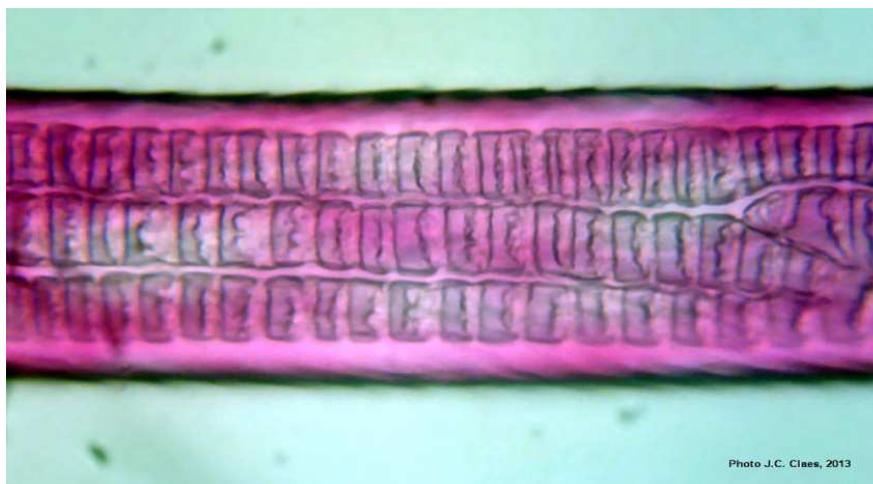
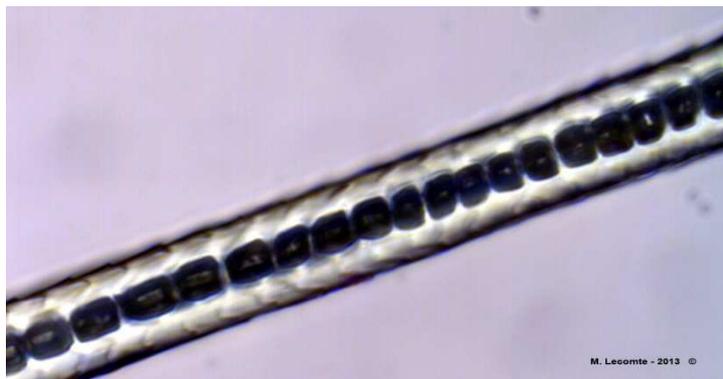
MODE OPÉRATOIRE

- ++ Dégraissage des poils dans le méthanol pur, durant 8 heures.
- ++ Laver à l'eau pure.
- ++ Coloration réalisée à la fuchsine acide en solution dans l'acide lactique pur.
- ++ Observation dans le même milieu.

Les lapins « angora » fournissent une fibre textile qui est la seule à porter cette appellation. Selon les races et sa nature (barbes du corps ou duvet), elle mesure de 14 à 18 μm ou 18 à 30 μm .

Sa structure particulière provoque une sensation de chaleur agréable et constante.

La chèvre dite « angora » donne une laine appelée « mohair ».



▲ Un poil de duvet.

◀ Une « barbe » du corps.

Les plumes

Les plumes sont des éléments caractéristiques chez les oiseaux : on ne les retrouve chez aucun autre être vivant. Leur ensemble (plusieurs milliers) forme le plumage.

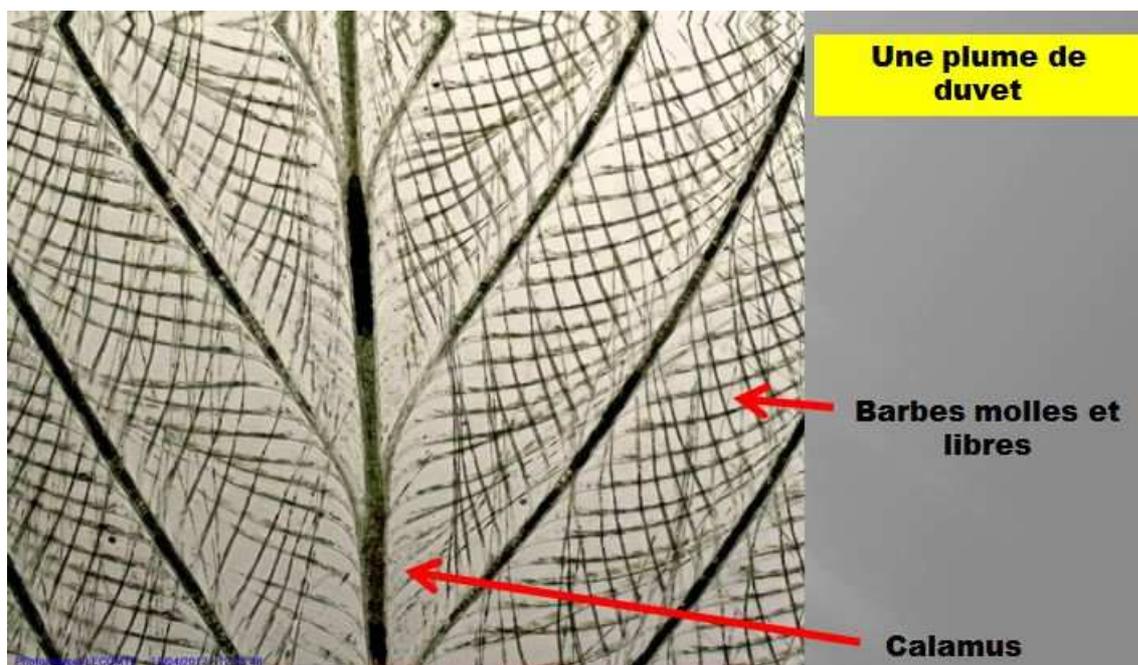
Ce complexe joue plusieurs rôles :

- + Protéger le corps des éléments extérieurs (chaleur, froid et eau) : ce sont les tectrices.
- + Permettre le vol, pour certaines d'entre-elles : ce sont les rémiges et les rectrices.
- + Intervenir dans la reproduction (la parade nuptiale joue un rôle important lors des préludes amoureux).
- + Jouer un rôle essentiel dans le camouflage pour certaines espèces.

La plume est constituée de kératine, comme les écailles, les ongles, les cheveux, les poils, les dents, les sabots, les griffes ; tous ces éléments sont appelés des phanères.

La plume est générée par des cellules spéciales de l'épiderme (les follicules) ; elle se compose d'un axe central, d'abord creux à la base (le calamus), et qui devient plein par la suite (le rachis).

Le rachis porte des barbes insérées dans un seul plan ; elles sont rendues solidaires par des barbules perpendiculaires, munies de minuscules crochets.



MODE OPÉRATOIRE

→ Placer dans le xylol durant 2 heures, pour chasser l'air.

→ Monter dans le BC.

OU

→ Placer dans le CLP durant ½ heure, puis chauffer légèrement durant 1 à 2 minutes (pas bouillir)

→ Monter dans le PVALPh

Barbules à crochets solidarisant les barbes d'une rémige. ▶



Photo Marcel LECOMTE - 2006/2012 - 19.11.30

Les colorants des plumes sont composés de mélanines (nuances de noir jusqu'au brun clair) et de caroténoïdes (tonalités variant du jaune au rouge). Mais leur origine s'avère très différente.

Les mélanines sont synthétisées par l'oiseau. Les caroténoïdes sont parfois synthétisés mais sont souvent générés par le mode nutritionnel.

Ainsi, chez le flamant rose, le pigment initial est produit par une algue unicellulaire, puis transformé par un crustacé (*Artemia salina*) qui s'en nourrit, et est finalement fixé dans les plumes de l'oiseau.

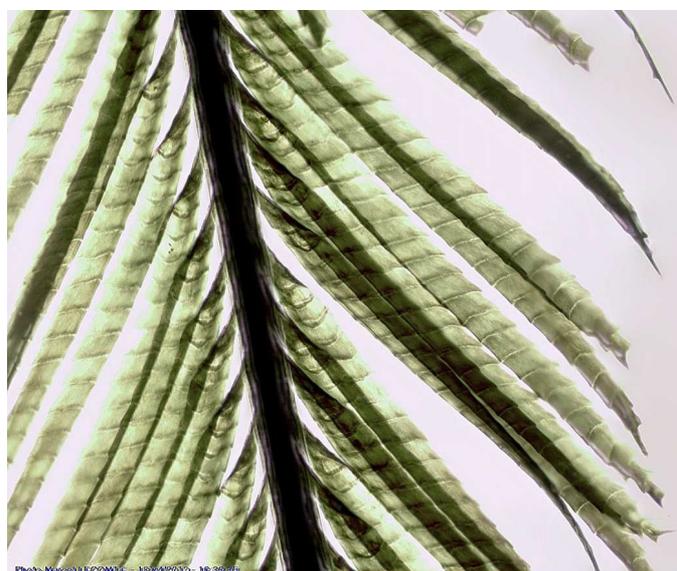


Photo Marcel LECOMTE - 13/04/2012 - 16.38.22

◀ **Détail d'une plume de paon.**

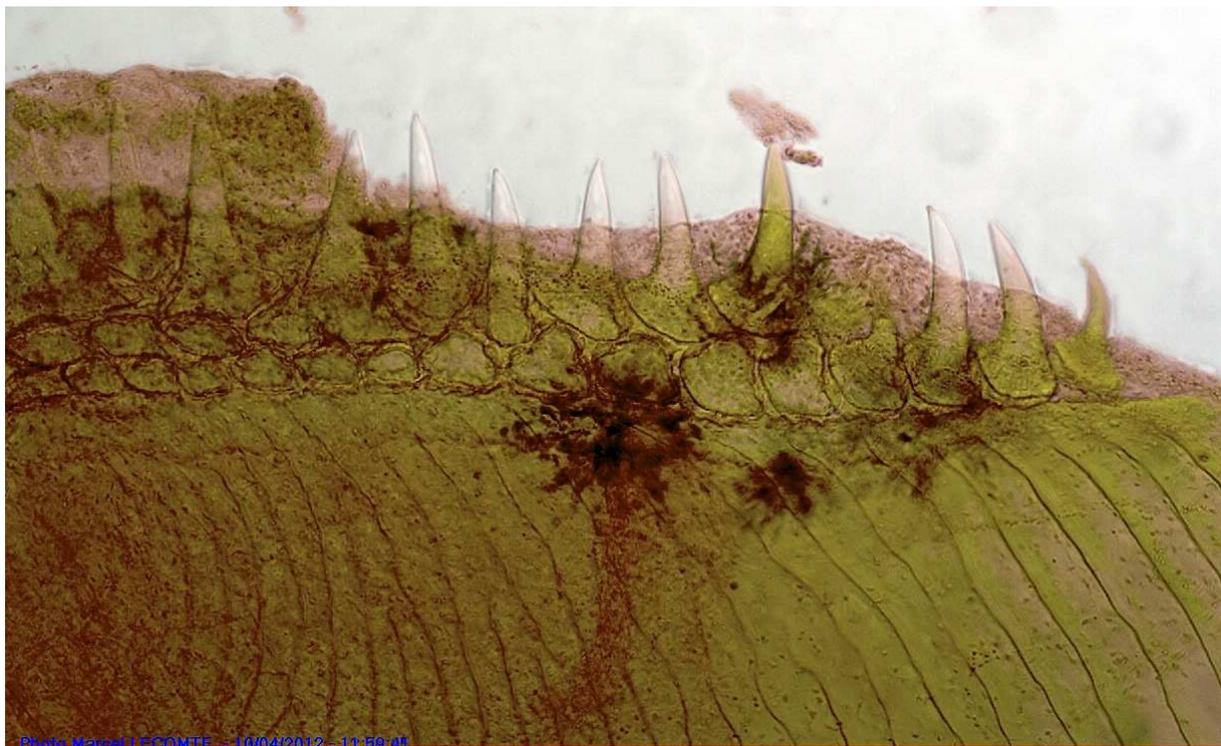
Le blanc est le simple résultat d'un manque de pigmentation.

Par contre, des couleurs comme le bleu et le vert sont qualifiées de « structurales », car elles sont générées par des micro granules ou des micro lamelles qui décomposent la lumière blanche, un peu comme les gouttelettes d'eau en suspension dans l'air provoquent l'apparition d'un arc-en-ciel.

Ajoutez à cela des variations de couleur selon l'angle d'incidence de l'œil de l'observateur, et des phénomènes d'irisation complexes.

Les plumes subissent un phénomène d'usure conséquent, et sont régulièrement remplacées lors de la mue.

Écailles de poissons



Toute la série de denticules constituent la zone d'insertion de l'écaille dans l'épiderme (ici, une carpe commune).
On distingue très nettement les stries de croissance (attention, une strie ne correspond pas à une année).



MODE OPÉRATOIRE

- Prélever les écailles sur un spécimen frais.
- Laver les écailles à l'eau plusieurs fois, en les frottant entre pouce et index pour enlever le mucus.
- Colorer dans l'éosine à 2 % (plusieurs heures) ou la safranine.
- Laver jusqu'à l'eau claire.
- Placer dans la glycérine.
- Monter dans la glycérine gélatinée.
- OU
- Laver puis colorer à l'éosine ou la safranine.
- Aligner les écailles entre 2 LPO ; bien ligaturer et baigner durant une semaine dans l'alcool à 95° (la compression vise à empêcher les écailles de gonfler sous l'effet de la déshydratation).
- ++ Laver à l'alcool à 95°.
- ++ Déshydrater au xylol.
- ++ Monter dans le BC.

QUELQUES PRÉCISIONS

- ++ Les écailles jouent un rôle de protection, et sont souvent enduites d'un mucus.
- ++ On parlera d'écailles cycloïdes lorsque le bord est entier (carpe commune, gardon, rotengle).
- ++ Quand le bord est dentelé, il s'agit d'écailles sténoïdes (perche).
- ++ Les stries correspondent à des périodes de croissance saisonnière.
- ++ Si on observe un fragment transparent de nageoire ou de la queue, on va trouver des chromatophores²¹, qui sont des taches ramifiées, noires ou colorées.

²¹ Ce sont des cellules pigmentaires présentes dans la partie superficielle des téguments de certains animaux (Poissons, Reptiles, Amphibiens, Crustacés, Céphalopodes ...). Dans certaines conditions, elles génèrent des modifications de couleur, qui sont souvent utilisées comme moyen de camouflage par homochromie. Chez certains animaux, ces changements chromatiques peuvent être déclenchés par des modifications de température, d'humeur, d'environnement, ou encore par le stress.

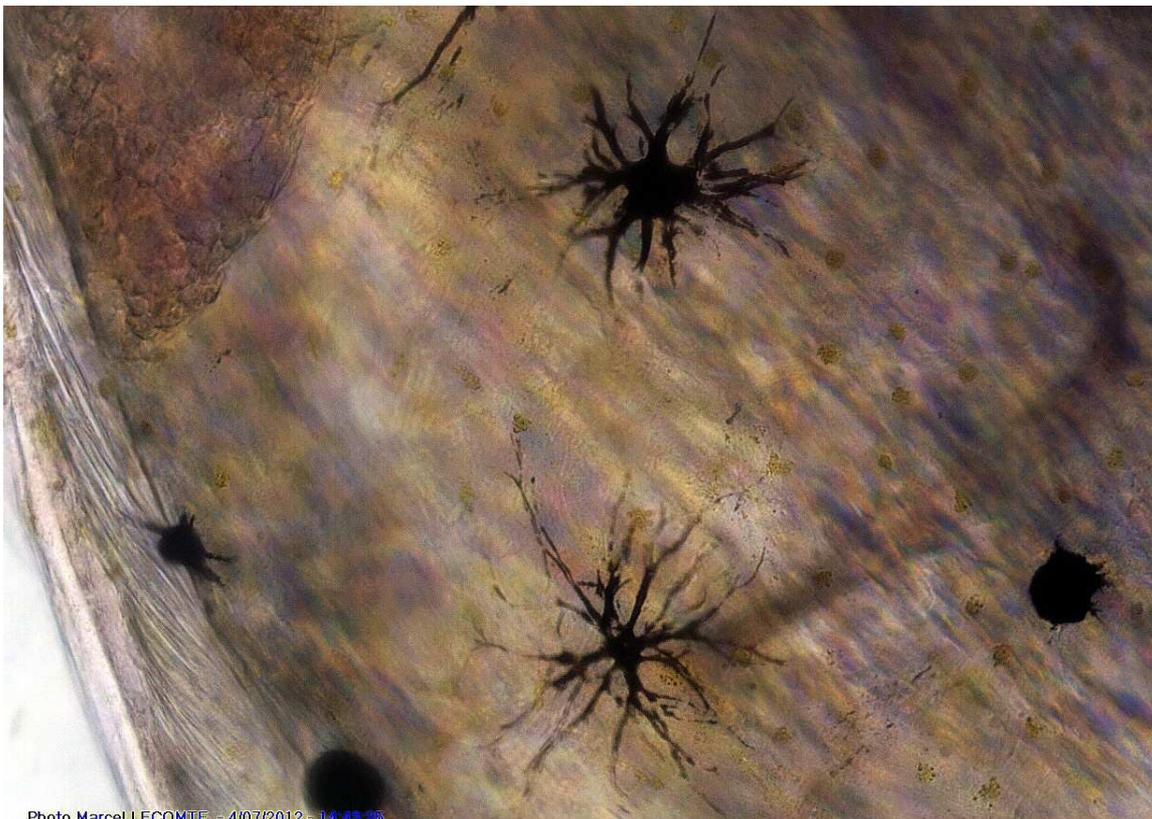
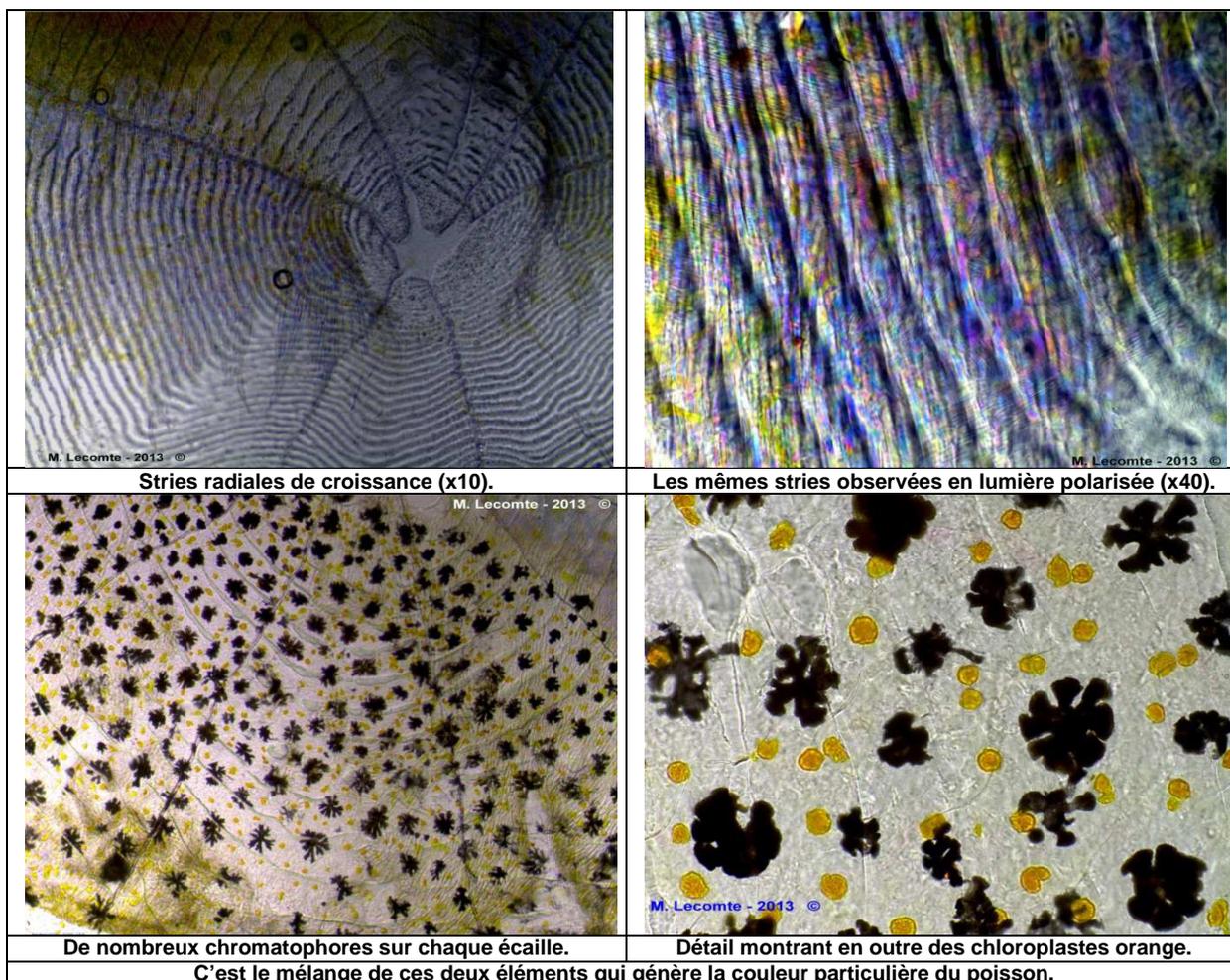


Photo Marcel LECOMTE - 4/07/2012 - 14:43:35

▲ Chromatophores en étoile sur une écaille de gardon (*Rutilus rutilus*).

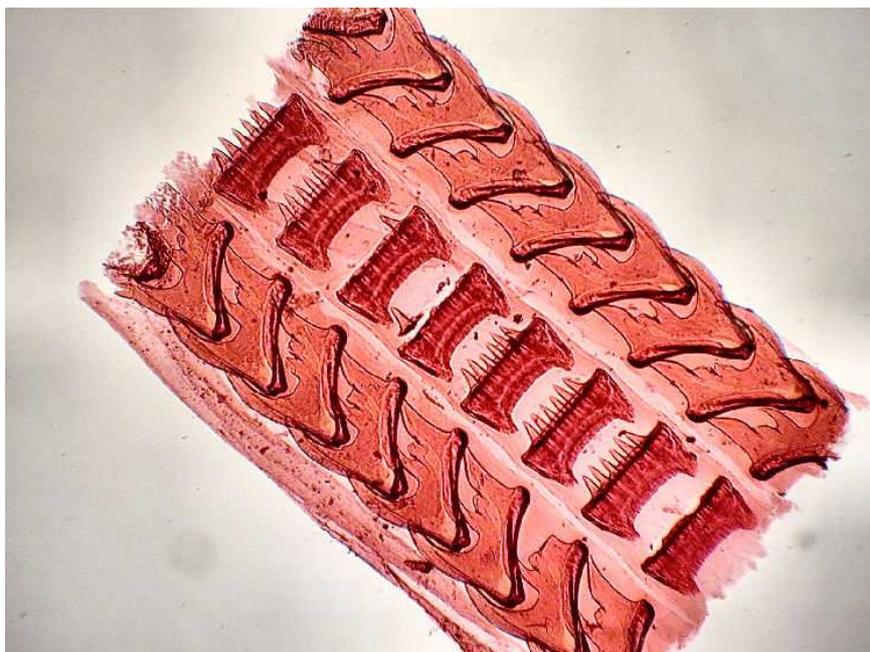
ETUDE RÉALISÉE SUR LES ÉCAILLES D'UNE CARPE KOÏ, DE COULEUR BRONZE ORANGÉ



Radulas et dards d'amour chez les Gastéropodes

La radula est une sorte de langue constituée d'une lame basale munie de nombreuses dents chitineuses, formant une râpe, qu'on trouve dans la cavité buccale des Mollusques (sauf chez les Lamellibranches : huîtres, moules et autres coquillages). La forme et la disposition des aspérités dentaires sont suffisamment spécifiques pour servir à l'identification de l'espèce. Les dents qui s'usent à l'avant sont remplacées par de nouvelles dents à l'arrière de la radula (fonctionnement en tapis roulant).

Au-delà de l'intérêt taxonomique, l'observation radulaire permet de reconnaître le type de nutrition du gastéropode. Quatre grands types peuvent être définis : les radulas rhipidoglosses et les docoglosses associés aux Archéogastéropodes brouteurs ; les tainioglosses associés aux Mésogastéropodes ; les rachiglosses et les toxoglosses associés aux Néogastéropodes prédateurs.



◀ Ruban lingual de Gastéropode (photo François Quinquet).

La radula fonctionne en faisant des mouvements de va et vient grâce aux muscles qui s'attachent à l'odontophore, sorte de plaque rigide qui la supporte.

Chez les espèces venimeuses comme les cônes (*Conus* sp.), une dent de la radula, longue et creuse, est associée à une glande à venin neurotoxique.

Chez certaines espèces prédatrices, comme les escargots de lune, la radula a subi une modification qui lui permet de

transpercer une coquille (de palourde notamment).

MODE OPÉRATOIRE

- ++ Couper la tête de l'escargot.
- ++ Dissoudre dans de la potasse à 10 %, à chaud.
- ++ Laver soigneusement avec de l'eau normale.
- ++ Monter dans l'Aquatex.

OU

- ++ Déshydrater durant 15 minutes dans l'isopropanol.
- ++ Monter dans l'Euparal.

OU

- ++ Passer 15 minutes dans l'éthanol ou le méthanol à 95°.
- ++ Plonger 15 minutes dans le xylol.
- ++ Monter dans le BC.

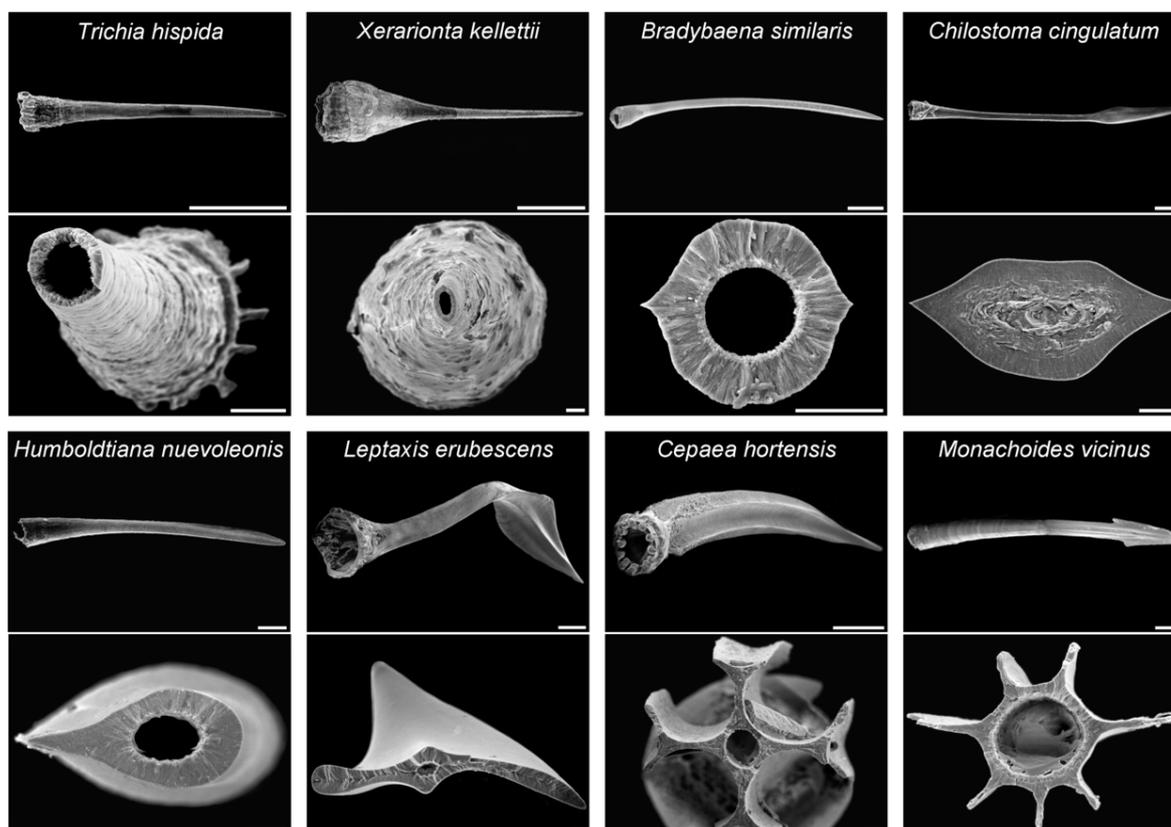


L'image de droite a été empruntée à Eynar, qui en autorise la libre utilisation, à des fins non commerciales. ▶

Le dard d'amour : les Gastéropodes hermaphrodites adultes possèdent une poche musculaire à côté de la tête, contenant une structure dure, longue et pointue, calcaire ou chitineuse. Durant les préludes amoureux, celle-ci va s'ouvrir pour planter « au corps à corps », dans la chair du partenaire, un dard, appelé « flèche de Cupidon, ou dard d'amour ». Il va être fiché entre la tête et la coquille (voir la flèche rouge, à droite, ci-dessus). Et pour le Gastéropode, le fait d'être piqué par ce projectile, enduit d'une sorte de mucus composé d'un cocktail d'hormones, va l'amener à copuler. Il ne s'agit en aucune manière d'un organe de transfert de sperme. Ce dard est relativement grand par rapport à la taille de l'animal qui le porte : chez les limaces du genre *Parmarion*, il peut mesurer le cinquième de la longueur du pied.

C'est ainsi qu'au printemps, quand vient la saison des amours, les escargots et les limaces « tombent amoureux » et se font la cour pendant des heures. Les deux partenaires se caressent, se titillent les antennes et se poignent avec ce dard finement ciselé, dont la forme varie considérablement selon les espèces. Leur seul point commun est leur allure générale de harpon ou d'aiguille, leur servant à percer. (voir les différents modèles représentés ci-dessous).

▲ ▼ Images réalisées en 2005 au microscope électronique, et empruntées à Joris M. Koene & Heinrich Schulenburg, qui en autorisent la libre utilisation, à des fins non commerciales. Pour les images longitudinales, l'échelle figurée est de 0,5 mm ; pour les coupes transversales, elle est de 50 µm.

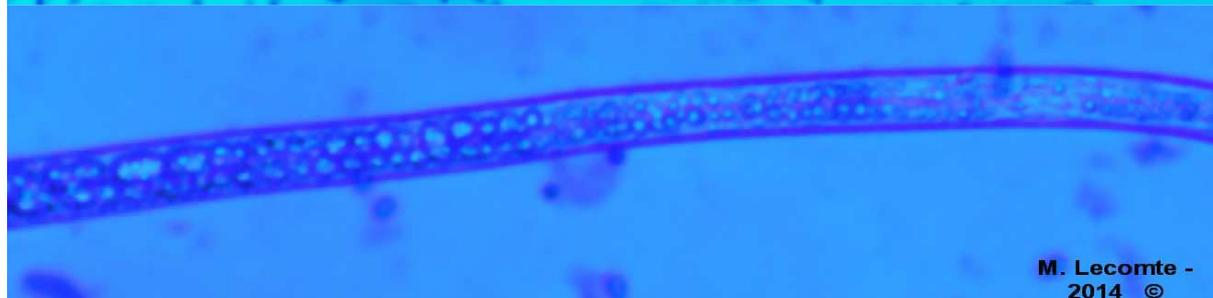
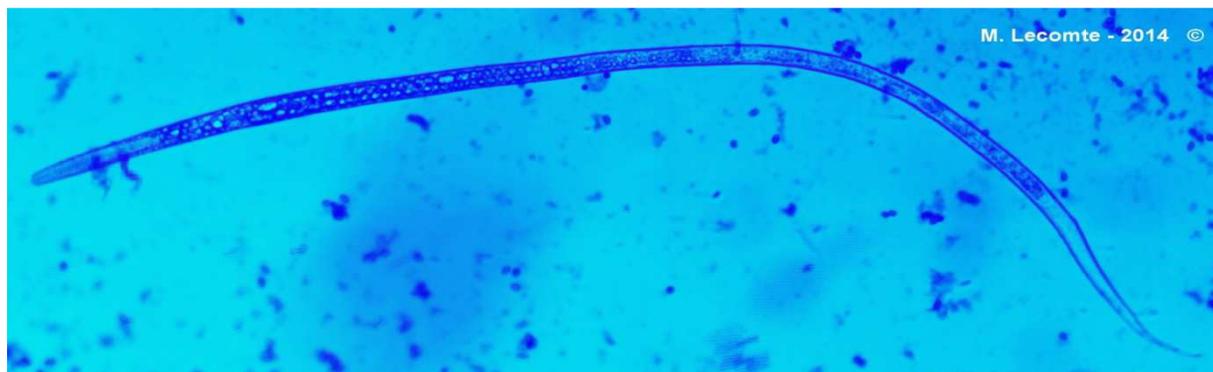


Les anguillules du vinaigre

Un vieux vinaigre de cidre, non pasteurisé, contient souvent de petits vers transparents, à peine visibles à l'œil nu, dont la taille moyenne est de 0,5 mm, mais peut aller jusque 2 à 3 mm. Il s'agit de Nématodes, et dans le cas présent : *Anguillula (Turatrix) aceti*, qui se nourrit des bactéries provoquant la fermentation du liquide (*Acetobacter suboxydans* ou *A. aceti*).

Ces petits vers sont très recherchés par les aquariophiles, qui les utilisent (en raison de leur petite taille) pour nourrir les alevins obtenus par élevage. Dès qu'une culture est lancée, il est très simple d'ensemencer de nouveaux pots, toutes les 3 ou 4 semaines.

Pour en acheter une souche : <http://www.aqualiment.eu/souche-anguillule-vinaigre-48.html> ou d'autres animalcules : <http://www.aqualiment.eu/index.php>



L'élevage s'avère très simple, car il suffit de placer la souche dans le liquide choisi. Après quelques jours, cela pullule littéralement. La grosse difficulté réside dans la photographie, car vivantes, ces bestioles ondulent sans arrêt et à toute vitesse : seule une bande vidéo peut les montrer à l'œuvre. Sur les photos ci-dessus, on distingue nettement les cellules germinales. Nous avons été assez surpris de découvrir la vie qui se développe dans un milieu aussi hostile (pH 2 - 3) : nous y

avons même trouvé des rotifères.

MODE OPÉRATOIRE

++ Remplir un pot à confiture aux 2/3 de vinaigre de cidre, et y placer 4 ou 5 morceaux d'une pomme fraîche. Après quelques heures, y verser la souche achetée (quelques €).



M. Lecomte - 2014 ©

++ Prendre la précaution de percer un petit trou dans le couvercle afin de laisser s'échapper les gaz de fermentation, sous peine de voir le couvercle se bomber dangereusement.

++ Prélever quelques gouttes dans le dépôt, au fond du pot avec une petite pipette.

++ Observer directement dans la goutte, ou mieux : y déposer une trace de fuchsine acide ou de bleu de méthylène (celui-ci colore très bien la zone de reproduction²² et son contenu) : il s'agit de chercher un ver filiforme, transparent, incolore, qui se déplace en serpentant dans tous les sens.

++ Pour la photographie, les immobiliser avec un

choc thermique à 50-60° (surtout, ne pas laisser bouillir).

En parcourant certaines publications d'aquariophilie et de vulgarisation sur la préparation du vinaigre, nous avons pu constater qu'il y avait une réelle confusion entre ces nématodes, et les larves de la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*), bien connue pour les expérimentations génétiques dont elle a fait l'objet. En effet, comme il s'agit d'un diptère, son stade larvaire est un minuscule asticot qui se développe sur des fruits trop mûrs, en quelques jours, et qui ne vit pas du tout en milieu liquide.

« Anguillule » est un terme employé également pour des Nématodes vivant dans d'autres milieux : sol humide, eaux douces, eaux d'égouttage, couches de champignons, racines et collet de légumes, cartons à bière ... certaines supportent même l'eau salée.

Les plus connues sont l'anguillule du fraisier (*Aphelenchoides fragariae*), du blé (*Anguina tritici*), des agrumes (*Tylenchulus semipenetrans*), des prairies (*Pratylenchus pratensis*), des bulbes (*Ditylenchus dipsaci*),

Certains nématodes parasitent l'être humain, le plus connu étant l'ascaris (*Ascaris lumbricoides*), mais il y a aussi les oxyures, dont *Enterobius vermicularis*, et la filaire de Bancroft (*Wuchereria bancrofti*) responsable de l'éléphantiasis dans les régions tropicales.



M. Lecomte - 2014 ©

²² C'est là que se forment des cellules germinales méiotiques puis mitotiques (elles sont bien visibles sur les deux premières photos), de même que des spermatocytes ; tout cela est conduit vers l'anus par un canal déférent.

Le trichrome de Masson

Dominique Biarrot & Marcel Lecomte

Préalable

La technique appelée « trichrome de Masson²³ » s'applique sur des coupes de tissus animaux, et fait intervenir 3 colorations successives :

- 1) Une coloration des noyaux par l'hémalum de Mayer²⁴.
- 2) Une coloration du cytoplasme par un mélange précis de fuchsine acide et de rouge ponceau²⁵ (qui sont des colorants acides).
- 3) Une coloration élective du collagène par le vert lumière²⁶ (parfois remplacé par le bleu d'aniline).

Mode opératoire

Pour ce genre de travail, les coupes sont réalisées au microtome automatique, sur des pièces enrobées à la paraffine, ce qui s'avère assez fastidieux. Nous avons également travaillé sur des coupes pratiquées avec un microtome à congélation, mais les résultats sont plus aléatoires. Considérons que nous travaillons sur des coupes de 10 à 12 µm d'épaisseur.

1. Poser les coupes sur les LPO (la coloration est meilleure sur la lame - le verre de montre rempli d'eau est à déconseiller).
2. Fixer sur le support à l'eau albumineuse, et sécher.
3. Déparaffiner dans 3 bains de xylène successifs (3' par bain).
4. Passer par des bains successifs de 3' dans de l'alcool absolu, puis à 90°, 70° et parfois même 30°.
5. Réhydratation dans l'eau durant 4' (ou passage dans du PBS²⁷, durant le même temps).
6. Placer dans l'hémalum de Mayer pendant 10' au moins (à adapter selon la fraîcheur du colorant : un rapide contrôle au microscope permet de se faire une idée précise) ; 15' semblent constituer une durée favorable.
7. Rincer à l'eau courante, en faisant passer la lame sous l'eau du côté opposé à la préparation (sinon on risque de décoller la coupe) ; puis placer dans l'eau du robinet durant 4' (cette opération est indispensable, afin d'effectuer la différenciation²⁸ de l'hémalum) ; on peut aussi différencier dans une solution de PSB.
8. Colorer dans la fuchsine-ponceau durant 5'.
9. Rincer rapidement dans 2 bains successifs d'eau acétique²⁹ à 1 %, ou plus simplement, passage sous l'eau du côté opposé à la préparation.
10. Mordancer dans un bain d'acide phosphomolybdique à 1 %, durant +/- 10'.
11. Surtout, NE PAS RINCER.
12. Colorer ensuite durant 5' dans le bleu d'aniline (pour le vert lumière, 20'' sont largement suffisantes car son pouvoir colorant est puissant et il va empâter la préparation, en cas d'exposition plus longue).
13. Rincer dans 2 bains successifs d'eau bidistillée acétique à 1 %, durant 5' chacun.
 - ++ Monter définitivement.
 - Monter les coupes telles quelles dans l'Aquatex.
 - OU

²³ Une brève recherche sur le Net permet de constater qu'il existe nombre de « recettes », ni tout-à-fait semblables ni tout-à-fait différentes.

²⁴ Ou la trioxhémateïne ferrique, ou l'hématoxyline ferrique de Harris, ou toute autre forme d'hématoxyline à fort pouvoir colorant.

²⁵ La fuchsine ponceau est un mélange extemporané d'un volume d'une solution aqueuse de fuchsine acide (1 %) et de 2 volumes d'une solution de rouge ponceau (1 %) dans l'eau acétique à 1%.

²⁶ Vert lumière en solution à 1% dans l'acide acétique à 1% ; bleu d'aniline en solution aqueuse à 1 %.

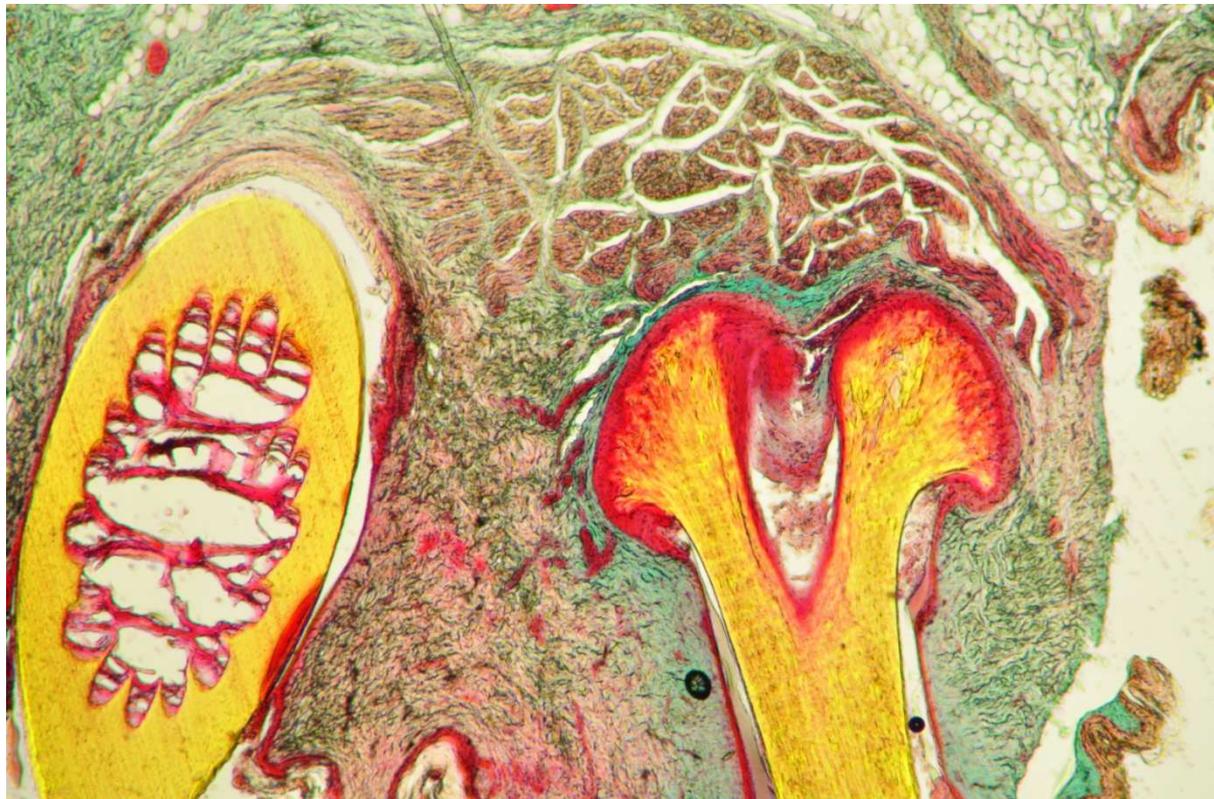
²⁷ PBS = tampon phosphate salin (comprimés se trouvant dans le commerce).

²⁸ On peut également différencier avec de l'alcool acétique à 1 %.

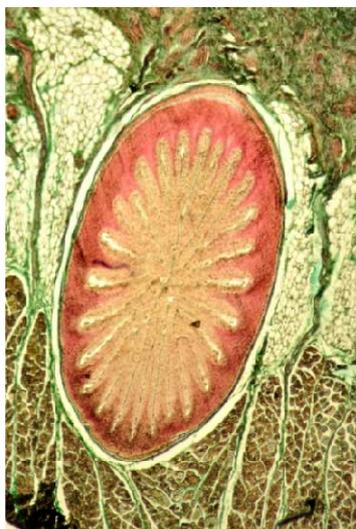
²⁹ Peut être remplacée par de l'eau bidistillée ammoniacale à 1% ; cependant, même si cela figure dans certains protocoles, nous le déconseillons car cela décolle souvent les pièces de la LPO.

- Appliquer les techniques successives de déshydratation à l'alcool puis passer dans le xylène et monter dans le BC, ou dans tout autre milieu dont le solvant est le xylène (ou le toluène).
- On peut pratiquer de même avec l'alcool isopropylique, qui permet un montage très facile dans l'Euparal (ce dernier est très avide d'oxygène, et il n'y a jamais le problème des bulles).

Il faut cependant tenir compte du fait que les temps de coloration peuvent varier en fonction de l'épaisseur des coupes et du type de tissu.



Coupe réalisée dans une peau de hérisson au niveau de l'implantation des épines (préparations et photos : D. Biarrat). La coloration de la kératine en jaune résulte de l'utilisation du fixateur de Bouin, (qui contient de l'acide picrique), et non des composants du trichrome de Masson. L'épine à gauche fait l'objet d'une coupe sagittale et montre le début de sa formation, avec un centre +/- vide, et des arches de consolidation naissantes. Celle de droite a subi une coupe longitudinale, qui passe au centre du bulbe et révèle que l'épine est ouverte par le dessous ; cet orifice permet le passage du système vasculaire qui va alimenter la structure cellulaire interne. Le volume du bulbe assure un ancrage très solide du tégument, dans la peau.



◀ Coupe sagittale montrant la formation d'une épine, avec de vieux kératinocystes périphériques, durcis et cornés ; la zone centrale contient le même type de cellules, mais actives.

Résultats généraux

- Le cytoplasme est coloré en rouge rosé.
- Les fibres élastiques en rose.
- Les fibres conjonctives (collagène) en bleu (si on utilise le bleu d'aniline) ou en vert (si vert lumière).
- Les globules rouges (hématies ou érythrocytes) et la kératine en rose - rouge vif.
- Le mucus en bleu.
- Les noyaux en brun, bleu - violet ou bleu - noir.
- Les substances basophiles en bleu - violet.

La coloration nucléaire de Feulgen

La coloration de Feulgen permet la mise en évidence des chromosomes et leur observation au microscope photonique ; elle a été mise au point en 1924, par le chimiste allemand Robert Feulgen. Le principe de la méthode est de dissocier les deux brins d'ADN grâce à un acide et de colorer ensuite ceux-ci au moyen de la fuchsine.

Il s'agit d'une coloration létale, qu'on travaille sur des coupes histologiques ou sur des cellules vivantes.

Cette technique fait intervenir une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 60°C qui va hydrolyser l'ADN (hydrolyse acide), en détruisant les bases puriques³⁰. Cela rend accessible les désoxyriboses et permet à la fuchsine de colorer les fonctions aldéhydes ainsi découvertes.

Elle est particulièrement utile lorsque les chromosomes se trouvent sous une forme polyténique³¹, comme par exemple dans les glandes salivaires des chironomes.

Les bandes colorées rosées qui apparaissent correspondent aux gènes, et les bandes claires aux régions intergéniques.

La chromatine se colore en rouge violacé alors que le cytoplasme, le nucléoplasme et le nucléole restent incolores.

OBJECTIF : mettre en évidence les différents stades de la mitose dans des cellules végétales (méristèmes de racines).

MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL

Mettre à germer durant 5 à 8 jours, à température ambiante, des bulbes (oignon, ail, jacinthe, tulipe) afin de provoquer l'apparition de petites racines dont on va prélever la partie apicale (méristèmes). Dès que les racines mesurent de 1 à 2 cm, le matériel est prêt à l'emploi.

PRÉPARATION des produits divers

++ 24 heures avant utilisation, placer 20 cc d'acide chlorhydrique à l'étuve, à 60°C (une solution plus simple à nos yeux consiste à placer l'HCl au bain-marie, à 60°C, durant ½ heure).

++ Un fixateur composé de 75 cc d'éthanol à 95° & 25 cc d'acide acétique glacial.

++ Préparer le réactif de Feulgen proprement dit :

- Verser 1 g de fuchsine basique (fuchsine diamant) dans 20 cc d'eau bidistillée bouillante. Bien mélanger.
- Refroidir jusqu'à 50°C, puis filtrer.
- Ajouter 20 cc d'HCl, et refroidir à 25°C.
- Ajouter 1g de bisulfite de potassium (on peut le remplacer par de l'hydrosulfite de sodium ou de potassium) .
- Fermer le flacon et conserver impérativement à l'obscurité.

ATTENTION ! le réactif ne se conserve que durant 24 heures.

MODE OPÉRATOIRE

++ Couper les racines à 1 cm du bout, et les sécher.

++ Placer les exsiccata dans le fixateur (éthanol acétique), durant 6 à 12 heures.

++ Récupérer les spécimens avec un tamis et les rincer sous un filet d'eau.

++ Sécher sur un papier filtre.

++ Les placer dans le tube d'HCl qui se trouve à l'étuve (ou au bain-marie), durant 15 minutes.

++ Récupérer les spécimens avec un tamis et les rincer sous un filet d'eau.

++ Sécher sur un papier filtre.

++ Laisser séjourner durant 15 minutes dans le réactif de Feulgen.

++ Rincer rapidement.

++ Monter entre LPO et LCO dans l'acide acétique à 45%, et écraser suffisamment, afin que la préparation soit la plus mince possible.

³⁰ Une base purique est une base azotée (une molécule aromatique) dont le noyau est une purine ; il en existe 2 : l'adénine et la guanine.

³¹ Des chromosomes polyténiques correspondent à un certain nombre de copies des chromatides (jusqu'à 1.024), qui sont restées soudées entre elles.

BOTANIQUE

Squelette et cellules

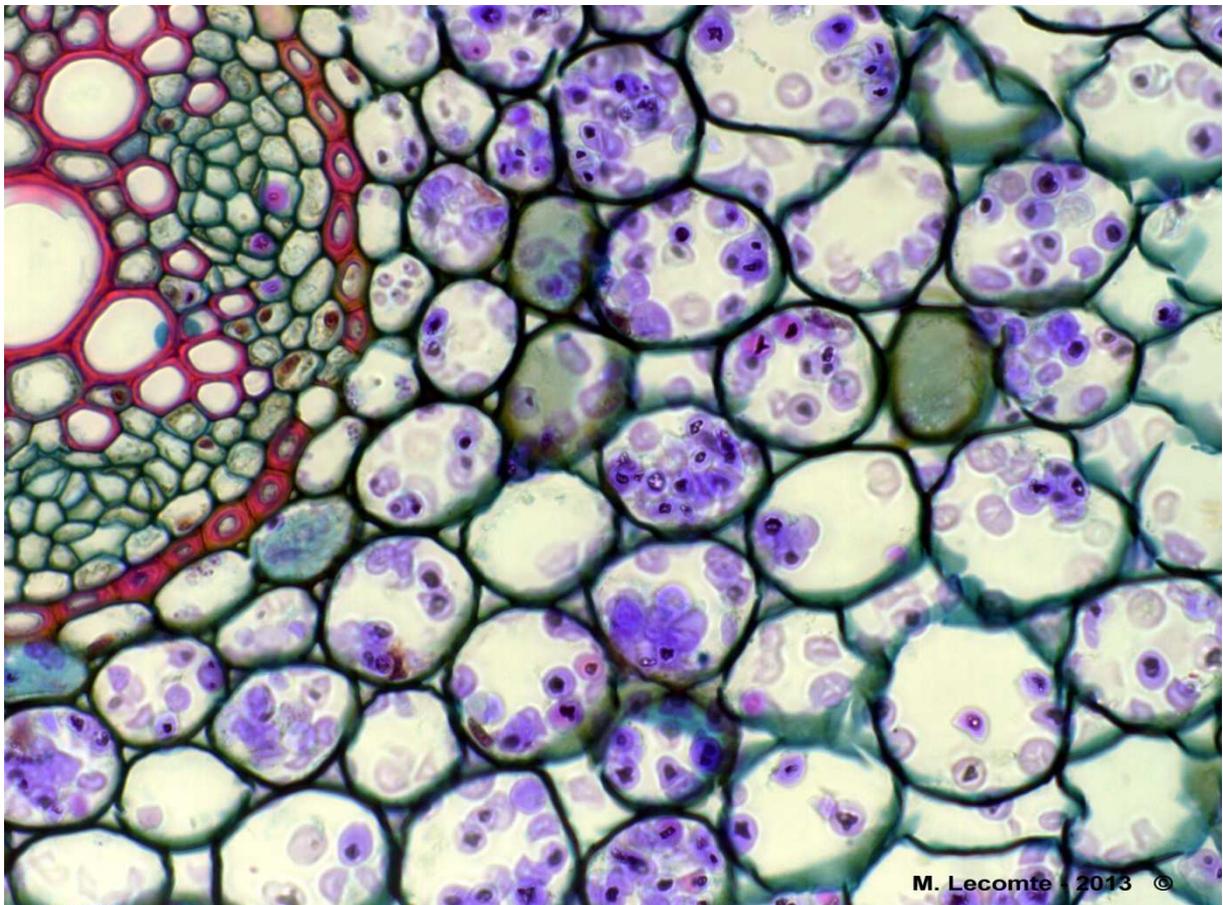
Parois, cristaux et inclusions

Stomates, poils et plastes

Des tissus excréteurs

Algues & Pollens

Mitose



Coupe transversale dans une racine de Renoncule âcre (*Ranuncula acris*) ▲

Microscopie générale des végétaux

Des milieux de montage

Notre souci essentiel est d'aller vers la simplicité, et nous choisissons, chaque fois que c'est possible, de ne pas utiliser les procédures longues et fastidieuses nécessitées par le montage dans des produits dont le solvant est le xylène.

Nous disposons d'une panoplie intéressante de produits à solvant aqueux, tels l'Aquatex et le PVA.

Glycérine gélatinée (GG)

Gélatine pure	15 g
Eau bidistillée	90 cc
Chauffer l'eau à 60°C, y ajouter la gélatine et laisser 2 h à l'étuve.	
Glycérine	100 cc
Ajouter la glycérine puis filtrer sur 2 couches de gaze hydrophile.	
Phénol sous forme cristalline	2,5 g
Hydrate de chloral	50 g
Mélanger longuement en secouant, après y avoir incorporé un barreau magnétique.	

Il est possible également de colorer la GG dans la masse, en y incorporant, avant mélange, une très petite quantité de colorant. Les meilleurs sont : la safranine, le vert de méthyle.

Des fixateurs intéressants et faciles à préparer

Nous ne reviendrons pas ici sur les techniques de coupes végétales, qui sont supposées être connues et ont été développées dans un autre chapitre.

Lorsque nous souhaitons conserver le contenu cellulaire, il est impératif de fixer le cytoplasme et les noyaux, afin qu'ils ne se modifient ni se détériorent (ou alors pas trop), lors des multiples manipulations.

Alcool acétique

Alcool éthylique à 95°	60 cc
Acide acétique glacial	10 g
Chloroforme	30 cc
Mélanger rapidement puis sceller dans un flacon très hermétique (bouchon en verre rodé).	

Picroformol acétique

Eau bidistillée	200 cc
Trinitrophénol (acide picrique) – Ce produit est très toxique et doit être manipulé avec beaucoup de précaution.	50 g
Chauffer à 70°, ce qui va permettre d'obtenir une solution saturée (à froid, on peut dissoudre à peine 1,4 g/100 cc) ; conserver dans un flacon bien hermétique. Prélever 75 cc et remettre à niveau avec de l'eau bidistillée.	
Solution saturée d'acide picrique	75 cc
Acide acétique glacial	5 cc
Formol de laboratoire (le formol du commerce contient trop d'impuretés)	25 cc
Mélanger rapidement puis conserver dans un flacon très hermétique (bouchon en verre rodé).	

La paroi des cellules végétales, est de nature pectocellulosique ; elle est composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines ; selon l'âge du tissu, on parlera de paroi primaire ou secondaire (dans cette dernière, on trouvera en plus de la lignine).

Elle se montre particulièrement résistante à nombre d'agents chimiques.

Si on s'intéresse uniquement aux parois (ce qui est très souvent le cas), il faut d'abord éliminer tout le contenu cellulaire (cytoplasme). Il suffit de plonger les coupes dans de l'hypochlorite de soude durant 15 à 30'. Laver ensuite à l'eau acétique à 1 %.

Coloration de la cellulose par le chlorure de calcium iodé

Chlorure de calcium (saturé à 745 g/litre)	80 cc
Eau bidistillée	100 cc
Formation d'un liquide sirupeux jaunâtre ; filtrer.	
Iodure de potassium	3 g
Iode	1 g

Passer à l'agitateur magnétique durant ½ heure ; ensuite, laisser reposer et décantier. On obtient un liquide brun ambre, à conserver dans un flacon brun, à l'abri de la lumière.

Ce réactif ne gonfle pas les parois ; il colore la cellulose en rose d'abord, puis en violet après quelques heures. Appliquer une goutte sur la coupe toutes les 5 minutes, jusqu'au moment où le réactif ne se décolore plus. La coloration persiste durant plusieurs semaines.

Un exercice intéressant :

++ Laisser macérer des feuilles d'iris dans de l'eau, en les plaçant durant 12 heures à l'étuve à 35°. Cela va provoquer le développement rapide de *Bacillus amylobacter*.

++ Prélever un morceau de pulpe et traiter au chlorure de calcium ; la cellulose se colore en diverses nuances de bleu ciel ; les bactéries se colorent en violet et le protoplasme³² en jaune d'or.

Coloration de la cellulose par des colorants non iodés

Déshydrater les coupes au méthanol à 95°.
Plonger les coupes dans un bain alcalin (pH supérieur à 7) → solution alcoolique de soude ou de potasse à 10 %.
Laisser agir durant 10-15 ' et éliminer l'excès de solution alcoolique.
Ajouter le colorant en solution aqueuse (rouge Congo) et laisser agir durant 15 à 30'.
Laver en 2 bains successifs d'eau bidistillée.
Fixer la coloration en passant les coupes dans une solution aqueuse de sulfate de cuivre à 1 %, durant 15', puis rincer à l'eau.
Conserver dans la glycérine ou monter dans la GG.

Coloration de la pectine

Passer les coupes dans de l'eau acétique à 1 % maximum, puis rincer dans l'eau bidistillée.
Ajouter le colorant en solution aqueuse (safranine, bleu de méthylène) et laisser agir durant 15 à 30'.
Rincer puis observer dans l'eau.
On peut conserver les coupes colorées et montées dans une solution aqueuse d'acide borique à 2 % durant plusieurs mois, à condition de les luter à la paraffine (utiliser le triangle de Drigalski ³³)
Une goutte d'acide acétique ou lactique (notre préférence va à ce dernier qui sert de milieu d'observation) fait disparaître la coloration des pectines.

Colorant	Matières azotées, lignine, subérine, cutine	Composés pectiques
Safranine	Rouge cerise	Jaune orangé
Bleu de méthylène	Bleu clair	Bleu violet

Une autre technique intéressante

Traiter les coupes à l'hypochlorite de soude, puis rincer dans l'eau bidistillée.
Laisser durant 24 heures dans une solution aqueuse de chlorure de fer à 5 %, puis rincer plusieurs fois dans l'eau bidistillée.
Rincer ensuite 2x dans l'eau acétique à 1 %.
Plonger les coupes dans une solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 5 % durant 30 à 60'. Les membranes du collenchyme prennent une belle coloration bleue. Celle-ci est accentuée si on ajoute une goutte d'acide chlorhydrique ou d'acide nitrique.
Laver à l'eau puis monter dans la GG ; la coloration est définitive.
Autre possibilité : remplacer le chlorure de fer par de l'acétate de cuivre aqueux à 5 % → on obtient alors une coloration rouge.

Coloration de la lignine : le réactif de Maule. Il permet une coloration élective de la lignine.

Placer les coupes dans du permanganate de potassium à 1 %, durant 5', puis rincer dans l'eau bidistillée.

³² Ensemble du cytoplasme, du noyau et des organites vivants de la cellule.

³³ C'est en fait un agitateur à extrémité triangulaire, utilisé comme fer à luter et composé d'une tige de métal courbée trois fois ; chauffer à la flamme, poser un coin sur un bloc de paraffine et déposer la goutte suspendue le long de la LCO.

Placer dans de l'acide chlorhydrique en solution à 5 %, jusqu'à disparition complète de la coloration.
Rincer à l'eau 3x de suite.
Observer dans une goutte d'ammoniaque à 25 %.
OU
Exposer la coupe aux vapeurs d'ammoniaque pure, juste au-dessus du flacon ouvert, puis observer dans l'eau, ou mieux, dans l'eau glycinée → les éléments contenant de la lignine se colorent en rouge.

Seconde possibilité : la fuchsine ammoniacale.

Préparer une solution alcoolique à 95° de fuchsine acide à 1 %.
Ajouter de l'ammoniaque pure, jusqu'à obtention d'un liquide de couleur jaune fauve.
Plonger les coupes dans ce réactif durant 20 secondes → apparemment rien ne se passe !
Observer dans de l'eau pure → les éléments contenant de la lignine se colorent en rouge.

Cependant, cette technique n'est pas sélective, car elle colore également des éléments tels la subérine³⁴ et la cutine³⁵.

Troisième possibilité : la double coloration, vert d'iode + carmin aluné.

C'est une des colorations les plus utilisées en histologie végétale → les tissus lignifiés se colorent en vert. On peut simplifier les opérations en utilisant un réactif contenant les deux colorants : le carmin-vert de Mirande³⁶, ou réactif de Mirande (nous préférons les utiliser séparément).

Plonger les coupes dans de l'hypochlorite de soude pendant 15'.
Rincer dans de l'eau acétique à 1 % durant 2'.
Plonger les coupes dans du vert d'iode aqueux à 1 %, pendant 5'.
Rincer à l'eau bidistillée : 2x 1'.
Plonger les coupes dans du carmin aluné ³⁷ aqueux, pendant 5'.
Rincer à l'eau bidistillée : 2x 1'.
Rincer durant 1' à l'alcool éthylique à 95°.
Monter dans la glycérine.

Coloration de la subérine

La réaction de Höhnel

Préparer une solution aqueuse de potasse à 30 %.
Chauffer et y plonger les coupes → le tissu subéreux se colore en jaune.

La réaction de Van Wisselingh

Préparer une solution aqueuse de potasse à 30 %.
Chauffer et y plonger les coupes.
Plonger ensuite les coupes dans du lugol → la couche secondaire des cellules de liège (la seule à contenir de la subérine) se colore d'abord en rose violacé, puis ensuite en jaune orangé rougeâtre.

- Le vert d'iode colore les tissus subéreux en vert foncé.
- La fuchsine ammoniacale colore les tissus subéreux en rouge.
- On peut indirectement utiliser également le soudan III qui colore les substances lipidiques présentes dans les tissus subéreux.

Notez que la cutine présente quasi les mêmes réactions que la subérine.

³⁴ C'est un composé organique imperméable imprégnant les parois celluloses de certaines cellules végétales, et dont la transformation aboutit à l'élaboration du liège.

³⁵ C'est une substance imperméable lipidique, voisine de la subérine, constituant la cuticule des feuilles et provenant de la modification de la cellulose. C'est elle qui donne cet aspect cireux souvent rencontré.

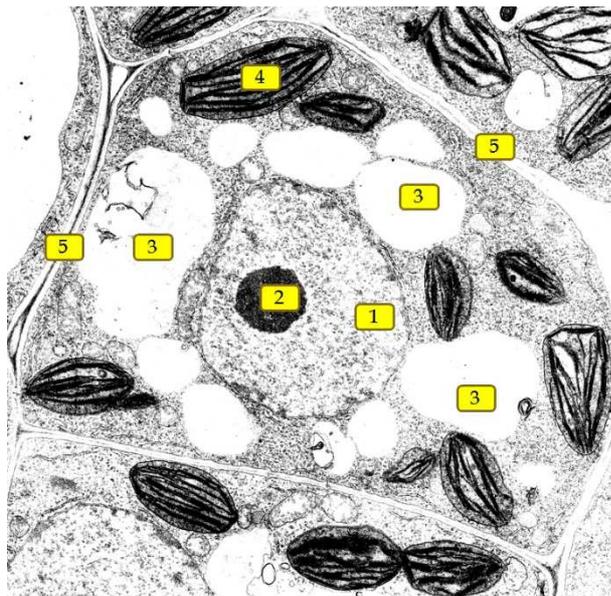
³⁶

Préparer à chaud une solution aqueuse d'alun de potasse ; laisser refroidir pendant 24 heures puis filtrer.
Dissoudre du carmin à saturation dans cette solution alunée, et laisser bouillir pendant 30', puis filtrer.
Mélanger 1 volume de vert d'iode aqueux à 1 % avec 10 volumes de carmin aluné ; bien agiter.
Ajouter 1 % de phénol ou de thymol.

Le réactif se conserve pendant très longtemps et est encore plus efficace en vieillissant.

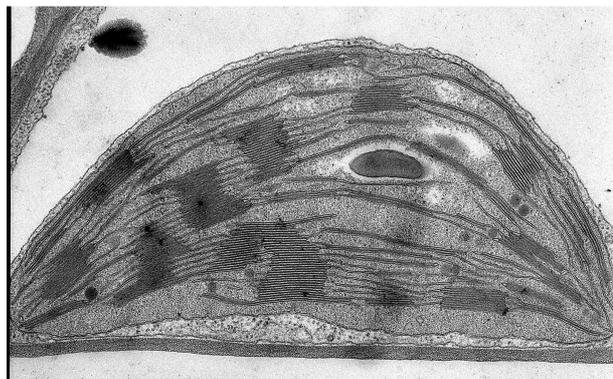
³⁷ L'alun de potasse, ou alun ordinaire, est un sulfate double d'aluminium et de potassium : $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$.

Considérations à propos du noyau



◀ Cellule de soja, observée au ME, 3000x et chloroplaste de feuille d'épinard, au ME 7000x. ▼ (photos G. Auderset)

1. Noyau.
2. Nucléole.
3. Vacuoles (ce sont les poubelles cellulaires).
4. Chloroplastes, contenant la chlorophylle.
5. Paroi composée de pectine et de cellulose.



Le noyau est déjà observable sans coloration, mais les détails sont peu évidents.
On va travailler sur du matériel frais (coupe ou lambeau de tissu).

PLUSIEURS POSSIBILITÉS

UTILISATION DE MATÉRIEL FRAIS

Préparer une solution alcoolique de vert de méthyle (100 cc eau bidistillée – 1 g vert de méthyle – 25 cc éthanol à 95°).

Y plonger les coupes ou le tissu entier pendant 15'.

Passer ensuite dans de l'eau acétique à 1 % pendant 15' → les noyaux sont colorés en vert et le protoplasme reste incolore.

OU

Préparer une solution aqueuse de rouge neutre (100 cc eau bidistillée – 2 g rouge neutre).

Y plonger les coupes ou le tissu entier pendant 30'.

Observer dans l'eau glycinée → les noyaux sont colorés en rouge et le protoplasme en rose.

UTILISATION DE MATÉRIEL FIXÉ ET INCLUS DANS LA PARAFFINE

Fixation : notre préférence va au fixateur de Hollande (ou picro-formol cuprique) → y laisser la pièce entre 8 et 24 heures, selon l'épaisseur.

Acide acétique cristallisable	1,5 cc
Eau bidistillée	100 cc
Acétate neutre de cuivre	2,5 g
Trinitrophénol	4 g
Formol à 40 %	10 cc

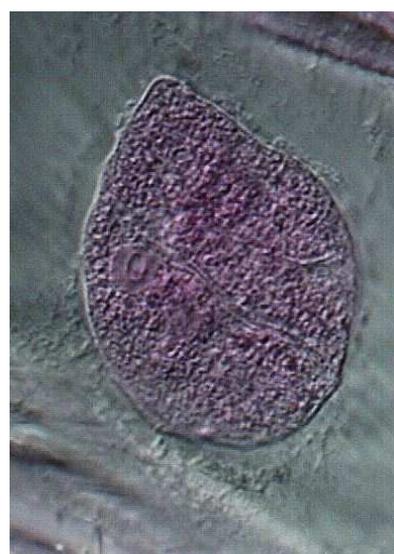
Coloration

De nombreuses possibilités s'offrent à nous :

- Safranine : 24 heures
- Vert de méthyle : 10'
- Fuchsine acide
- Violet de gentiane
- Eosine + hématoxyline
- Hématoxyline + orange G
- Hématoxyline + safranine
- Vert de méthyle + éosine

Durées de coloration variables selon la nature et la concentration du colorant.

Les cellules de l'épiderme d'oignon (*Allium cepa*) : leur contenu



OBSERVATION RAPIDE

- Prélever un bout d'épiderme.
- Monter dans du PVA coloré à la fuchsine acide ou au bleu d'aniline.

PRATIQUER DES COLORATIONS CELLULAIRES

- coloration possible avec phloxine B, Giemsa, fuchsine acide, éosine, rouge neutre, bleus divers.

PROTOCOLE 1

- ++ Dans un verre de montre, mélanger à parts égales du rouge neutre et une solution aqueuse de saccharose à 6 %.
- ++ Le rouge neutre est un colorant vital, à grande dilution (1/1.000ème à 1/10.000ème) : il pénètre dans la cellule sans la tuer. Une grande vacuole se colore en rouge. Elle renferme de l'eau et des substances dissoutes, élaborées par la cellule. Une mince couche de cytoplasme incolore sépare la membrane cellulaire épaisse de la vacuole. Le cytoplasme s'épaissit légèrement aux angles. Il entou-

re complètement le noyau. Dans ce noyau, les nucléoles³⁸, généralement au nombre de deux, sont bien visibles.

++ Rincer et monter dans l'Aquatex.

PROTOCOLE 2

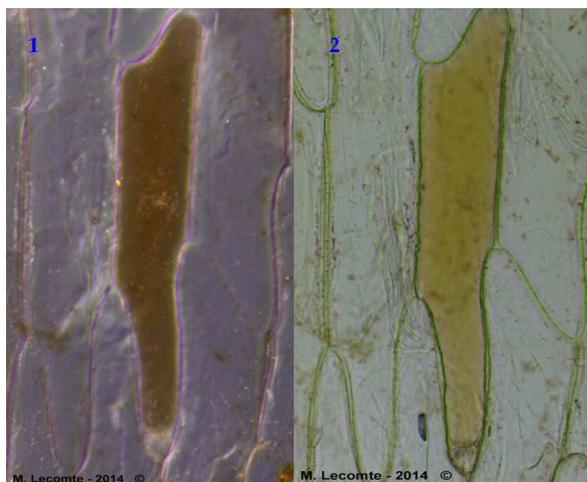
++ Dans un verre de montre, mélanger à parts égales du lugol et une solution aqueuse de saccharose à 6 %.

++ L'iode tue la cellule en provoquant la coagulation du cytoplasme et du noyau (c'est un fixateur) et en teintant en jaune certains éléments. Le cytoplasme prend une structure finement granuleuse qui permet de distinguer, au fort grossissement des gouttelettes sphériques réfringentes (plus brillantes) : ce sont des inclusions huileuses ; des organites de formes variées, non réfringents : ce sont des mitochondries³⁹, en forme de grains, de bâtonnets ou de filaments.

++ Rincer et monter dans l'Aquatex.

La même expérience est très facile à reproduire avec une feuille de poireau.

Le phénomène de PLASMOLYSE observé dans les cellules de l'épiderme d'oignon



→ Coloration au rouge neutre.

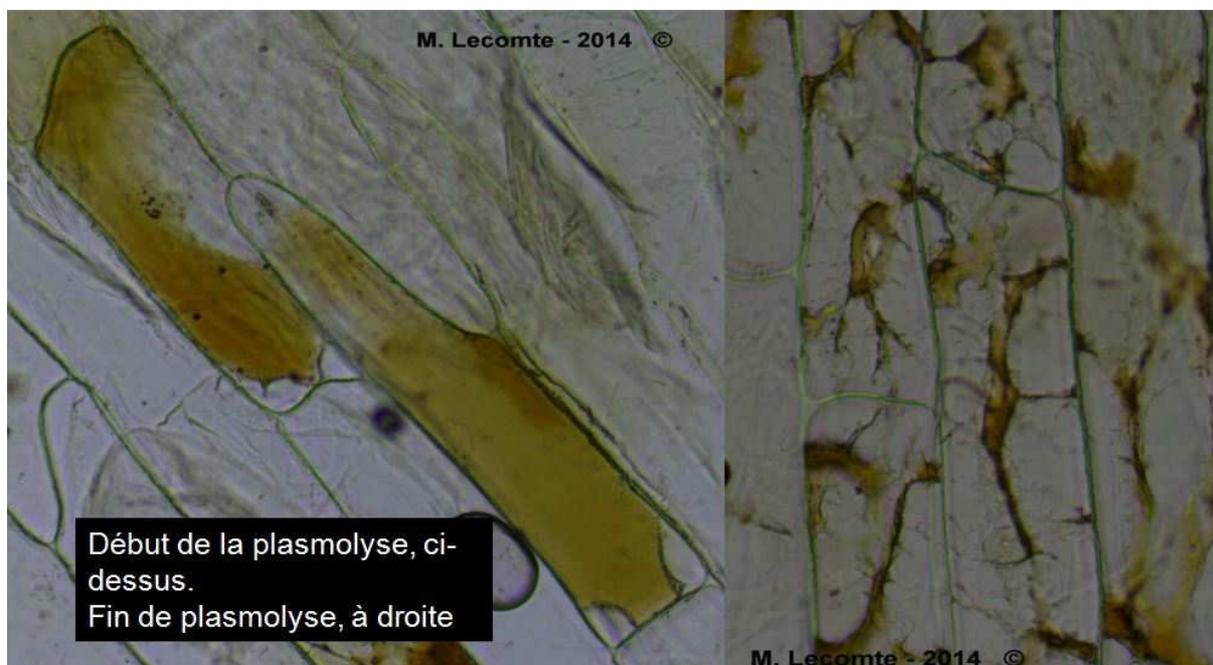
→ Rincer.

→ Provoquer la plasmolyse avec de l'eau salée ou sucrée (saccharose), de 6 à 20 % : 2 grosses gouttes déposées sur le spécimen puis couvrir avec une LCO. On peut aussi couvrir d'abord le fragment, dans une goutte d'eau, puis faire pénétrer la solution sucrée par aspiration avec un papier absorbant.

→ Monter dans la glycérine pure ou l'Aquatex.

1. Vacuole colorée au rouge neutre à 1/1.000 (observation en DIC).

2. La même cellule observée en lumière transmise.



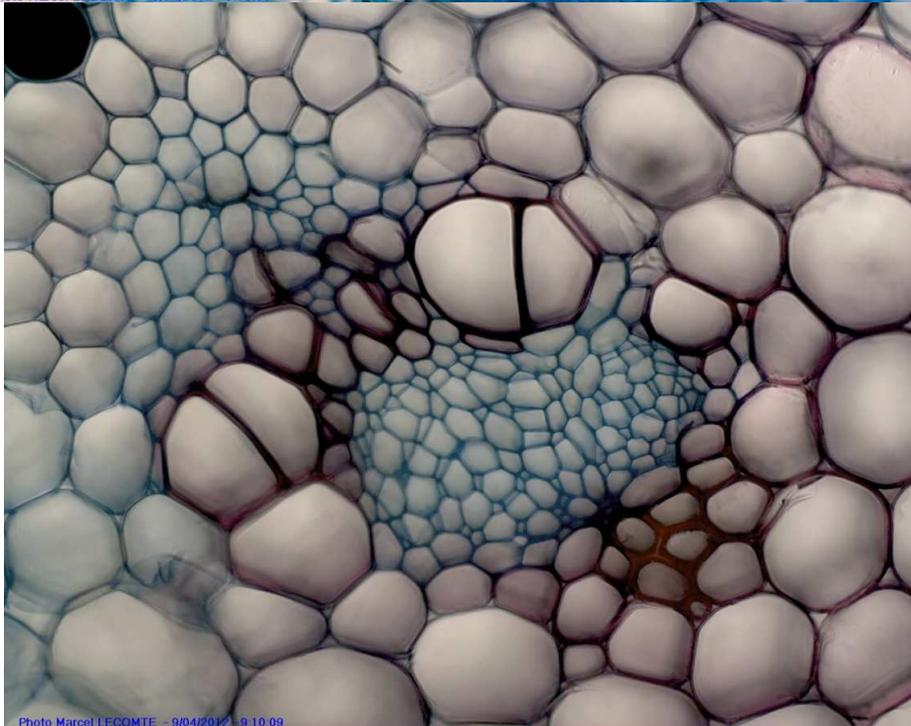
Début de la plasmolyse, ci-dessus.
Fin de plasmolyse, à droite

▲ Avec une concentration forte en sel de cuisine (20 %), la plasmolyse est violente et ratatine complètement les vacuoles.

³⁸ Nucléole : organite intracellulaire, formé de tubules et de granules, qui produit les ribosomes. Ceux-ci passent dans le cytoplasme et sont alors responsables de la synthèse des protéines.

³⁹ Mitochondrie : organite cytoplasmique, porteur de nombreuses enzymes nécessaires à la respiration.

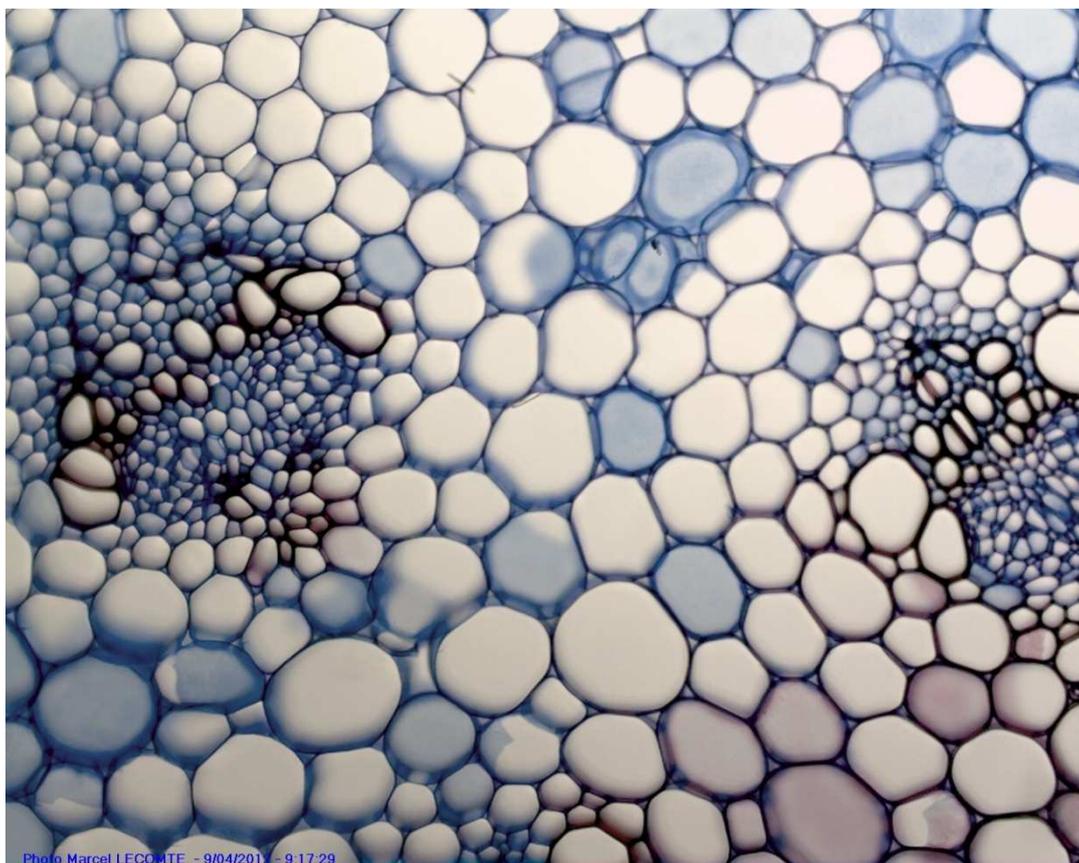
CT dans une tige de monocotylédone (*Lilium sp.*)



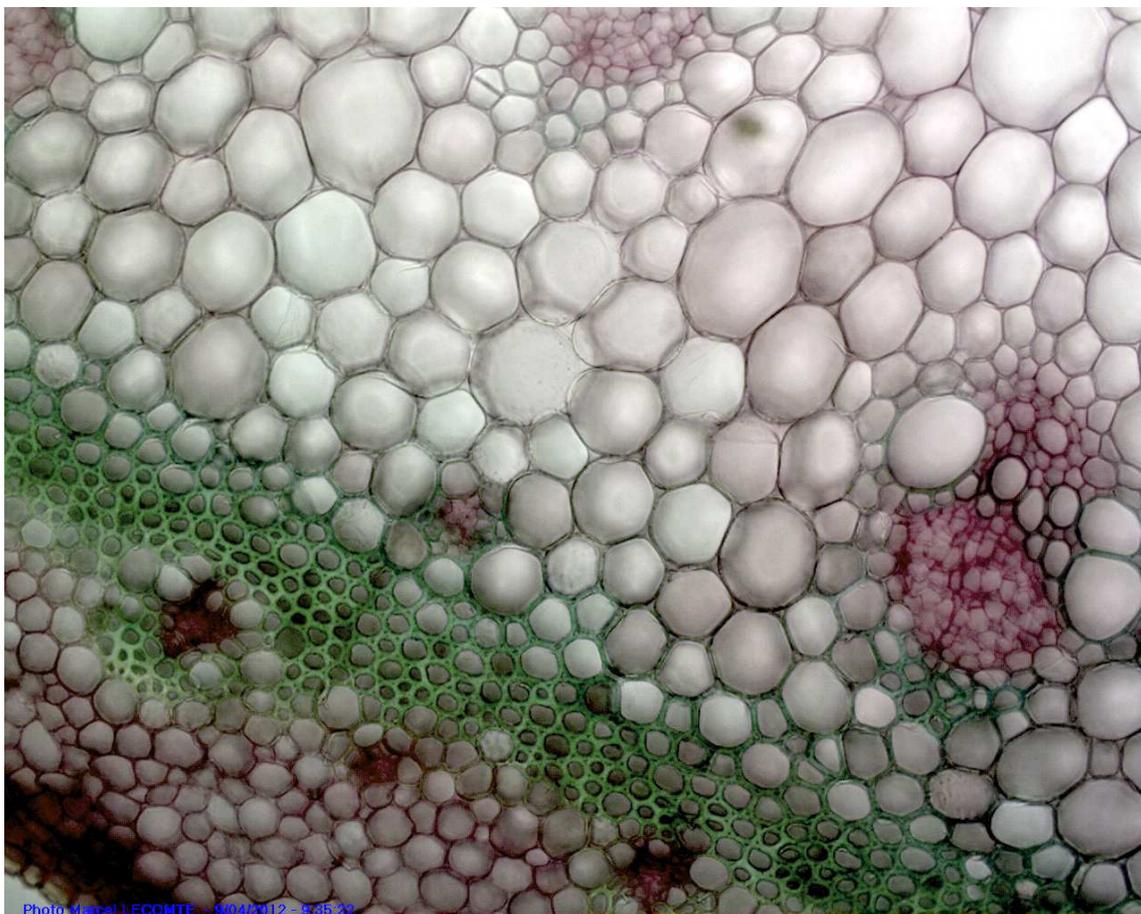
▲ Coloration avec Etzold grün ▲

MODE OPÉRATOIRE

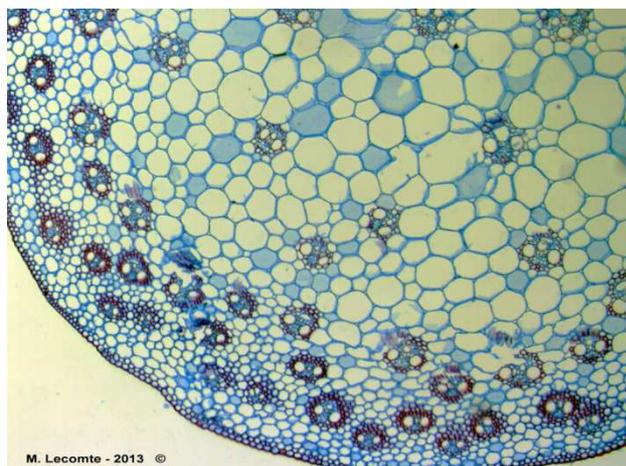
- ++ Trancher et trier les coupes ; il est très important de choisir les plus fines, sinon des problèmes de rétraction du médium vont se présenter lors du montage définitif. Les placer dans l'eau.
 - ++ Éliminer le contenu des cellules (eau de Javel).
 - ++ Rincer 3x à l'eau (eau bidistillée ou déminéralisée).
 - ++ Passer dans un bain d'eau acétique à 5 % (eau bidistillée + acide acétique glacial).
 - ++ Colorer (le choix du colorant va déterminer le conservateur).
- Etzold grün → isopropanol → Euparal.
 CVM (ou vert d'iode, ou carmin aluné, ou bleu de toluidine) → Aquatex.
 safranine + astra blue → Aquatex.



▲ Coloration avec Etzold bleu et montage dans l'Euparal ▲



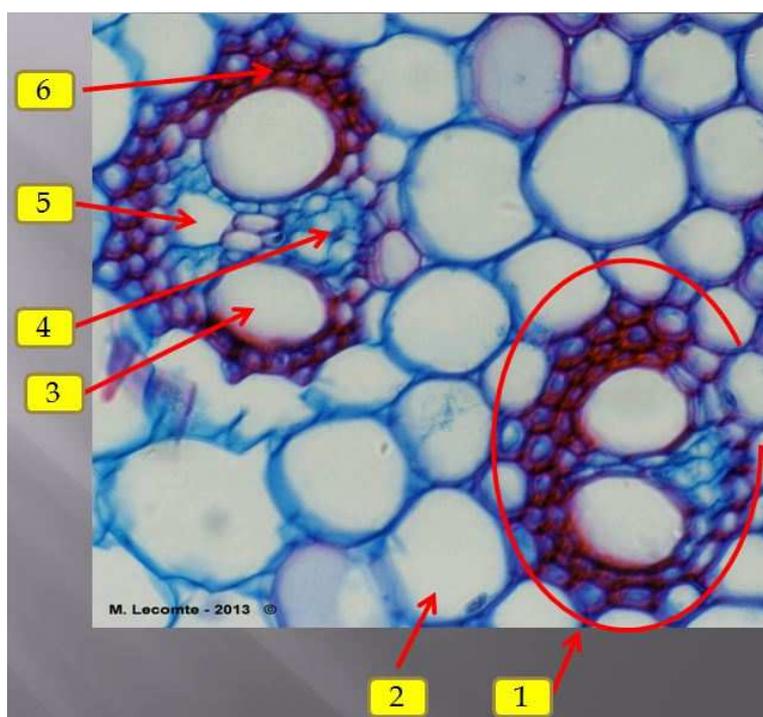
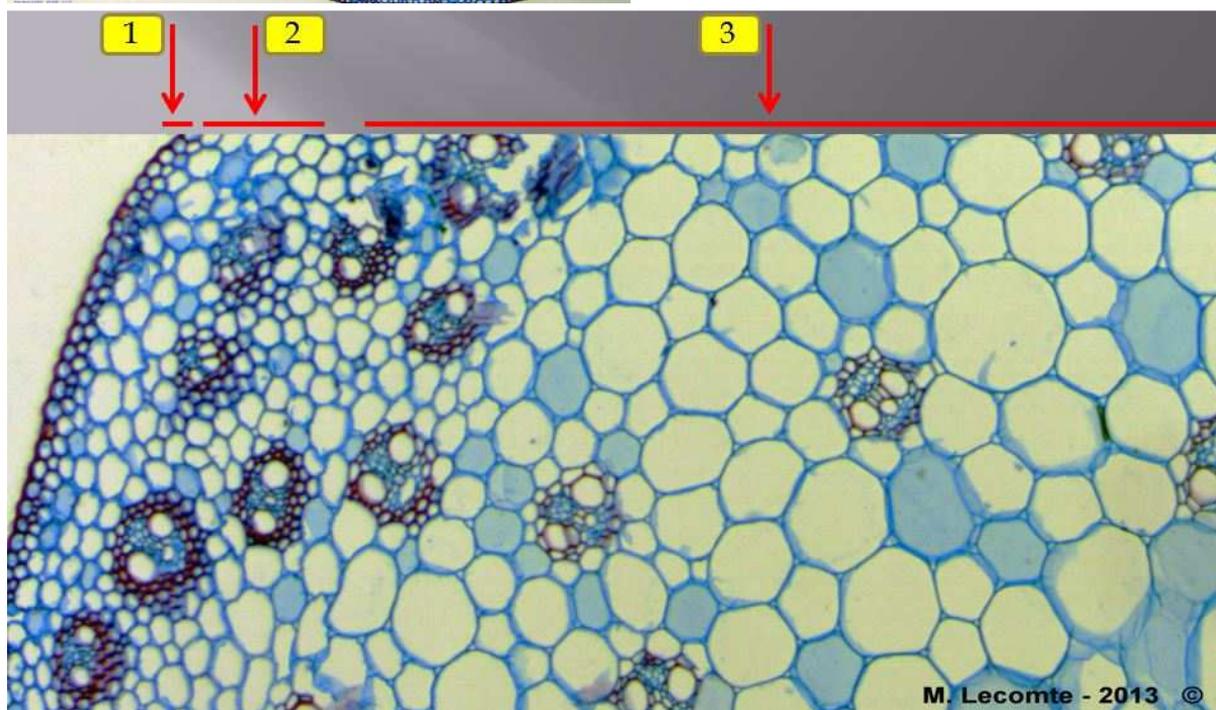
▲ Coloration au carmino-vert de Mirande et montage dans l'Aquatex ▲



◀ Coupe transversale dans une tige de maïs (*Zea mays*)

▼ **INTERPRÉTATION DE LA COUPE CI-DESSOUS**

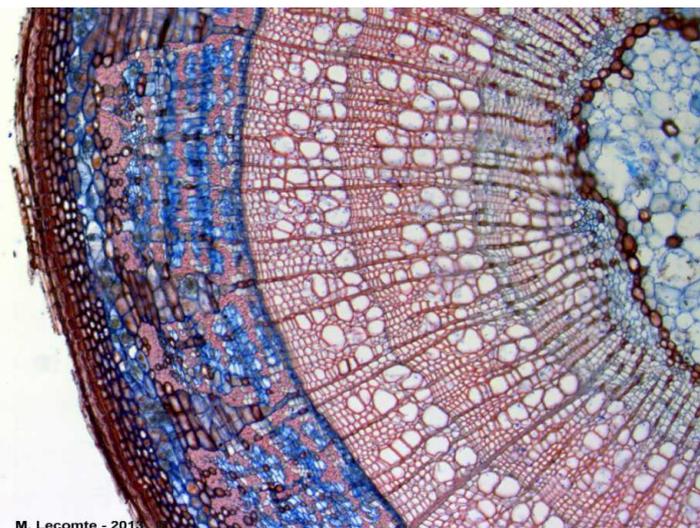
1. Zone épidermique : elle est constituée de cellules mortes, formant une assise cellulaire jouant un rôle protecteur, et limitant notamment la déperdition d'eau.
2. Zone corticale : parenchyme de l'écorce, constitué de cellules vivantes, permettant des échanges nutritifs.
3. Cylindre central, avec faisceaux collatéraux fermés, disposés au hasard, et grandes cellules médullaires parenchymateuses, à parois cellululosiques.



- ◀
1. Faisceau collatéral fermé (ou faisceau vasculaire).
 2. cellule parenchymateuse du cylindre central (encore appelé parenchyme médullaire).
 3. Vaisseau du métaxylème.
 4. Phloème (ou tissu libérien).
 5. Lacune du protoxylème (xylème de formation précoce).
 6. Fibres lignifiées (elles servent de soutien).

La très grande majorité des plantes monocotylédones sont des plantes annuelles ; on ne doit donc pas y chercher des zones de croissance secondaire. Dans ce type de structure, il n'y a pas de rayons médullaires différenciés (voir la coupe d'une dicotylédone, p. suivante).

La tige d'une dicotylédone

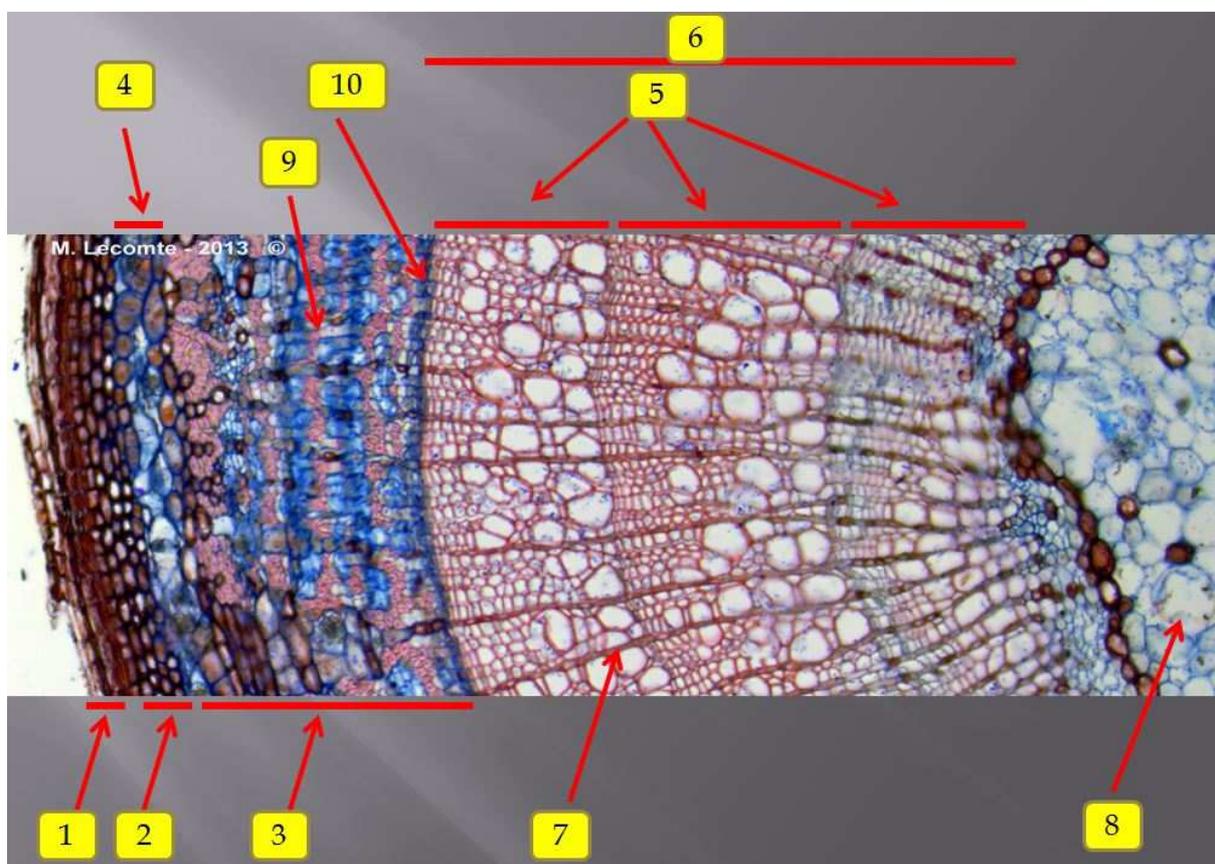


◀ Coupe transversale dans une tige de tilleul commun (*Tilia cordata*).

▼ INTERPRÉTATION DE CETTE COUPE

1. Zone épidermique : elle est constituée de cellules mortes.
2. Zone corticale.
3. Phloème secondaire, ou liber : c'est le tissu conducteur de la sève descendante élaborée chez les plantes vasculaires ; c'est une solution riche en glucides tels que le saccharose, le sorbitol et le mannitol.
Chez un arbre, 1 + 2 + 3 constituent l'écorce.
4. Phelloderme ou cambium : c'est un tissu marquant la limite entre le bois et l'écorce.

5. Cernes de croissance annuels.



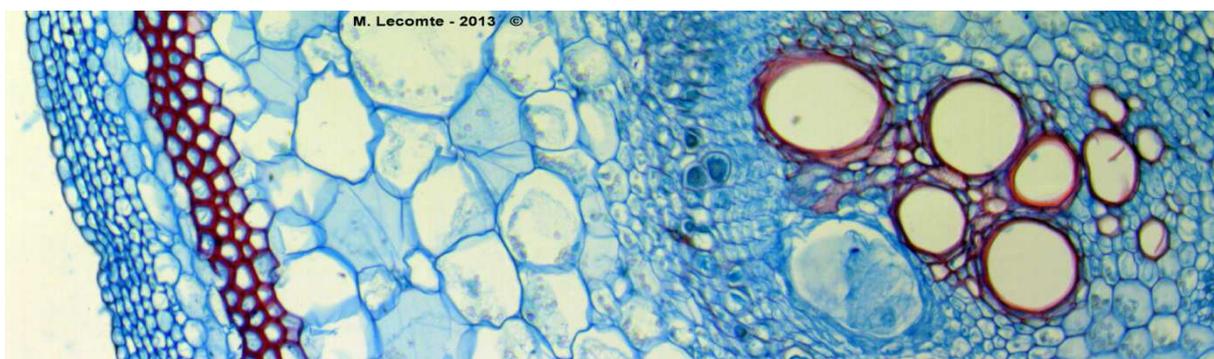
6. L'ensemble des cernes de croissance est appelé xylème secondaire : c'est le bois ; les vaisseaux qui le parcourent sont constitués de faisceaux de cellules mortes, ligneuses ; ils véhiculent la sève brute, minérale, composée d'une grande quantité d'eau et de nutriments extraits du sol par les racines (pour un arbre adulte, cela représente des dizaines de litres), pour les conduire vers les feuilles où aura lieu la photosynthèse.

7. Rayons médullaires : ce sont des fibres de sclérenchyme, un tissu dur, composé de cellules mortes, lignifiées, dites scléreuses, qui sert de soutien.

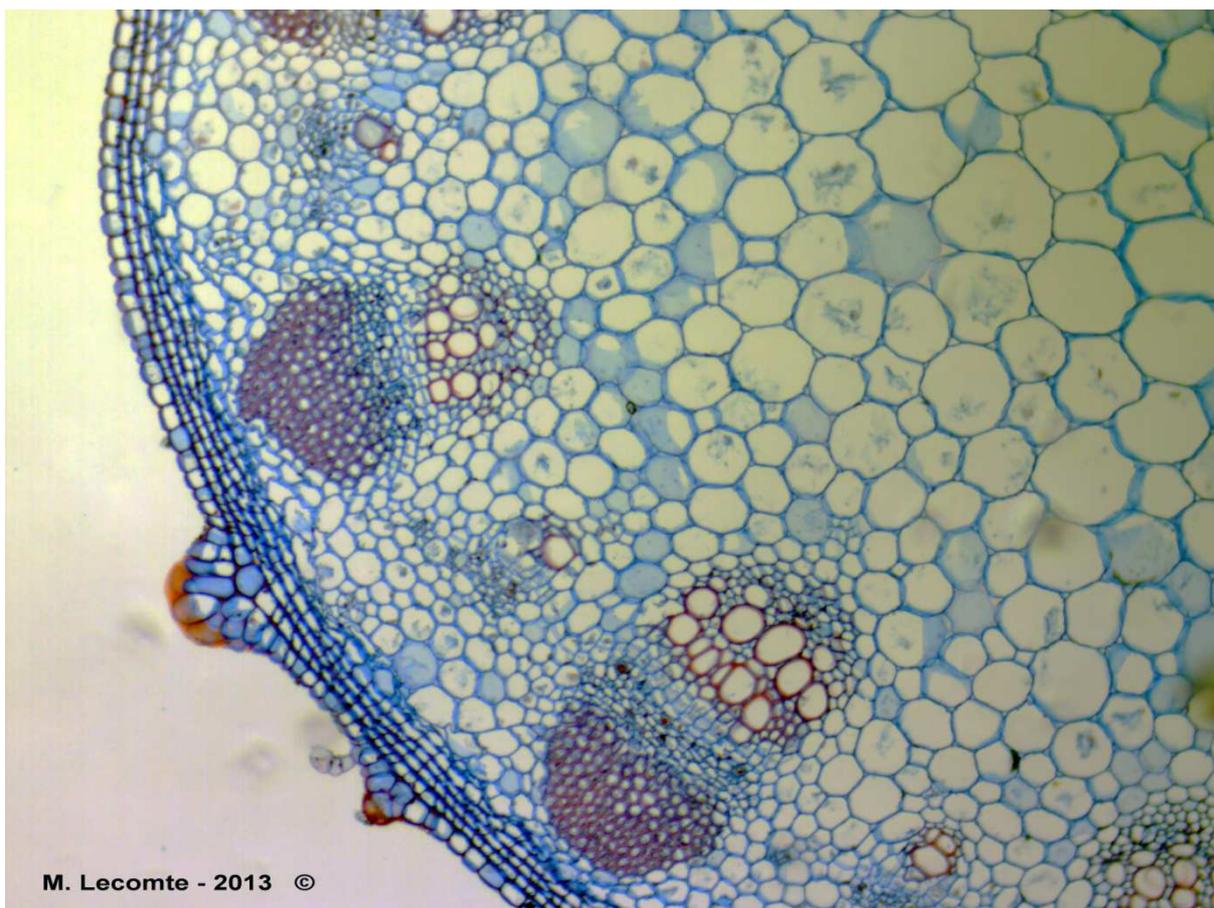
8. Moelle : partie centrale, molle, qui se réduit fortement avec l'âge, chez la plupart des arbres.

9. Parenchyme de dilatation : il est constitué de cellules vivantes, à paroi mince et perforée, qui permettent une circulation intercellulaire des diverses substances.

10. Région du cambium libéro-ligneux.

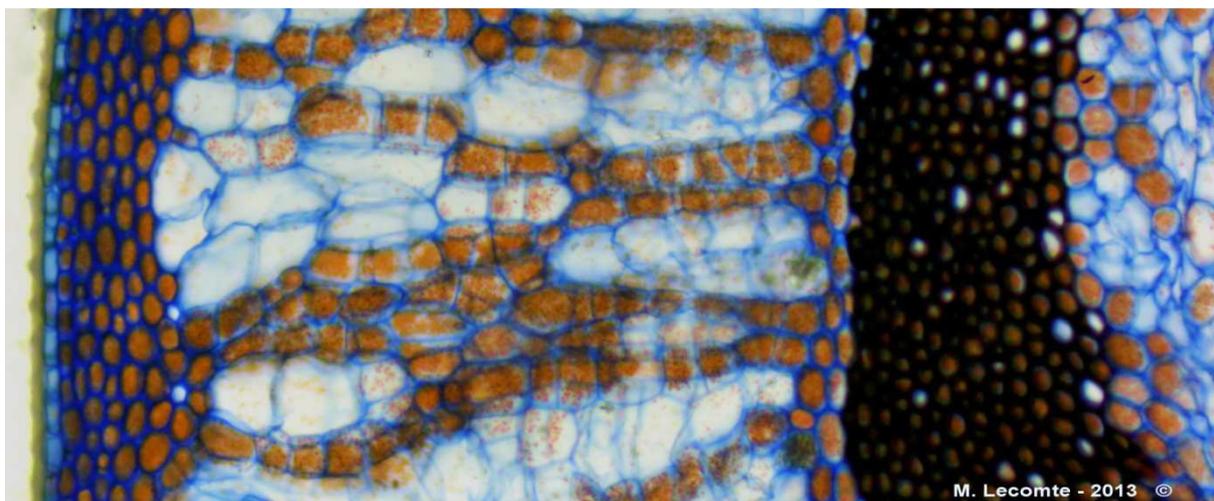


▲ Potiron (*Cucurbita maxima*). Tournesol (*Helianthus annuus*). ▼



M. Lecomte - 2013 ©

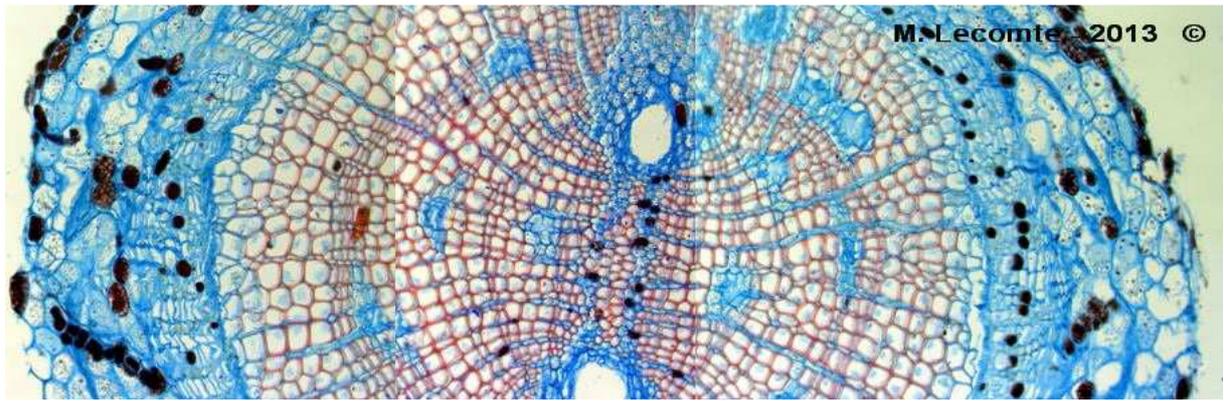
▲ ▲ Le mode opératoire utilisé est le même que celui qui figure en page 71.



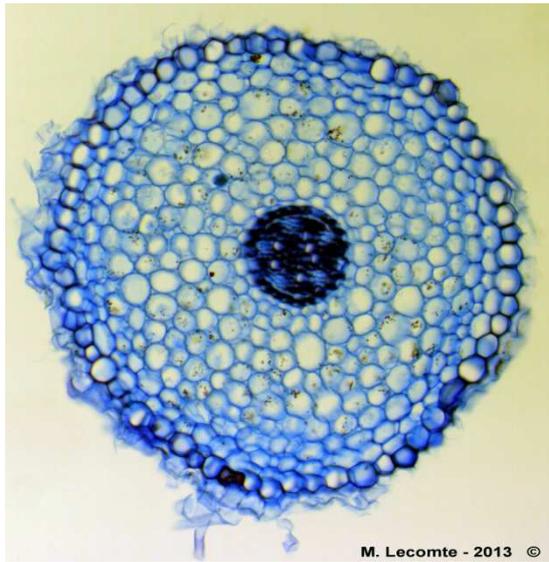
M. Lecomte - 2013 ©

▲ Aristolochie clématite (*Aristolochia clematitis*).

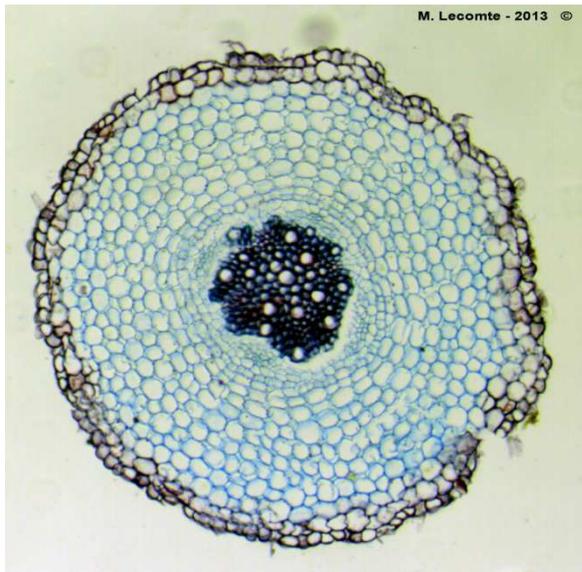
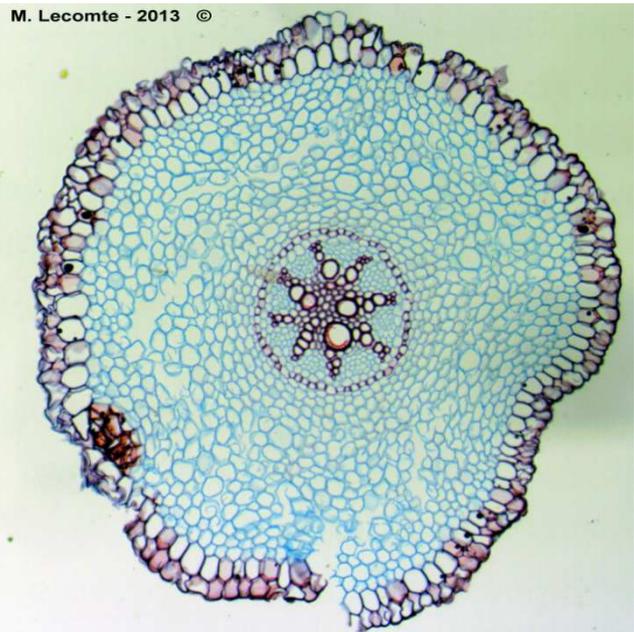
Coupe transversale dans la racine de mono et dicotylédones



▲ Pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) → montage de 3 photos. Sceau de Salomon (*Polygonatum verticillatum*). ▼

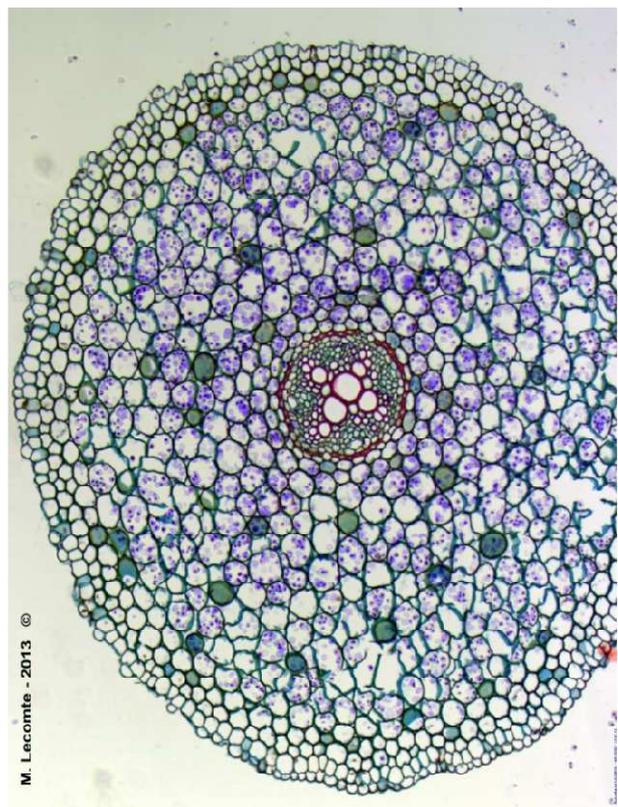


Muguet (*Convallaria majalis*). ▲



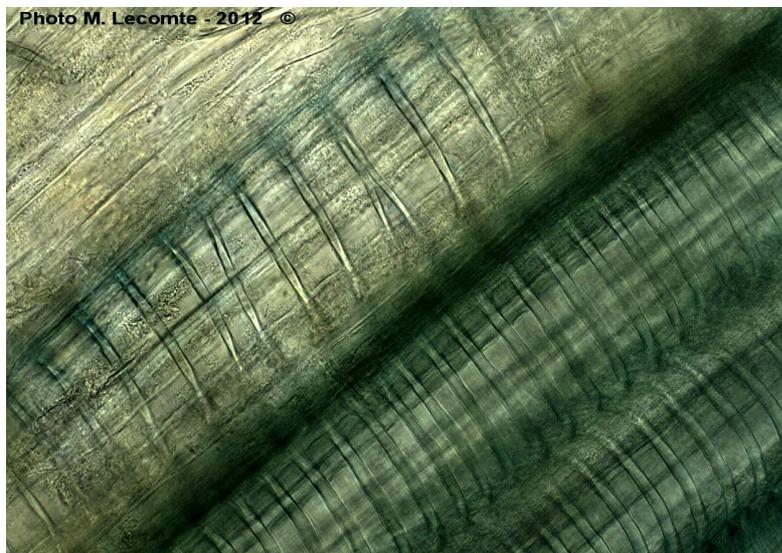
▲ Scrofulaire (*Scrophularia nodosa*).

▶ Renoncule (*Ranunculus* sp.).



Les tissus conducteurs (vaisseaux ligneux)

Le xylème, ou tissu ligneux, ou tissu vasculaire, assure essentiellement la conduction de la sève brute et des sels minéraux. Il comprend des éléments conducteurs (trachéides et vaisseaux ligneux) associés à des cellules parenchymateuses et souvent à des fibres ligneuses. Chaque vaisseau provient d'une file de cellules mortes, réduites à leurs membranes latérales pourvues d'épaississements lignifiés.



PRÉALABLE

◀ Utiliser une feuille de poireau (*Allium porrum*). Si on en fait bouillir des morceaux, on obtient un décollement des épidermes et une extraction facile des tissus libéroligneux avec un minimum de parenchyme résiduel.

MODE OPÉRATOIRE

++ Couper des morceaux de 4 à 5 cm dans une feuille de poireau bien verte.

++ Faire bouillir dans de l'eau pendant 10' (cela permet de séparer facilement les tissus de la feuille).

++ A l'aide d'une pince à bouts

très fins, prélever, en tirant, les vaisseaux conducteurs situés dans les nervures.

++ Les placer dans de l'eau de javel durant 20'.

++ Rincer durant 15'.

++ Placer la pièce dans de l'eau acétique (à 1 %) pendant 3 à 4'.

++ Rincer.

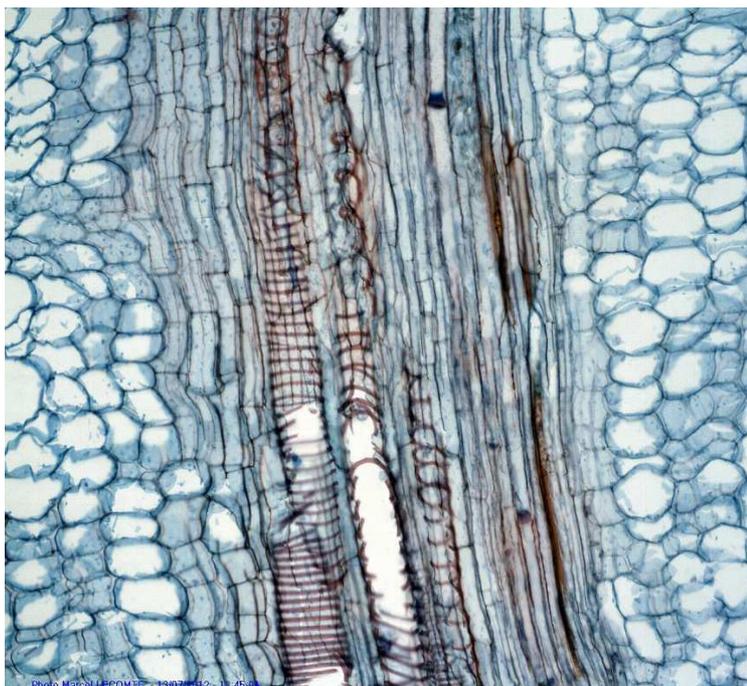
++ Passer dans le CVM durant 3'.

++ Rincer soigneusement à 2 reprises.

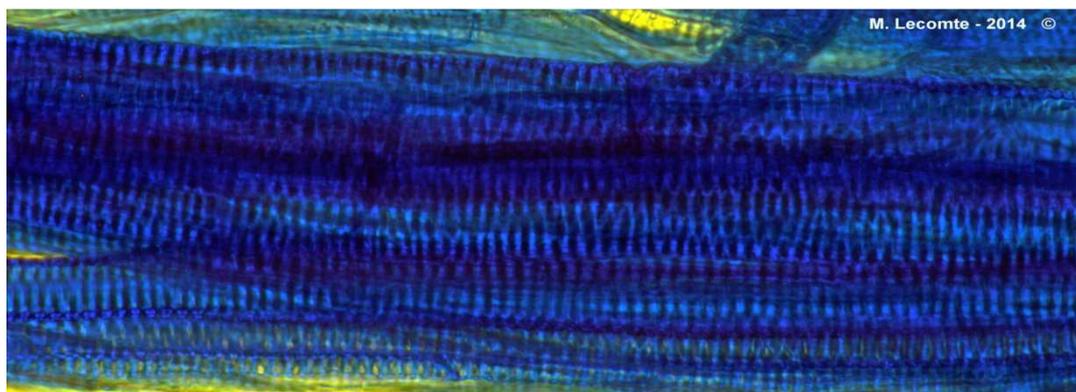
++ Poser sur une LPO et monter dans l'eau glycinée (observation extemporanée) ou dans la glycérine (préparation semi définitive, à luter au vernis à ongle).

Feuille de Cucurbitacée (potiron) ►

RM : on peut observer directement dans l'eau ou la glycérine, sans coloration. Mais la DC de Mirande permet d'aboutir à une observation de bien meilleure qualité.



Racine d'*Epipactis helleborine* ▼

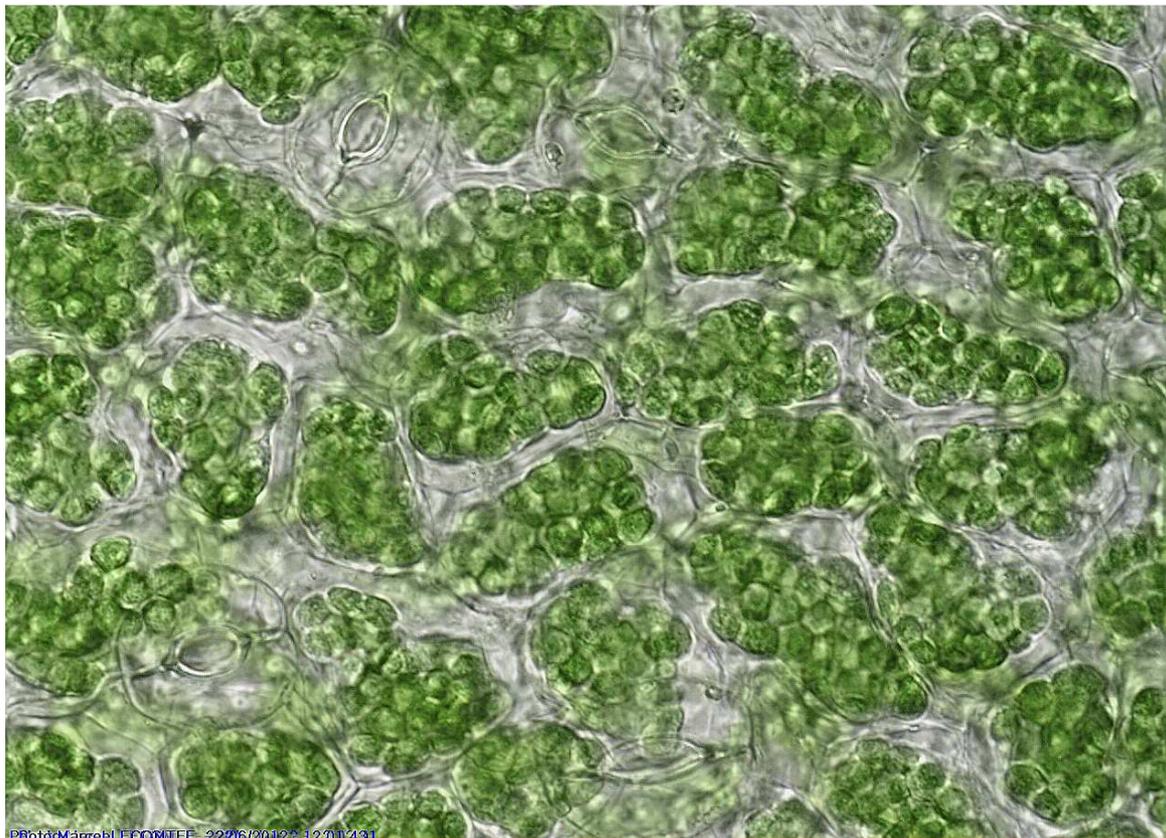


Les inclusions dans la cellule végétale

Chloroplastes des feuilles

Les chloroplastes sont des organites des cellules végétales qui contiennent de la chlorophylle. Ils jouent un rôle très important dans le cycle du carbone et la photosynthèse. Ils peuvent également contenir parfois des caroténoïdes.

Les feuilles du bourgeon terminal d'une élodée (*Elodea canadensis*), plante aquatique répandue dans les cours d'eau et étangs, se prêtent bien à l'observation des chloroplastes. On peut également utiliser des feuilles d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou du poivron vert (*Capsicum annuum*).



▲ Cotylédon de myosotis (*Myosotis* sp.) ; quelques stomates sont également visibles.

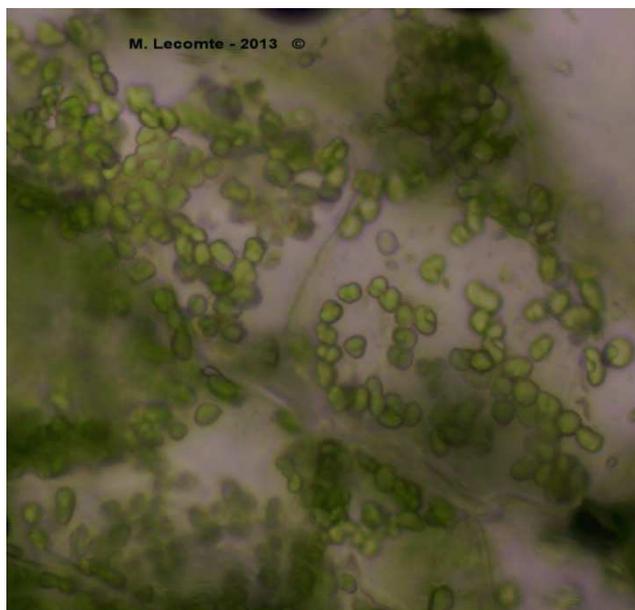
Feuille d'une Crassulacée ornementale : *Crassula ovata*. ▼

MODE OPÉRATOIRE

Avec une pince fine, on prélève un morceau de feuille, et on la place entre LPO & LCO, dans une goutte de lactoglycérol. Nous privilégions ce milieu d'observation, car dans l'eau, il y a toujours des bulles et il s'avère très difficile de les faire disparaître sans détruire les cellules.

Observation (objectifs x20, x40).

Chauffer très légèrement, si nécessaire, pour faire disparaître les bulles d'air (attention de ne pas « brûler » la préparation, car les cellules seront thermolysées).

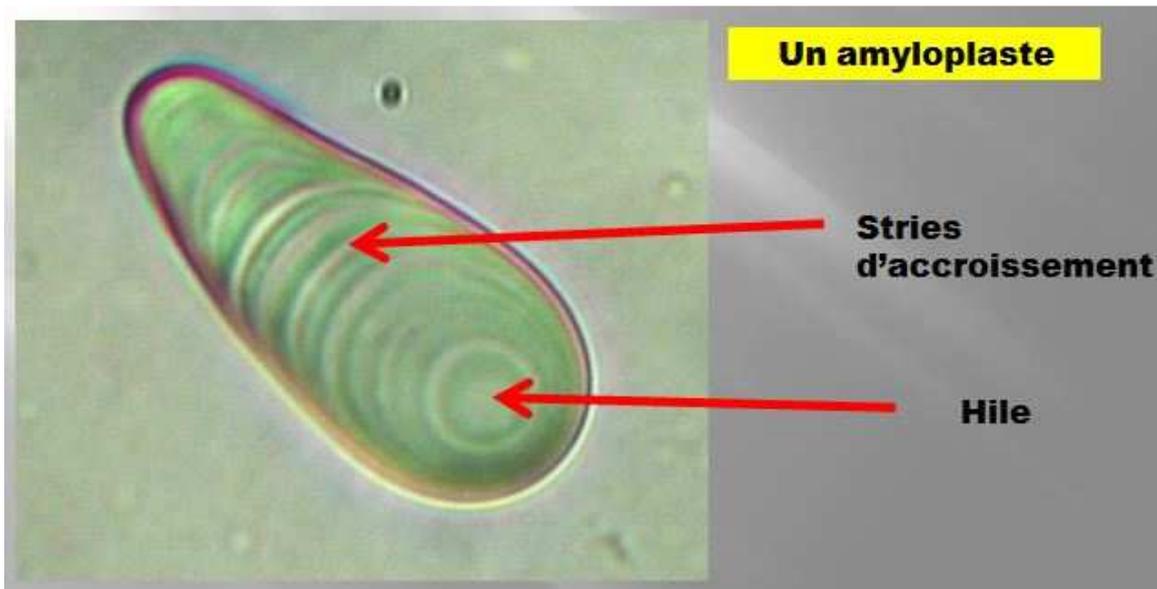


Amyloplastes dans la pulpe de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et de banane

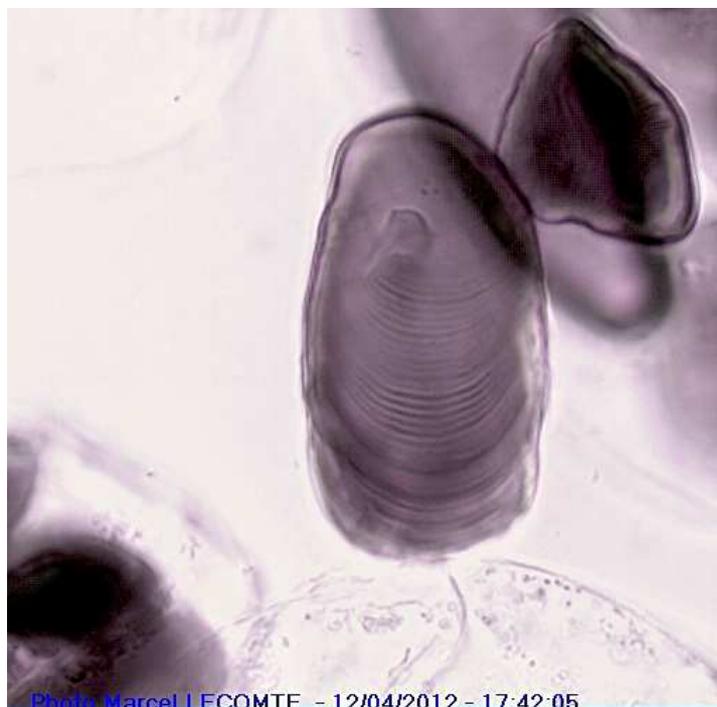
Un plaste est un organite intracellulaire végétal, qui peut se charger de divers éléments. On parle de chloroplastes quand ils sont chargés de chlorophylle. Les amyloplastes accumulent l'amidon ; d'autres se chargeront de carotène. L'amidon est un sucre complexe, qu'on ne trouve que dans le monde végétal (les animaux n'en fabriquent pas). C'est une substance de réserve, correspondant à la graisse animale : on l'appelle aussi féculé.

On va également le rencontrer dans les haricots, le maïs, le manioc, les petits pois.

Le changement de couleur qui se manifeste en présence d'iode est appelé « réaction amyloïde ».



▲ Pomme de terre : observation dans l'eau glycinée – x40.



MODE OPÉRATOIRE

→ Gratter la pulpe du tubercule avec une aiguille lancéolée.

→ Diluer dans une goutte d'eau distillée et observer (les grains d'amidon sont peu colorés).

Ensuite,

→ Mélanger une goutte de lugol avec 5 à 10 gouttes d'eau (avec du lugol pur, la coloration sera trop forte) ... on peut également utiliser du melzer ou du liquide de Baral (IKI).

→ couvrir avec une LCO et observer : les stries de croissance sont nettement visibles.

→ Éponger et monter dans l'Aquatex.

◀ Pomme de terre : observation dans le lugol dilué 5x – x40.



Photo Marcel LECOMTE - 12/04/2012 - 17:37:58

▲ Pulpe de banane : grains d'amidon non colorés. Ils sont visiblement contenus dans des sortes de vésicules ▲

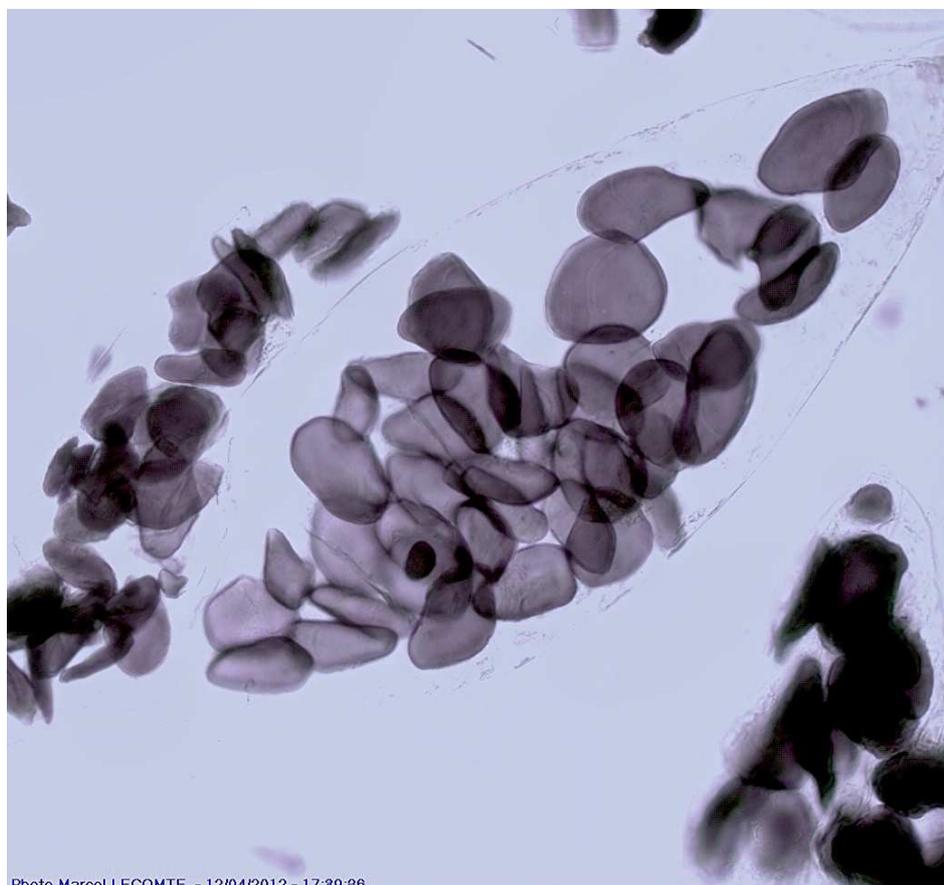
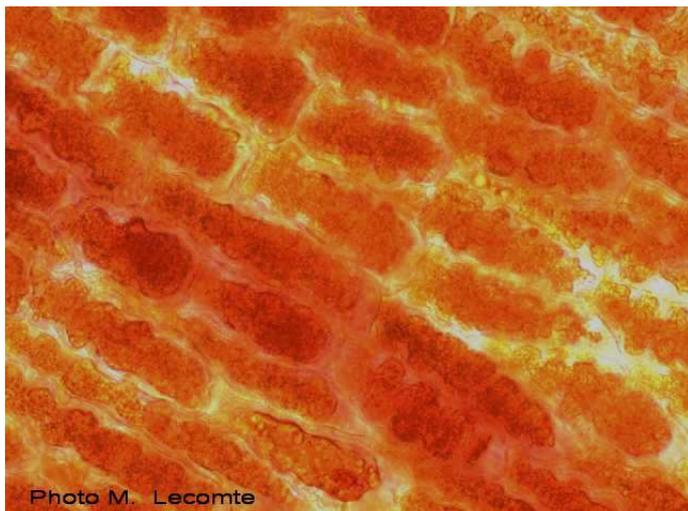


Photo Marcel LECOMTE - 12/04/2012 - 17:39:36

Coloration (réaction amyloïde) des grains d'amidon, sous l'action du lugol selon Moser dilué (1 goutte de lugol pour 5 g. d'eau bidistillée). - x20. ▲

Chromoplastes chez les fleurs et les fruits



◀ Fleur ligulée d'un capitule de Composée (cultivar), avec des chromoplastes orangés.

Ce sont des organites cellulaires qui contiennent des pigments caroténoïdes (pigments jaune, rouge ou orangé). La tomate, le poivron jaune, la carotte sont riches en chromoplastes. Voir également tous les pétales colorés.

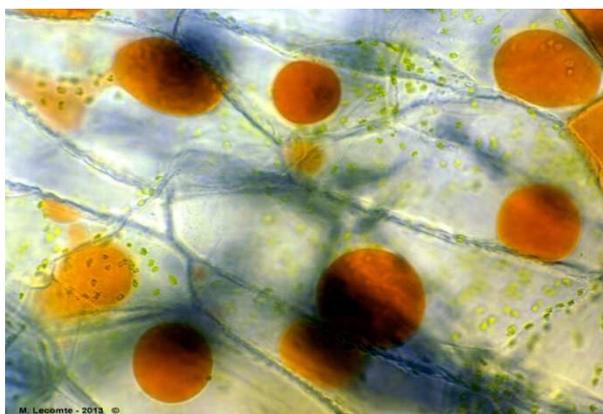
MODE OPÉRATOIRE

++ Avec une pince fine, prélever un morceau de pétale (fleur) ou de pelure (tomate).

++ Le placer entre LPO & LCO, dans une goutte d'eau glycinée. Nous privilégions ce milieu d'observation, car dans l'eau, il

y a toujours des bulles et il s'avère très difficile de les faire disparaître sans détruire les cellules.

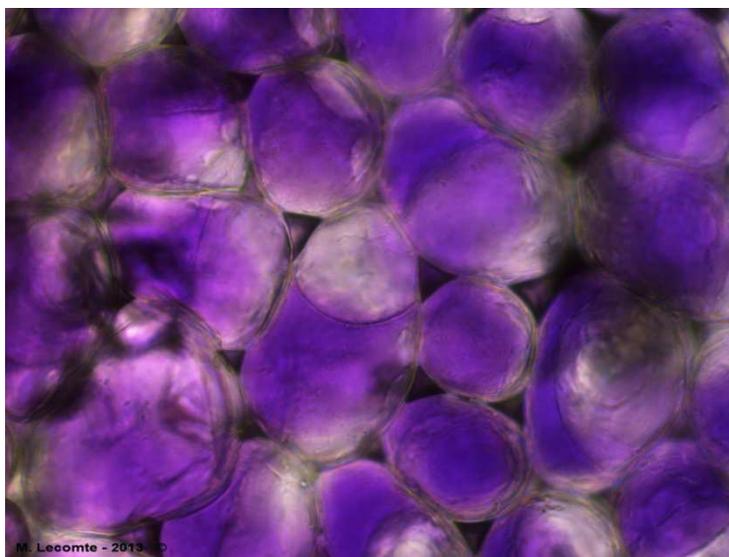
++ Observation à 20x et 40x. Chauffer très légèrement, si nécessaire, pour faire disparaître les bulles d'air (attention de ne pas « brûler » la préparation).



◀ Chromoplastes rouges d'un pétale de bégonia retombant (*Begonia pendula*) → espèce intéressante à observer car les fleurs mâles sont très différentes des fleurs femelles. ▼

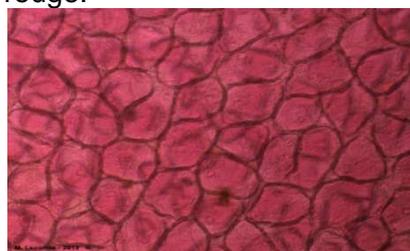


Une observation attentive dans l'eau a permis de mettre en évidence ces formations curieuses sur les pétales, auxquelles semblent s'accrocher des gouttelettes d'un liquide rouge, qui disparaissent à la moindre trace de chauffage.

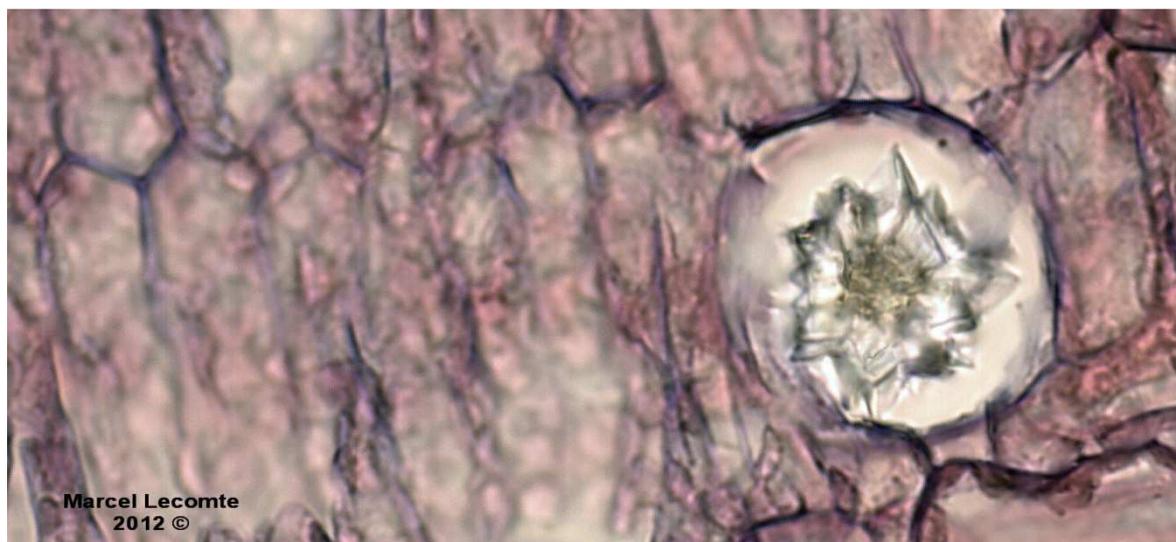


◀ Pied d'alouette (*Delphinium consolida*)

Nous avons réalisé des essais d'observation dans le lactoglycérol, le CLP, le lactophénol de Amann, afin de tenter de remédier au problème des bulles, mais cela présente un inconvénient majeur : l'acide lactique fait virer le violet en rouge.

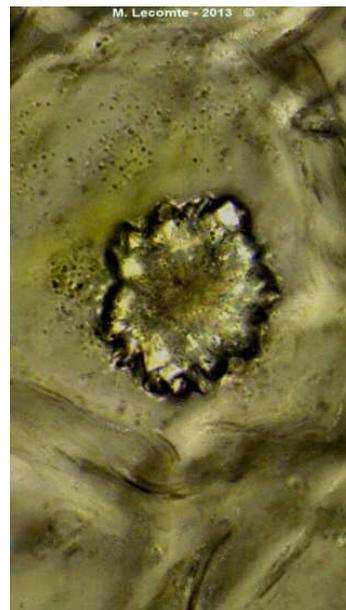
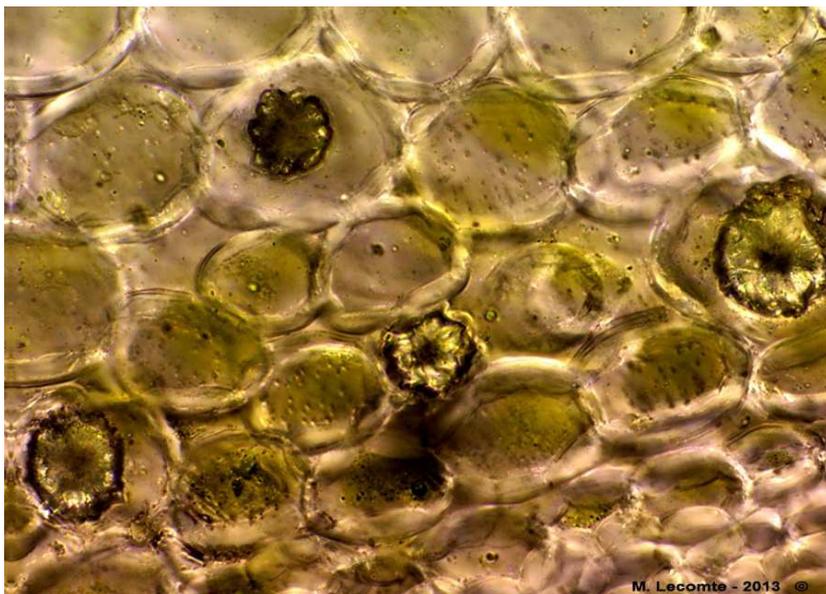


Cristaux maclés⁴⁰ d'oxalate de calcium (dits cristaux en oursin, ou encore « druses ») dans une coupe de feuille de peuplier (*Populus nigra*)



⁴⁰ Une macle est un édifice cristallin constitué par un assemblage de plusieurs cristaux d'une même espèce minérale, accolés selon des plans de symétrie bien précis.

Cristaux en oursin dans une coupe de tige de lierre (*Hedera helix*)

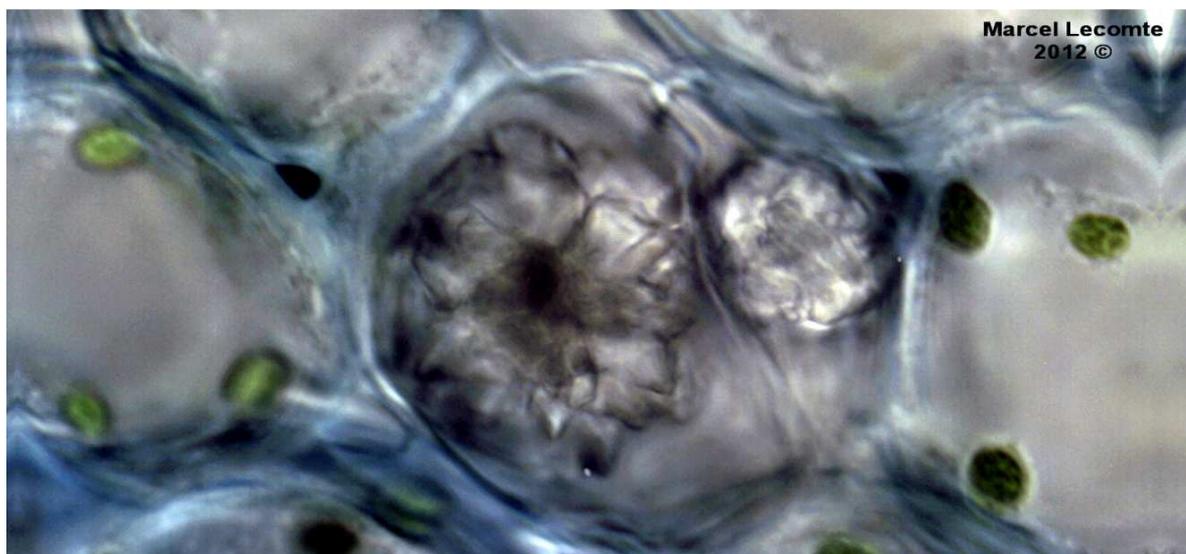


MODE OPÉRATOIRE POUR UNE PRÉPARATION DE ROUTINE

1. Pour le peuplier, choisir une feuille mature et prélever un morceau de 1 cm² dans la partie basale ; pour le lierre, prélever une feuille de grande taille, avec un pédoncule bien ferme.
 2. Avec un microtome de Ranvier (ou tout autre moyen choisi), réaliser une dizaine de coupes transversales les plus fines possible, dans le pédoncule et dans la feuille.
- ++ Observer dans l'acide lactique pur, l'eau glycinée ou l'eau bidistillée (selon notre ordre de préférence) → Glisser les coupes encore humides en biais dans le médium, avec une pince très fine, afin d'éviter la formation de bulles.
- ++ En cas de bulles (ce qui sera généralement le cas), chauffer la lame avec précaution, plusieurs fois de suite, jusqu'à obtention d'une lame nette de « taches noires ».

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE PRÉPARATION DÉFINITIVE

1. & 2. Comme ci-dessus.
- ++ Colorer une moitié au carmin aluné (5') et l'autre moitié au vert d'iode (30''), ou colorer en une seule fois au CVM (5 à 10').
- ++ Bien rincer à l'eau bidistillée.
- ++ Préparer une LPO avec une goutte d'Aquatex.
- ++ Glisser les coupes encore humides en biais dans le médium, avec une pince très fine, afin d'éviter la formation de bulles (s'il y en a, il ne sera pas possible de les faire disparaître).

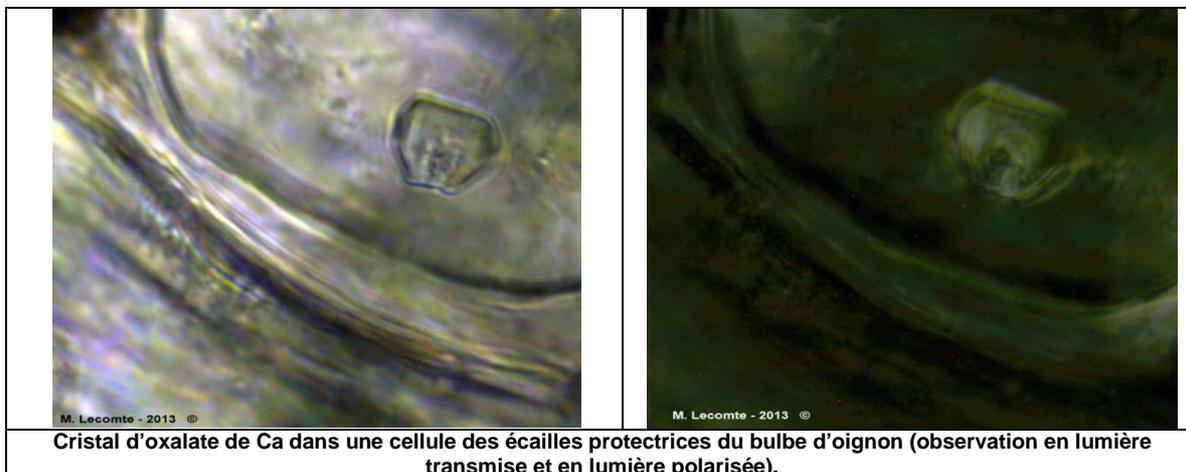


L'acide oxalique (ou acide éthanedioïque – C₂H₂O₄) se rencontre à l'état naturel sous forme d'oxalate de potassium ou de calcium dans les différentes parties de nombreuses plantes (feuilles et pédoncu-

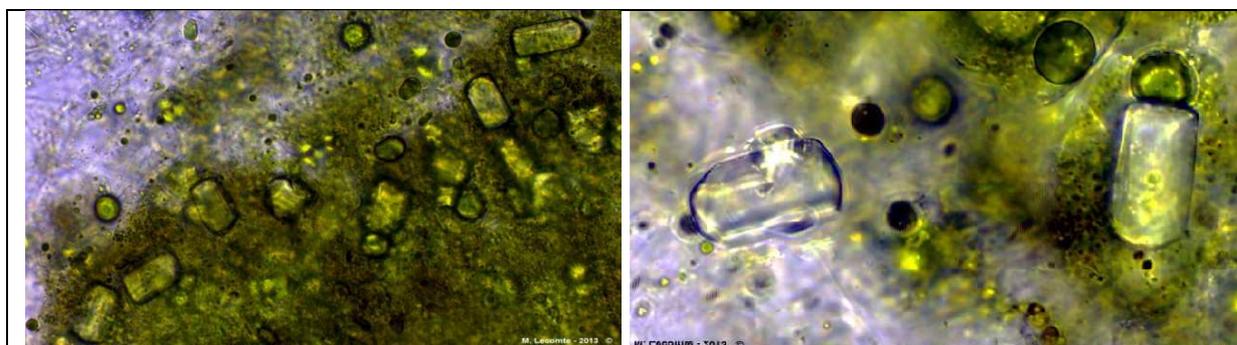
les, racines et rhizomes). Il se trouve en très grande quantité dans les feuilles de betterave, de rhubarbe, d'épinard, d'oseille, dans les fèves de cacao, et toutes les représentantes du genre *Oxalis*. On en rencontre également dans les noix, les noisettes, les fraises, les figues, les agrumes, le céleri, le persil, les carottes, la roquette, les haricots ... On le rencontre aussi dans le vin, en compagnie de l'acide tartrique.

Il est peu soluble dans les solvants organiques, mais plus dans l'eau, surtout au-dessus de 20°C. Les précipités d'oxalate de calcium sont responsables des calculs rénaux.

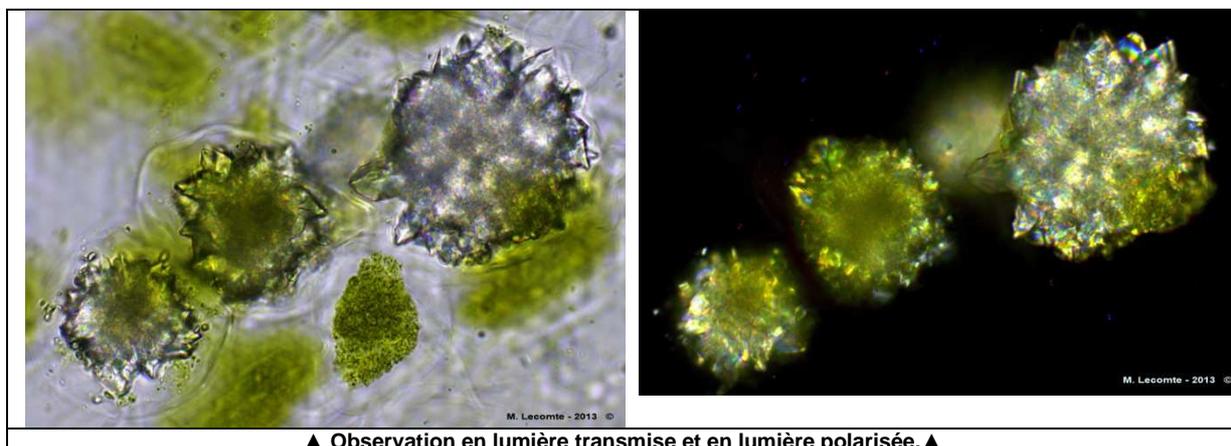
En chauffant de l'acide oxalique avec de la diphenylamine, il se forme une couleur bleue appelée bleu d'aniline.



Cristaux rhomboédriques d'oxalate de calcium dans les cellules de *Begonia* sp.



Druses d'oxalate de calcium dans les cellules de *Rheum rhabarbarum* (rhubarbe)



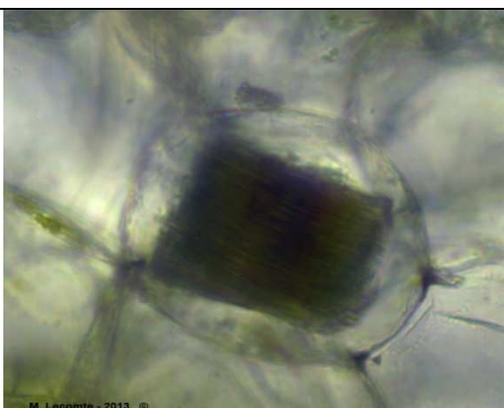
Druses et raphides d'oxalate de calcium dans les feuilles de la plante ZZ



Lors d'une visite dans une grande surface de jardinerie, nous avons eu l'œil attiré par une plante inconnue à nos yeux, aux feuilles nues et brillantes. Pressentant la présence de cristaux, nous avons opéré le prélèvement discret d'une feuille (avec un évident sentiment de honte, mais la connaissance a ses exigences), afin de la torturer pour lui faire avouer ses secrets.

◀ *Zamioculcas zamiifolia* (image empruntée sur le net), dont les feuilles mesurent 7-10 x 3-4 cm.

Appartenant à la famille des *Araceae*, et unique représentante du genre, cette plante aux fleurs discrètes et peu spectaculaires (c'est un spathe, comme chez tous les *Arum*), est facile à cultiver pour les professionnels et très recherchée comme plante d'intérieur, vu sa facilité d'entretien (vivace, à feuillage persistant) et son aspect esthétique (belles feuilles brillantes) ; comme son nom est assez difficile à mémoriser, les horticulteurs l'appellent simplement « plante ZZ », à cause de ses initiales.

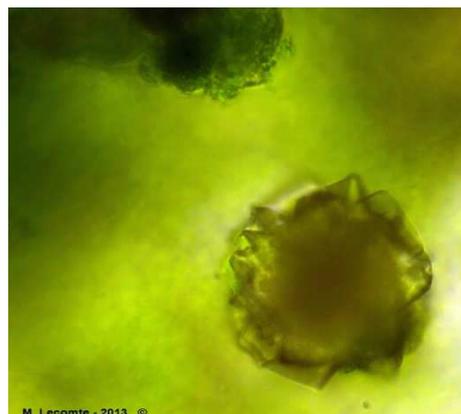
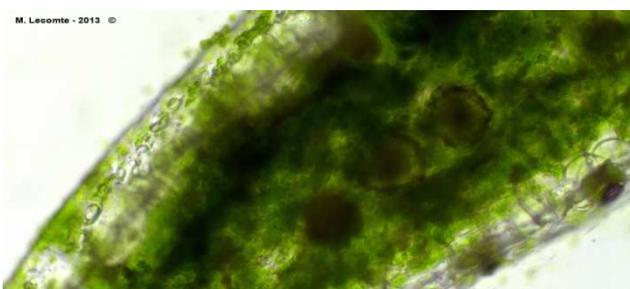


Des coupes transversales réalisées au niveau du pétiole et de la nervure principale attestent la présence de cellules remplies de bâtonnets très serrés.



Au contact de la lame du rasoir, certaines cellules éclatent ; les bouquets de bâtonnets se séparent et la préparation est envahie de raphides (fines aiguilles cristallines d'oxalate de calcium).

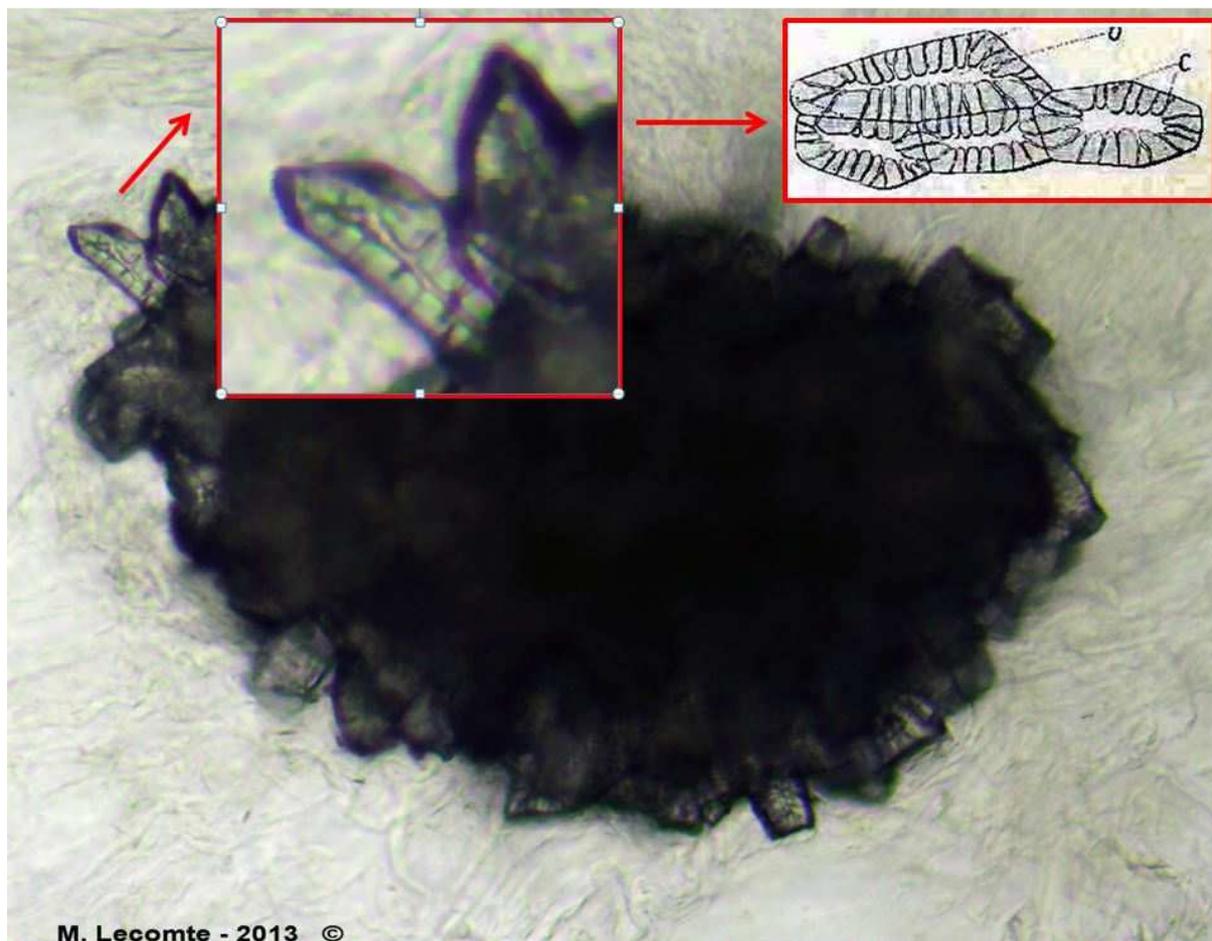
Des coupes transversales ont également permis de mettre en évidence la présence de nombreux cristaux en oursin, concentrés surtout en bordure de la feuille.



Cellules pierreuses dans la chair d'une poire

Lorsque vous dégustez une poire (fruit de *Pyrus communis*, et de nombre de cultivars), vous avez certainement déjà eu l'impression de sentir de petits grains croquants sous la dent, comme de minuscules grains de sable.

Cette sensation traduit simplement la présence dans la chair du fruit de sclérites (ou scléréides), des cellules dures, à paroi très épaisse, qu'on a appelées cellules pierreuses. Elles font partie du sclérenchyme, c'est-à-dire des tissus de soutien, et leurs amas peuvent être très gros, jusqu'à être visibles à l'œil nu. Un sclérite de départ, simple et de petite taille, génère petit à petit, et de façon concentrique, des amas de plus en plus importants.



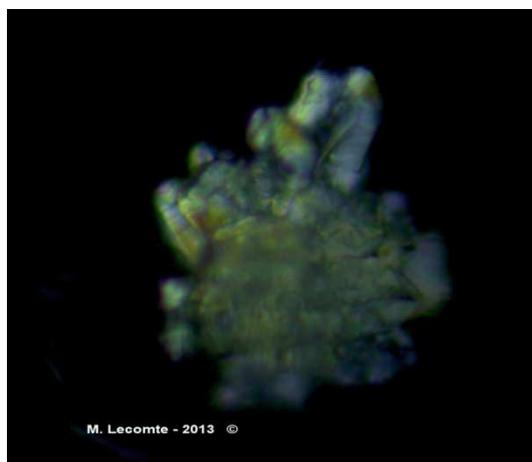
▲ Amas de sclérites de près de 400 μm de \varnothing ; passage du détail au dessin, où on peut distinguer les canalicules (c) qui passent d'une cellule à l'autre, et le lumen (o), une zone centrale vide.

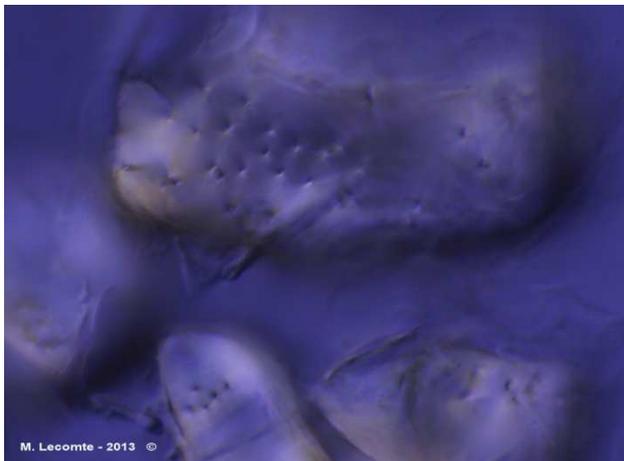
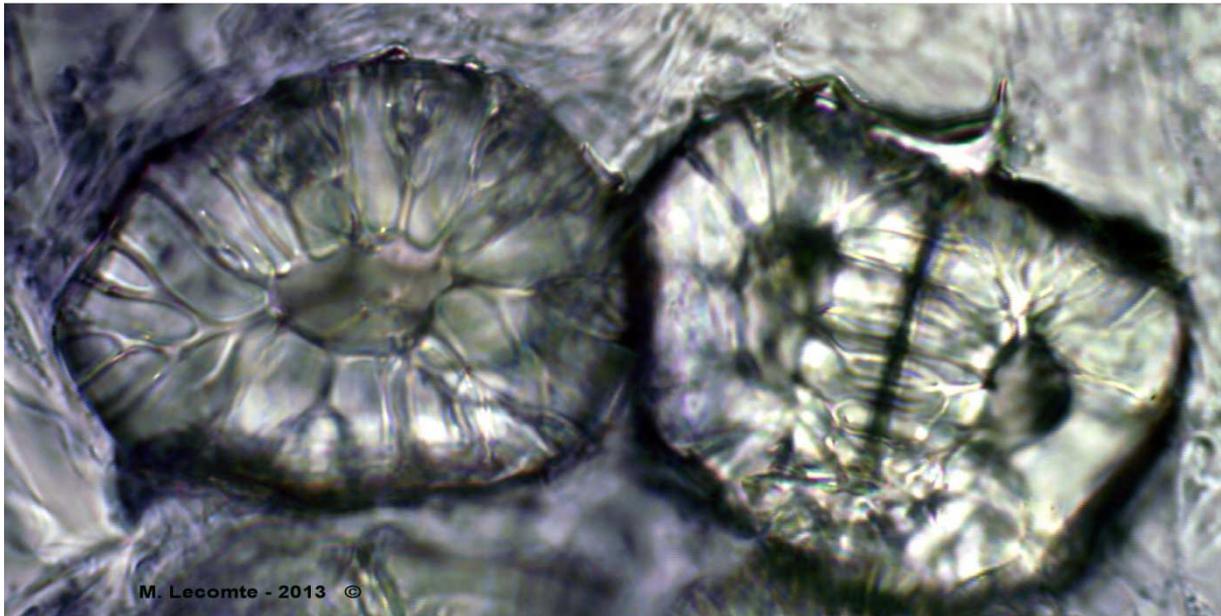
Essai de polarisation d'un amas de sclérites, où les strates de lignine réagissent souvent à la lumière polarisée. ►

MODE OPÉRATOIRE

- Réaliser une coupe transversale dans le fruit, à 3 ou 4 cm sous le pédoncule.
- Gratter la pulpe de la poire avec un scalpel (ou mieux, réaliser une coupe la plus fine possible, à main levée).
- Écraser sur une LPO.
- Monter dans l'eau et observer à 10 ou 20x.
- Pour conservation définitive, éponger et monter dans Aquatex.

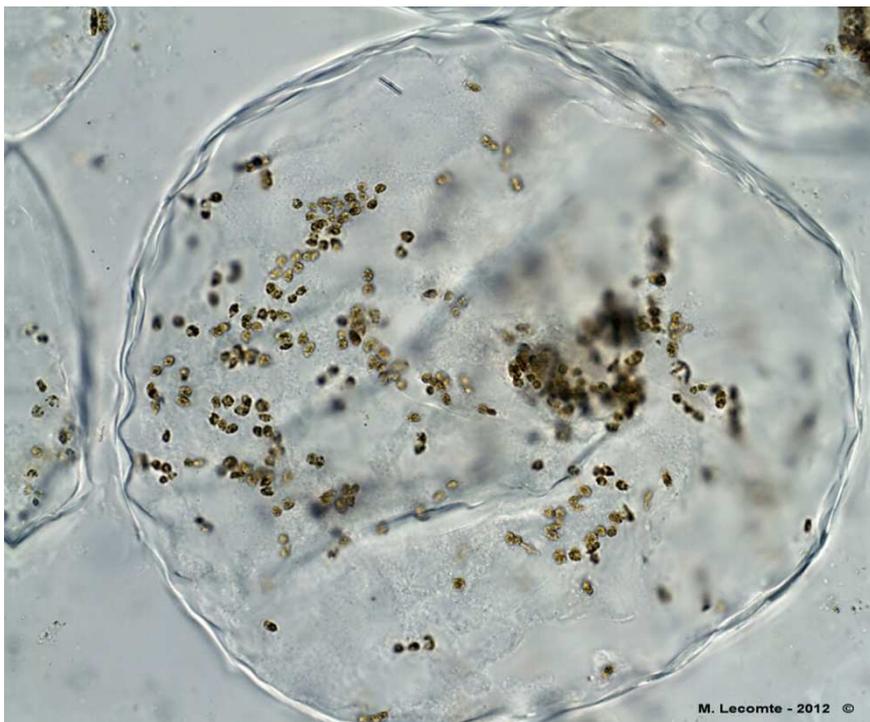
NB : des essais de coloration montrent qu'il est facile de colorer les tissus de la poire (congo, phloxine B), mais les sclérites « prennent » mal le colorant (la safranine donne parfois des résultats intéressants). Pour observer à fort grossissement le détail des sclérites, il nous a été nécessaire d'écraser fortement la pulpe entre 2 LPO, afin de dissocier les cellules pierreuses.



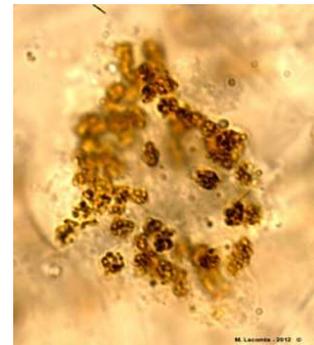


▲ Sclérites x100, avec lumen et canalicules bien visibles (à droite, on voit que les petits canaux communiquent bien entre eux).

◀ Sclérites observés en DIC, ce qui permet de mettre en évidence les orifice d'ouverture des canalicules.



◀ Cristaux enfermés dans de grandes « poches » dans la chair de l'abricot. ▼



Cistolithes de carbonate de calcium dans les cellules de *Ficus elastica*

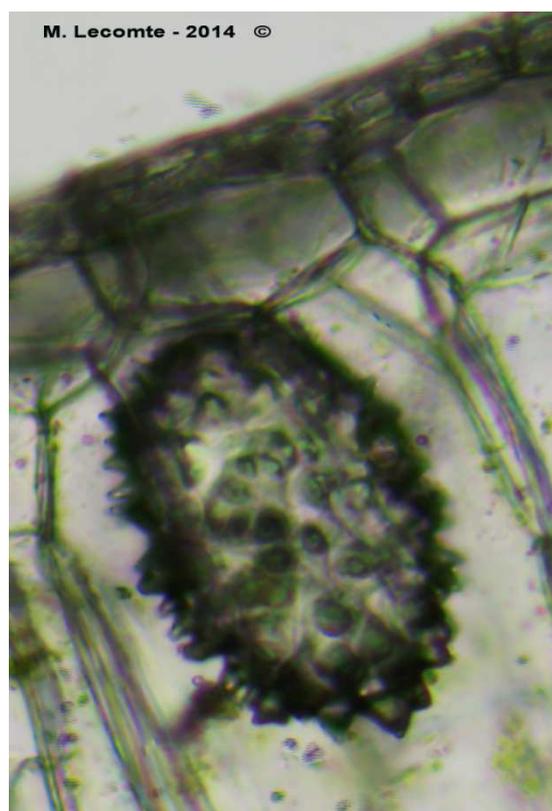


Le caoutchouc (*Ficus elastica* var. *robusta*) est originaire d'Asie. Dans la nature, il peut atteindre plusieurs dizaines de mètres de haut ; dans nos régions tempérées, il est cultivé en pot, à grande échelle, comme plante d'intérieur ; il se caractérise par des feuilles larges, épaisses, brillantes, sempervirentes, et par la production d'un latex à la blessure.

Son nom vernaculaire nous rappelle qu'à une époque, il fut recherché pour son latex qui permettait d'obtenir un caoutchouc de moindre qualité que celui qui est fourni maintenant par *Hevea elastica*. Il a la propriété d'éliminer certains polluants aériens comme le monoxyde de carbone et le formol. Il nous paraît intéressant de signaler que cette plante est toxique et irritante, pour les Mammifères et l'homme. C'est une source d'intoxication très courante chez les enfants.

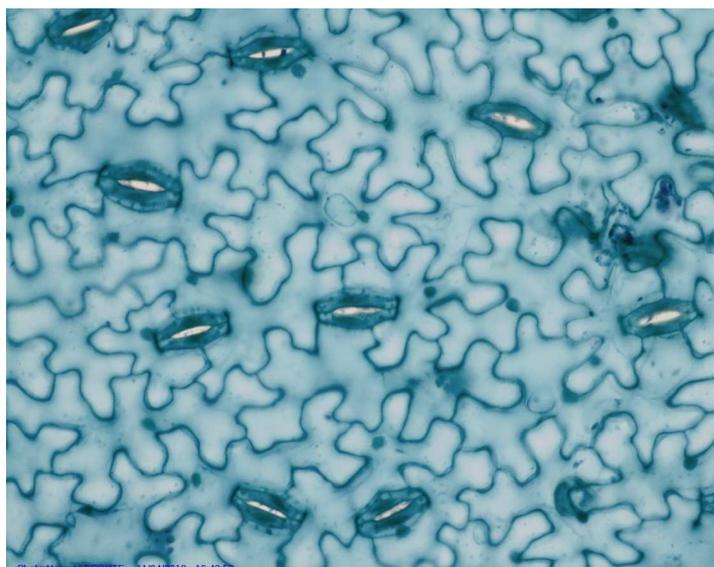


▲ CT dans la feuille montrant un cistolithe en suspension dans sa cellule.



Les cistolithes se trouvent dans la couche cellulaire externe, ne contenant pas de chlorophylle ; ils sont assez nombreux (8 dans une coupe de 1,5 cm de long et 15 μm d'épaisseur), et sont solubles dans des composés alcooliques. Un essai de conservation dans le formol est en cours.

Les stomates



Les stomates sont de minuscules organites qui, chez les Dicotylédones, se situent à la face inférieure des feuilles (organes aériens des végétaux) qui n'est pas soumise à l'action directe de la lumière. On en rencontre de 50 à 500/mm². C'est une interface entre le milieu ambiant (l'atmosphère) et le réseau gazeux interne. Ils jouent un double rôle :

++ Permettre des échanges gazeux entre la plante et le milieu ambiant : vapeur d'eau, oxygène, gaz carbonique (dioxyde de carbone).

++ Réguler la pression osmotique.

La partie centrale est parcourue d'une fente minuscule, appelée ostiole, qui s'ouvre ou se ferme en fonction des échanges.

▲ Stomates sur l'épiderme de *Vicia faba* L. (fève comestible) – x20.



▲ Stomates sur l'épiderme d'une tulipe – x20. ▲

MODE OPÉRATOIRE

++ Prélever la pellicule superficielle de la feuille (l'épiderme). Si cela s'avère difficile, faire bouillir les feuilles durant 5 minutes dans une solution de potasse à 2 ou 5 %.

++ Observer directement dans l'eau ou colorer.

++ Colorer avec safranine, phloxine B, vert de méthyle ...

++ Laver et éponger.

++ Monter dans l'Aquatex.

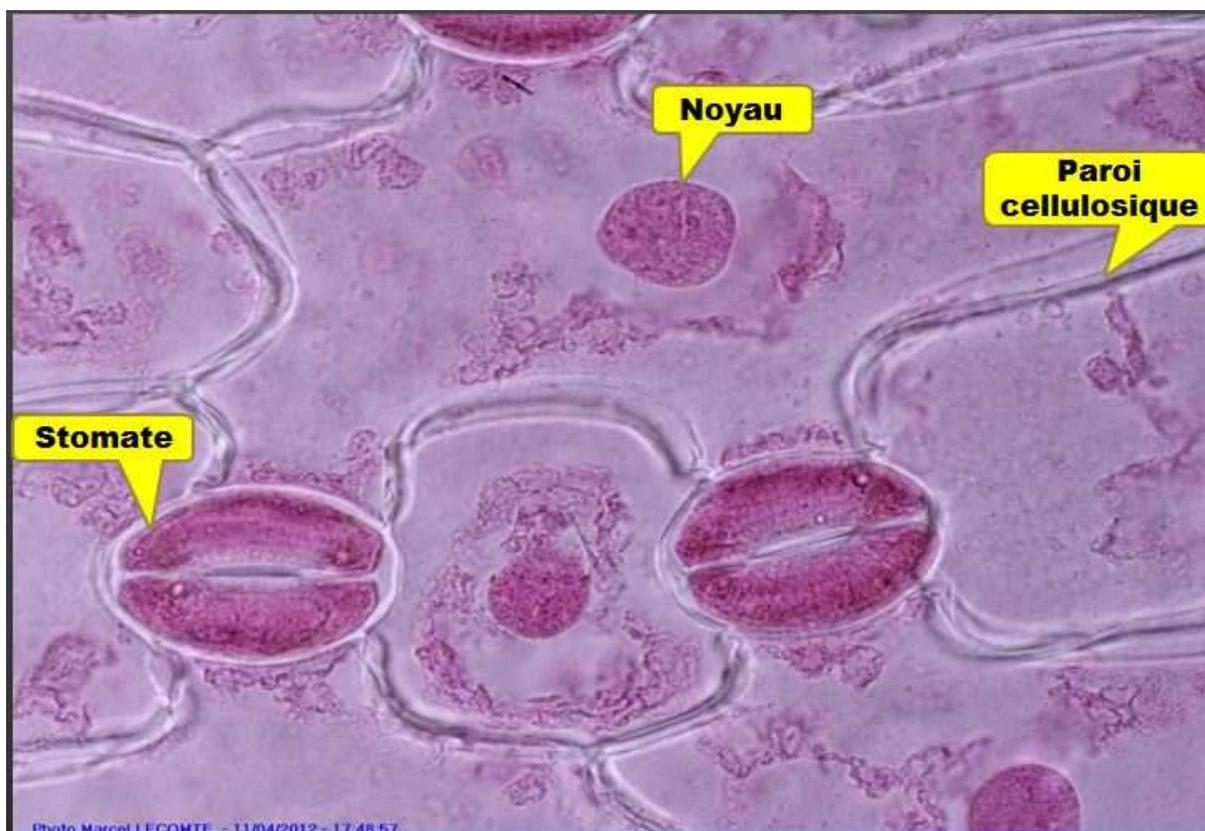
OU

++ Colorer avec safranine, phloxine B, vert de méthyle ...

++ Laver et éponger.

++ Fixer à l'isopropanol (quelques secondes, sinon l'épiderme se rétracte trop fort).

++ Monter dans l'Euparal.



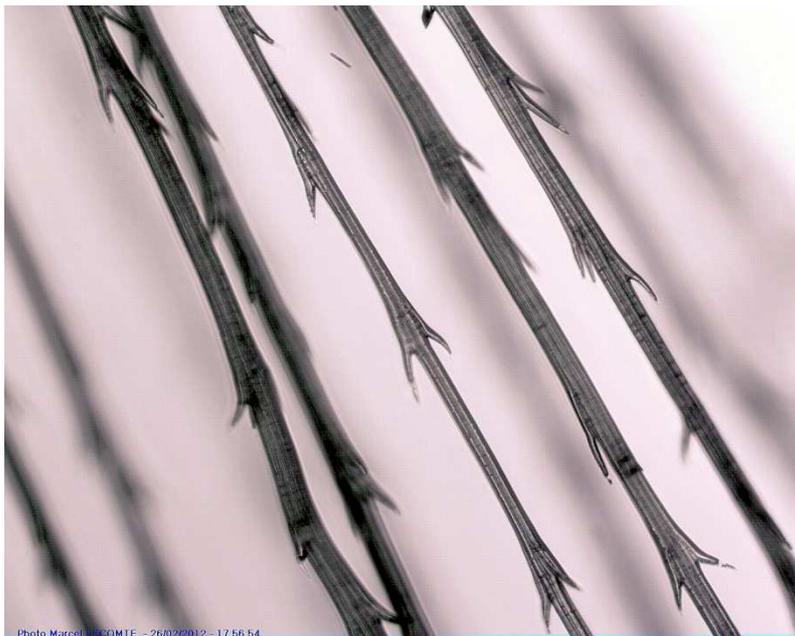
▲ Détail de l'épiderme d'une tulipe – x40.

C'est également l'occasion d'observer les cellules épidermiques, qui peuvent être de formes très variées (sinueuses, polygonales, allongées ...) ; en voici quelques exemples !



Stomates sur feuille de poireau – x40 - ▲ coloration fuch sine acide & DIC ▲

Les poils des feuilles et des fruits



Le pissenlit dent-de-lion (*Taraxacum officinale*) donne des fruits secs contenant une graine, et appelés akènes.

Ce fruit est surmonté d'une aigrette de poils (le pappus) disposés en parapluie, qui va servir de moyen de locomotion passive, grâce au vent qui va disséminer les graines, parfois sur de très longues distances.

Éclaircir dans le CLP.
Monter dans le PVALPh, l'Aquatex ou la glycérine gélatinée.

◀ Ces poils sont munis de minuscules aspérités – x20.



▲ Les poils de la peau d'un abricot (*Prunus armeniaca*) – x40. ▲

C'est cela qui confère tout son velouté au fruit. Observation dans le lactoglycérol.

L'inflorescence de la grande bardane (*Arctium lappa*) se présente sous forme de grappes de capitules globuleux, à sommet aplati, avec de petites fleurs en forme de tube. Cette fleur composée porte à la base un involucre composé de bractées qui se terminent par des crochets, leur permettant ainsi de s'accrocher aux vêtements ou à la fourrure des animaux. Voir photo, page 96.

Les poils sur différentes feuilles

La plupart des plantes ont les feuilles couvertes de poils +/-denses ou clairsemés. La question se pose bien évidemment de connaître leur éventuelle utilité.

On peut raisonnablement penser qu'ils augmentent sensiblement la surface foliaire et contribuent à une bonne régulation de la température. La face inférieure de l'organe est souvent densément poilue, ce qui permet de retenir les gouttes de rosée et de contrer le processus de dessèchement.

C'est un matériel d'étude très intéressant, en raison de sa diversité et de sa facilité d'accès, même en plein centre-ville. En outre, il n'exige qu'un grossissement d'objectif faible (x10 ou x20 au maximum), ce qui en fait un excellent sujet pour les débutants.

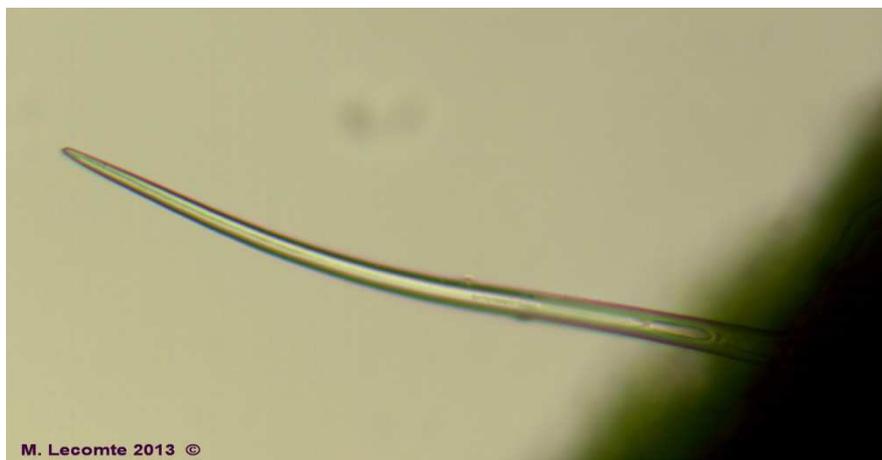
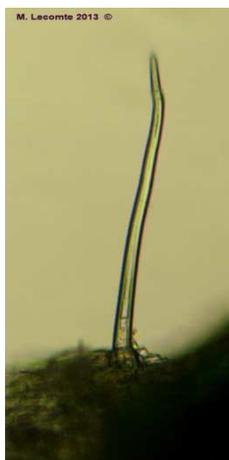
L'identification de la plante étudiée n'est pas une priorité, mais cela fait « plus sérieux » si on connaît son nom, vernaculaire ou scientifique.

1ER MODE OPÉRATOIRE

- + Prélever un morceau de feuille.
- + Effectuer une coupe transversale très fine, à main levée, avec une lame de rasoir.
- + Observer dans la lactoglycérol.

COMMENTAIRES

Technique très simple à mettre en œuvre, avec un peu de maîtrise des coupes. Les poils restent attachés sur leur support, mais les bulles d'air sont fréquentes ; on peut les faire disparaître par la chaleur mais cela décolore les cellules vertes (thermolysé de la chlorophylle).



Sur une feuille de noisetier ▲ (*Corylus avellana*), on rencontre des poils simples, effilés, non segmentés, qui laissent une sensation veloutée au toucher.



◀ ▲ La consoude (*Symphytum officinale*) a des poils différents selon la face de la feuille : poils à crochets en-dessous et poils effilés au-dessus, ce qui justifie cette curieuse sensation au toucher, de doux et rugueux à la fois.



◀ La rose trémière (*Althaea rosea*) présente des touffes de poils agglomérés et effilés, dits « en chevaux de frise ».

2ÈME MODE OPÉRATOIRE

- ++ Prélever une feuille entière.
- ++ Racler avec une lame de rasoir, au-dessus d'une LPO.
- ++ Éclaircir éventuellement dans le lactophénol de Amann ou le CLP.
- ++ Monter dans l'Aquatex ou la glycérine gélatinée.

3ÈME MODE OPÉRATOIRE à pratiquer sur un pétiole ou une tige.

- ++ Avec une lame de rasoir, inciser légèrement la tige (1/2 mm ou 1 mm au plus).
- ++ Saisir le petit bout de tissu végétal avec une pince fine et tirer lentement : un morceau d'épiderme de plus en plus ténu va se détacher (même technique que celle pratiquée

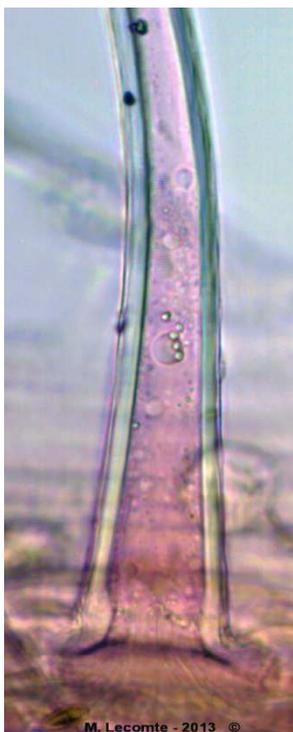
pour le scalp d'un chapeau de champignon).

- ++ Déposer immédiatement chaque prélèvement dans un verre de montre rempli d'eau glycinée.
- ++ Effectuer une série de scalps, afin de disposer de plusieurs spécimens de travail.
- ++ Réaliser un tri sous la loupe binoculaire afin de choisir les meilleurs échantillons (ce seront ceux où il n'y a plus qu'une seule couche de cellules, ce qui permettra d'observer le poil et sa zone de fixation).
- ++ Monter dans l'Aquatex ou la glycérine gélatinée.

Les poils segmentés de la primevère (*Primula officinalis*) ▶

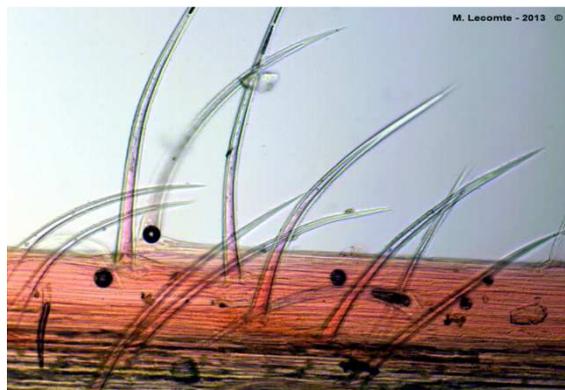
QUELQUES OBSERVATIONS INTÉRESSANTES À RÉALISER

- + Les poils en étoile de la tige du lierre (*Hedera helix*) sont assez rares : il faut chercher pour les trouver.
- + Les poils de *Pelargonium* sp. sont munis à leur extrémité d'une vésicule contenant une goutte d'essence parfumée.
- + Les bouquets de poils hirsutes de la lavande (*Lavandula officinalis*).
- + Les poils en massue du chèvrefeuille (*Lonicera periclymenum*).



- + Les poils urticants de l'ortie (*Urtica dioica*), qui constituent un réel chef d'œuvre d'ingénierie ; le poil est parcouru par un canal et est le prolongement d'une glande qui sécrète un « venin » contenant notamment de l'acide formique et de l'histamine (responsables respectivement de la brûlure et de la rougeur) ; au moindre contact, la pointe du poil (constituée de silice) se brise et le contenu de la poche urticante est injecté dans la peau.

◀ Un poil d'ortie, encore rempli de liquide urticant.

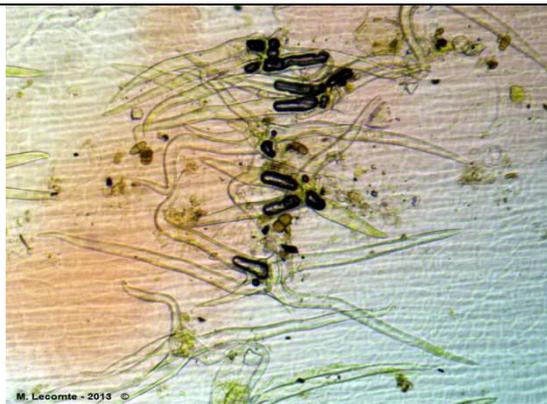


Des poils urticants terminés par une pointe de silice très acérée et fragile ▲

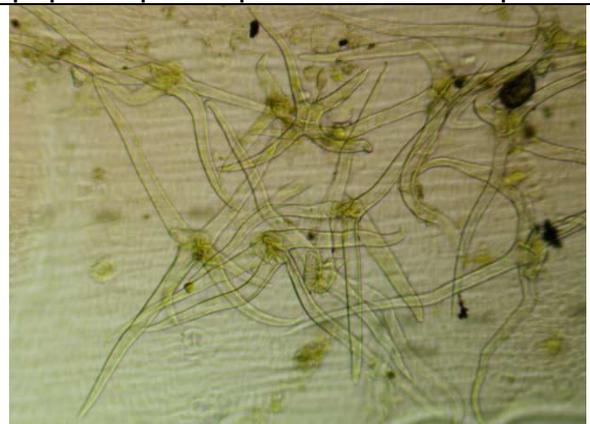
ATTENTION ! Un gros désagrément : l'air qui reste dans les éléments montés.



Montage d'un fragment de tige de lierre dans le lactoglycérol de Cléménçon ; cette préparation est nulle car toutes les traces noires constituent un artéfact provoqué par l'air qui est emprisonné à l'intérieur des poils.



Le résultat est amélioré après avoir passé la préparation à la chaleur d'une lampe à alcool, durant quelques secondes, mais il subsiste des traces d'air.



Cette fois, après plusieurs passages à la flamme, tout l'air a disparu, mais on a perdu du contraste et une coloration serait la bienvenue.



Un montage nettement plus contrasté, et sans bulles d'air, dans le CLP, après chauffage.

Des poils spectaculaires



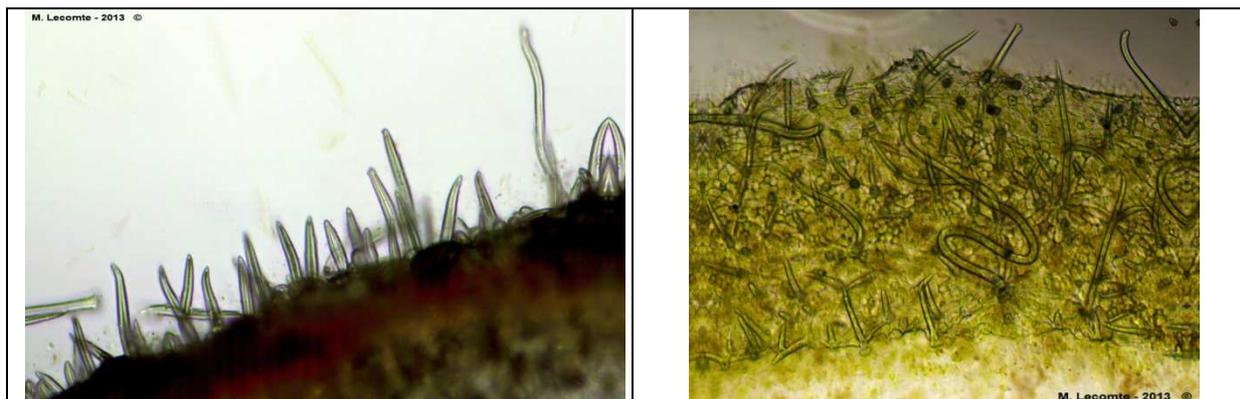
Photo Marcel LECOMTE - 18/04/2012 - 16.48.08



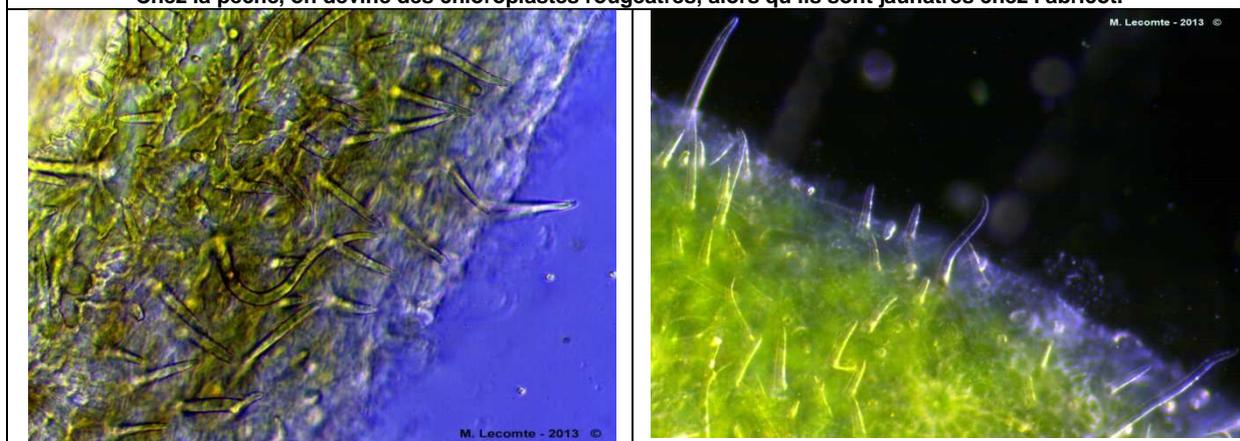
M. Lecomte - 2013 ©

◀ ▲ Ces formations piléiques remarquables se rencontrent sur les feuilles, pétioles et pédoncules d'un arbuste américain appelé Silverberry (*Elaeagnus commutata*) ; les éléments figurés ici ont fait l'objet d'une coloration.

On va rencontrer également des poils très diversifiés sur les fleurs, les fruits (pêche, abricot), les graines⁴¹.



▲ Poils de pêche et d'abricot ► ▲ donnant au fruit cette sensation de velours.
Chez la pêche, on devine des chloroplastes rougeâtres, alors qu'ils sont jaunâtres chez l'abricot.



Cuticule d'abricot ▲ observée en contraste de phase, et en fond noir ▲
Ces techniques d'investigation n'existent que sur des microscopes de haut de gamme ; elles peuvent donner des images spectaculaires en améliorant les contrastes, pour des sujets hyalins ou transparents.



▲ Les poils à crochets des fruits du Gaillet gratteron (*Galium aparine*), et les poils en épine de la tige. ▲
On comprend aisément leur facilité à s'accrocher aux vêtements ou aux poils des animaux.

La réalisation de préparations correctes s'avère malaisée car il est difficile de faire disparaître l'air contenu dans les poils creux. Nous avons trouvé une solution très satisfaisante, en montant dans l'acide lactique pur, et en chauffant à de multiples reprises, jusqu'à 10x. Nous préférons ce milieu au CLP, qui est toxique et malodorant lorsqu'on le chauffe.

⁴¹ Accordons une mention spéciale à la graine de la bardane (*Arctium* sp.) qui est à l'origine de l'invention du VELCRO (bande autoagrippante). Il a été inventé par un ingénieur suisse, Georges de Mestral, il y a 70 ans ; il avait observé des fruits de la grande bardane (*Arctium majus*) et était intrigué par leur facilité à s'accrocher aux vêtements ou aux toisons animales. Un coup d'œil au microscope lui donna l'idée de ce nouveau type de fixation, devenu banal maintenant.

Pour information, la découverte de quelque chose par accident, chance, maladresse ou sagacité, s'appelle le **concept de sérendipité**.



Chaque graine de la benoîte commune (*Geum urbanum*) est prolongée par un appendice curieusement courbé, et armé de denticules (photo réalisée en fluorescence, sans colorant spécifique).



Poil gluant sur sépale de rose ▲

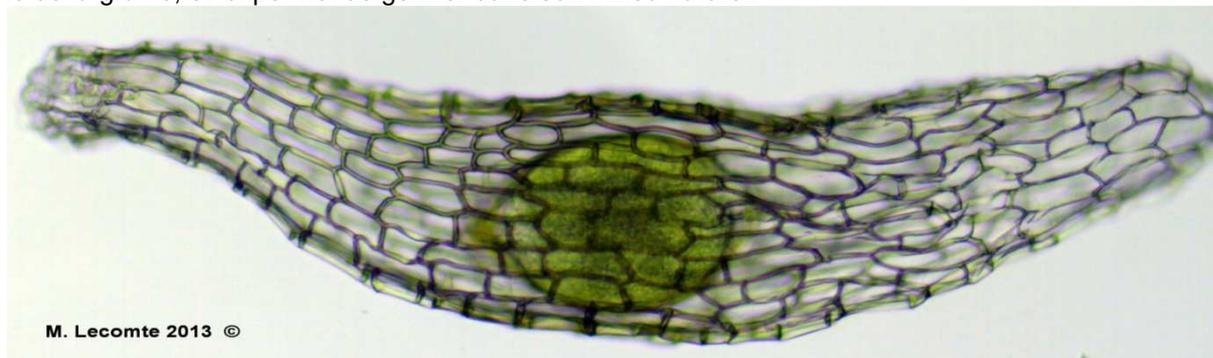
◀ Poils à crochet de Bardane (*Arctium lappa*)

▼ Poil de Sauge (*Salvia officinalis*)

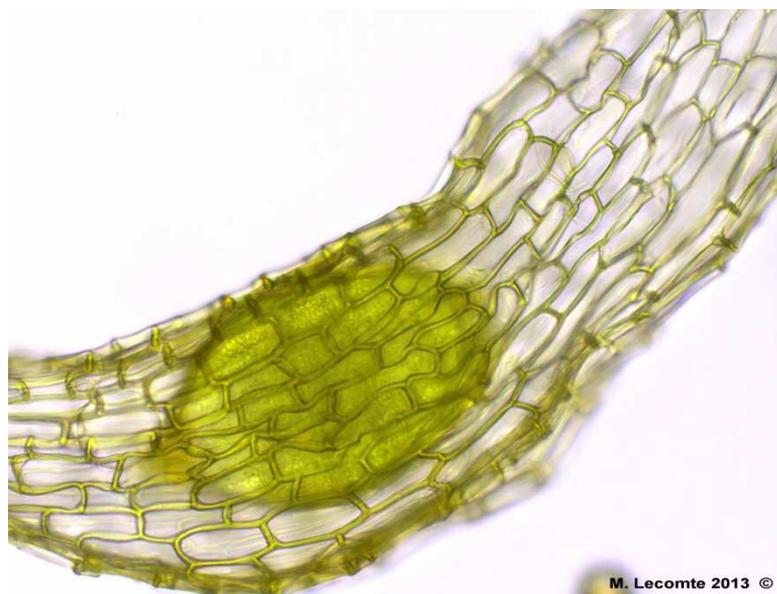


Des graines particulières chez les orchidées

A la fin du 19^{ème} siècle, Noël BERNARD⁴², un célèbre botaniste français, a étudié de très près les mycorhizes, et tout spécialement les endomycorhizes. C'est ainsi qu'il a découvert le secret de la germination des graines d'orchidées, et ses travaux ont permis de faire progresser considérablement leur culture (en laboratoire, l'intervention humaine peut se substituer au champignon et faire germer les graines dans des conditions spéciales, en leur fournissant des solutions nutritives à haute concentration). Il a démontré de manière irréfutable qu'une intervention fongique est indispensable dans la nature, et que c'est une nécessité pour la germination : c'est un champignon du genre *Rhizoctonia* (*Orcheomyces*), et principalement *R. repens*, qui crée une symbiose, détruit l'enveloppe très résistante de la graine, et lui permet de germer dans son milieu naturel.



La plupart des graines d'orchidées sont minuscules et ne présentent pas la configuration habituelle qui, dans les autres graines, permet la poussée de la future plante ; la structure de l'embryon est à peine différenciée : pas de réserves nutritives, pas de plantule. Il faut l'intervention obligatoire du champignon pour permettre la germination : le mycélium pénètre dans la graine, apporte les nutriments indispensables et déclenche la multiplication et la différenciation cellulaires. La graine développe un protocorme (un tubercule primordial), dans lequel vont se différencier les futurs organes de la plante adulte et qui, au fil du temps, est envahi de chloroplastes, indispensables pour la photosynthèse.



Nous allons nous intéresser aux graines d'*Epipactis helleborine*, ▲ & ◀, très courante en terrain calcaire (nous en avons plusieurs dizaines de pieds autour de notre habitation), dont la dispersion est dite « anémochore », c'est-à-dire avec l'aide du vent. Elles se comptent par dizaines de milliers sur un seul plant, et sont de très petite taille : partie centrale de +/- 0,1 à 0,15 mm et filet de 0,5 à 1 mm de long x 0,3 mm de large.

La difficulté de montage réside dans la présence de ce filet, qui va emprisonner des bulles d'air, avec les inconvénients habituels.

PRÉALABLE

Récolter des graines au moment opportun ; les placer dans une BP bien ventilée, et les laisser se dessécher durant plusieurs jours ; stocker dans un tube à centrifuger de 2 cc.

MODE OPÉRATOIRE

- ++ Préparer une LPO bien dégraissée, et y déposer une goutte de CLP.
- ++ Prélever quelques graines à l'aide d'une pointe d'aiguille humide.
- ++ Bien incorporer dans le CLP.
- ++ Chauffer jusqu'à apparition des premières bulles et refroidir brusquement.
- ++ Poser une LCO et observer.

⁴² BERNARD N., 1909 - *L'évolution dans la symbiose, les Orchidées et leurs champignons commensaux*, (Annales de Sciences naturelles, IXe série, Ed. Masson, Paris).



++ Si des bulles d'air sont encore présentes, recommencer l'opération de chauffage sans ôter la LCO.
 ++ Luter au vernis à ongles.

VARIANTE :
 utiliser du PVAL-FA ou du PVAL-BA, comme milieu de montage.

Les 3 photos représentent des graines d'*Epipactis helleborine*.

Des tissus excréteurs (laticifères et poches d'excrétion)

Chez certains végétaux, nous allons rencontrer des tissus spécialisés appelés tissus sécréteurs ; ils réalisent la synthèse de diverses substances, telles les latex, résines, essences, tanins, etc. Certaines résines ou huiles générées sont utilisées dans l'industrie. Citons le latex, produit par *Hevea brasiliensis*, qui sert à la fabrication du caoutchouc naturel ; l'encens (ou oliban), secrété par *Boswellia sacra* et *B. serrata*... ou encore le benjoin (*Styrax tonkinensis*), la myrrhe (*Commiphora myrrha*), le camphre (*Laurus camphora* ou *Dryobalanops camphora*), les résines des conifères.

Il en existe plusieurs types :

- ++ les laticifères,
- ++ les poches excrétrices,
- ++ les canaux excréteurs,
- ++ les cellules sécrétrices isolées,
- ++ les épidermes sécréteurs (Ils sont variés, et correspondent à des canaux sécréteurs ou à des parenchymes de stockage).

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons aux 2 premiers cités.

Les laticifères

Ce sont des éléments allongés en tubes, ramifiés ou non, dans lesquels on trouve une grosse vacuole centrale contenant le latex, souvent laiteux, parfois limpide.

On distingue :

- ++ les laticifères non articulés : chaque laticifère provient d'une seule grande cellule, très allongée, contenant de nombreux noyaux et pouvant atteindre plusieurs mètres ;
- ++ les laticifères articulés, qui s'organisent chacun à partir de nombreuses cellules disposées en file.

Chez certaines plantes, le latex contient des grains d'amidon en suspension, qui se colorent en violet sous l'action de l'iode (lugol, melzer, IKI).

Coupe longitudinale dans une tige de laiteron des champs, avec grains d'amidon bien visibles dans le latex blanc. ▶

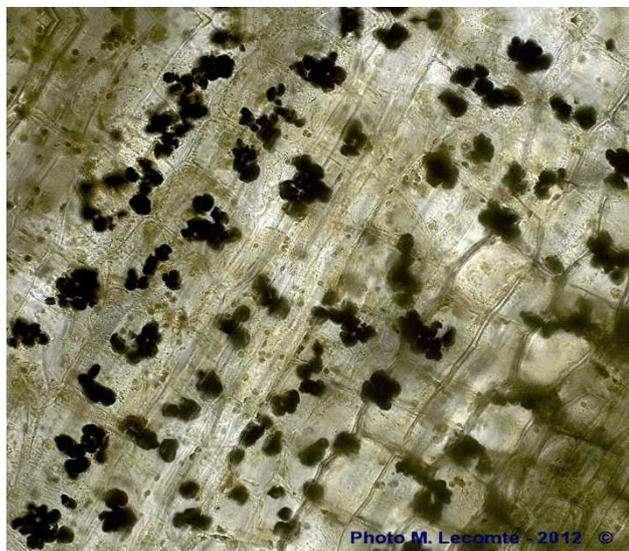


Photo M. Lecomte - 2012 ©

PRÉALABLE

Récolter les tiges des plantes suivantes : euphorbe (*Euphorbia* sp.), pissenlit (*Taraxacum* sp.), laiteron (*Sonchus* sp.), figuier (*Ficus elastica*, *F. benjamina*), laitue (*Lactuca* sp.).

MODE OPÉRATOIRE

- ++ Réaliser des coupes longitudinales dans l'écorce de la tige.
- ++ Les trier à la loupe et choisir les meilleures.
- ++ Sur une LPO, poser la coupe et une grosse goutte de Lugol.
- ++ Poser une LCO et observer à 20x et 40x.

REMARQUE

Le terme de « laticifère » est également utilisé en mycologie. On les rencontre dans l'ordre des Russulales. Chez les lactaires, le latex généré présente des couleurs différentes à l'origine ou par oxydation (rouge, orange, violacé, blanc, verdâtre, grisâtre) qui aident grandement à la détermination. Voir le tome III, consacré aux champignons.

Les poches excrétrices

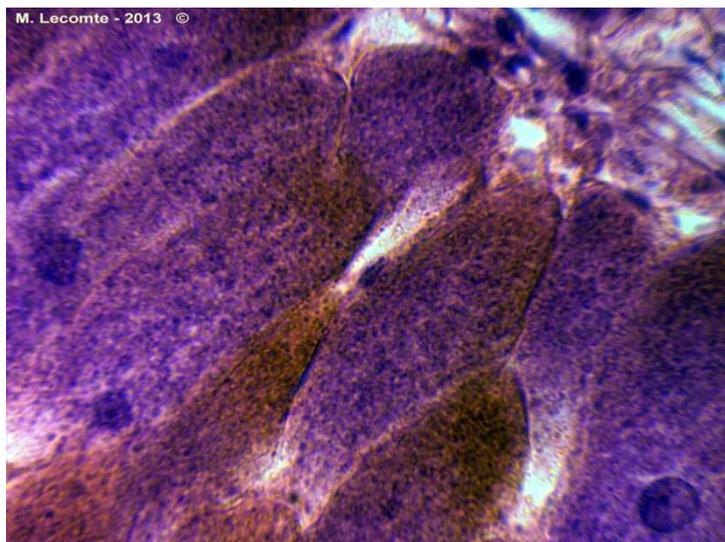
On les rencontre chez certaines espèces. Ce sont des cavités situées dans le parenchyme des feuilles, des tiges et des fruits. Elles sont nombreuses dans le péricarpe des oranges, mandarines, citrons, etc. où l'on observe, à l'examen microscopique, une cavité sphérique contenant une essence, et bordée par une rangée de petites cellules sécrétrices.

PRÉALABLE

Prendre un des fruits suivants : orange (*Citrus sinensis*), mandarine (*Citrus reticulata*), citron (*Citrus limon*).

MODE OPÉRATOIRE

- ++ Faire une coupe tangentielle dans la couche colorée de l'enveloppe du fruit choisi.
- ++ Placer la coupe sur une LPO, dans une goutte d'alcool (éthanol ou méthanol).
- ++ Centrer une poche d'excrétion, à faible grossissement puis observer à 63x ou 100x.

Des bactéries qui fixent l'azote

◀ Coupe radiale dans un nodule de racine de haricot, avec coloration au bleu de méthylène ; les bactéries apparaissent sous forme de points colorés en bleu foncé.

Depuis l'Antiquité, les Légumineuses⁴³ (haricot, trèfle, luzerne, vesce, fève, pois, lentille, lupin, fenugrec, arachide, soja ...) sont connues pour leur faculté d'améliorer la richesse des sols, car elles fixent l'azote atmosphérique et le réduisent en ammonium, directement assimilable par la plante. En réalité, ce processus chimique est dû à des bactéries du genre *Rhizobium* sp., qui sont présentes dans les nodosités⁴⁴ des racines.

⁴³ On les appelle aussi Fabacées ou Papilionacées ; ce sont des plantes dicotylédones, dont certaines sont cultivées et servent de nourriture aux animaux domestiques et à l'homme (voir la liste ci-dessus). D'autres poussent à l'état sauvage (gesse, bugrane, sainfoin, mélilot, réglisse, genêt, astragale, vulnéraire) ou sont utilisées comme plantes ornementales (glycine, robinier faux acacia, cytisier, arbre de Judée, caroubier, mimosa ...).

⁴⁴ Une nodosité (ou nodule) est un renflement présent sur les radicelles, dont le parenchyme central est constitué de cellules géantes envahies par des bactéries. C'est un organe d'échange métabolique entre les bactéries et la plante.

Cette capacité de fixation de l'azote leur permet de fabriquer des protéines en quantités importantes, au sein de leur tissu. Exemple : les graines de soja contiennent (en moyenne) 33% de protéines.

Dans la nature, on rencontre 2 sortes de bactéries fixatrices d'azote :

- ++ Les formes libres, aérobies, comme *Azotobacter*, présentes dans le sol et l'eau (*A. vinelandii*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* p. ex.).
- ++ Les formes symbiotiques⁴⁵, comme *Rhizobium leguminosarum*, *R. pisi*, associées aux légumineuses.

L'observation microscopique de ces bactéries révèle 3 aspects morphologiques différents :

- ++ Des formes jeunes, allongées, très mobiles.
- ++ Des formes adultes, ramifiées en Y, qui fixent activement l'azote de l'air et produisent de l'ammonium utilisé par la plante .
- ++ Des formes âgées, ovoïdes, progressivement digérées par la plante.

MATÉRIEL

- + Nodules de racines de haricot.
- + Colorants : lugol, bleu de méthylène, rouge neutre.

MODE OPÉRATOIRE

- ++ Avec une aiguille lancéolée, prélever un petit fragment d'un nodule.
- ++ Le déposer sur une LPO et pratiquer une première dissociation avec le plat de l'aiguille.
- ++ Choix du colorant :
 - Avec le lugol, on observera des grains d'amidon fortement colorés en bleu noir par l'iode (réaction amyloïde).
 - Avec le rouge neutre, il est possible de voir bouger certaines des bactéries (elles sont munies d'un cil non visible).
 - Le bleu de méthylène colore les bactéries et est létal pour ces dernières.
- ++ Ajouter une goutte de colorant et laisser agir pendant 2-3 minutes environ.
- ++ Rincer.
- ++ Observer dans l'eau ; poser une LCO et effectuer une nouvelle dissociation.

RÉSULTATS

Au grossissement 100x, on observe de grosses cellules déformées, contenant une quantité importante de bactéries du genre *Rhizobium*, et des grains d'amidon.

⁴⁵ La symbiose est une association à bénéfice réciproque entre 2 êtres vivants. Dans le cas présent, les *Rhizobium* prélèvent dans l'hôte les glucides nécessaires à leur nutrition carbonée, tandis que la plante profite des substances azotées produites par la bactérie.

Les grains de pollen

Les plantes à fleurs (ou Angiospermes), qu'elles soient monocotylédones ou dicotylédones, constituent la majorité des espèces végétales.

Une fleur est composée :

- ++ des sépales, généralement verts dont l'ensemble est appelé calice,
- ++ des pétales, généralement colorés dont l'ensemble est appelé corolle,
- ++ des étamines : partie mâle de la fleur, **produisant le pollen**, et constituées d'un filet et d'une anthère,
- ++ des carpelles : partie femelle de la fleur, contenant un ou plusieurs ovules ; l'ensemble des organes femelles est appelé pistil, et il se compose d'un ovaire, d'un style et d'un stigmate.

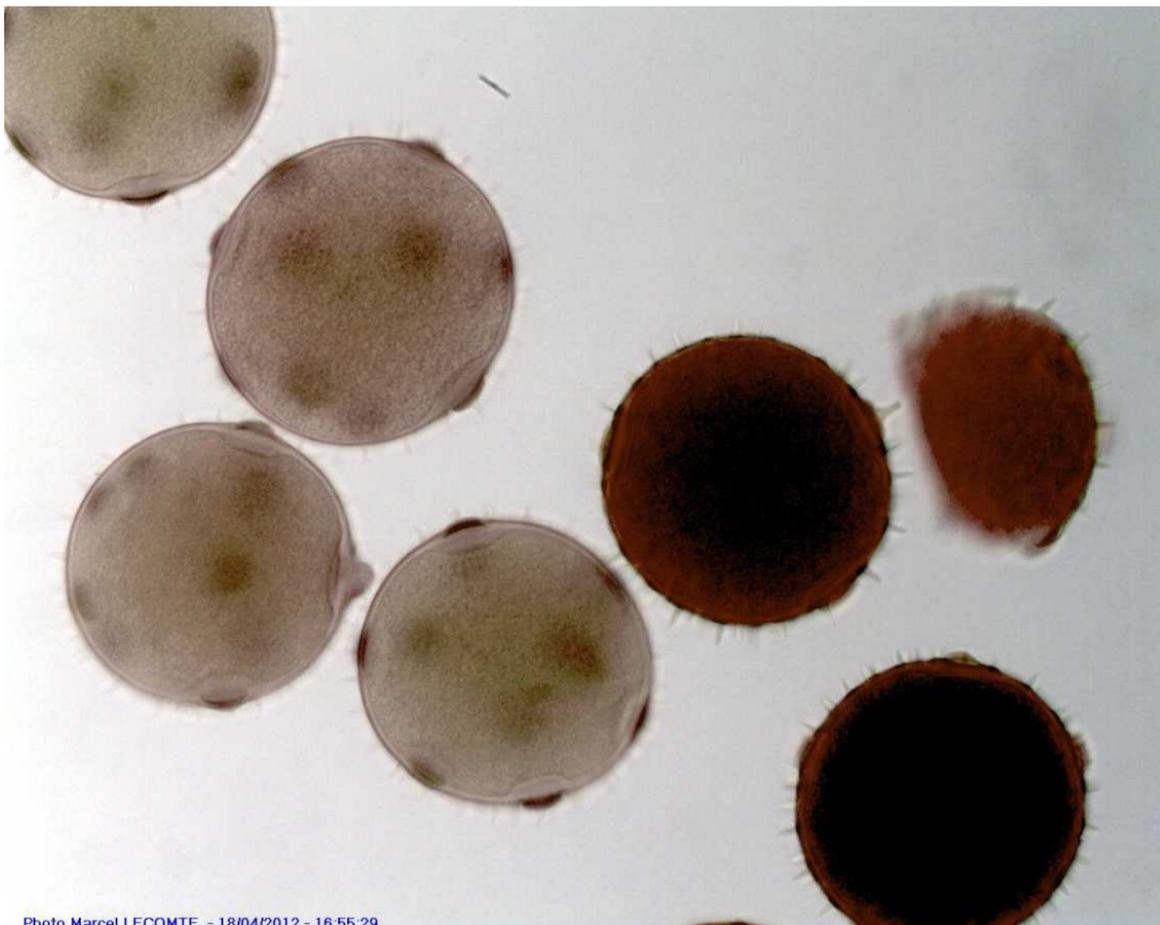


Photo Marcel LECOMTE - 18/04/2012 - 16.55.29

▲ Grains de pollen d'une Cucurbitacée, montés dans l'Aquatex, sans coloration ▲

Macroscopiquement, tous les grains de pollen ressemblent à une poussière généralement jaune. Sous l'objectif, c'est une autre histoire ; les grains de pollen présentent des formes, des tailles et des revêtements très variés. On y observe également un ou plusieurs pores (ou plis), par où sortira le tube pollinique.

Un pollen particulier : celui de *Pinus* sp. est agrémenté de deux ballonnets remplis d'air et nécessite un mode de préparation particulier.

PRÉPARATION DU POLLEN

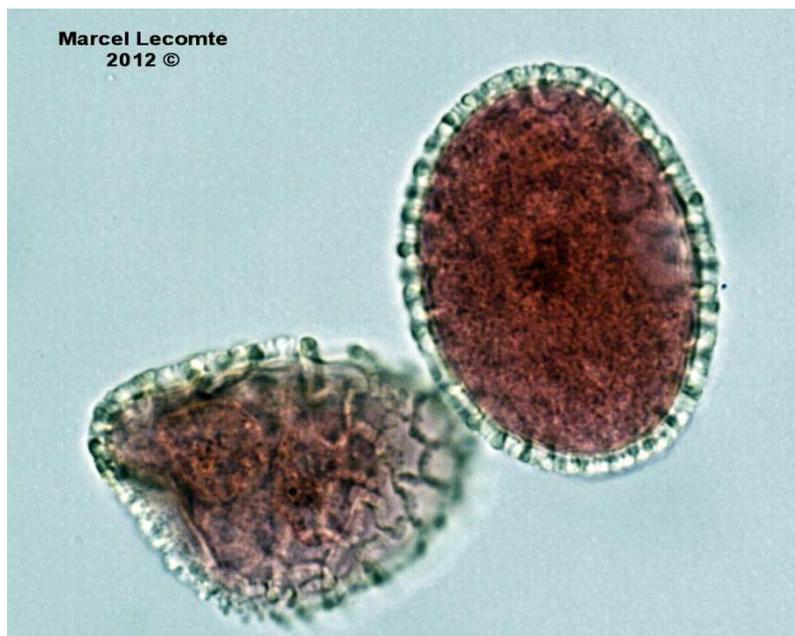
Dans tous les cas, le dégraissage à l'alcool à 95° nous paraît obligatoire (ou mieux encore, avec utilisation du fixateur de Carnoy - voir page 104).

- ++ Selon les types de pollen, pratiquer 1 à 5 lavages.
- ++ Éliminer chaque fois l'auréole périphérique avec un essuie-tout.

Personnellement, nous réalisons un collage à l'alcool avant coloration (laisser simplement sécher complètement le dernier alcool) ou mieux encore, un frottis à l'eau albuminée.

DIVERSES TECHNIQUES DE MONTAGE

- ++ Coloration fuchsine de Ziehl ou carmino-vert de Mirande.
- ++ Déshydrater à l'isopropanol.



Marcel Lecomte
2012 ©

◀ Grains de pollen de *Lilium* sp.

++ Euparal (temps de séchage assez long : plusieurs jours).

OU

++ Coloration fuchsine de Ziehl ou carmino-vert de Mirande.

++ Aquatex (temps de séchage intéressant : 3 à 4 heures).

OU

++ Glycérine gélatinée colorée dans la masse (nos préférences vont à fuchsine de Ziehl, vert de méthyle).

++ Lutage impératif.

REMARQUES

++ Certains auteurs recommandent une 1^{ère} observation à sec, afin de bien situer la forme du grain.

++ L'observation dans l'eau n'est guère conseillée car certains grains gonflent considérablement → les détails superficiels peuvent disparaître et le grain éclate dans la majorité des cas.

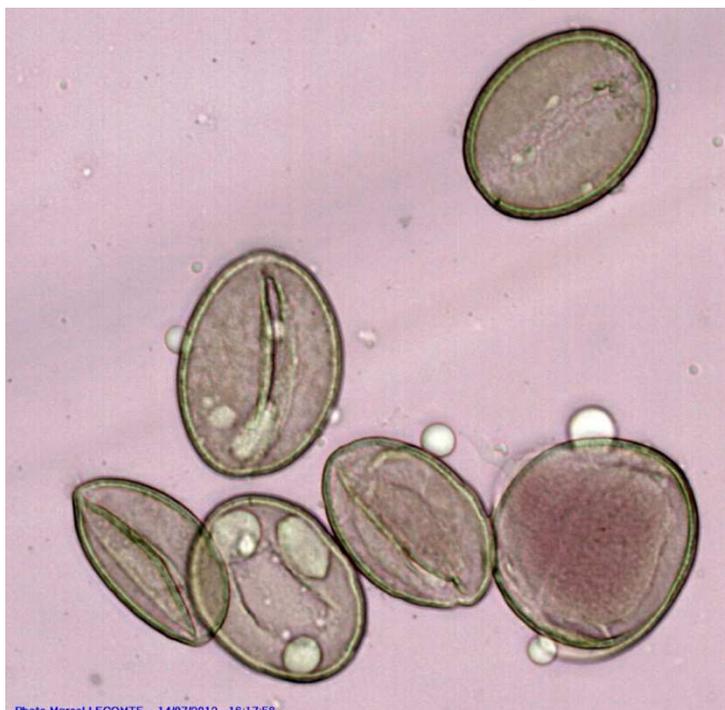
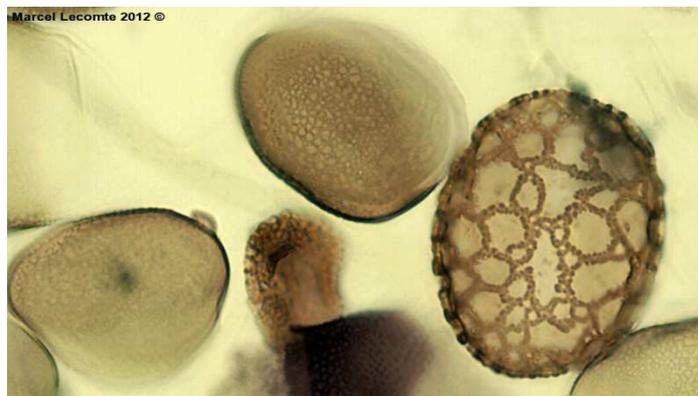


Photo Marcel LECOMTE - 14/07/2012 - 16:17:58

++ Si on dépose du pollen dans de l'eau sucrée, les grains vont gonfler lentement et, en quelques heures, donner naissance à un tube pollinique (germinatif). Dans la nature, ce phénomène se passe lorsque le grain de pollen rencontre le stigmate : le tube pollinique pénètre alors dans le style et va jusqu'à un ovule qui va se développer et donner une graine.

◀ Grains de pollen de *Yucca filamentosa*, avec fente germinative.



Marcel Lecomte 2012 ©



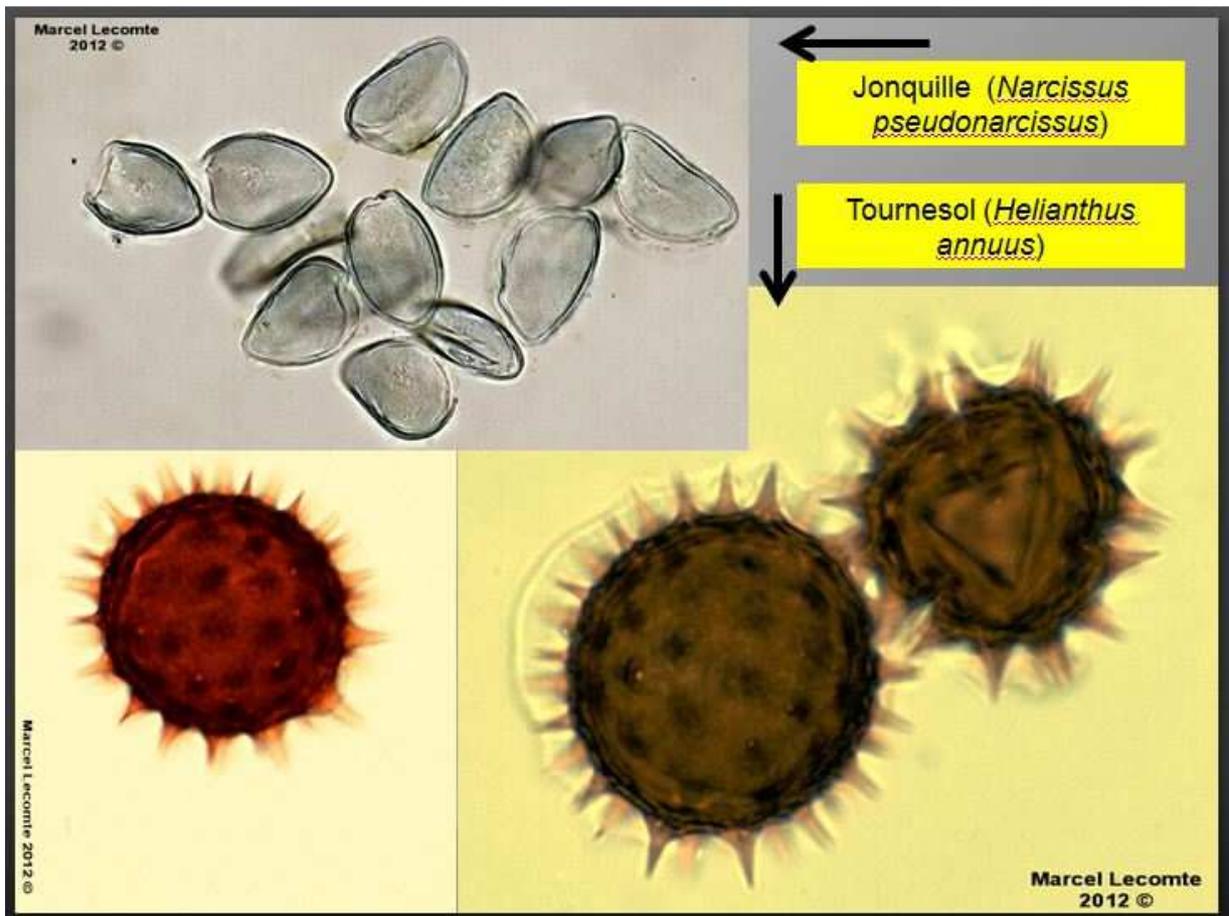
16/06/53

Marcel Lecomte 2012 ©

▲ Passiflore (*Passiflora caerulea*). – Ornementation superbe (plante exotique indéterminée). ▲



▲ Anthère de mauve (*Malva sylvestris*) avec grains de pollen encore attachés. ▲



Le test d'Alexander

En France notamment, (et dans nombre d'autres pays, dont le Canada⁴⁶ et les USA⁴⁷), les responsables du « Programme d'amélioration génétique des arbres forestiers » ont besoin de pollen de grande qualité afin de favoriser la production de graines les meilleures possible.

Afin d'effectuer un tri valable au sein d'une production pollinique, et pouvoir séparer les grains viables des autres, les ingénieurs agronomes ont mis au point des tests rapides et économiques, présentant un niveau de fiabilité assez élevé.

Nous ne nous attarderons pas sur des tests physiologiques, qui permettent de doser la quantité de molécules nécessaires à l'activité future du grain concerné. Par contre, les tests colorimétriques vont nous intéresser. Il en existe deux types, avec des champs d'activités et des objectifs bien différents.

1. PRODUIRE UNE RÉACTION AVEC DES MOLÉCULES SPÉCIFIQUES

Certains colorants réagissent en présence de molécules organiques, et l'intensité de la coloration va dépendre de la concentration de ces molécules, ce qui indiquera le niveau de maturation du grain.

Le plus utilisé est l'isatine⁴⁸, qui réagit avec la proline⁴⁹, présente en quantité importante.

Le carmin acétique révèle en rouge carmin la présence du bagage génétique (chromosomes), et le lugol colore l'amidon présent (réserve alimentant la 1ère étape de germination) en bleu foncé, mais ces deux colorants ne sont pas très fiables car ils réagissent sur du matériel tant vivant que mort. Le bleu d'aniline colore la callose⁵⁰ en jaune vert sous lumière fluorescente.

2. VÉRIFIER LA PRÉSENCE DE CYTOPLASME DANS LA CELLULE VÉGÉTATIVE

C'est grâce au colorant (ou réactif) d'Alexander qu'on va vérifier cela, et notamment mettre en évidence une éventuelle stérilité mâle. Sa préparation est assez complexe et comprend des produits très toxiques ; cela a conduit une équipe de chercheurs (voir réf. 47 en bas de page) à réétudier la problématique et revoir la composition du réactif initial. Voici la formule actuelle pour 100 cc, les produits devant être ajoutés dans l'ordre, avec mélange à l'agitateur magnétique, à chaque phase ; conservation en flacon opaque, à 4°C (frigorifère).

Ethanol à 95° (10 cc) + vert de malachite (1 cc de solution alcoolique à 1 %) + eau bidistillée (50 cc) + glycérol (25 cc) + phénol (5 g) + trichloréthylène glycol (5 g) + fuchsine acide aqueuse à 1 % (5cc) + orange G aqueux à 1 % (0,5 cc) + acide acétique glacial (4 cc) + compléter à 100 cc avec de l'eau bidistillée.

MODE OPÉRATOIRE

++ Recueillir les anthères lorsque le pollen est à maturité et placer dans le fixateur de Carnoy⁵¹ pendant 2 h au minimum.

++ Poser sur une LPO et sécher soigneusement avec du papier absorbant.

++ Appliquer immédiatement 2 à 4 gouttes de colorant (l'échantillon ne doit pas se dessécher).

++ Chauffer lentement à la flamme jusqu'à ébullition, afin de faciliter la pénétration du colorant.

++ Rincer.

++ Couvrir d'une LCO et observer dans l'eau glycinée.

→ Les grains de pollen avortés sont teintés en bleu-vert ; les grains fertiles sont colorés en rouge magenta.

Cette technique s'avère très intéressante à nos yeux, car elle peut être utilisée avec du matériel optique classique, accessible à tous les amateurs.

⁴⁶ COLAS F. & MERCIER S., 2000 - Mémoire de recherche forestière n°135 : *Evaluation et maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres*, Gouvernement du Québec.

⁴⁷ PETERSON R., SLOVIN J.P., CHEN C., 2000 - *A simplified method for differential staining of aborted and non aborted pollen grains*, International Journal of Plant Biology, Vol. 1, n° 2.

⁴⁸ C'est un colorant bleu, obtenu par synthèse, mais qui existe à l'état naturel notamment chez une Brassicacée, le pastel des teinturiers (*Isatis tinctoria*).

⁴⁹ La proline, ou plus exactement L-proline, est un des 20 acides aminés du code génétique ; son rôle principal est d'assembler les protéines ; elle participe à la synthèse du collagène.

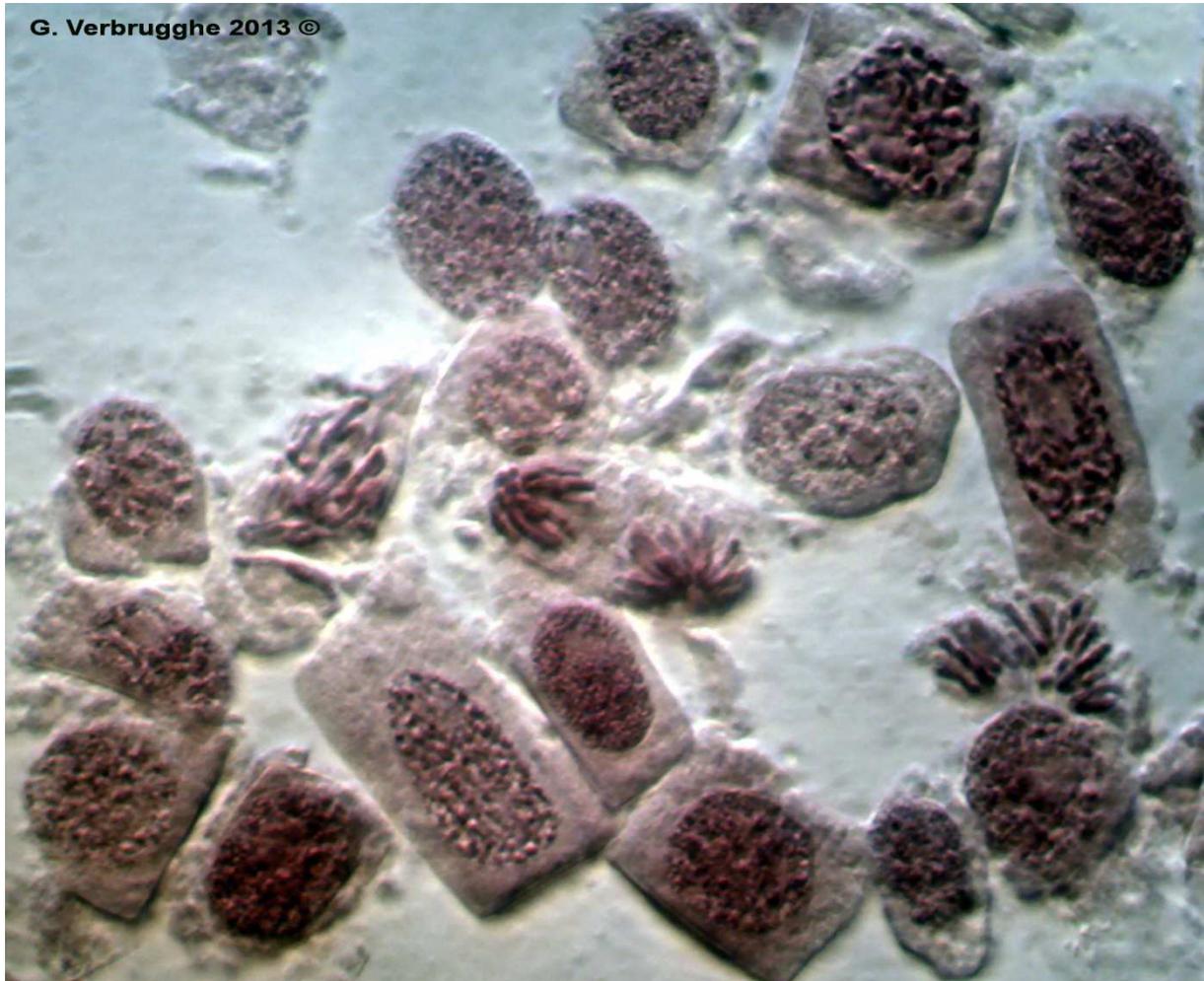
⁵⁰ La callose est un sucre complexe, formé par polymérisation du glucose, mais différent de la cellulose ; c'est un des constituants de la paroi des champignons, en association avec la chitine. Elle est insoluble dans l'eau, l'alcool, et la liqueur de Schweitzer (solvant cellulosique, obtenu par réaction de l'ammoniaque sur du cuivre). Elle joue aussi un rôle important dans la circulation de la sève (arrêt ou montée).

⁵¹ Composants : méthanol pur : 6 - chloroforme : 3 - acide acétique glacial : 1. Ce fixateur à base d'alcool présente l'avantage de ne pas agir chimiquement sur la cellule, mais seulement comme déshydratant ; cela signifie donc qu'il ne modifie pas la colorabilité des éléments cellulaires. Le fixateur de Carnoy est un des fixateurs les plus pénétrants qui existent, même s'il différencie mal le noyau et le cytoplasme. Il n'assure pas non plus la conservation des lipides.

La mitose

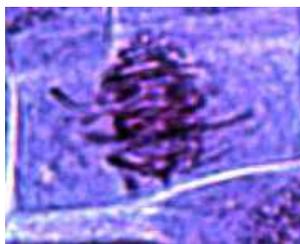
DÉFINITION

C'est la division du noyau d'une cellule en deux noyaux fils, ces derniers conservant le même nombre de chromosomes que la cellule mère. Par extension : division de la cellule mère elle-même, ce qui implique celle de son cytoplasme ou cytotélière.



▲ Cellules en division dans un méristème de bulbe d'oignon (contraste de phase).

LES QUATRE ÉTAPES DE LA MITOSE



1) LA PROPHASE

Durée : 15 à 60 minutes. **La chromatine se condense** et forme des chromosomes clivés longitudinalement en deux chromatides, réunis au niveau du centromère. Disparition de l'enveloppe du noyau. Apparition d'un **fuseau de fibres** entre deux pôles de la cellule.



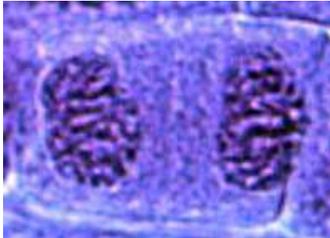
2) LA MÉTAPHASE

Durée : quelques minutes seulement. **Les centromères se regroupent dans le plan équatorial de la cellule.** L'ensemble des chromosomes forme ainsi la **plaque équatoriale**. Des **fibres chromosomiales**, qui naissent au voisinage du centromère, rattachent chaque chromosome aux deux pôles du fuseau.



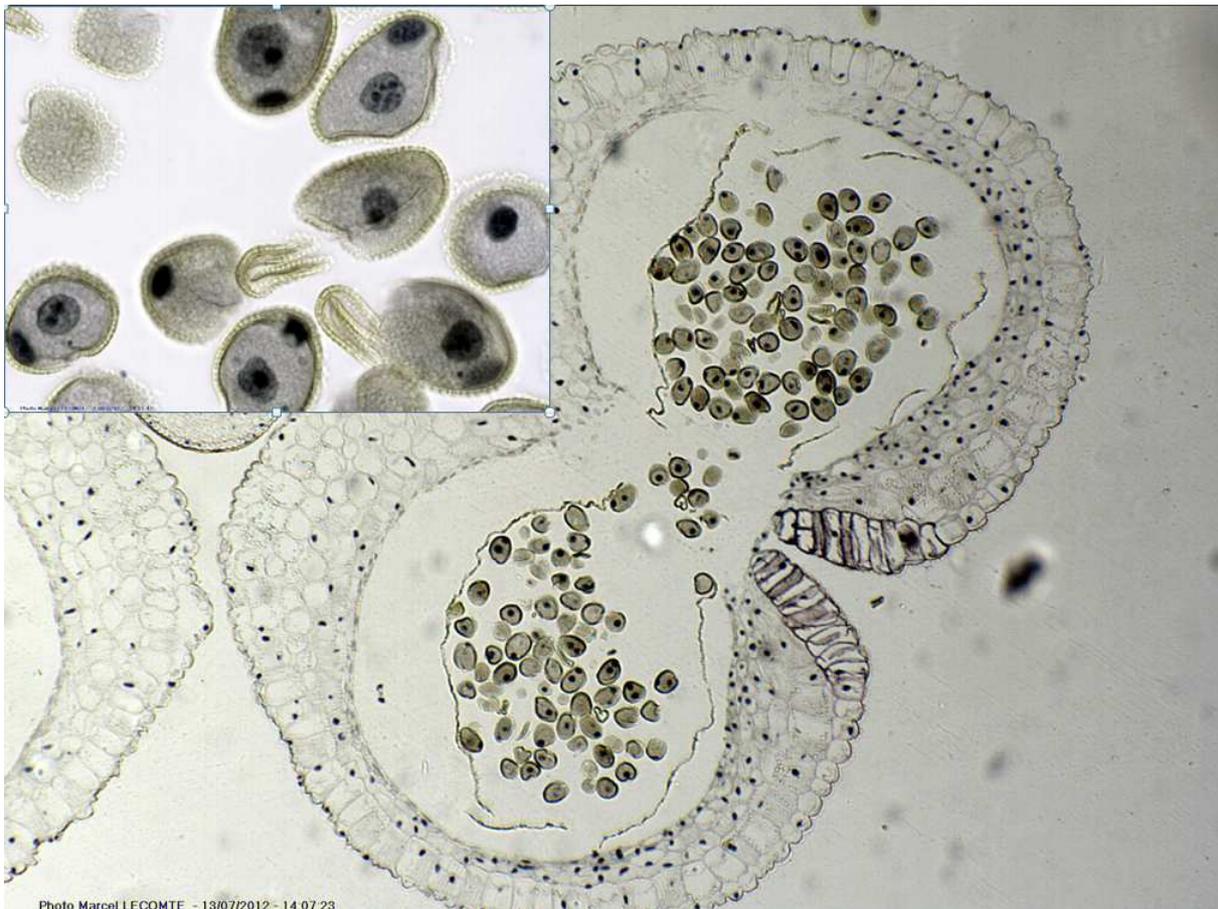
3) L' ANAPHASE

Durée : 2 à 3 minutes. Chaque centromère se divise en deux ; les centromères fils, solidaires chacun d'une chromatide, s'écartent en direction des pôles du fuseau, par raccourcissement des fibres chromosomiales. On assiste ainsi à une **migration en sens opposé de deux lots de chromosomes strictement identiques**. En effet, tout chromosome de la cellule initiale est représenté dans chacun des lots par un chromosome fils (c'est-à-dire une chromatide).



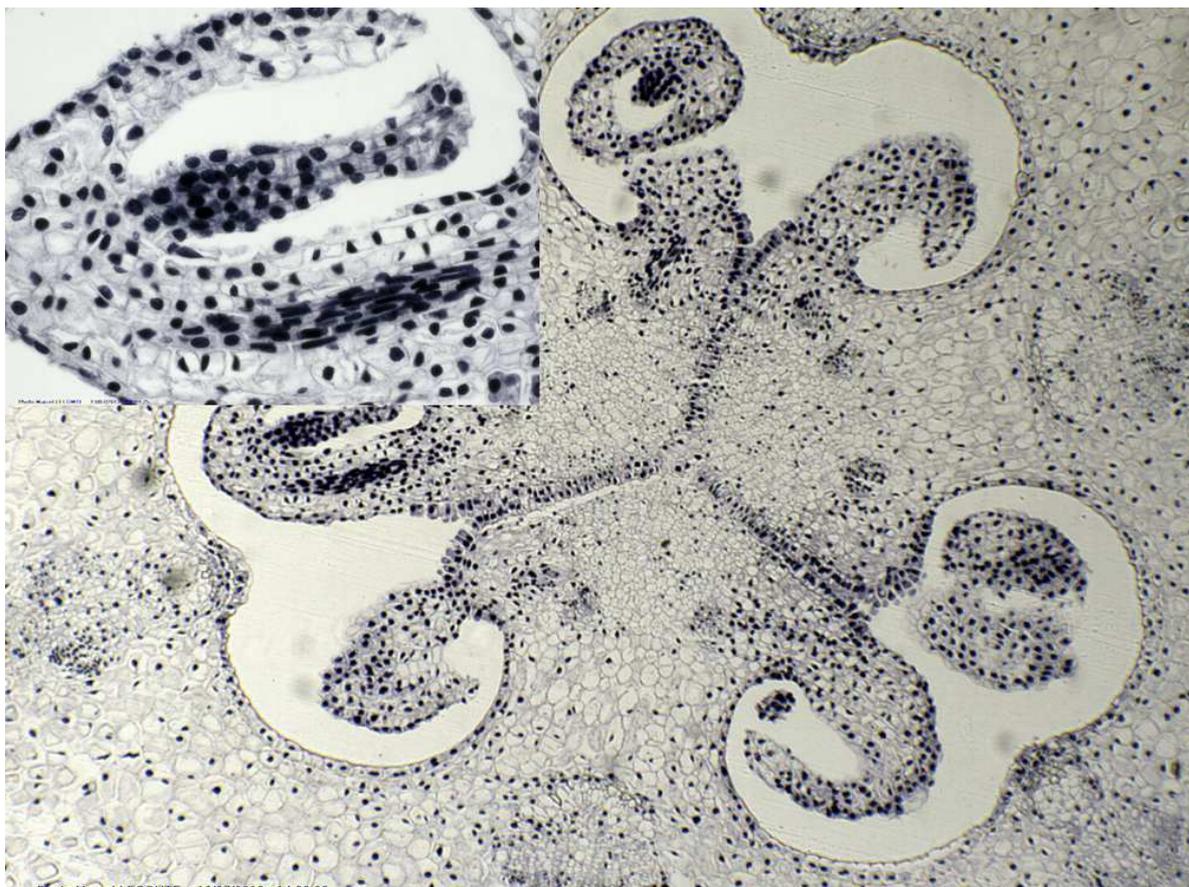
4) LA TÉLOPHASE

Même durée que la prophase ; elle se caractérise par la **formation d'un noyau** au niveau de chacun des deux lots de chromosomes. Les chromosomes se retransforment une masse diffuse de chromatine ; le fuseau de division disparaît ; l'enveloppe nucléaire se reconstitue. La division du noyau est terminée. Elle est suivie par **la division du cytoplasme** et la reconstitution de la membrane cellulaire. Les deux cellules filles entrent alors en interphase.



▲ Coupe dans une anthere (avec détail des grains de pollen) de *Lilium* sp. (cultivar). ▲

▼ Coupe dans un ovaire de *Lilium* sp. (cultivar), avec détail des ovules en formation. ▼



◀ Noyau de cellule épidermique d'un cœur de poireau, avec grains de chromatine nettement visibles (en noir).

REMARQUES

- + Durée de la mitose : 30 à 180 minutes selon les cellules.
- + Les chromosomes résultent d'un phénomène de condensation de la chromatine du noyau en début de la mitose. Bien individualisés tout au long de la division cellulaire, ils semblent à nouveau disparaître à la fin de celle-ci ; ils retournent alors à l'état de chromatine diffuse.
- + Dans la mitose des cellules animales, une structure particulière apparaît à chaque pôle du fuseau : il s'agit des **asters**, formés de microtubules en étoile.

PRÉALABLE

- ++ Poser un bulbe (jacinthe, tulipe, oignon, ail ou autre) dans un verre, en plaçant le dessous en contact avec de l'eau. Après quelques jours à température ambiante, des racelles vont se développer.
- ++ Au moment opportun, laisser séjourner l'ensemble durant 12 à 24 h. au frigidaire (cette opération accélère les divisions cellulaires).

MODE OPÉRATOIRE 01

- ++ Prélever les extrémités des racines (3 à 5 mm) ; cette zone apicale de la racine est appelée méristème, et c'est là que les cellules se multiplient très activement par mitose.
- ++ Fixer durant 4 heures dans l'alcool acétique {alcool à 95° (3x) + acide acétique glacial (1x)}.
- ++ Faire bouillir les méristèmes, durant 1 à 2 minutes, dans un flacon en pyrex avec 5 cc de carmin acétique (CA) ; pour une préparation individuelle, on peut faire bouillir un méristème dans une grosse

goutte de CA sur une LPO, en veillant à renouveler la goutte : la préparation ne doit absolument pas se dessécher.

++ Prélever un méristème et le placer dans une nouvelle goutte de CA non bouilli ; poser une LCO et presser légèrement, sans dissocier. L'objectif est d'écraser les cellules sans les éclater.

++ Eponger le surplus de carmin.

++ Observer directement.

En cas d'observation différée, luter avec de la paraffine ; cela permettra de conserver la préparation durant des mois.

MODE OPÉRATOIRE 02

++ Prélever un bout de jeune racine en croissance sur un bulbe. Couper le segment terminal à environ 5 mm de l'extrémité et le déposer sur une LPO. On doit observer près de l'extrémité le méristème qui forme une petite tache.

++ Couvrir d'acide chlorhydrique à 1 %. Laisser agir 5 minutes (l'acide hydrolyse le ciment pectique qui relie les parois cellulaires). Cela va faciliter ensuite la dissociation des cellules.

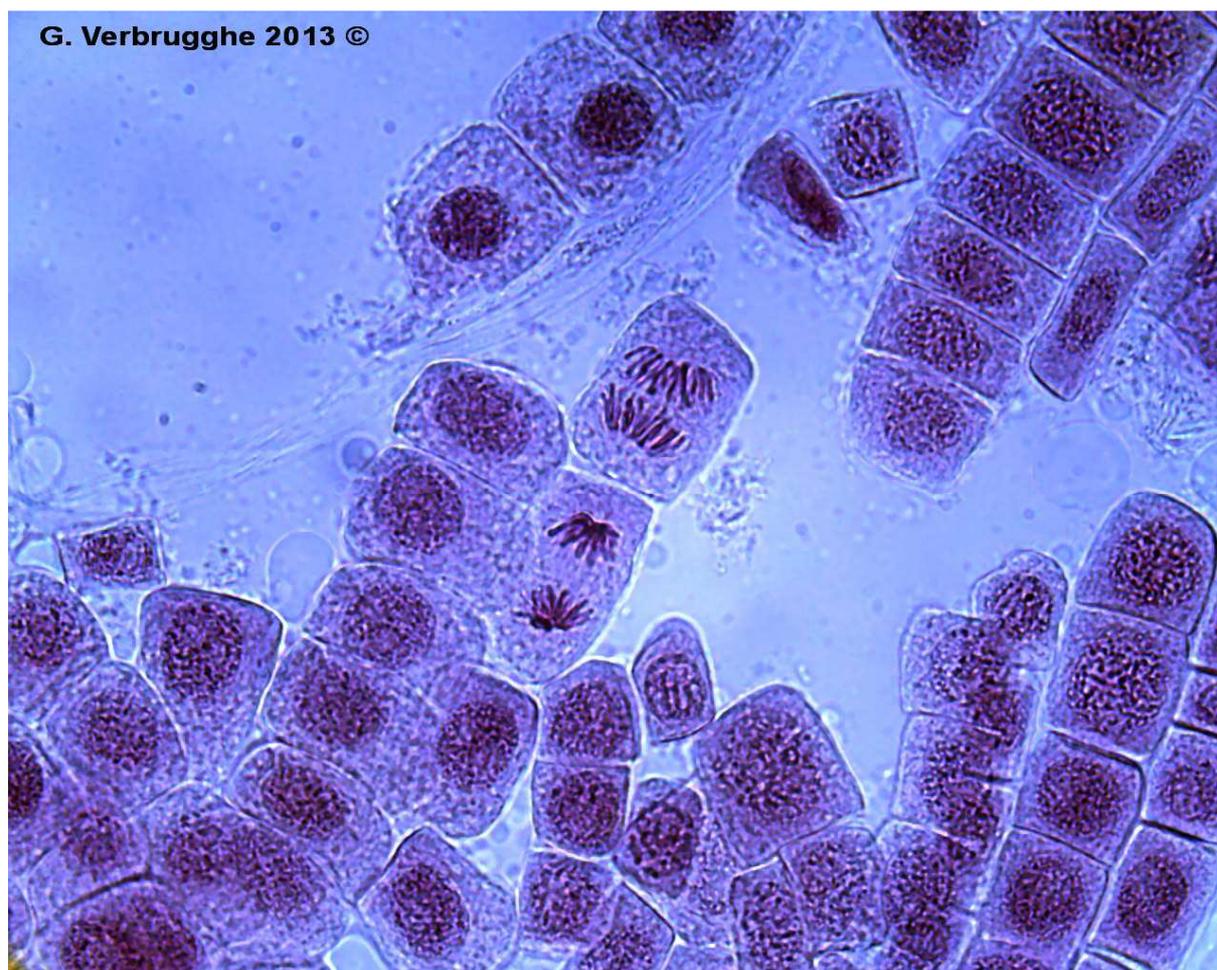
++ Enlever l'acide avec précaution, à l'aide d'un papier absorbant.

++ Déposer 2 gouttes d'orcéine acétique et laisser agir pendant 20 minutes.

++ Éliminer le colorant avec du papier absorbant.

++ Recouvrir d'une goutte d'acide acétique à 45 % et poser une LCO.

++ Appuyer doucement sur la LCO pour aplatir l'échantillon de façon à former une couche monocellulaire, en déplaçant légèrement la lamelle tout en appuyant pour provoquer la dissociation des cellules.



**Tout ce qui vit DANS L'EAU,
courante, stagnante ou salée.**

Protozoaires

Paramécies

Métazoaires

Plancton marin

**Algues diverses,
mono et pluricellulaires**



Introduction à ce chapitre, traité avec Daniel Crabbé⁵², qui a accepté de partager son expérience des Protozoaires.

Je devais avoir une dizaine d'années quand, comme beaucoup de gamins de cet âge (cela reste malheureusement une passion essentiellement masculine), j'ai reçu mon premier microscope. Comme beaucoup de petits garçons, j'ai également commencé par mettre un cheveu en dessous de l'objectif, mais il faut avouer qu'on s'en lasse très vite.

Vint ensuite la goutte d'eau, d'abord naïvement celle du robinet et ensuite celle du pot de fleur de maman. Et là, c'est l'émerveillement qui commence : un monde incroyable et grouillant se livre à nous. Malheureusement, faute d'un bon matériel optique et de connaissances suffisantes, l'exploration des milieux aqueux se termine bien vite. Cette passion de jeunesse se terminant alors souvent par l'observation de l'éternel épiderme d'oignon.



M. Lecomte - 2014 ©

Si vous lisez ce syllabus aujourd'hui, cela signifie probablement que votre passion vous a repris ou ne vous a pas quitté. Vous possédez maintenant un microscope plus performant et vous désirez acquérir les connaissances utiles à l'exploration de la vie dans les gouttes d'eau. Eh bien, vous avez grandement raison et cela pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, le milieu aquatique est partout présent et disponible à toute saison. Cela va bien sûr de la rivière à l'étang, mais cela passe également par la flaque d'eau, la gouttière un peu encrassée, le vase de fleurs, les mousses gorgées de liquide ; bref, un peu partout et n'importe quand.

Ensuite, en plus d'être omniprésent, le milieu aquatique est très varié. Vous aurez l'occasion d'y observer une infinité

d'espèces recouvrant une bonne partie de la systématique animale et végétale. Si la nomenclature du vivant vous intéresse, vous trouverez là une source inépuisable de sujets à identifier.

Si c'est l'éthologie et l'écologie qui vous intéressent d'avantage, vous ne serez pas déçu non plus. Tout ce petit monde vit en communauté, et en perpétuel recherche d'équilibre dans un milieu qui de par sa nature peut rapidement évoluer. Le comportement de ces populations est souvent fascinant et il est parfois difficile de mettre de côté les projections anthropomorphiques.

La vie microscopique de l'eau que l'on appelle communément le plancton, est également d'une importance environnementale capitale. Sont repris sous ce vocable tous les organismes aquatiques ayant une taille comprise entre moins de 1 µm (un millième de millimètre) et 2 mm.

Même si Ernst Haeckel le considérait à la fin du XIXe siècle comme enchanteur mais négligeable, celui-ci est d'une importance fondamentale à la vie sur terre. Pour vous donner une idée de son importance, le phytoplancton (celui capable de faire la photosynthèse) représente à lui seul 50 % de la biomasse produite sur terre et génère 75 % de l'oxygène planétaire. On se rend donc compte de son importance dans les chaînes alimentaires.

Le plancton n'a pas attendu l'époque actuelle pour être important. En effet, ce sont probablement les cyanobactéries présentes il y a 3,8 milliards d'années dans l'océan primitif qui ont capté l'excès de CO₂ de l'atmosphère et l'ont enrichie en oxygène, la rendant ainsi respirable et permettant à la vie de s'affranchir du milieu aquatique.

Le plancton à « squelette » est également responsable de la formation de nombreuses roches sédimentaires alors que le phytoplancton est à l'origine du tant convoité pétrole.

A l'heure actuelle, le plancton continue à jouer ces différents rôles en consommant notamment une bonne partie du CO₂ qu'il transformera en matière organique, dont une partie sera stockée dans le fond des océans pour quelques millénaires.

Le phytoplancton est une véritable pompe à gaz carbonique. De par sa capacité à produire énormément de matière organique, il n'allait pas mettre longtemps à intéresser le « génie » humain. De nombreuses études sont en cours pour produire du phytoplancton qui pourrait être utilisé comme complément alimentaire ou biocarburant.

J'espère vous en avoir dit assez pour vous donner l'envie d'aller plus loin et de plonger dans les gouttes d'eau, en compagnie de notre ami Marcel Lecomte.

La photo représente une daphnie (*Daphnia pulex*).

Daniel Crabbé, 15/03/2014

⁵² Daniel Crabbé, Ham-sur-Heure (B.) - daniel.crabbe@village.uunet.be

Généralités.



Ce que nous allons découvrir dans les quelques pages qui suivent ne constituera qu'une infime partie du monde qui s'ouvre à nos yeux, lorsqu'on plonge l'objectif du microscope dans l'eau de l'étang ou d'une simple mare.

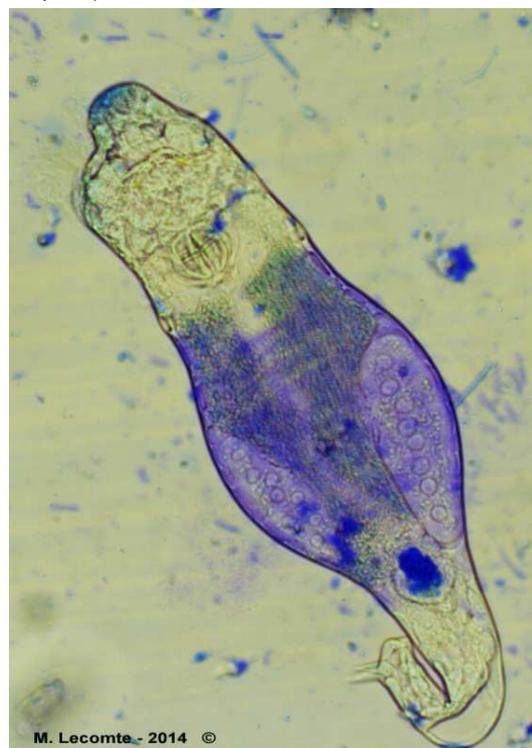
Ce petit aperçu ne sera qu'une porte entrouverte sur ce microcosme, avec une seule idée en tête : « l'envie de vous donner envie ». Nous ne chercherons pas à classer ou donner des clés d'identification : il existe une littérature très abondante sur ces différents sujets.

Le végétal et l'animal vont se confondre, car nous allons rencontrer des algues qui se déplacent et des animalcules contenant de la chlorophylle.

1. LA RÉCOLTE

Elle est simple et se pratique de diverses manières :

- ++ le flacon en verre attaché à un bâton et qui permet de prélever de l'eau à diverses profondeurs ;
- ++ un petit grappin (gros hameçon à trois branches) peut se substituer au bocal ci-dessus en permettant d'arracher de petites quantités d'algues ou de plantes immergées ;
- ++ le godet avec lequel on va prélever le milieu benthique (boue et sédiments) ;
- ++ récolter des feuilles de plantes aquatiques, des algues envahissantes ou des élodées, et les placer dans un cristallisoir avec un peu d'eau prélevée au même endroit ;
- ++ racler avec un canif la surface des tiges et feuilles des plantes aquatiques ;
- ++ laver les galets gluants dans un peu d'eau avec une brosse à dents ;
- ++ presser les algues filamenteuses pour en extraire l'eau et la récolter dans un bocal ;
- ++ ne pas négliger les « bêtes » flaques d'eau temporaires, les fonds de corniches, les murs suintants, l'eau des huîtres (ne pas oublier de manger le mollusque !) ;
- ++ déposer de la mousse dans un cristallisoir et l'arroser abondamment d'eau de pluie. Au bout de quelques temps vous y trouverez plein de choses intéressantes et notamment de magnifiques et captivants tardigrades ;
- ++ le filet à plancton (avec des mailles de l'ordre de 0,05 mm), qu'on va promener de gauche à droite dans le milieu à explorer. Celui-ci peut être bricolé de façon classique avec de la soie à bluter, qui est relativement onéreuse et peut être remplacée par de la soie pour sérigraphie (prendre une maille de 120T (300 US). Pour une dizaine d'euros, vous pouvez vous fabriquer deux filets de 20 cm de diamètre. Les méthodes de fabrication ne manquent pas sur internet.
- ++ Pour transporter vos prélèvements, privilégiez les récipients en verre à large col se fermant hermétiquement et relativement volumineux (pots à confiture, bouteilles de jus de fruit). Ne remplissez pas les bords au-delà de la moitié afin de laisser suffisamment d'oxygène à la population que vous aurez prélevée. De retour chez vous, pensez à ouvrir les bords.



2. LA CONSERVATION DES PRÉLÈVEMENTS

Nous les plaçons dans des flacons fermés, de 250 à 500 cc, au frigidaire, où ils vont se conserver assez longtemps (nous travaillons encore à ce jour sur des échantillons utilisés lors du séminaire de 2012). Il est préférable d'observer du matériel vivant, car après fixation, nombre d'organismes à cuticule molle et non siliceuse subissent des déformations qui rendent toute identification quasi impossible.

3. LA CULTURE

Elle est rendue possible grâce au développement de l'aquariophilie ; dans les milieux spécialisés, on peut se procurer sans difficulté des daphnies, des paramécies, des nauplies d'*Artemia*, différentes

sortes d'algues ... Lancer des élevages est quasi un jeu d'enfant, avec ainsi à disposition, du matériel de travail à volonté.

On peut aussi initier des élevages plus personnels en remplissant des bocaux à demi avec de l'eau de pluie non filtrée, dans laquelle on va placer des tiges de fleurs, des débris végétaux ou du foin sec. Placer le tout à l'ombre, sans couvercle. Un voile bactérien va d'abord apparaître, et servira de nourriture aux Flagellés et aux Infusoires⁵³.

Le nec plus ultra est la réalisation d'élevages purs. Ce type d'élevage devient utile lorsque l'on veut identifier avec précision certaines espèces, préparer des lames définitives, se livrer à différents types de colorations, observer les modes de reproduction, Pour y arriver, il suffit de prélever deux trois exemplaires de l'espèce que l'on veut élever à l'aide d'une pipette Pasteur sous une loupe binoculaire ou avec un microscope inversé. Même si cela paraît compliqué, on y arrive très bien avec un peu de patience et d'exercice.

Il faut ensuite nourrir l'animal, ou l'algue que l'on veut élever. Pour les algues, certaines se développent très bien en mettant dans l'eau une ou deux gouttes d'engrais liquide universel. Certaines sont très compliquées à élever car elles ont des conditions de croissance beaucoup plus strictes comme par exemple le pH de l'eau. Pour les animaux (Protozoaires y compris), il est utile de connaître un peu l'écologie de l'espèce que l'on veut élever. Certaines se contentent d'algues, d'autres se nourrissent de bactéries ou d'autres protozoaires. On en vient parfois à devoir élever certaines espèces pour en nourrir d'autres. Si vous voulez vous lancer dans l'élevage, la levure de boulanger est appréciée par de nombreux ciliés.



4. L'OBSERVATION DE PIÈCES VIVANTES

Fabrication d'une lame « aquarium » : l'idée est de reproduire un micro monde hermétique à l'abri du dessèchement, permettant l'observation répétée, durant plusieurs heures.

++ Prendre une LCO ronde ou carrée de 18 mm, et à l'aide d'une fine spatule, déposer un léger bourrelet de vaseline sur le pourtour (2 mm d'épaisseur).

++ Déposer une goutte du liquide à observer au centre d'une LPO.

++ Poser délicatement la LCO vaselinée sur la goutte et exercer une légère pression pour remplir d'eau tout l'espace sous la LCO ; vous obtenez

ainsi un milieu fermé, insensible à la dessiccation, où vous pourrez voir évoluer en toute liberté les occupants du lieu. Comme on travaille en général avec des objectifs faibles (x4 ou x10), l'épaisseur du montage réalisé ne constitue pas un désagrément.

++ Une telle lame peut être conservée plusieurs jours si on prend soin, en dehors des observations, de la poser dans un petit récipient clos dont on tapisse le fond de papier absorbant imbibé d'eau.

UNE VARIANTE PERSONNELLE : nous préférons utiliser une lame creuse, qui permet de maintenir la goutte au centre de la lame, dans la cavité existante, et nous lutons à la vaseline.

5. LA CONSERVATION DE TRACES

++ **LA PHOTOGRAPHIE** : nous allons rencontrer ici les pires difficultés car tout ce qui bouge dans la préparation, se déplace souvent très vite, rendant toute capture de photo quasi impossible. Il va falloir utiliser des techniques de narcose ou de ralentissement, que nous développerons plus loin.

++ **LA BANDE VIDÉO** : c'est la solution idéale si vous disposez de matériel photographique (reflex ou caméra) disposant de cette option. Une pause effectuée au bon moment permet une capture d'écran.

++ **LA PRÉPARATION DÉFINITIVE** : nous n'aborderons pas ce chapitre, car les résultats sont souvent décevants, voire nuls, du fait que nombre de fixateurs désagrègent les parties molles des éléments observés. Arriver à des résultats probants nécessite l'utilisation de produits et de matériel relevant de laboratoires spécialisés, et inaccessibles à des amateurs, même passionnés.

Deflandre (1923) préconise une technique qui donne parfois des résultats corrects : mélanger intimement une goutte de liquide à observer et une goutte de nigrosine à 5 % ; réaliser un frottis ; faire sécher rapidement sur une surface bien horizontale, sans chauffer (éventer) ; poser une goutte de BC et une LCO ; certaines espèces vont éclater, mais d'autres se préparent ainsi de manière admirable.

⁵³ Les anciens auteurs utilisaient ce nom parce que ces organismes apparaissent en grand nombre dans toute infusion de débris végétaux.

6. LA TECHNIQUE DU RALENTISSEMENT

Nous en avons expérimentées plusieurs.

++ Séguy préconise les fibres de coton hydrophile dilacéré, qui vont gêner le déplacement des pièces observées ; c'est assez efficace, mais guère esthétique pour la photographie.

++ Le même auteur recommande une solution +/- épaisse de gomme arabique.

++ La glycérine donne les mêmes résultats : en mélanger une goutte avec une goutte d'eau prélevée.

++ D. Crabbé utilise la colle à tapisser, si possible sans antifongique ; préparer une solution à 10 % dans de l'eau non chlorée, puis en mélanger une goutte avec une goutte d'eau prélevée.

Tout produit de consistance +/- épaisse, gélifiée, est susceptible de convenir, s'il ne comprend pas de composés mortels pour les organismes.

++ Il est également possible de ralentir les individus par compression. Pour ce faire, placer une petite quantité de vaseline aux quatre coins d'une LCO et la placer sur une goutte de la préparation. La technique consiste ensuite à écraser très délicatement la lamelle à l'aide d'une aiguille montée tout en observant au microscope pour évaluer le résultat. Il faut pratiquer très délicatement et progressivement pour éviter que l'objet de votre curiosité n'explode. Si la température est supérieure à 22 °C, la vaseline peut être remplacée par de la lanoline.

7. LA NARCOSE

Elle consiste à « endormir » les sujets, jusqu'à la mort.

La littérature spécialisée nous parle de la liqueur de Rousselet (3 cc de chlorhydrate de cocaïne à 2 %, 1 cc de méthanol pur & 6 cc d'eau), ou de la formule modifiée par De Beauchamp (0,5 g de chlorhydrate de cocaïne à 2 %, 5 cc de méthanol absolu & 5 cc d'eau) ... mais vous imaginez qu'un des composants n'est guère facile à trouver. Ajouter 1 goutte d'anesthésique dans 1 cc d'échantillon, et répéter toutes les 5' jusqu'à narcose.



H. Taylor recommande la mercaine (ou bupivacaïne), utilisée par les dentistes, en solution à 0,5 %.

Au su de ses propriétés sédative et léthargiques, nous avons expérimenté l'hydrate de chloral à 5 et 10 %, mais sans succès valable.

Grâce à un ami médecin, nous avons pu nous procurer de la xylocaïne à 1 % (chlorhydrate de lidocaïne), un anesthésique à usage local ; les résultats s'avèrent très efficaces, après avoir trouvé le bon dosage 2 cc de xylocaïne dans 5 cc de sérum physiologique. La solution pure se montre trop agressive car, après essai, elle a « explosé » tous les spécimens traités.

M.F. Canella préconise le chlorure de magnésium en solution aqueuse à 1 % ; en ayant retrouvé dans nos tiroirs, nous l'avons expérimenté d'abord à 10 % (suite à une erreur de manipulation) : les résultats sont très valables, et quasi instantanés, voire même trop rapides, car il se produit un phénomène presque immédiat de plasmolyse, qui fait littéralement exploser les organismes et les détruit en moins d'une minute. Le retour à une solution à 1 % est moins radical. Nous pensons que nous obtiendrions le même résultat avec du chlorure de sodium.

Dans la solution de Corri, les composants sont plus faciles à trouver : 10 cc de méthanol à 96%, 0,15 cc de chloroforme et 90 cc d'eau distillée. Comme pour toutes les narcoses, il est conseillé d'ajouter progressivement la solution et d'observer le résultat avant de réaliser le montage.

Le bleu de méthylène et la fuchsine acide en solution classique jouent bien leur rôle de colorant, avec une finalisation létale.

Organismes aquatiques.

475. — *Méthodes d'examen.* — Les collections d'eau où poussent des plantes aquatiques contiennent toujours des organismes errants, Infusoires, Rotifères, Crustacés, Acariens, etc., dont la transparence facilite l'étude. Pour se procurer des matériaux d'étude, il suffit de pêcher avec un filet à mailles assez fines et de laver le filet dans un seau ou dans un bocal. On peut encore attirer une touffe d'herbes submergées et l'emporter telle quelle dans un linge mouillé ou dans une boîte de fer blanc. Ces herbes, placées dans un aquarium, délivreront les organismes qu'elles ont retenus au moment de leur sortie de l'eau.

476. — Il est encore facile de se procurer des Infusoires et des Amibes (716, 766). Un bocal à large ouverture est rempli d'eau. Quelques feuilles fraîches froissées de laitue ou de mâche, ou une pincée de foin sec, seront placées dans l'eau. Au bout de deux ou trois jours, les Infusoires apparaissent en grand nombre. Ces organismes pourront être étudiés à l'état vivant. Une goutte de cette macération est puisée avec une pipette à la surface et déposée sur une lame.

477. — L'observation peut se faire telle quelle avec un objectif faible. Elle sera facilitée si la goutte d'eau est recouverte d'une lamelle. Si cette goutte est trop épaisse,

CLX XVI

les organismes seront entraînés sur les bords ; dans le cas contraire, s'il y a trop peu d'eau, ils risquent d'être écrasés par l'adhérence de la lamelle sur le porte-objet.

Une lamelle, essuyée avec précaution au moyen d'un chiffon de toile usée, sera saisie par une pince douce à mors plat. On la déposera obliquement sur la goutte d'eau, convenablement disposée. Le surplus de l'eau peut être absorbé avec précaution au moyen d'une pipette effilée ou avec une languette de buvard.

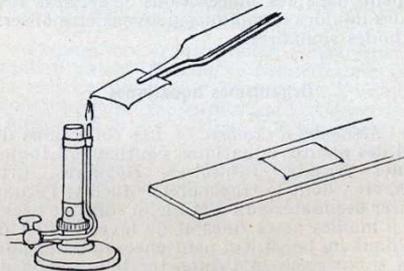


Fig. 45. — Préparation de la cellule de Legendre (Langeron).

478. — Pour empêcher l'écrasement des objets en suspension, on peut placer sous la lamelle de petites languettes de papier ou des petits fragments de coton hydrophile, de moëlle de sureau, des petits morceaux de lamelle, des cheveux, etc... M. Legendre déforme les quatre coins de la lamelle dans la flamme de la veilleuse d'un bec Bunsen ; l'épaisseur ainsi provoquée permet l'examen d'objets très délicats sans risque d'écrasement.

Pour immobiliser, comprimer légèrement ou éviter l'écrasement des petits animaux (Daphnies, Copépodes) le Dr M. Langeron utilise la composition suivante :

Cire blanche	2 parties en poids
Térébenthine de Venise	1 partie en poids

4 pages extraites de Séguy, tome I (1949), pour ceux qui n'ont pas la chance de posséder cet ouvrage ; il y explique nombre de techniques à expérimenter à l'occasion.

CLX XVII

fondue sur un feu très doux. Le mélange refroidi doit s'amollir facilement entre les doigts, on l'utilisera avec avantage de la manière suivante :

Placer au niveau des angles de la lamelle quatre petites boules de cire pétrie entre les doigts. L'animal est posé dans une goutte d'eau entre les boules. On recouvre avec la lamelle. On exerce une pression graduée sous le microscope jusqu'à obtention du résultat cherché. L'excès de liquide est absorbé par un petit morceau de papier buvard ou à la pipette.

479. — Les préparations qui nécessitent un examen prolongé seront bordées pour éviter le dessèchement. Les bords seront recouverts d'un peu de paraffine appliquée au fer chaud ou de vaseline ou de lanoline étalées au pinceau. Pour que les substances ainsi appliquées puissent adhérer à la surface du verre, il est nécessaire que la lame et le couvre-objet soient parfaitement propres et que le liquide examiné n'ait pas débordé.

Les Infusoires circulent dans la goutte d'eau ; les Amibes, relativement peu mobiles, se reconnaîtront à leur forme et à l'absence de cils.

480. — Les grosses espèces seront étudiées sans lamelle, dans une goutte d'eau que l'on aspire peu à peu avec un petit triangle de papier buvard jusqu'au moment où les mouvements sont impossibles. Il faut maintenir cependant assez d'eau pour que l'animal ne périsse pas et rende, par sa déformation, toute observation impossible.

Le microaquarium peut se confectionner en collant sur une lame, avec du baume du Canada, des bandes de verre découpées dans une autre lame. L'ensemble est recouvert d'une lamelle. Quelques fragments de Spirogyres placés dans l'eau avec les animaux favoriseront l'aération.

481. — *Chambre humide.* — L'examen en goutte pendante ou chambre humide est supérieur à celui entre lame et lamelle. On prépare une lame creuse ou à défaut une lame portant un disque de verre collé au baume du Canada, ou une lame garnie d'une cellule en carton. Une petite goutte du liquide à examiner est placée sur une

E. P. N. XXXIII

7

CLX XVIII

lamelle qui est retournée sur la cellule ainsi disposée. La goutte de liquide doit être très petite pour ne pas toucher le fond de la cellule et éviter que les organismes ne tombent, ce qui interdit l'emploi d'objectifs forts. Les bords des cellules peuvent être enduits de vaseline pour empêcher l'évaporation (99, 100).

Les examens en goutte pendante ou en chambre humide présentent plusieurs inconvénients. Leur épaisseur et le manque de fixité des objets ne permettent pas les fortes amplifications. Il est difficile d'éviter complètement l'évaporation et la formation d'une buée gênante sur les parois non recouvertes de liquide. Les préparations sous l'huile de paraffine réduisent ces inconvénients. Grâce à l'inactivité chimique de cette huile et à sa perméabilité suffisante aux gaz, les organismes vivants peuvent se conserver et se multiplier dans les préparations qu'elle protège.

482. — a. *Préparation sous l'huile.* — Une goutte d'huile de paraffine ou de vaseline médicinale est déposée au centre d'une lamelle maintenue horizontalement au moyen d'un support. Une petite quantité du liquide renfermant les microorganismes à étudier est aspirée au moyen d'une fine pipette. La pointe de la pipette est dirigée au centre de la goutte d'huile. En soufflant légèrement, une gouttelette de liquide sort de la pipette, et s'étale sous l'huile contre la surface du verre. L'excès d'eau peut être aspiré jusqu'à ce que les organismes soient légèrement comprimés entre la lamelle et la couche d'huile. Surveiller l'opération sous le microscope. L'étude s'effectuera à travers la lamelle retournée (144).

Les liquides aqueux adhèrent au verre plus fortement que l'huile et ne s'en détachent pas, même en couche très mince. Ils sont protégés de l'évaporation par l'huile qui les recouvre. Les gouttes pendantes ainsi enrobées se conservent bien à l'air libre et la chambre humide extérieure est inutile (624 d).

Les Protozoaires

Dans vos différentes infusions ou récoltes, vous aurez l'occasion d'observer de nombreux protozoaires.

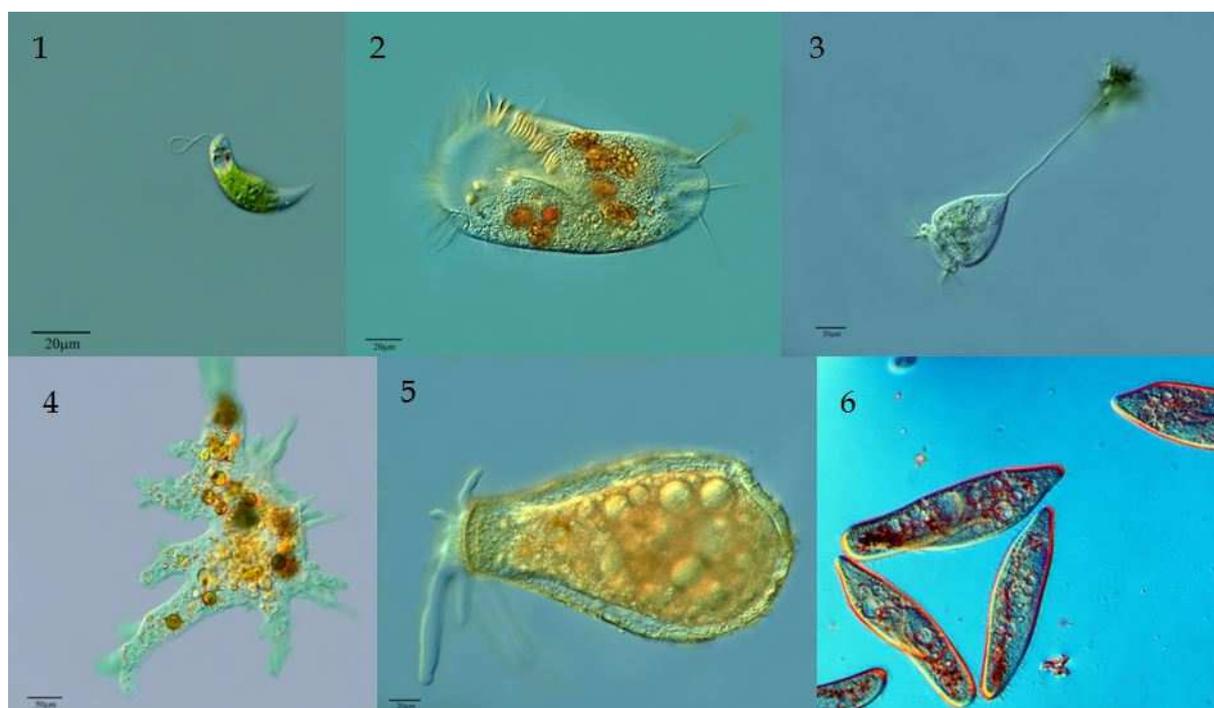
On regroupait anciennement sous ce nom tous les organismes unicellulaires à caractère animal. Comme la différence entre le règne végétal et animal n'est pas toujours évidente, on a regroupé tous ces êtres vivants sous le vocable de protistes.

Comme les algues sont traitées dans un autre paragraphe, nous ne parlerons donc ici que des protistes à caractère animal sans rentrer dans la systématique de ces derniers, qui nécessite une bonne documentation, si on veut se lancer dans l'identification.

Dans nos prélèvements, nous aurons l'occasion de rencontrer trois grands types de protozoaires, les Flagellés (munis de 1 ou deux flagelles pour se déplacer → euglènes), les Ciliés, munis de cils pour se déplacer et se nourrir ; ils peuvent être mobiles (paramécies) ou fixés (vorticelles) et les Rhizopodes, qui se nourrissent et se déplacent à l'aide de déformations du cytoplasme (amibes).

Les protozoaires ne sont pas faciles à observer et à identifier. La première raison est leur mobilité (surtout les ciliés et flagellés), et la deuxième est leur relative transparence qui complique l'observation de leur structure en lumière transmise.

C'est pour cette raison qu'il est intéressant de les observer en lumière oblique, en contraste de phase ou en contraste interférentiel. Malheureusement ces deux dernières techniques ne sont pas à la portée de tout le monde, contrairement aux techniques de coloration que nous allons aborder ici.



1. *Euglena viridis* (Flagellé) - 2. *Stylonichia mytilus* (Cilié mobile) - 3. *Vorticella microstoma* (Cilié fixé) - 4. *Amoeba proteus* (Rhizopode) - 5. *Nebela tubulosa* (Rhizopode, amibe à thèque⁵⁴) : ces 5 photos sont de Antonio Guillén /Proyecto Agua⁵⁵ - 6. *Paramecium caudatum*, observées en DIC ; les cils vibratiles périphériques, les vacuoles digestives et le péristomes sont bien visibles (photo D. Crabbé).

Mise en évidence des vacuoles digestives (coloration vitale)

Ces vacuoles se forment à l'intérieur du cytoplasme autour des particules ingérées par les protozoaires. Pour les observer, on utilise une solution aqueuse de rouge neutre à 1/1.000. A une goutte de prélèvement, ajoutez une **très petite quantité** de la solution colorante et observez ensuite avec l'objectif 4x jusqu'à ce que les vacuoles soient colorées.

Ce n'est que quand les vacuoles seront bien apparentes que vous pourrez déposer la LCO et poursuivre votre observation. Celle-ci vous permettra de voir le cheminement des vacuoles dans le cytoplasme. La teinte de ces dernières évoluera au cours de la digestion : rouge si le pH est supérieur à 7 et jaune orangé si le pH devient acide.

⁵⁴ Enveloppe de protection minéralisée, permettant de résister à diverses agressions extérieures.

⁵⁵ <http://www.flickr.com/people/microagua/>

Mise en évidence des vacuoles pulsatiles (coloration vitale médiocre)

Chez les Ciliés, les vacuoles pulsatiles sont des organites destinés à réguler la teneur en eau de la cellule. Elles sont particulièrement visibles chez certaines paramécies.

Pour les mettre en évidence, on utilisera une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1/1000. Le bleu de méthylène n'est malheureusement pas un bon colorant vital et il tuera les individus en quelques minutes. Il colore également le macronucléus (beaucoup de ciliés possèdent deux noyaux, un macro et un micronucléus)

M. Lecomte - 2014 ©



Mise en évidence de l'ingestion alimentaire et des mouvements d'eau générés par les cils (vital)

La manipulation est très simple, il suffit d'ajouter quelques gouttes d'encre de chine très diluée à la préparation.

Mise en évidence du (ou des) noyau(x) - (coloration létale)

Pour observer le ou les noyaux des protozoaires, ajouter à la préparation un peu d'une solution de vert de méthyle acétique (100 cc d'eau distillée, 1 cc d'acide acétique et 1 g de vert de méthyle). Observer à l'objectif 4x sans LCO (les individus sont morts) et attendre que le noyau (ou le macronucléus) soit coloré. A partir de ce moment on peut déposer la LCO et passer à des grossissements supérieurs pour observer l'appareil nucléaire.

Observation des cils vibratiles (coloration létale)

Chez les ciliés, la structure et la disposition de la ciliature est également un élément important pour leur détermination.

mination.

Pour ce faire, on utilisera un réactif iodo-ioduré en proportion 1/1 avec le prélèvement (1 gr d'iode, 10 gr d'iodure de potassium et 100 cc d'eau distillée).

Non seulement la ciliature sera rendue visible, mais vous pourrez également observer le noyau et différentes inclusions cellulaires en brun foncé.

Observation des trichocystes (coloration létale)



Les trichocystes sont des petites structures fréquentes chez les Ciliés, situées entre les cils vibratiles. Au contact d'autres organismes ou de prédateurs, ils émettent un liquide qui va coaguler et qui a pour effet d'éloigner des prédateurs éventuels. Pour les mettre évidence, ajouter à la préparation un mélange de bleu coton à 1% et de potasse à 3%. Leur éclatement est instantané.

Trichocystes de paramécie - (photo D. Crabbé).

Les paramécies



◀ Paramécie soumise au bleu de méthylène, ce dernier ayant rapidement une action létale ; 2 grandes vacuoles visibles.

Au même titre que la drosophile ou que la souris blanche, la paramécie est une véritable bête de laboratoire ; les expériences menées autour de cette dernière sont nombreuses et ont permis de découvrir beaucoup de choses sur les protozoaires et sur les ciliés en particulier.

Les manipulations du paragraphe précédent sont bien sûr applicables aux paramécies, mais elles peuvent également être utilisées pour étudier les différents tropismes. C'est ainsi que vous aurez probablement l'occasion d'observer l'affinité de ces dernières pour les bulles d'air présentes dans votre préparation (bulles d'air que d'habitude, on essaie d'éviter dans les préparations !).

Nous avons expérimenté au départ d'une souche achetée dans le commerce spécialisé (Aqualiment).

L'élevage s'avère très simple : verser 0,75 litre d'eau de Volvic⁵⁶ à 16-20° dans une bouteille à col large (jus de fruit), y placer la souche, ainsi que 10 gouttes de lait (ou d'une solution de levure fraîche), qui vont servir de nourriture. Placer dans un endroit éclairé et ensoleillé. Les paramécies vont se regrouper près de

la surface où elles sont bien visibles.

Cela fonctionne bien, car après 8 jours, il y avait des milliers de sujets, bien identifiables par transparence.

Lorsque l'eau redevient claire (une semaine en général), apporter quelques gouttes de lait ; après 2 ou 3 semaines, initier une ou deux nouvelles cultures dans de nouveaux flacons.

Le milieu de culture n'est pas exclusif et nous y avons rencontré nombres d'autres organismes dont certains que nous n'avons pu identifier, faute de connaissances dans ce domaine.

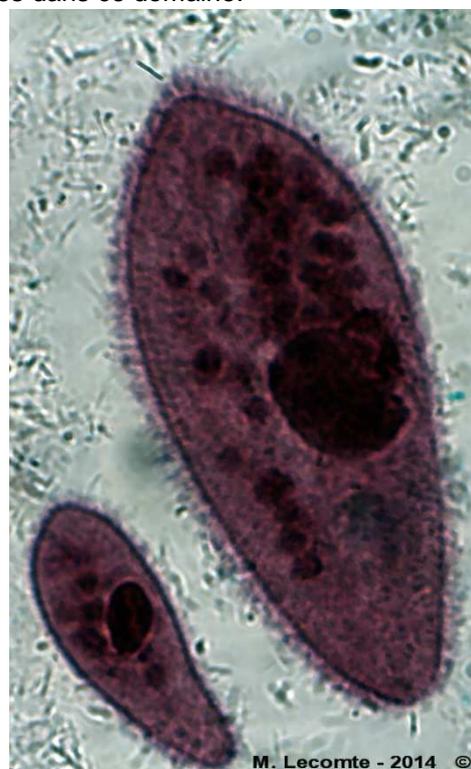
La photographie n'est guère facile car, même après narcose, la frange de cils périphériques continue de vibrer, rendant le contour +/- flou.

UNE EXPÉRIENCE INTÉRESSANTE :

- ++ préparer une solution de levure naturelle ;
- ++ colorer quelques gouttes de levure (avec du rouge Congo aqueux) ;
- ++ prélever quelques gouttes du milieu d'élevage des paramécies et placer au contact de la levure colorée ;
- ++ observer après quelques minutes : les paramécies ingèrent les levures colorées en rouge ; sous l'action des sucs digestifs, celles-ci vont virer au bleu noirâtre (car le congo est un indicateur d'acidité).

Paramécies colorées à la fuchsine acide lactique, puis endormies à la xylocaïne ▶

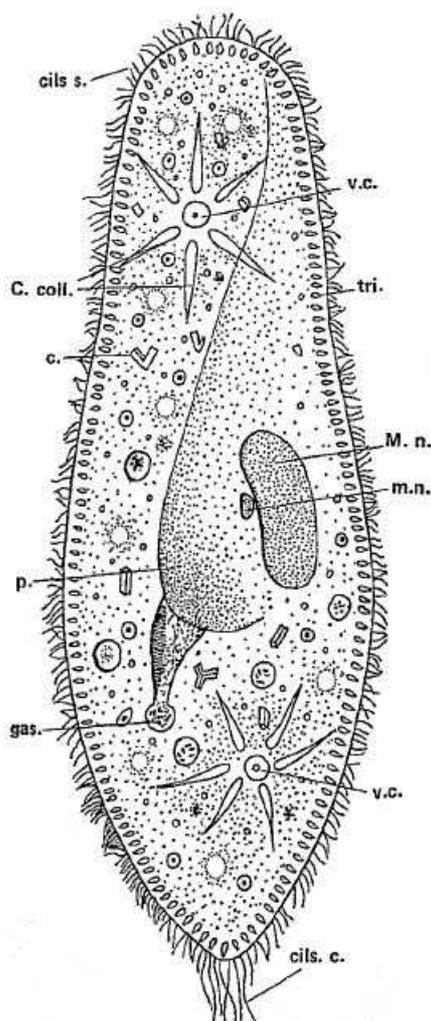
Beaucoup de Ciliés ont la capacité de former un kyste⁵⁷ lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables.



⁵⁶ Il ne s'agit pas ici d'une publicité gratuite, mais un conseil de spécialistes des Infusoires, qui après avoir testé tout ce que nous procure le marché, en ont fait le maître-conseil ; l'eau de distribution est à proscrire vu la présence de chlore. On peut aussi utiliser une eau de citerne, de source, d'aquarium ou d'étang ; mais dans ces derniers cas, il est très difficile d'obtenir une souche pure, car l'eau est occupée par d'autres protozoaires qui prennent très vite le dessus sur les paramécies.

⁵⁷ Le kyste est une forme de survie et de résistance, entourée d'une membrane double ou triple, quasi imperméable, qui assure la propagation d'une espèce ; il est le siège d'une vie ralentie, pouvant persister très longtemps (plusieurs années dans certains cas).

◀ Schéma structural d'une paramécie, selon Dragesco



c. = **cristaux** : on peut aussi rencontrer des concrétions calcaires ; leur présence ne s'explique guère.

C. coll. = **canaux collecteurs** : ils servent à amener l'eau du cytoplasme vers les vacuoles contractiles.

cils c. = **cils caudaux** : ils permettent l'orientation du déplacement et des changements brusques de direction.

cils s. = **cils somatiques** : ils battent de manière synchrone et permettent à l'organisme de se déplacer.

gas. = **gastriole** : c'est la vacuole alimentaire où sont conduits les aliments absorbés, et où a lieu la digestion.

Les déchets digestifs sont éliminés à un endroit déterminé de la paroi, appelé **cytoprocte**.

M. n. = **macro noyau** : il gère le quotidien vital cellulaire et s'occupe de la reproduction asexuée.

m. n. = **micro noyau** : il assure les fonctions sexuelles de reproduction avec échange génétique.

p = **péristome** : invagination ventrale vers laquelle la nourriture (surtout des bactéries) est envoyée par le mouvement des cils qui la bordent. Dans le fond se trouve la bouche, ou **cytostome**, qui ouvre sur un canal appelé **cytopharynx**, conduisant à la gastriole.

tri. = **trichocystes** : ce sont des organites situés sous la cuticule, qui peuvent projeter au dehors de longs filaments rigides (moyen de défense ?).

v.c. = **vacuoles contractiles** ou **pulsatiles** : elles ont la capacité d'évacuer l'excès d'eau qui se trouve dans le cytoplasme, et qui y pénètre par osmose.



G. Verbrugghe 2013 ©

Paramécie en phase de reproduction par scissiparité, ce qui va donner deux clones.

Les Métazoaires

Sauf mention contraire, toutes les photos de ce chapitre sont de Antonio Guillén /Proyecto Agua.

Alors que nous avons développé le règne des Protistes, nous n'aborderons pas les champignons et les végétaux « vrais », qu'on retrouve rarement dans les gouttes d'eau, si ce n'est pour certains par la présence de leurs cellules reproductrices (spores, conidies ...).

Par contre, les « animaux » seront largement présents dans nos prélèvements même si ce n'est que sous le microscope qu'ils se révéleront à nous.

Sans rentrer dans la complexité de leur classification, voici les principaux représentants de cette microfaune aquatique.



LES ÉPONGES

Ce sont des animaux pluricellulaires d'organisation très simple, qu'on a dans le passé très souvent classés parmi les végétaux. Le fait qu'elles peuvent abriter des algues symbiotiques a probablement participé à la confusion.

Elles peuvent être en croûte, dressées ou enveloppantes.

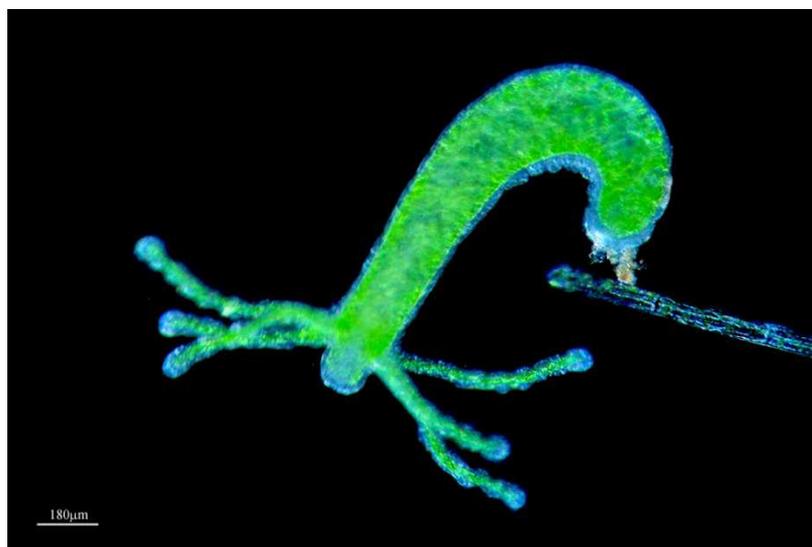
La taille de nos éponges d'eau douce peut être de l'ordre du millimètre, c'est pourquoi elles sont mentionnées comme pouvant faire partie de la vie visible dans une goutte d'eau.

◀ Source photo : Wikipedia

LES CNIDAIRES

Les Cnidaires sont des animaux d'organisation relativement simple, caractérisés par seulement deux feuillets de cellules à l'état embryonnaire. Composés de 99% d'eau, les représentants les plus connus sont les coraux, les méduses et les anémones de mer.

Dans nos échantillons d'eau douce, il est peu probable que nous trouvions la relativement rare méduse d'eau douce *Craspedacusta sowerbyi*; par contre, il est fort probable que nous rencontrions des hydres et notamment *Hydra viridis*, dont la couleur verte est due à une algue verte symbiotique.



▲Hydre

PLATHELMINTHES

Les Plathelminthes, également appelés vers plats, regroupent des animaux nettement plus complexes, dont les plus connus sont souvent parasites (petite et grande douve du foie, ténia ou ver solitaire, planaire).

Les planaires sont les Plathelminthes que nous aurons le plus de chance d'apercevoir dans nos prélèvements. Elles sont facilement reconnaissables à leur forme allongée et plate et aux deux petits yeux noirs présents à l'extrémité antérieure. Elles sont très connues et étudiées par les biologistes à cause de leur faculté de régénération d'un animal entier à partir d'un fragment sectionné.



Une planaire : *Gyratrix* sp. ▲ ►

ASCHELMINTHES

Egalement connus sous le nom de Némathelminthes, les représentants de cet embranchement possèdent un tube digestif simple, rectiligne, comprenant une bouche (souvent avec des crochets), un pharynx, un œsophage, un intestin et un anus ventral (pas de glandes digestives).

Parmi les nombreuses classes composant ce groupe, trois nous intéressent plus particulièrement, car très présentes dans nos prélèvements d'eau : **les Rotifères, les Gastrotriches et les Nématodes.**



LES ROTIFÈRES

◀ *Brachyonus* sp.

De la taille des plus grands ciliés, et présentant également des cils, ils sont facilement confondus avec ces derniers. Un examen des structures internes montre cependant rapidement que cet animal est bien un pluricellulaire avec des organes complexes. Ils sont fascinants à observer et leur écologie ne l'est pas moins, mais nous écarterait trop de l'objectif restreint de ce syllabus.

Le terme rotifère (du latin rota, « roue ») leur vient des deux couronnes de cils entourant leur bouche,

dans la région antérieure, qui tourbillonnent en sens contraire pour faire entrer l'eau et les particules de nourriture qui y sont en suspension. Ces cils peuvent aussi servir à la locomotion chez certaines espèces.

Au fond du pharynx musculueux se situe un appareil masticateur caractéristique, le mastax, constitué de sept pièces dures et mobiles servant à broyer la nourriture. Postérieur, leur pied possède souvent une glande adhésive qui permet à certaines espèces de se fixer au substrat.

▲ *Philodina roseola*

LES GASTROTRICHES

Leur forme générale rappelle celle d'un poisson microscopique, et ils ont un corps vermi-forme, cilié seulement sur la face ventrale et terminé postérieurement, par deux appendices fourchus, entre lesquels débouche le tube digestif. La bouche arrondie est située en avant : les cils abdominaux semblent pousser vers elle les particules alimentaires.

Ils rappellent un peu les Rotifères, mais ne possèdent ni appareil rotateur, ni mastax.

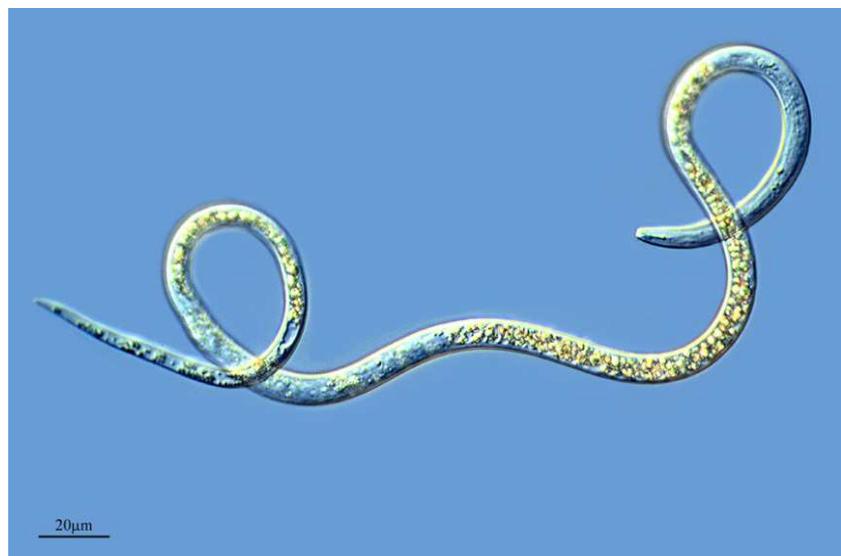
◀ *Chaetonotus maximus*

LES NÉMATODES

Ce sont des vers qui possèdent un tube digestif complet, c'est-à-dire avec bouche et anus. Par contre, ils n'ont ni appareil respiratoire, ni appareil circulatoire.

L'Ascaris en est une forme parasite bien connue, mais les formes libres se retrouvent dans de nombreux milieux (sol, eau douce, eau saumâtre, eau salée). On en retrouve même dans le vinaigre (anguillule du vinaigre - *Anguillula acetii*) → voir page 59.

Nématode sp. ►





LES ANNÉLIDES

Ce sont des vers qui portent souvent des soies. On y distingue trois grandes classes :

++ Les Polychètes, surtout marins, riches en soies et en appendices.

++ Les Oligochètes, aux soies peu nombreuses, fréquents dans les sols (lombric) et dans les eaux douces (tubifex).

++ Les Achètes ou Hirudinées, dépourvus de soies (sang-sues).

◀ *Aelosoma* sp.

LES CRUSTACÉS

Les Crustacés sont des arthropodes, c'est-à-dire des animaux dont le corps est revêtu d'un exosquelette chitino-protéique, souvent imprégné de carbonate de calcium. Cette cuticule peu extensible les oblige à muer pour assurer leur croissance.

Ils forment un vaste ensemble de plus de 50.000 espèces, de formes aussi variées que les balanes, les copépodes, les cloportes, les crevettes ou les homards.

La plupart de ces espèces sont aquatiques et les plus petits représentants seront présents dans nos récoltes de plancton. Parmi ceux-ci :



LES CLADOCÈRES

Ce sont des petits crustacés aquatiques dont le nombre de segments est très réduit, avec un abdomen et un thorax fusionnés. Leurs mouvements saccadés leur ont valu le surnom de puces d'eau.

Le représentant le plus connu est la daphnie, produite par élevage, et abondamment utilisée en aquariophilie, pour le nourrissage des alevins.

◀ *Daphnia longispina*

LES COPÉPODES

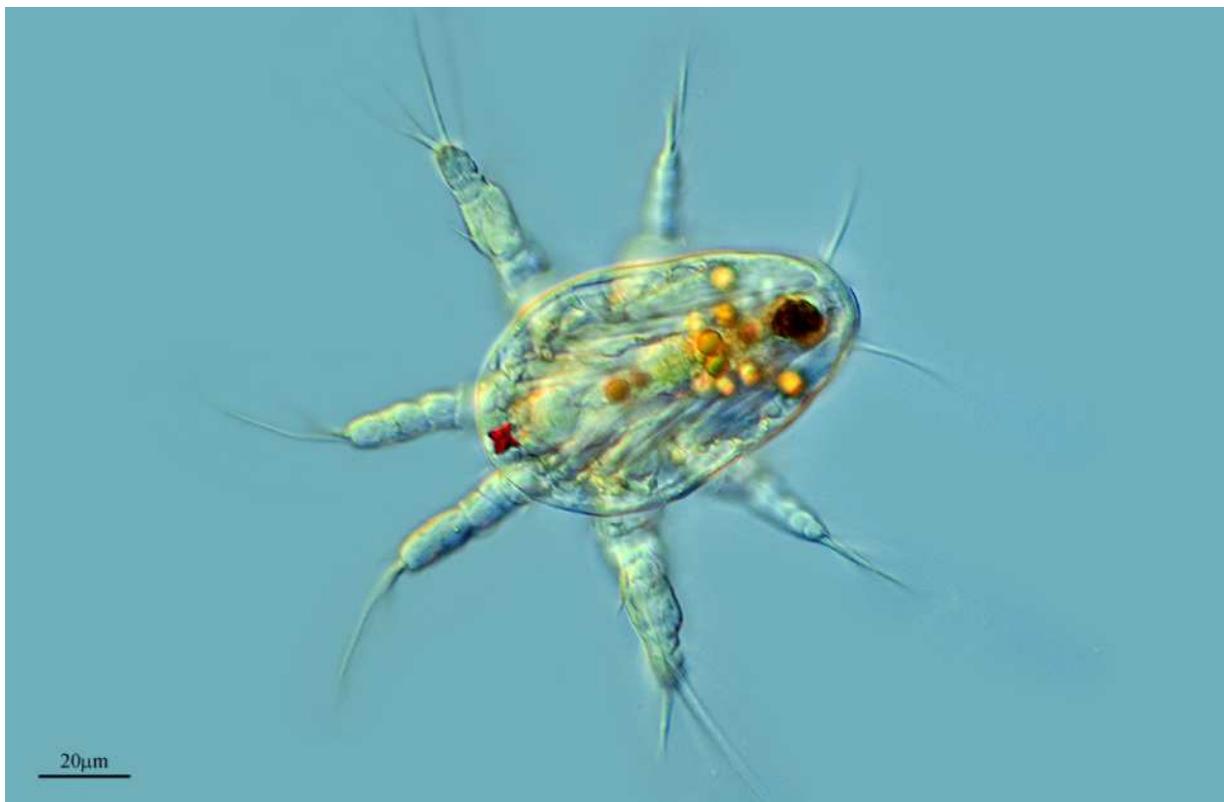
C'est un groupe de petits crustacés, libres ou parasites (externes ou internes d'organismes variés), vivant dans l'eau de mer et dans presque tous les habitats d'eau douce (lacs, marais, rivières, eaux souterraines).

Ils n'ont ni branchies ni carapace, et ne présentent qu'un seul œil, médian, dit « œil nauplien ». Ils nagent par petits sauts, à l'aide d'antennes natatoires. Les femelles sont reconnaissables à leurs deux sacs ovigènes latéraux.

Ils donnent naissance (comme d'autres crustacés) à de nombreuses larves, appelées nauplies, et qu'on pourrait facilement confondre avec des acariens, mais elles ne possèdent pas les huit appendices de ces derniers.



▲ Cyclope - ▲ *Eucyclops speratus* - nauplie ▼





LES OSTRACODES

Bien que ressemblant à des mollusques bivalves, ce sont des crustacés au corps entièrement enfermé dans une carapace constituée de deux valves, le plus souvent calcaires, articulées dorsalement. Seules les extrémités de quelques appendices sortent ventralement de cette carapace quand les animaux se déplacent sur le substrat ou quand ils nagent.

Ils occupent tous les milieux aqueux (mer et eau douce), et leur taille varie pour la plupart des espèces de 0,5 à 3 mm.



▲ *Hydryphantes ruber*

LES ACARIENS

Parasites ou libres, les acariens sont des arthropodes bien connus de l'homme. Responsables de nombreuses allergies, ils sont également des hôtes non désirés du corps humain quand ils s'appellent sarcopte (responsable de la gale) ou tique (vecteur de la maladie de Lyme).

Leurs pattes au nombre de huit (sauf au stade larvaire) les distinguent des insectes et leur corps non segmenté (la tête est un prolongement de l'abdomen) les distingue des araignées.

Dans nos prélèvements, avec un peu de chance, nous pourrions observer des hydracariens.

LES TARDIGRADES

Pseudobiotus sp. ►

Ils ont un corps segmenté en quatre, protégé par une cuticule, et sont dotés de huit petites pattes terminées chacune par des griffes. Leur aspect un peu pataud les a fait surnommer « oursons d'eau » (water bear en anglais).

On les retrouve partout, de l'Himalaya (jusqu'à 6.000 mètres d'altitude) aux eaux profondes (à - 4.000 mètres).

Ils figurent parmi les représentants les plus résistants du règne vivant, capables de résister à des contraintes extrêmes qui tueraient presque n'importe quelle autre for-



me de vie. Cela est notamment dû à leur possibilité de cryptobiose : les Tardigrades ont en effet la faculté d'entrer dans un état proche de la non-vie, durant lequel l'activité vitale devient presque indécélable en s'abaissant à 0,01 % de la normale. Le record en laboratoire est actuellement de 8 ans passés dans un état de cryptobiose, après lesquels les tardigrades sont revenus à la vie.

On les trouve en abondance dans les mousses qui constituent avec les lichens une source de nourriture prisée par eux.

LES BRYOZOAIRES

Essentiellement marins, ils ont néanmoins quelques représentants en eau douce.

Le plus souvent, ils vivent en colonies de formes très variées, mais propres à chaque espèce. Cette forme est un des critères d'identification des espèces. La colonie se présente sous de nombreux aspects ; en baguette, en disque, en éventail ou en croûte. Elle est souvent étendue à plat, tapissant un substrat, d'où le nom « bryzoaire », littéralement « animal mousse » ; mais elle forme également des monticules, ou bien se dresse en lamelles, en branches ramifiées et même en forme de tire-bouchon.



Source : Wikipedia

ET TOUT LE RESTE ...

Nous avons brossé ici, et de manière très restreinte, un aperçu les différentes formes vivantes que nous pourrions rencontrer lors de nos observations de gouttes d'eau.

Il est fort probable que vous y rencontrerez également d'autres formes de vie, qu'elles soient tombées accidentellement à l'eau ou qu'elles soient réellement aquatiques.

L'éventail de ces observations est très large : il peut aller des larves d'insectes ou de mollusques, à des œufs, en passant par des collemboles, des spores ou des grains de pollen, et de nombreuses autres choses que parfois on n'arrive pas à identifier et que certains avec humour appellent des OMNI (objets microscopiques non identifiés).

Le plancton marin

Les spécimens figurés ont été prélevés dans le Sud de la Bretagne (près de Concarneau), et ont été étudiés par Christian Grassin, qui a réalisé les clichés présentés ci-dessous.



◀ Larve de *Balanus crenatus* (balane crénelée). Ce crustacé se fixe sur des supports solides divers, jusqu'à une profondeur de 200 m, mais aussi sur les coques des navires et les bouées, ce qui en fait un important objet de salissure, nécessitant périodiquement un grattage vigoureux (sinon, les navires sont fortement ralentis). La larve est parfois appelée « nauplie ».

Le plancton marin est composé de micro-organismes animaux (zooplancton) et végétaux (phytoplancton), et représente 98 % de la biomasse marine. Succinctement, on peut dire que tout organisme aquatique, vivant en suspension dans l'eau, et incapable de remonter le courant, fait partie du plancton.

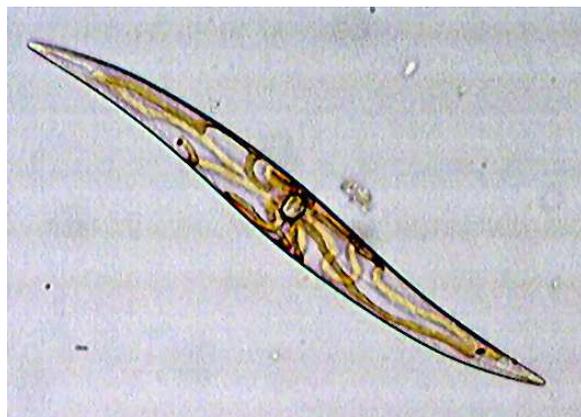
Certaines espèces sont munies d'organes simples de locomotion qui leur permettent de voyager au sein d'une colonne d'eau (aller-retour entre la surface et les profondeurs, afin

de se nourrir). Par opposition, on appelle « necton » l'ensemble des espèces pouvant se déplacer à contre-courant (poissons, mammifères marins). Le necton et le plancton forment le pélagos.

◀ *Odontella* sp. ▶

Les *Odontella* sont des diatomées, qui peuvent vivre en eau douce ou salée. Une espèce de ce genre (*Odontella aurita*) est cultivée pour la consommation humaine, en raison de sa richesse en protéines, vitamines, acides gras (oméga 3) et sels minéraux (silicium, magnésium).

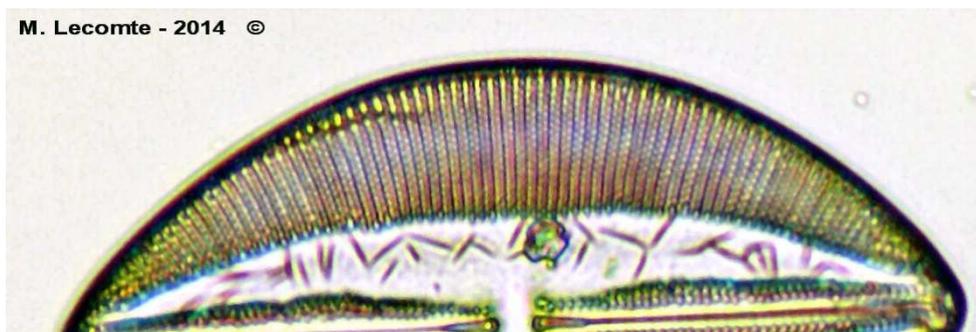
Un chapitre a été consacré aux diatomées, dans le fascicule de travail du séminaire 2012, pages 137 à 144.



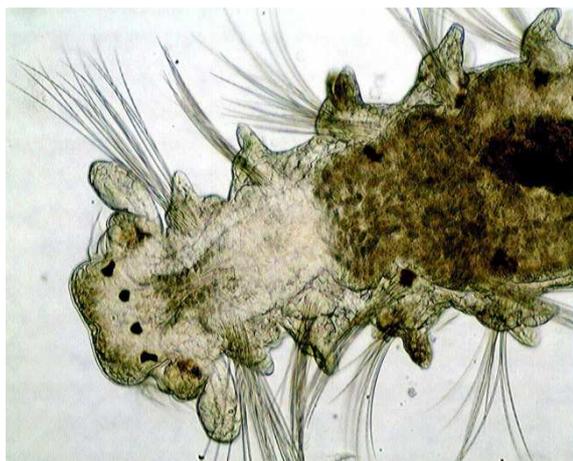
◀ *Pleurosigma* sp. - Les *Pleurosigma* sont également des diatomées. Certaines espèces sont très communes ; plusieurs d'entre-elles sont utilisées pour apprécier la qualité optique des objectifs de microscopie : seul un grand pouvoir de résolution, et donc un objectif d'excellente qualité, permet de distinguer certaines stries parallèles, qui sont très proches les unes des autres.

▼ Dans le cas présent, un objectif planapochromatique de $n = 1,40$ permet de constater que les stries sont en réalité composées d'une série de « boules » accolées.

M. Lecomte - 2014 ©



***Polydora* sp. ►** - Les *Polydora* sont des vers marins polychètes (vers annelés, dont le corps est couvert de nombreuses soies), vivant librement dans le sable, la vase, ou à l'intérieur de tubes qu'ils construisent. Certains sont redoutés par les conchyliculteurs car ils creusent des galeries dans les coquilles des huîtres (également chez d'autres mollusques bivalves).



◄ ***Chaetoceros* sp.** - Les *Chaetoceros* sont également des diatomées. Ce genre compte plusieurs centaines d'espèces, caractérisées par la présence de cils naissant à la jonction de cellules adjacentes.

Les *Noctiluca* sont des unicellulaires, qu'on trouve fréquemment à la surface des mers chaudes. Ils appartiennent à l'embranchement des *Dynophyta*, et sont parfois appelés Dinoflagellés. Beaucoup d'espèces sont protégées par une thèque (enveloppe) cellulosique, incrustée de silice. Ils sont munis d'un flagelle qui se loge dans un sillon équatorial, appelé « cingulum ».



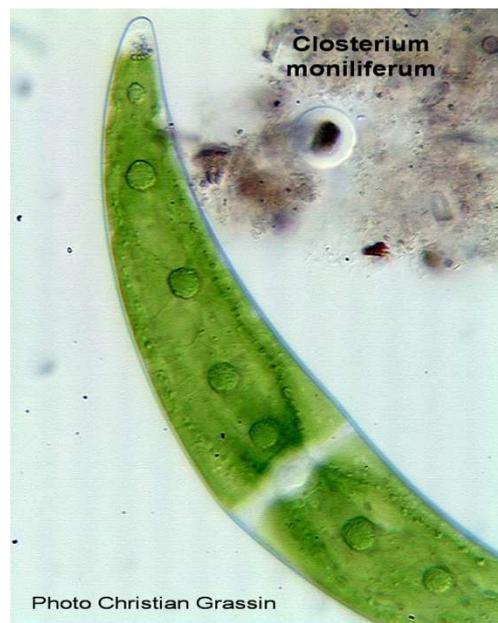
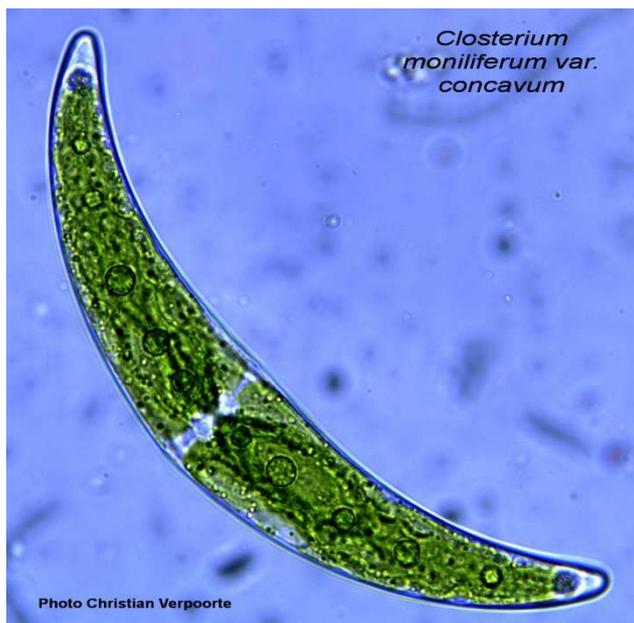
◄ ***Noctiluca* sp.** ▼



Attention à la confusion de noms :

Noctiluca est le nom d'un genre, qui regroupe de nombreuses espèces de Dinophytes.
Pelagia noctiluca est le nom d'une seule espèce de méduse.

Les algues unicellulaires



La phycologie est la science qui étudie les algues. Ces dernières sont capables de pousser n'importe où, pourvu qu'il y ait un peu d'humidité.



◀ Sur les troncs d'arbres humides, les vieilles planches et les vieux murs, on va rencontrer *Pleurococcus vulgaris*, qui est une espèce d'algue verte microscopique et unicellulaire.

MODE OPÉRATOIRE

++ Gratter l'écorce verdâtre des arbres, afin de recueillir la « poussière » responsable de cette couleur verte.

++ Conserver dans l'eau formolée à 10 %. Elles résistent très bien à la dessiccation et sont revivifiées par une goutte d'eau.

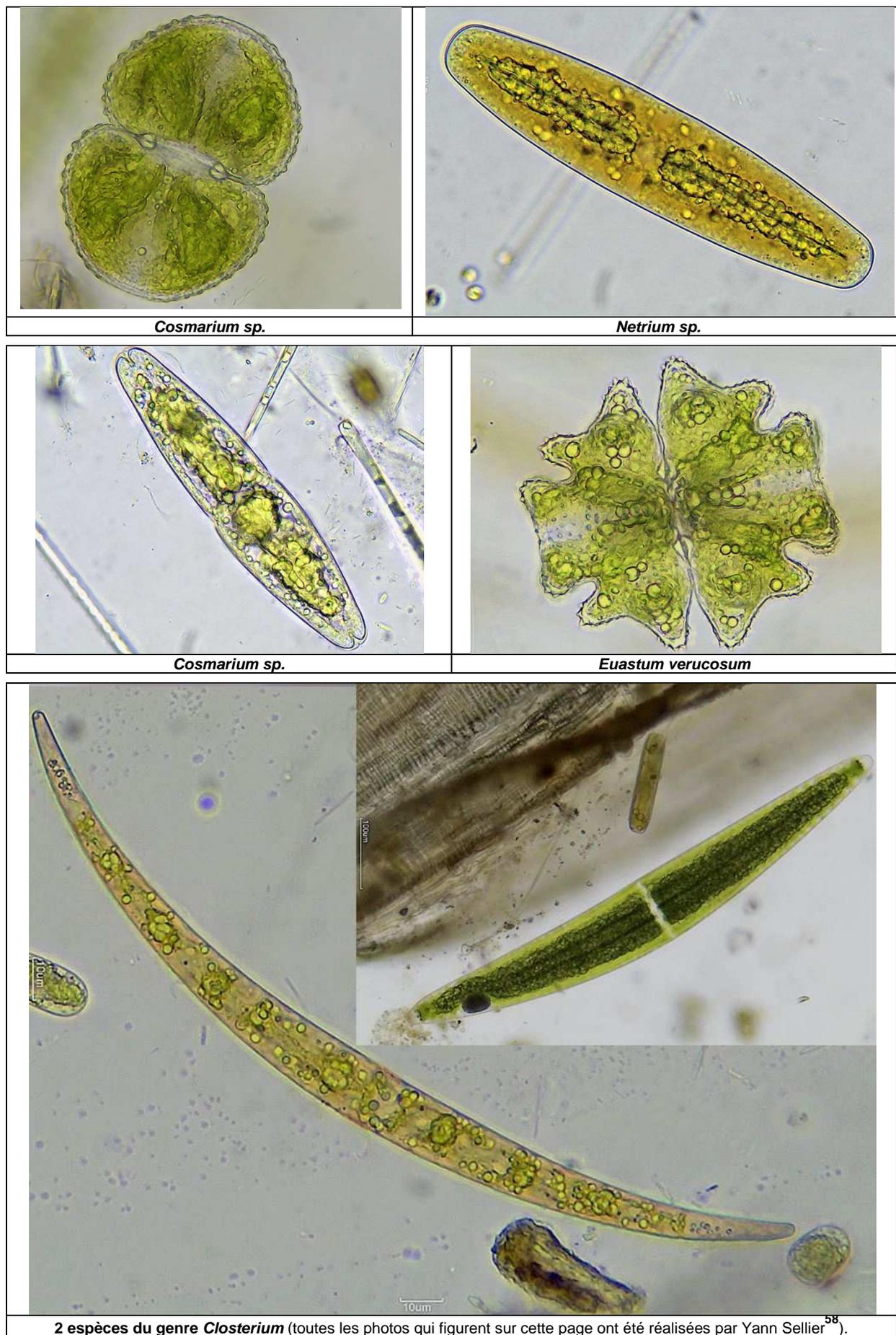
++ Pour une observation directe, placer dans une goutte d'eau glycinée. On va découvrir des cellu-

les arrondies, isolées ou regroupées par 5 ou 6, formant une sorte de thalle. Le cytoplasme est incolore, mais largement occupé par des chloroplastes. On peut observer un noyau central.

++ Pour un montage définitif, fixer au picroformol durant ½ heure.

++ Rincer, éponger et monter dans la glycérine gélatinée (classique) ou dans l'Aquatex (moderne).





2 espèces du genre *Closterium* (toutes les photos qui figurent sur cette page ont été réalisées par Yann Sellier⁵⁸).

⁵⁸ Yann Sellier, F-86210 Vouneuil-sur-Vienne, sellieryann@gmail.com

Les algues filamenteuses



Ajouter 20 % de formol au liquide contenant les algues (inconvenient majeur : la couleur verte disparaît).

OU

- Prélever les algues et enlever un maximum d'eau.
- Les immerger dans du fixateur cupro-acétique (on peut les conserver très longtemps dans ce milieu).
- Laver au liquide glycérique (eau + alcool + glycérine).
- Laisser évaporer eau & alcool.
- Monter dans la glycérine gélatinée.

OU

- Laver à l'eau alcoolisée et laisser évaporer.
- Second lavage à l'eau puis éponger.
- Monter dans l'Aquatex.

Les algues multicellulaires



Développer pareil sujet sortirait du cadre de ce travail. Sachez simplement que chez les Algues, on donne le nom d'**anthéridie (spermatocyte)** à une structure à l'intérieur de laquelle se forment les gamètes mâles appelés **anthérozoïdes**.

◀ un groupe d'anthéridies (x40) chez *Nitella syncarpa* ; elles sont souvent entourées d'un mucilage bien visible ci-dessous. ▼



Dans le même ordre d'idée, on parlera de **gamétange (gamétocyte ou oogone)** est plus indiqué pour des Thallophytes) pour désigner une structure qui contient des gamètes femelles.



Divers types d'oogones

Nitella translucens ▶

◀ *Chara fragivera*

Toutes les photos de cette page ont été réalisées par Y. Sellier.



Nitella hyalina ▶



La conjugaison chez les spirogyres



◀ Spirogyre, x40 - la flèche indique le noyau (peu visible sans coloration).

Les spirogyres sont des algues filamenteuses, de la famille des *Zygnemataceae*, rares en rivière, mais parfois communes en plans d'eau fermés.

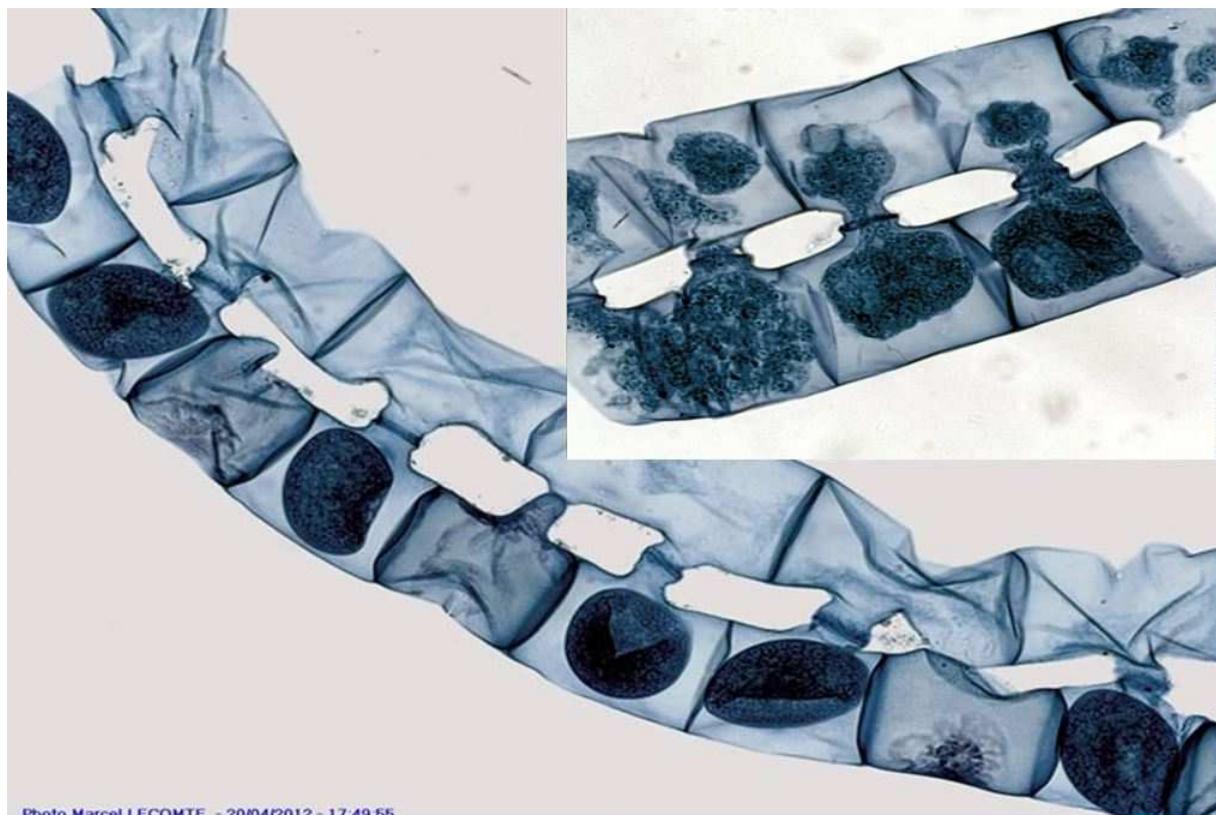
Les chloroplastes sont disposés en forme d'hélice, en rubans spiralés, ce qui justifie le nom de l'organisme.

Durant l'été, le thalle s'allonge par simple division cellulaire, de manière apicale. Mais lorsque les conditions climatiques deviennent défavorables, ces algues se caractérisent par un mode de reproduction sexuée très particulier : la CONJUGAISON, ou CYSTOGAMIE.

Deux filaments, dont l'un joue le rôle du mâle et l'autre de la femelle, se rapprochent l'un de l'autre, émettent des extensions qui finissent par former des tubes de contact, par lesquels le contenu d'une cellule haploïde (gamète) va passer dans celle qui lui fait face.

Le contenu des deux cellules fusionne dans le filament femelle en un zygote diploïde au contenu indistinct, qui s'entoure d'une enveloppe résistante (enkystement). Ces œufs vont tomber au fond du plan d'eau, et y rester jusqu'au printemps. A la

bonne saison, ils feront l'objet d'une méiose puis vont germer pour donner chacun un nouveau filament.



Dans l'encart, le contenu des cellules mâles passe dans les cellules femelles (x40). En bas, la conjugaison est terminée : le filament mâle est vide et les zygotes sont dans le filament femelle (x20).

ENTOMOLOGIE

Anatomie

Pattes, ailes et écailles

Larves et chenilles

Acariens

Chromosomes

Genitalia

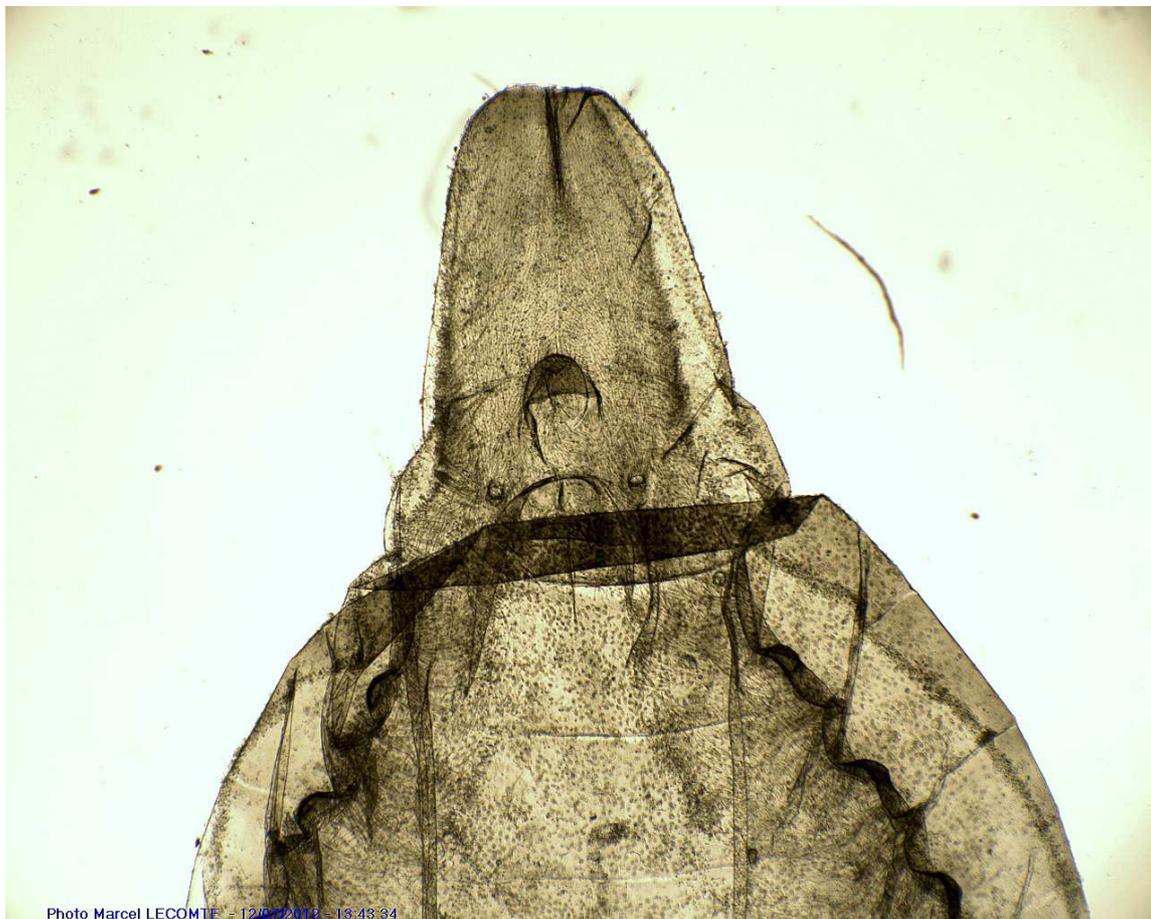


Photo Marcel LECOMTE - 12/07/2012 - 16:43:34

Larve de nêpe cendrée (*Nepa cinerea* - Hétéroptère) ; l'imago (forme adulte) possède des ailes.
Vue de la partie arrière de l'abdomen, où il est intéressant de noter que le siphon aérifère (servant à la respiration) n'est pas encore formé. L'adulte capte l'air par ce tube et le stocke sous les élytres.

Éléments anatomiques d'un insecte complet



Photo
Marcel Lecomte

Pyrrhidium sanguineum L. est un Coléoptère *Cerambycidae*. Cette famille se caractérise par des espèces munies d'antennes assez longues, composées d'articles nettement visibles.

P. sanguineum est un insecte de taille moyenne (entre (6) 8 et 12 (15) mm de long), qui se reconnaît facilement à ses élytres et au thorax d'un beau rouge. Mais dès qu'il meurt, la couleur change et vire vers le violet ou le jaunâtre. Le corps et les appendices sont couverts de poils.

Il présente un cycle de métamorphoses complètes, c'est-à-dire que la femelle pond un œuf, d'où naît une larve ; celle-ci se transforme ensuite en nymphe d'où sortira l'imago.

Il est connu de toutes les personnes qui se chauffent avec du bois de chêne, dans lequel sa larve se nourrit.

Il infeste les bois coupés de l'année, et qui ont encore leur

écorce (nécessaire pour la construction de la loge nymphale). Un choc thermique (rentrer les bûches près de l'âtre, en hiver) va provoquer l'éclosion prématurée. Dans la nature, les imagos éclosent au mois d'avril. Il ne doit pas être considéré comme nuisible, car il ne s'attaque jamais au bois d'œuvre ni aux meubles ou parquets.



MODE OPÉRATOIRE

- ++ Traiter durant 24 h avec KOH 10 % à froid (cela dissout tous les tissus mous).
- ++ Laver 2 à 3x de suite à l'eau ordinaire.
- ++ Laver 2x à l'eau acétifiée (acide acétique à 5 %).
- ++ 3 bains successifs d'une heure dans alcool à 95°.
- ++ 2 bains d'une heure dans le xylo.
- ++ Monter dans le BC.

OU

- ++ Éclaircir la pièce dans CLP (5 à 10 minutes à chaud, ou 24 h à froid).
- ++ Changer 2x le CLP.
- ++ Éponger au maximum le CLP.
- ++ Monter dans le PVALPh.

Cette 2^{ème} méthode permet l'étude des muscles en place (les colorer éventuellement)

Pattes, ailes, antennes

MODE OPÉRATOIRE

- Traiter durant 24 h avec KOH 10 % à froid (cela dissout tous les tissus mous).
- Laver 2 à 3x de suite à l'eau ordinaire.
- Laver 2x à l'eau acétifiée (acide acétique à 5 %).
- 3 bains successifs d'une heure dans alcool à 95°.
- 2 bains d'une heure dans le xylol.
- Monter dans le BC.

OU

- Éclaircir la pièce dans CLP (5 à 10 minutes à chaud, ou 24 h à froid).
- Changer 2x le CLP.
- Éponger au maximum le CLP.
- Monter dans le PVALPh.

Cette 2^{ème} méthode permet l'étude des muscles en place (les colorer éventuellement)



◀ Patte antérieure de la nèpe cendrée. Elle est dite « ravisseuse », car parfaitement adaptée pour la chasse à l'affût. L'insecte immobilise sa proie en repliant la partie avant de la patte dans une sorte de gouttière, et puis la pique avec son rostre acéré.



▲ Les autres pattes sont munies d'une double griffe acérée. Pièces anatomiques montées dans Aquatex.

▼ Tarse terminal d'une patte de mouche



Antenne de mouche : chaque article porte de nombreux poils très sensibles ▲



Photo Marcel LECOMTE - 12/04/2012 18:04:02



▲ Aile de mouche domestique (Diptère), avec détail du « bord d'attaque » de l'aile. ▲



M. Lecomte 2013 ©

MODE OPÉRATOIRE

++ Éclaircir la pièce dans CLP (5 à 10 minutes à chaud, ou 24 h à froid).

++ Changer 2x le CLP.

++ Éponger au maximum le CLP.

++ Monter dans le PVALPh.

OU

++ 10 minutes dans alcool à 95°.

++ 1 bain d'une heure dans le xylol.

++ Monter dans le BC.

OU

++ 10 minutes dans isopropanol.

++ Monter dans Euparal.

◀ Le balancier chez un moucheron (chez les diptères, la seconde paire d'aile est transformée en ces 2 organes qui permettent l'équilibre en vol).



M. Lecomte 2013 ©

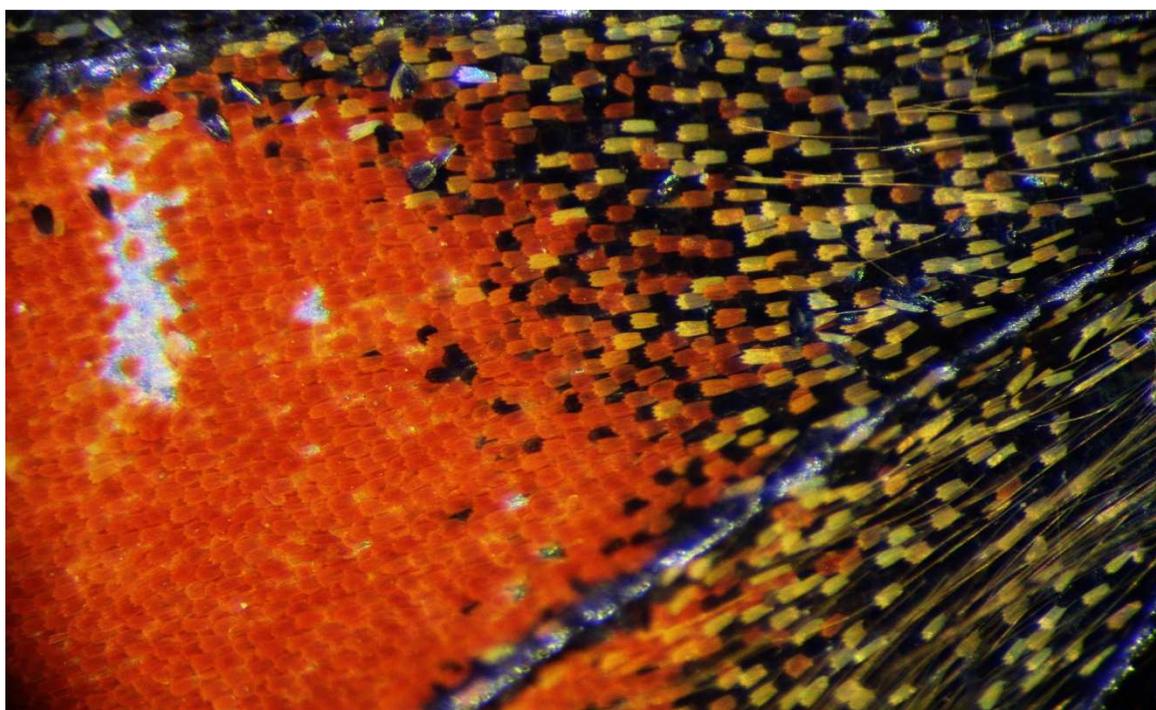
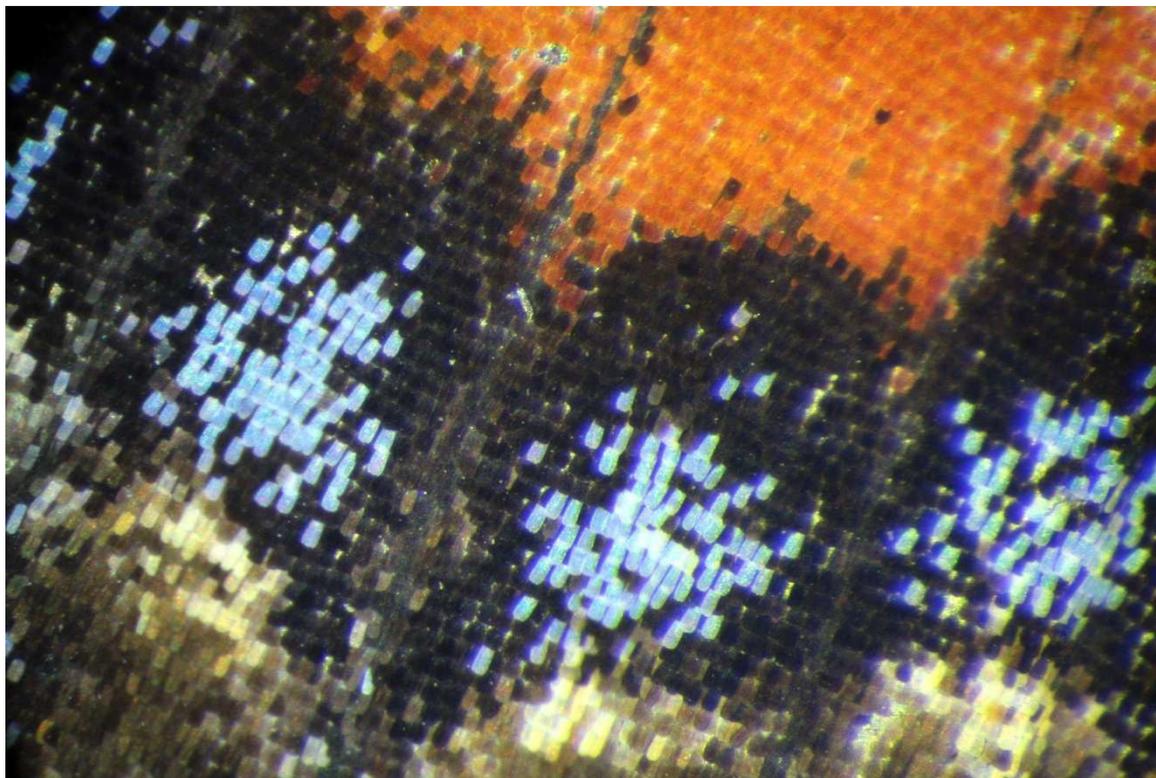


M. Lecomte 2013 ©

Bout d'abdomen de mouche avec ponte ▲ ▶

Écailles d'une aile de papillon

Les ailes des papillons sont couvertes d'une matière pulvérulente, semblable à de la poussière plus ou moins colorée. Le spectacle est tout-à-fait différent si on les observe au microscope. Il s'agit en réalité d'écailles alignées côte à côte, semblables à l'agencement des tuiles sur une toiture, et présentant des formes variées. On peut également en rencontrer sur les ailes ou le corps d'autres insectes, comme les tipules ou les lépismes p. ex.



▲ Détail d'une aile d'*Aglais urticae* (Lépidotère rhopalocère) – photo avec loupe stéréoscopique, 45x ▲

MODE OPÉRATEUR

++ Déposer une petite goutte de xylol sur une LPO.

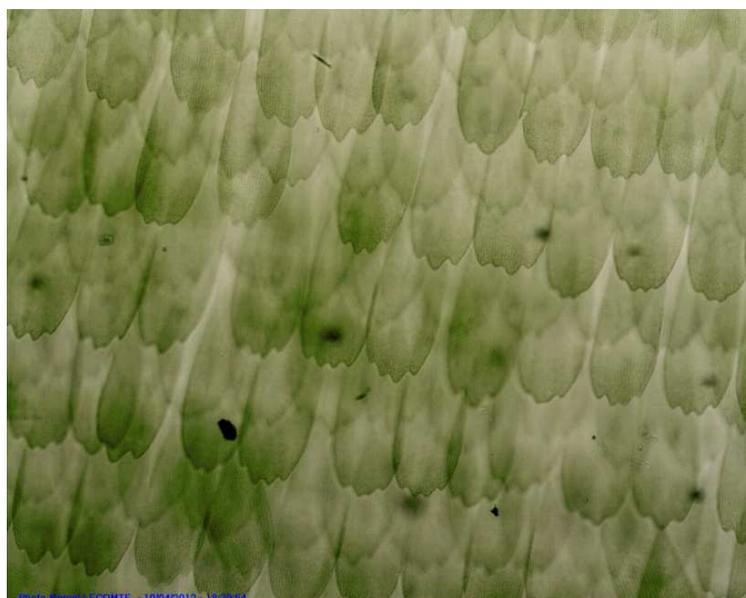


- ++ Gratter délicatement l'aile au dessus de la goutte pour y déposer des écailles.
- ++ Mélanger et attendre 10 minutes.
- ++ Déposer une goutte de BC et placer une LCO.

OU

- ++ Déposer une goutte d'Euparal ou d'Aquatex.
- ++ Gratter, mélanger et placer une LCO.

Les écailles sont imbriquées sur l'aile comme les tuiles d'une toiture, et sont fixées sur leur support par un pédoncule, bien visible sur la photo ci-contre.



Chenille défoliante

PRÉALABLE



▲ Une photo d'un groseillier de mon jardin, dans son état « normal », avec fruits et beau feuillage.

► Un autre arbuste infecté par les « chenilles » qui ont dévoré toutes les feuilles jusqu'au pédoncule, compromettant la survie du fruitier : seuls subsistent les pétioles. Ces larves dévorent en 24 h le double de leur poids initial, et se comptent par centaines, car une seule femelle pond environ 300 œufs. C'est un véritable fléau, et il faut intervenir de façon énergique, sans état d'âme écologiste (pulvériser avec un insecticide à base de pyrèthre, qui est naturel, ou une solution de savon noir) : il y va de la survie de vos groseilliers.



L'auteur du crime : une pseudo chenille, qui est en réalité la larve d'un Hyménoptère de la famille des Tenthredés : *Pteronidea (Nematus) riberii*.

Le terme de chenille ne s'applique qu'à un stade larvaire de la métamorphose des papillons. Les vraies chenilles ont 3 paires de vraies pattes thoraciques et au maximum 5 paires de fausses pattes abdominales, ainsi que plusieurs paires d'ocelles.

Chez ces larves de fausses chenilles, on va trouver de 6 à 9 paires de pattes (pseudopodes sans crochets) à l'arrière du corps, et une seule paire d'yeux très rudimentaires. Elles sont phytophages et très nuisibles ; elles se laissent tomber au sol lorsqu'on les dérange, et se tiennent alors enroulées sur elles-mêmes.

Les seules parties qui vont nous intéresser en microscopie sont les téguments chitineux, à savoir les extrémités des fausses-pattes et la capsule céphalique, avec les mandibules.

MODE OPÉRATOIRE (Les larves ont été stockées dans du conservateur de Locquin, qui conserve +/- bien les couleurs).

- ++ Sectionner délicatement la tête et la zone d'attache des vraies pattes.
- ++ Traiter durant 12 à 24 h avec KOH 10 % à froid (cela dissout tous les tissus mous).
- ++ Laver 2 à 3x de suite à l'eau ordinaire.
- ++ Laver 2x à l'eau acétifiée (acide acétique à 1 %).
- ++ Observer dans l'eau glycinée.

- OU, après lavage à l'eau acétifiée,
- ++ 3 bains successifs d'une heure dans alcool à 95°.
 - ++ 2 bains d'une heure dans le xylol.
 - ++ Monter dans le BC.

- OU, éclaircir la pièce dans CLP (5 à 10 minutes à chaud, ou 24 h à froid).
- ++ Changer 2x le CLP.
 - ++ Éponger au maximum le CLP.
 - ++ Monter dans le PVALPh.



Le charançon de la rose trémière



Photo Jean-Jacques Milan, 2005 - avec autorisation de la GNU Free Documentation License

La morphologie particulière de cet insecte nous oriente immédiatement vers la famille des charançons (*Curculionidae*), qui sont caractérisés par une tête prolongée par un rostre +/- long, portant les pièces buccales et des antennes coudées. Nous avons étudié durant des années cette famille qui est représentée par plus de 1.500 espèces pour la Belgique et la France. Un peu de pratique permet de reconnaître immédiatement le faciès d'un représentant des *Apioninae*.

Comme chaque charançon est quasi toujours inféodé à une plante précise, il ne nous semblait pas difficile à déterminer. Mais après consultation de la bible des charançons⁵⁹, nous sommes dans une impasse totale. Seule planche de salut : les Compléments⁶⁰. Et nous déterminons enfin l'apion des roses trémières (*Rhopalapion longirostre*), grâce à la longueur démesurée du rostre de la femelle, aussi long que son corps.

Cet insecte est une espèce invasive, originaire d'Asie Mineure, du Moyen-Orient et d'Amérique du Nord (où il vit également sur le coton – *Gossypium* sp.). Il fut déterminé pour la 1^{ère} fois en 1982, en Ardèche, et 30 ans plus tard, en 2012, il est commun dans nos deux pays.

La femelle mesure jusqu'à 3,4 mm de long, tandis que le mâle (2,4 mm de long) est muni d'un rostre plus court.

L'insecte s'observe d'avril à septembre ; la femelle pond en juin-juillet, au fond des boutons floraux et les larves se développent durant 4 à 6 semaines dans les graines.

Sauf pullulation très importante, cette espèce n'est pas considérée comme nuisible, étant donné le nombre élevé de graines que les roses trémières produisent. Les dégâts sont facilement réparables, grâce aux trous par lesquels sortent les imagos.

Nous l'avons rencontré en dizaines d'exemplaires à Beez (Namur) entre le 22 juin et le 10 juillet 2012. Effectivement, nous avons pu constater que les dégâts sont minimes, par rapport à ceux provoqués par *Puccinia malvacearum* p. ex., la rouille de la rose trémière.

⁵⁹ HOFFMANN A., (n° 52,-1950, n° 59,-1954, n° 62,-1958) - « *Curculionidae* », collection Faune de France, Ed. Lechevalier.

⁶⁰ TEMPÈRE G. & PERICART J., 1989 - « *Coléoptères Curculionidae* », 4^{ème} partie : compléments, , Faune de France n° 74, Ed. Lechevalier.

L' « araignée rouge »



Ordinairement, le terme « araignée rouge » fait référence non à des araignées, mais à de minuscules acariens de la famille des *Tetranychidae*. Il vaut donc mieux parler d'acariens rouges, ou de tétranyques, car plusieurs espèces se cachent sous ce patronyme. Leur taille varie de 0,2 à 0,7 mm.

Panonychus ulmi est l'acarien rouge du pommier.

Tetranychus urticae est polyphage ; c'est le tétranyque tisserand.

Oligonychus ununguis est le tétranyque de l'épinette (*Picea* sp.).

D'autres acariens, étrangers à la famille des tétranyques, sont également rouge vif et sont nettement plus visibles parce que plus grands. Ce sont en général des espèces non parasites, fréquentes notamment sur les lieux secs et ensoleillés, comme divers *Trombididae*.



◀ Voici une espèce du genre *Allothrombium* - 2 photos libres de droit sur Internet.

Les larves des acariens trombidions sont plus connues sous le nom d'aoûtats (*Trombicula autumnalis*), et s'avèrent redoutables l'été lorsqu'elles "piquent", provoquant de fortes démangeaisons (elles se nourrissent des tissus de la peau).

Les Acariens appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, classe des Arachnides, qui se caractérise par 8 pattes chez les adultes (cependant, les larves des acariens ne possèdent que 6 pattes). Le corps est particulièrement compact car le céphalothorax et l'abdomen ont fusionné en une masse unique, et il n'y a quasi plus trace de segmentation. Il en existe plus de 50 000 espèces répertoriées.

Quelques espèces intéressantes et assez faciles à trouver :

- ++ *Ixodes ricinus*, une tique commune dans nos forêts.
 - ++ *Varroa destructor*, parasite d'*Apis mellifera*, dans les ruches.
 - ++ *Dermatophagoides pteronyssinus*, un des acariens des poussières.
 - ++ *Acarus ciro*, le ciron des fromages à croûte dure.
 - ++ *Tyrolichus casei*, qui vit sur les fromages à croûte molle.
 - ++ *Demodex folliculorum*, vivant dans les glandes sébacées du nez (« points noirs »), 0,08 à 0,1 mm de long, à allure vermiforme.
 - ++ *Tyroglyphus entomophagus*, qui n'épargne aucune collection d'insectes.
 - ++ *Cheyletus eruditus*, vit dans les vieux livres et les vieux papiers.
- Ceux que nous pourrions repérer à l'œil nu mesurent de 0,5 à 2 mm.

MODE OPÉRATOIRE pour observation extemporanée de petites pièces

- ++ Préparer des LPO avec des bandes de calage espacées de 10 mm (épaisseur variant de 0,05 à 0,17 mm : papier autocollant à LCO collée au BC). Cela permettra de ne pas écraser l'acarien à observer.
- ++ Prélever le spécimen à l'aide d'une pointe d'aiguille enduite d'un peu de salive.
- ++ Le déposer dans une goutte de glycérine.
- ++ Poser une LCO adéquate et observer.

MODE OPÉRATOIRE pour montage définitif de petites pièces

- ++ les 2 premières étapes comme ci-dessus.
- ++ Le déposer dans une goutte de PVALPh incolore ou coloré à la fuchsine acide (nous préconisons ce milieu de montage afin de pouvoir évacuer facilement le éventuelles bulles d'air par la chaleur).
- ++ Poser une LCO adéquate et observer.

Les deux MO décrits ci-dessus ne sont pas d'application pour le montage de grosses pièces, comme des tiques adultes, p. ex. Pour cela, se référer au tome 1 du MANUEL DE MICROSCOPIE, publié en 2012 (p. 175-176).

***Parasitus fucorum* : une espèce phorétique**



▲ Phorésie de *Parasitus fucorum* sur le bourdon des pierres - Photo François Graf

On trouve fréquemment sur les bourdons, les osmies et les bousiers, des espèces dites « phorétiques », c'est-à-dire qui sont « transportées » par leur hôte, dans le cadre d'une association libre, indépendante et non dommageable, en principe. Il ne s'agit pas de parasitisme au sens strict.

Cependant, la présence des Acariens en grand nombre affaiblit considérablement l'hôte, jusqu'à l'empêcher de voler (à cause du poids à transporter). C'est ainsi que nous avons récolté au sol nombre d'exemplaires de *Bombus lapidarius*, dont 3, porteurs respectivement de 52, 86 et 128 spécimens de *Parasitus fucorum*.

Cet acarien (parmi d'autres) vit dans les nids des Hyménoptères (abeilles, bourdons). Les osmies sont envahies par *Chaetodactylus osmiae*. *Geotrupes stercorarius* (bousier) est infesté par *Poecilochirus carabi*.

M. Lecomte - 2014 ©



PRÉALABLE

++ Pour les récolter, il est quasi indispensable de tuer le « transporteur » qui, dans le cas du bourdon, est souvent incapable de voler : il se traîne misérablement sur le sol, en battant vainement des ailes. Les acariens sont solidement ancrés dans la toison thoracique grâce à leurs griffes.

++ Nous employons des flacons de prélèvement de 30 cc, à large ouverture pour la récolte.

++ Utiliser de l'acétate d'éthyle (éther acétique) qui a la propriété de ne pas durcir les téguments.

++ En imprégner ½ tampon circulaire à démaquiller et fermer de manière à le coincer dans le couvercle, afin de ne pas toucher le bourdon. C'est un spectacle hallucinant, après 2 secondes, de les voir « gicler » dans tous les sens par dizaines.

++ Après 2 heures de « chambre à gaz », les récolter à l'aide d'un pinceau à pointe fine et les placer dans une éprouvette contenant du conservateur de Locquin⁶¹.

⁶¹ Mélange très précis d'eau bidistillée, d'éthanol, d'acide acétique glacial, de saccharose et de formol (voir la formule dans le tome 1, du séminaire de 2012).

MODE OPÉRATOIRE

Nous avons tenté de trouver une solution de montage rapide dans l'Aquatex, mais en vain, car les résultats ne sont pas bons : opacité, bulles d'air, fuite de fluides internes qui polluent le médium.

Il faut passer par le même type de montage que pour les tiques⁶².

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). Cette opération va vraisemblablement vider l'abdomen, qui ne résistera pas à la pression.
5. Plonger dans l'alcool à 90 ou 95° (24 heures).
6. Placer dans le xylol (12 heures).
7. Placer dans une boîte de Pétri en verre de 4 cm de diamètre externe avec du BC très dilué, durant 4 à 5 jours ; surtout, ne pas fermer hermétiquement pour permettre l'évaporation du xylène (si elle est trop rapide, rajouter du xylol).
8. Montage ensuite dans le BC.



Larve de moustique



◀ **Vue dorsale d'une larve de moustique**
– Photo de Julien Pellet – utilisée avec l'autorisation de l'auteur, selon licence GFDL.

Les moustiques sont des insectes appartenant à l'ordre des Diptères, sous-ordre des Nématocères, famille des *Culicidae*. Ils sont caractérisés par des antennes articulées, longues et fines, et des ailes couvertes d'écailles.

Les mâles affichent des antennes plumeuses, et sont inoffensifs ; les femelles ont des antennes filiformes et possèdent de longues pièces buccales, en forme de trompe rigide, du type piqueur-suceur ; elles sont les seules à émettre leur vrombissement si caractéristique... et annonciateur de démangeaisons.

Il en existe environ 3.500 espèces de par le monde. Peu piquent l'homme, mais certaines (dont le genre *Anopheles*) peuvent être vecteurs d'agents pathogènes graves, comme *Plasmodium falciparum* (malaria) et nombre de virus (chikungunya, dengue, encéphalite...).

Celui qui nous agresse, les soirs d'été, est *Culex pipiens*.

Les larves des *Culicidae* sont aquatiques, et se développent rapidement dans la moindre eau stagnante. Dans la sous-famille des *Culicinae*, l'abdomen est muni d'un siphon respiratoire, ce qui n'est pas le cas pour les espèces de la sous-famille des *Anophelinae*.



⁶² LECOMTE M., 2012 - « Manuel de microscopie », tome 1, 175.

PRÉALABLE

++ Remplir un seau d'eau et le laisser au fond du jardin durant 2 à 3 semaines ; visiter de temps en temps jusqu'à présence de larves de bonne taille, qui séjournent juste sous la surface.

MODE OPÉRATOIRE

++ préparer un récipient à ouverture large (modèle cristalliseur), contenant une solution alcoolique à 25 ou 30 %.

++ Prélever les larves avec un tamis à mailles fines (passe-thé p. ex.), ou à l'aide d'une grosse pipette (mais c'est moins facile).

++ Plonger le tamis dans la solution, puis le retourner, lorsque les spécimens récoltés sont immobiles.

++ Placer ensuite dans de l'eau, pour rinçage.

++ Laisser séjourner durant 24 heures dans le lactophénol, afin de faciliter une bonne imprégnation.

++ Monter ensuite au PVALPh incolore ou au PVA coloré (fuchsine acide ou bleu d'aniline) sur une LPO, de préférence avec fins calages, afin de ne pas écraser le sujet. Nous apprécions le montage incolore car il permet de mettre en évidence différents systèmes et leurs ramifications.



Chromosomes et glandes salivaires



Le chironome plumeux (*Chironomus plumosus*) est le plus connu - Attribution: @entomart – publié avec l'autorisation de l'auteur.

Les chironomes sont des insectes de l'ordre des Diptères (caractérisés par une paire d'ailes antérieures, et une paire de balanciers). Il en existe environ 1200 espèces en Belgique et en France. Ils ressemblent à des moustiques mais ne possèdent pas de pièces buccales vulnérantes, simplement une trompe courte non piquante ; les antennes sont plumeuses ; le thorax bombé forme une bosse au dessus de la tête ; les ailes sont plus courtes que l'abdomen et repliées en toit au repos ; les pattes antérieures sont très

longues.

Ces insectes et leurs larves constituent une part importante de la nourriture des Salmonidés en plans d'eau fermés.

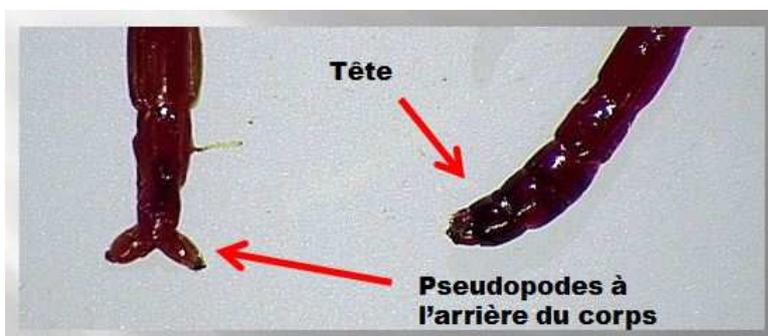


Les larves des *Chironomidae* sont aquatiques, et vivent dans la vase des eaux stagnantes, ce qui leur a valu d'être appelées "vers de vase" par les pêcheurs. L'animalcule mesure de 1 à 1,5 cm, et est de couleur rouge : c'est dû à un pigment respiratoire, l'hémoglobine (sensiblement différente de celle des Vertébrés), qui se trouve dans l'hémolymphe. C'est ce qui leur permet de vivre dans des milieux particulièrement anoxiques, comme des boues et des vases en fermentation. La tête brunâtre est armée de mandibules et est accompagnée de deux pseudopodes thoraciques courts. A l'autre extrémité du corps se trouvent 2 pseudopodes nettement plus longs.

PRÉALABLE

Orcéine acétique, solution mère : dissoudre 1 g d'orcéine dans 45 cc d'acide acétique pur. Faire bouillir jusqu'à dissolution et laisser refroidir. Filtrer et conserver le filtrat au réfrigérateur.

Solution diluée à préparer extemporanément : mélanger 9 cc de solution mère avec 11 cc d'eau distillée.



MODE OPÉRATOIRE

- ++ Se procurer des vers de vase chez un marchand d'articles de pêche.
- ++ Plonger 6 larves dans une coupelle contenant de l'alcool méthylique à 20 %.
- ++ Poser une larve sur une LPO.
- ++ Bloquer le corps de la larve sur la lame avec l'index.
- ++ A l'aide d'une pince fine, saisir

la tête et tirer jusqu'à ce qu'elle se détache.

++ On voit apparaître 2 petites masses translucides : ce sont les glandes salivaires.

++ Répéter l'opération sur les 5 autres larves, afin de disposer d'assez de matériel à observer.

++ Séparer les glandes du reste de la tête.

++ Déposer une grosse goutte d'orcéine acétique (ou de vert de méthyle acétique, de carmin acétique, ou encore de bleu de toluidine).

- ++ Laisser agir 5 minutes.
- ++ Couvrir avec une LCO en appuyant légèrement pour bien aplatir la préparation.
- ++ Observer à 10x et 40x.

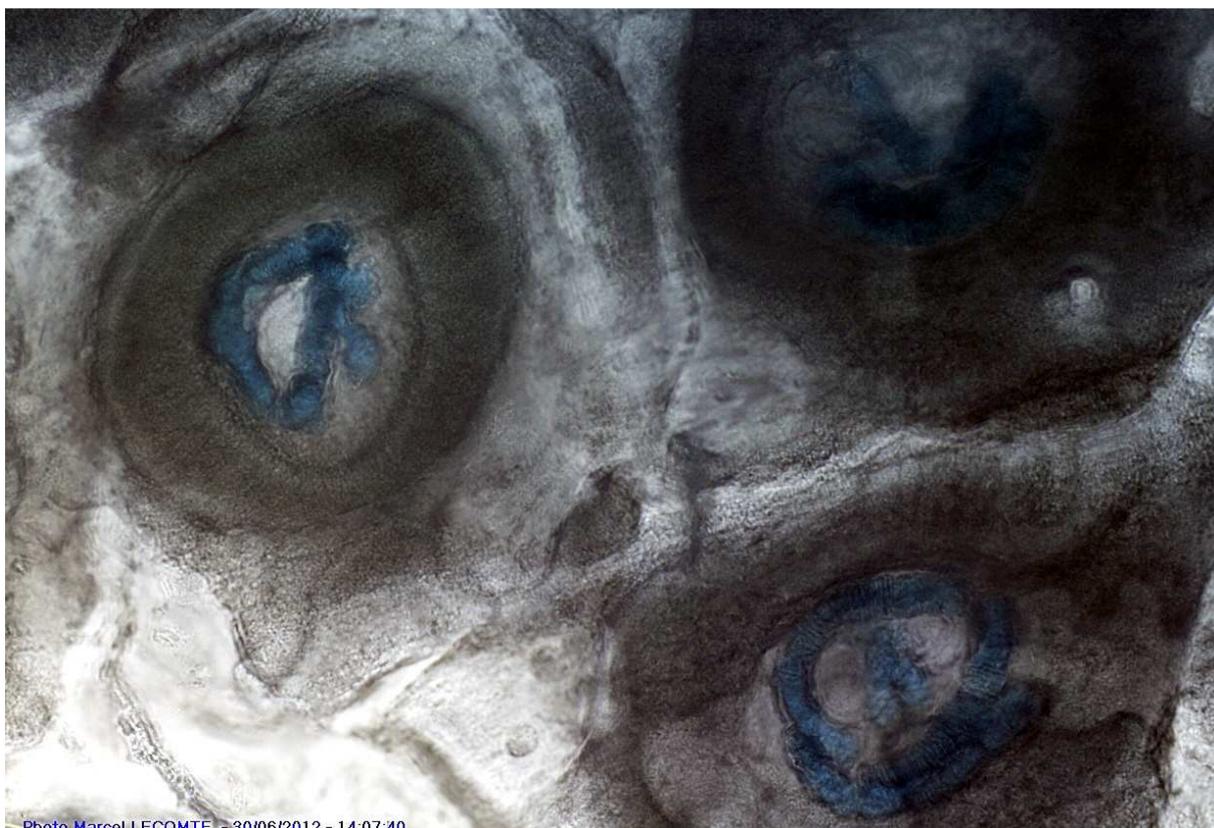


Image Internet

RÉSULTATS

Des filaments bleuâtres ou verdâtres, enroulés en pelotes, apparaissent dans des logettes : ce sont les 4 chromosomes géants (polyténiques), présents dans les glandes salivaires hypertrophiées.

Ils correspondent à un certain nombre de copies des chromatides⁶³ qui sont restées soudées entre elles (phénomène d'endo-réplication : c'est une variante de la mitose consistant en la réplication de l'ADN du noyau d'une cellule sans division de la cellule elle-même). Au microscope classique, la coloration de Feulgen rend visible des bandes fortement colorées, correspondant à des régions de chromatine très condensée (appelée hétérochromatine), et des bandes plus claires de chromatine moins condensée (appelée euchromatine).



⁶³ Molécule d'ADN associée à des protéines - (jusqu'à 1 024)

Protocole pour le montage entre lame et lamelle des petits arthropodes au baume du Canada

Le texte et les images du matériel de travail sont de Paul Leroy⁶⁴.

1. ARTHROPODES FRAIS OU CONSERVES DANS L'ALCOOL FAIBLE (60 – 70°) : JAMAIS DE FORMOL



◀ Bac pour vidage.

Immersion dans la potasse à 30% pour ramollissement et liquéfaction des muscles ; la durée de trempage sera de quelques heures pour les petits spécimens (à surveiller), mais de 24 à 36 h pour les gros à très gros, comme abeilles, guêpes, frelons, etc.

Ne pas rincer à la sortie du bain de potasse, mais transporter l'objet dans un petit bac plat à bords peu élevés (environ 5 à 7 mm) contenant de l'eau du robinet,

ou déminéralisée de préférence. Je déconseille le verre de montre, car trop instable.

2. L'OPERATION DE VIDAGE PEUT COMMENCER (LOUPE BINOCULAIRE VIVEMENT RECOMMANDEE

Micro-scalpel d'ophtalmologue ▶

Avec l'outil adapté au sujet (spatule plastique), procéder par légères pressions pour malaxer muscles et viscères. Si rien ne sort par les orifices naturels ne pas insister afin d'éviter la déchirure disgracieuse. Prendre alors un micro-scalpel, et pratiquer une petite ouverture à un endroit peu visible (entre les anneaux de l'abdomen, là où l'enveloppe est fine et transparente). Ceci concerne des sujets déjà assez volumineux (à partir du pou de porc, par ex.). Pour les tiques, pratiquer plutôt entre le scutum et les pattes, ou dans les sillons de la face



ventrale. Ensuite, continuer la trituration avec l'outil le mieux adapté : spatule plastique, baguette verre selon la taille de l'extrémité, les petits pinceaux peuvent également être utilisés, ainsi qu'une bande de plastique mince mais rigide pour une plus large surface de pression (pas de film, trop mou). Renouveler plusieurs fois l'eau du bain ; c'est fou ce qu'une aussi petite bestiole peut avoir dans le corps.

◀ Baguettes de verre étirées à la flamme.

Spatules en plastique et pinceaux. ▶

Attention avec les individus ailés ! Ces organes sont très fragiles, surtout après traitement à la potasse : donc, prendre beaucoup de précautions lors des manipulations.

Lorsque vous jugez le sujet convenablement vidé, le saisir délicatement avec une pince fine et le placer dans un godet contenant du vinaigre d'alcool (15 à 20 cc, qui peut servir



pour un bon nombre de bestioles).

Après une quinzaine de minutes, (pas de risque même pendant une heure), le faire passer dans au moins 3 pots contenant de l'eau (déminéralisée de préférence) pour éliminer l'acide. S'il y a plusieurs sujets à traiter, changer l'eau assez fréquemment. Pour éviter le gaspillage, faire tourner les pots (par ex., le dernier pot remplace le premier). Après le dernier passage à l'eau, placer dans l'alcool à 60 - 70°, en 2 bains successifs.

Si la pièce n'est pas montée dans l'immédiat, elle peut être conservée dans ce milieu très longtemps sans dommage, durant plusieurs mois, voire même des années. Surtout ne pas laisser séjourner plusieurs heures dans l'eau nature, car il y a grand risque de contamination bactérienne ou fongique.

⁶⁴ Paul Leroy, F-37300, JOUE-LES-TOURS, pauleroy37@hotmail.fr ; sans doute le plus remarquable technicien microscopiste que j'aie rencontré ; ses préparations d'insectes, d'acariens et de tiques en particulier, de vers et autres représentants du monde animal sont extraordinaires de qualité et de précision, frôlant la perfection. Nous nous sommes croisés pour la 1ère fois en 2000, à Ambleteuse, et depuis, je n'ai cessé d'apprendre à son contact.

3. MISE EN FORME ET DURCISSEMENT

Les sujets vidés ne présentent plus aucune rigidité, et sont informes lors des manipulations ; il est donc indispensable de leur redonner une attitude pour le montage.



◀ 2 minuties⁶⁵ montées sur un manche de plastique, avec leur cache indispensable, vu leur grande fragilité.

Pour cela, les installer sur une LPO recouverte d'alcool (90 – 95°) : ne pas laisser sécher ; puis avec les minuties et beaucoup de précautions, mettre en place pour la meilleure attitude. Ensuite, placer des cales aux extrémités de la lame (cales découpées dans du plastique correspondant à la plus faible épaisseur du sujet mais en veillant à ne pas l'écraser), et y poser délicatement une LPO, puis maintenir fermement avec

des pinces à linge, à l'aplomb des cales. **Attention, prendre beaucoup de précautions lors de cette opération afin de ne rien déplacer.** Ensuite, placer dans un récipient quelconque (pot à confiture !) contenant de l'alcool à 95° : l'immersion doit être totale. Par commodité, ce montage se place dans le pot avec les lames sur la tranche. Cette opération assure la rigidité des pièces, et ne doit pas être inférieure à 24h, le mieux étant 36h.

4. DERNIERE OPERATION, DESHYDRATATION ET MONTAGE

Sortir l'assemblage du bain alcoolique de durcissement, et prendre beaucoup de précautions lors du démontage, car les pièces sont devenues fragiles. Les placer dans l'alcool propre à 95°, en 2 bains successifs, (minimum ¼ d'heure, mieux ½ h ou plus) ; ensuite xylène phénolé (min. ½ h, de préférence 1 heure pour les gros sujets), puis 1 ou 2 bains de xylène pur. Pendant ce temps, préparer LPO et LCO, avec des cales mises en place sur la LPO si cela s'avère nécessaire, vu l'épaisseur du sujet ; les cales sont de petites bandes de LCO, coupées au diamant et collées préalablement au BC.

Déposer sur la LPO la quantité de BC correspondant au volume de la pièce et à la dimension de la LCO ; saisir délicatement le sujet en l'égouttant très légèrement, sans la laisser se vider du xylène, et l'immerger dans la goutte de BC. Vérifier sous la loupe binoculaire qu'elle est bien recouverte et qu'il n'y a pas d'impuretés ; s'il y en a, les retirer avec des minuties façonnées en crochet.

Ensuite déposer délicatement la LCO ; surtout, ne pas la laisser tomber, car il y aurait risque de déplacement de la pièce et formation de bulles. Cependant, avec le BC, il ne faut pas s'en inquiéter : à moins d'égaliser la taille d'un confetti, elles disparaîtront dans les heures qui suivent. Sinon, en cas de vide important, chauffer modérément avec la flamme d'un briquet ou d'une lampe à alcool, sous la lame, vers le bord, en l'inclinant pour tirer la bulle vers le haut. En même temps, et en dehors de la flamme, avec la pointe d'un petit pinceau, ajouter un peu de baume pour uniformiser la quantité de matière et prévenir la réinstallation d'un vide.

Compresseurs, réalisés au départ d'attaches trombones ►

Pour éviter les retraits lors de l'évaporation du solvant, le BC doit déborder un peu, surtout quand il s'agit de sujets épais. Par précaution, avoir à proximité un récipient contenant du xylène et à l'aide d'un petit pinceau (aquarelle n°2), éliminer l'excédent.

Pour les sujets assez épais montés avec cales, (fragments de LCO), il est indispensable d'utiliser les compresseurs ; ceux-ci devront être installés à l'aplomb des cales. Mais ils seront aussi utilisés dans le cas d'une lamelle mal équilibrée, c'est à dire un bord touchant et l'autre relevé.



⁶⁵ Des minuties sont de petites épingles, utilisées en entomologie pour le montage d'insectes minuscules ; leur diamètre est de l'ordre de 0,1 à 0,2 mm.

Râtelier de séchage (ce modèle double face convient pour 62 lames ►

Ces opérations terminées, placer les montages à plat pour le séchage. Avec le baume, il est plutôt long : il faudra être patient. Afin de ne pas risquer le déplacement et éventuellement la détérioration du sujet, éviter de manipuler avant 3 ou 4 semaines. Toutefois cette recommandation n'est pas absolue : elle peut varier selon l'épaisseur du montage, les conditions de température et de ventilation du lieu de stockage. Quant à la dépose des compresseurs !... pas trop tôt, mais à chacun de juger. Cependant, pour éviter les déceptions, ne jamais se précipiter. Il faut se dépêcher lentement.

Autre précaution : le BC étant sensible à la chaleur, ne pas stocker, même des montages anciens, dans un endroit où la température est élevée, près d'un radiateur par exemple.

5. PRECAUTIONS A PRENDRE POUR L'EMPLOI DE CES PRODUITS

Toutes ces manipulations devront se dérouler dans des conditions rigoureuses de propreté. En plus du récipient de xylène pour ébarbage (pot avec couvercle), toujours avoir à proximité un pot d'alcool pour remédier aux maladroites. Si du xylène est répandu sur le plan de travail, de même que des gouttes de BC, nettoyer rapidement à l'alcool ; les outils souillés au baume se nettoient aussi avec ce solvant. Ne pas mettre d'alcool en contact avec le baume frais d'un montage, car celui-ci se troublerait ; mais l'alcool élimine bien le xylène de même que le baume, et sèche rapidement.

Si vous avez plusieurs objets à monter → entre chaque opération, nettoyer les outils car les poussières en suspension s'y collent inévitablement et seront alors transportées dans la préparation. Veiller aussi à la propreté de la LPO et de la LCO et en particulier aux poussières, peu visibles mais bien présentes.



◀ Exemple de correction d'un sujet.

Travailler sur un plan en verre ou en faïence, car le xylène dilue certaines matières, entre autre le PVC et la plupart des vernis. En l'absence de hotte aspirante, opérer dans un local bien ventilé, car le xylène et le phénol sont des matières toxiques par inhalation. Pour les mains, à moins de disposer de gants spéciaux très coûteux, aucun ne résiste à ces produits : alors, la prudence s'impose.

CETTE METHODE CONCERNE LES ARTHROPODES EN GENERAL ET PLUS PARTICULIEREMENT CEUX D'UNE CERTAINE TAILLE QUI ONT ETE VIDES.

Mais les petits à très petits ne se vident pas, car ce n'est pas nécessaire ; ou bien, parce que certains organes internes doivent être conservés (pour les puces, les poux et les nymphes de tiques par ex.).

Donc, pour cette gamme de sujets, éviter le long séjour dans l'alcool fort ; cette opération entraîne le durcissement de la cuticule mais surtout des muscles, empêchant la pénétration du baume (les brefs passages dans l'alcool pour déshydrater n'ont pas d'incidence). De ce fait, lors de la mise en place, le xylène imbibant la pièce, très fluide, va en sortir mais le baume, plus épais, n'y pénétrera pas. Le retrait n'est pas toujours immédiat, il se produit parfois quelques minutes, voire quelques heures après le montage. Dans ce cas, l'opération est ratée : sous le microscope, les parties non comblées apparaissent noires (présence d'air). Toutefois, si le dégât est peu important, le vide peut se combler progressivement dans les jours qui suivent ; c'est à surveiller. Pour éviter ces désagréments, ne pas employer du baume trop épais. Cependant, même dans les cas graves, tout n'est pas perdu, il y a possibilité de rattrapage.

Pour cela, récupérer le sujet et le placer dans un godet contenant du baume très fluide, puis couvrir sans boucher hermétiquement afin que le xylène s'évapore. Dans ce bain, la pièce va se ré-impregner et le milieu s'épaissir, évitant ainsi que lors du montage, le phénomène du vide se reproduise. Pas de consigne stricte pour le temps d'immersion, il est à l'appréciation de l'opérateur.



POUR LE MONTAGE DES PIÈCES VÉGÉTALES LE PROCESSUS EST PEU DIFFÉRENT.

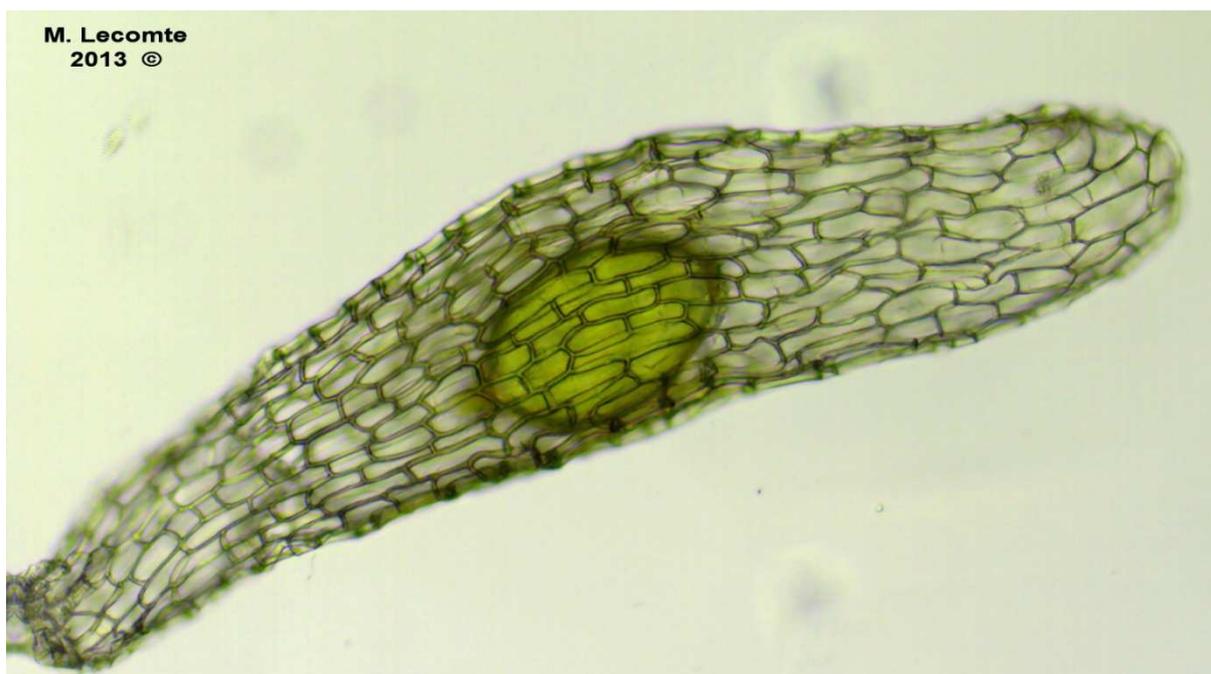
Qu'il s'agisse de coupes de tiges ou de racines, il est impératif de les traiter préalablement pour détruire le contenu des cellules. La méthode est simple :

1. Bain d'eau de javel, ¼ d'heure environ,
2. Acide acétique (vinaigre) pour arrêter l'effet de la javel,
3. Rinçage abondant.

Conserver les coupes traitées dans l'alcool à 60-70°, si le montage n'est pas immédiat.

Après traitement, ces pièces sont blanc laiteux et ne peuvent être montées en l'état. Il est nécessaire de les colorer, le traitement classique étant la double coloration **carmin – vert d'iode** (encore appelé **carmino-vert de Mirande**). Après coloration, rincer à l'eau pour éliminer l'excédent de colorant, déshydrater par la série d'alcools, comme pour les Arthropodes ; mais ne pas utiliser le xylène phénolé, peu compatible avec les végétaux. Le remplacer par l'alcool absolu (pas facile à se procurer), sinon un bain supplémentaire d'alcool à 95°, puis deux ou trois bains de xylène. Dans le premier bain, sitôt introduites, les pièces vont s'agiter vivement, réaction chimique mais aussi traces d'eau : le phénomène est bref. Dans le second bain, il ne doit pas y avoir de réaction (sinon, appliquer un bain supplémentaire), puis procéder au montage. De toute façon, si la déshydratation n'est pas parfaite, le baume se troublera.

On peut monter de cette manière les graines d'orchidée mais sans le traitement à l'eau de Javel. Pour celles-ci, les milieux aqueux conviennent aussi, et dans ce cas, la déshydratation est inutile. La coloration est laissée à l'appréciation de chacun.



Graine d'*Epipactis helleborine*, montée sans coloration. ▲

D'autre part, pour ne pas être déçu, ne jamais introduire ces graines à l'état sec dans un quelconque milieu de montage. Les mettre à tremper préalablement, plutôt à chaud qu'à froid.

Voici ma méthode :

- dans un tube en verre, les immerger dans une solution aqueuse d'acide lactique ± 10 %,
- chauffer à la flamme jusqu'à ébullition, en un ou deux passages brefs.

Ainsi traitées et placées dans un flacon bouché contenant la même solution propre, elles peuvent être conservées très longtemps. Les grains de pollens seront traités de la même manière.

Cette façon de faire n'est peut-être pas très académique, mais je la pratique depuis longtemps et le résultat est très satisfaisant.

En ce qui concerne les champignons, le montage au baume est à exclure. À part les spores qui sont très résistantes, toutes les autres cellules sont très fragiles et ne supportent pas le traitement de déshydratation aux alcools. En éliminant l'eau, elles se ratatinent et deviennent méconnaissables.

Seuls les montages en milieu aqueux sont possibles. La gamme de ces produits est variée, c'est au libre choix de l'utilisateur, chacun à sa méthode. En ce qui me concerne, ma préférence va au **PVA-lactophénol** et au **PVA glycérolé**. Ce dernier milieu est une astuce que j'ai concoctée, pour écarter l'acide lactique, incompatible avec certains colorants, en particulier le rouge Congo.

Sa composition est très simple : 1 partie de solution aqueuse de PVA à ± 15 %, et une partie de

glycérine neutre ; bien mélanger au bain-marie, à 50°. Ces proportions sont approximatives, car la solution aqueuse de PVA a un faible indice de réfraction. Il faudra donc tâtonner par ajout d'eau ou de glycérine, pour obtenir la meilleure limpidité. La glycérine a un très bon indice, mais ne pas trop forcer car au final la solution serait trop fluide. De toute façon, dans un montage, ce milieu ne durcit jamais, après évaporation de l'eau de la solution de PVA sa consistance est un peu celle de la pâte de fruit. Toutefois, la tenue est assez solide pour nettoyer les bords de la lamelle sans risque de la déplacer, après cela luter (vernis à ongle de préférence). La préparation de PVA glycérimé est très sensible à la contamination bactérienne et fongique, il faut donc protéger le stock. Eviter le phénol qui décolore ; quelques gouttes de lugol conviendront, mais pas trop pour éviter une coloration brunâtre.

Avec ces produits, (PVA-lactophénol = PVLPh et PVA glycérimé), les colorations tiennent peu de temps. On peut améliorer la durée, en colorant le milieu plutôt que les pièces. Ne colorer que des petits flacons de 20 à 30 cc, mais pour indication, voici les proportions (pour 100 cc de PVLPh, introduire 0,5g de bleu coton, ou 0,5g de fuchsine acide), secouer pour mélanger et laisser reposer. Le mélange est homogène sans dépôt ni grumeaux. Pour le PVA glycérimé, le procédé sera identique ; dans un petit flacon de préparation, introduire quelques grains de rouge Congo en poudre, bien mélanger et laisser reposer. Là non plus, il ne doit y avoir ni grumeaux ni dépôt.

A PROPOS DU PVA

Ce produit se présente sous diverses formes, à l'état brut : granulés, paillettes, poudre... La gamme de qualité est très étendue ; en ce qui nous concerne, une qualité standard convient. De ce fait, selon la qualité, la proportion moyenne de 15% généralement indiquée pour une solution aqueuse est approximative. D'autre part, selon la présentation du produit de base, la dilution est parfois laborieuse. Mais malgré cela, cette solution convient parfaitement pour la préparation des milieux de montage ; il suffit d'ajuster au mieux les ingrédients qui s'y ajoutent. Et le résultat est tout à fait convenable. Surtout, après dilution et refroidissement, la solution aqueuse doit rapidement être protégée car très sensible aux contaminations.

[Pour compléter ce qui précède, même si dans les boutiques spécialisées on peut trouver les résines et autres solutions ainsi que les outils appropriés pour pratiquer cette activité, voici quelques astuces qui aideront à la recherche du meilleur résultat.](#)

Tout d'abord le traitement à la potasse avant montage indiqué au début de ce texte est celui que je préfère, mais il y a d'autres façon de procéder. Certains utilisent une solution à seulement 10 ou 15 % : c'est un peu moins brutal, mais la durée du bain devra être prolongée. Toutefois ce traitement ne peut convenir pour les gros sujets ou alors le séjour sera de plusieurs jours.

Attention, les tiques ne doivent pas être traitée à la potasse.

Certains éléments de leur cuticule complexe sont détruits par cette solution et ce qui en résulte est plutôt décevant. Donc, pour ramollir les muscles et autres éléments internes, la solution de traitement sera l'acide lactique. Ce produit est moins agressif que la potasse ; le dosage est laissé à l'appréciation de l'opérateur. Cependant pour les petits sujets, la solution aqueuse à 50/50 est convenable ; pour les tiques adultes, où certaines sont assez grosses (les *Dermacentor* entre autres), il faut prévoir 3 à 4 parties d'acide, pour 1 partie d'eau. Selon la taille du sujet et la concentration de la solution, la durée du séjour sera au minimum de 3 semaines, voire un mois ou plus pour les gros.

A surveiller toutefois, car un séjour trop long peut entraîner quelques désagréments, tels que la perte des poils lors de la trituration.

Pour terminer sur ce sujet, si les petits arthropodes qui se montent sans être vidés peuvent très bien être traités à la potasse : moi, je préfère l'acide lactique, même pour de plus gros, comme les mouches Hippobosques entre autres. Bien que la potasse ne fasse pas disparaître les pigments, elle les atténue sensiblement, alors que l'acide lactique les conserve intacts.

Ceci étant vu, quelques mots sur l'outillage. N'ayant jamais trouvé dans le commerce les outils vraiment adaptés pour ces manipulations (tout au moins pour moi), j'ai dû les fabriquer. Ce qui n'est pas tout à fait exact, car j'ai plutôt détourné des objets destinés à un autre usage pour les adapter à mes besoins.

A l'intention des bricoleurs voici la panoplie de ce que j'utilise. Vous trouverez les photos de chaque ustensile dans le texte. Le bac pour vidage, à fond en verre épais et bords en plastique, de 5 mm de haut collés à l'araldite ; des minuties montées sur un manche ; des baguettes en verre, étirées à la chaleur ; des bâtonnets en plastique et des pinceaux de tailles diverses ; des brucelles fines ; scalpel ophtalmo et cutter, de ce dernier ne pas utiliser les lames d'origine, trop épaisses, mais des lames de rasoir taillées en biseau.





Pour les petits sujets devant être vidés, utiliser plutôt des aiguilles hypodermiques, plus fines ; les seringues jetables à insuline sont idéales. Les godets de lavage sont faciles à se procurer.

En ce qui concerne les outils servant à remettre en place un objet monté qui s'est déplacé, ils sont taillés dans des lames de rasoirs jetables, car très minces. Ensuite il faut les amincir le plus possible, ce qui en même temps va les polir. Ceci se fait entre deux feuilles de papier abrasif mouillable n°1000 (utilisé

en carrosserie) ; puis, les coller sur un manche. ►

Les compresseurs sont façonnés à partir de trombones, et vous voyez, sur la photo, la manière de les utiliser pour la remise en place d'un objet. Surtout ne pas les placer sur la lamelle mais au plus près de ses bords sur trois cotés. Le petit sabre glissé entre lame et lamelle permettra la manipulation de l'objet sans déplacer la LCO.

Les râteliers de séchages sont, eux aussi, faciles à fabriquer.



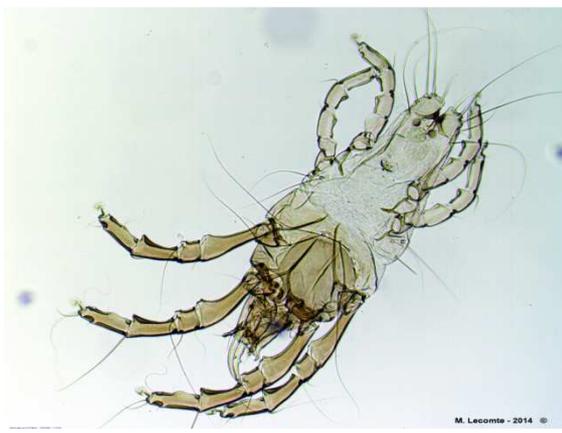
Pour fixer les minuties sur leur support, et autres collages, j'utilise toujours l'araldite ; les manches, dans la plupart des cas, sont des tubes à encre de stylos (Pilot, encre liquide, très pratiques) ; ils sont insensibles aux solvants. Les micro-spatules sont les bâtonnets fournis avec les coricides ou fongicides, eux aussi très résistants aux solvants. Il faut les étirer à la flamme pour la taille et la forme désirée, de même que les baguettes de verre. Les pinceaux sont eux aussi d'origines diverses, surtout flacons de vernis à ongle, et les poils seront coupés assez courts pour leur donner de la rigidité. En avoir plusieurs, avec les poils coupés à des longueurs différentes.

Ultime recommandation : le milieu de montage doit être parfaitement exempt d'impuretés. Pour éviter ce désagrément, quel que soit le milieu, ne jamais prélever directement dans le flacon principal. Prévoir un petit flacon (20 ou 30 cc) avec baguette de prélèvement solidaire du bouchon. Une baguette annexe qui, entre chaque prélèvement, serait posée sur le plan de travail, constituerait le piège idéal à poussières ; celles-ci seraient alors transportées dans le flacon, souillant le produit.

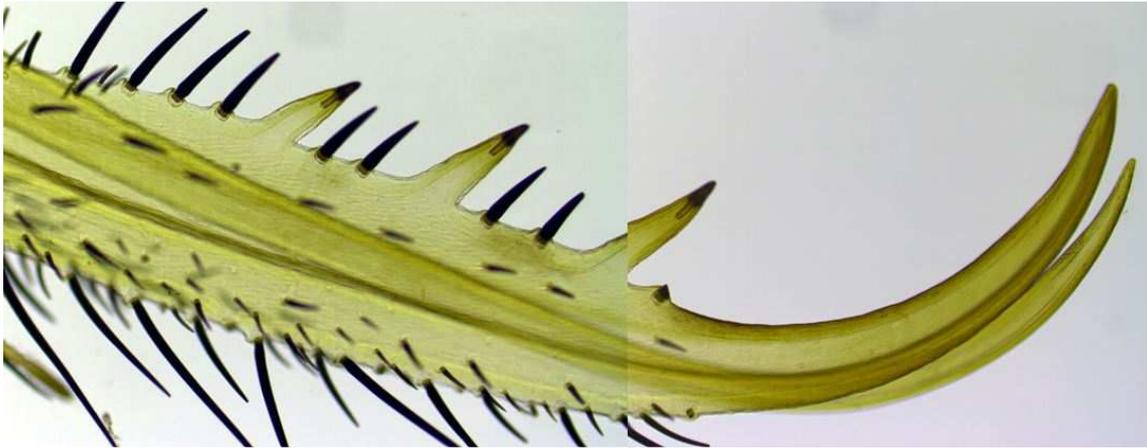
Pour les montages au BC, après séchage suffisamment solide du médium, tout au moins sur le pourtour, procéder à l'ébarbage. Cette opération est délicate et devra se dérouler avec précautions. Avec une lame de rasoir et d'une main légère, gratter le baume sec, éliminer d'abord celui se trouvant sur la lamelle, puis les bords en laissant une petite marge. Ensuite, avec un chiffon imbibé d'alcool à 90-95° nettoyer délicatement sans frictionner avec insistance. La lame ne sera pas propre ; en s'évaporant, l'alcool laisse un dépôt blanchâtre : ne pas s'en inquiéter. Laisser sécher 24 h ou plus, puis laver à l'eau savonneuse, mais bien entendu sans trempage, et toujours délicatement, puis essuyer. S'il reste des traces de baume, les éliminer avec un peu d'alcool sur un chiffon.

Les montages en milieu aqueux se nettoient à l'eau, puis après séchage, luter de préférence.

Evidemment, les premières expériences ne seront certainement pas des chefs-d'œuvre ; j'ai moi aussi connu des échecs à mes débuts, et même encore parfois maintenant ; mais l'expérience s'acquiert en pratiquant. Alors, je vous souhaite à tous bonne réussite.



Chaetodactylus osmiae ▲ (Acarien parasite des osmies, qui sont des abeilles sauvages), et **Falculifer rostratus** ▲ (Acarien provoquant la pseudo-gale du pigeon) - Les photos présentées par M. Lecomte ont été réalisées d'après des préparations de l'auteur.



Montage de 2 photos illustrant une mandibule de larve de fourmilion. ▲



Larve hexapode de *Rhipicephalus sanguineus* (tique du chien). ▲ Les Acariens adultes, qui sont des Arachnides, possèdent 8 pattes.



▲ Nympe d'*Ixodes ricinus* (tique s'attaquant à l'homme). Pattes antérieure et médiane de l'hippobosque du cerf (*Leptocera cervi*), dont la femelle est aptère ; les griffes sont particulièrement conformées pour s'agripper aux poils du pelage. ►



Les genitalia chez les papillons

Ce texte est une adaptation personnelle d'un article publié sur un site appelé « l'entomologie ludique et interactive ».

Depuis le début du 20^{ème} siècle, les entomologistes ont à leur disposition des moyens remarquables de détermination macroscopique des insectes. Parmi la multitude d'atlas magnifiquement illustrés mis à notre disposition, citons ce qui, malgré son âge séculaire, reste une bible : « *Gross-Schmetterlinge der Erde – Les Macrolépidoptères du Monde* », de Adalbert Seitz, un entomologiste allemand. Cet ouvrage compte 16 volumes et 4 suppléments, dont le début de publication commença en 1907.

Mais parfois, il faut faire appel à la microscopie pour des déterminations précises ; et pour cela, il faut s'intéresser plus particulièrement à l'étude des armatures génitales sclérifiées des mâles et des femelles.

Il faut tenir comme une certitude que tous les individus d'une même espèce, présentent des structures génitales (appelées genitalia), identiques pour chacun des sexes. Ces structures sont typiques, et différentes pour chaque espèce ; elles sont assez semblables au sein d'un même genre, mais nettement différentes pour des espèces appartenant à d'autres genres ou familles.

L'observation de ces structures est surtout pratiquée chez les Lépidoptères, (Rhopalocères ou Hétérocères), les Coléoptères, Les Orthoptères (sauterelles) et les Diptères (moustiques).

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons uniquement aux genitalia des papillons.



Pheosia gnoma - Lépidoptère Hétérocère (photo Pierre Cabrol)

L'armature génitale d'un mâle de Lépidoptère.

Elle est située à l'extrémité de l'abdomen, sur les derniers segments. Généralement, une paire de formations symétriques émerge : ce sont les valves. Lors de l'accouplement, la femelle est fermement maintenue en place par trois appendices externes du mâle : un crochet dorsal, l'uncus, et deux plaques latérales, les valves. Ces valves maintiennent latéralement l'extrémité de l'abdomen de la femelle, tandis que l'uncus s'insère dorsalement dans la membrane intersegmentaire du dernier anneau de la femelle.

Sur ces structures sont insérés des muscles qui servent à l'accouplement. Le mâle, alors, introduit son pénis (édéage), dans l'orifice de copulation de la femelle (ostium bursae), et injecte ses spermatozoïdes par le truchement d'un spermatophore. Ce dernier, qui abrite les spermatozoïdes, est un conduit creux et gélatineux. Il glisse le long d'un canal

appelé le ductus bursae, jusqu'à une sorte de sac appelé bourse copulatrice. De cette bourse, un très fin canal, nommé ductus seminalis, amène la semence jusqu'aux ovaires. L'accouplement est long et peut durer plusieurs heures.

Les genitalia d'une femelle de Lépidoptère

La structure génitale de la femelle comprend des pièces externes plus ou moins sclérifiées que l'on appelle les plaques anté- et postvaginales. Elles entourent l'orifice de copulation. De cet orifice génital, part un conduit interne plus ou moins long et plus ou moins complexe, le ductus bursae, qui aboutit à une sorte de grand sac appelé bourse copulatrice. Sa forme est généralement oblongue, mais elle peut prendre des formes multiples, avec des diverticules plus ou moins longs et plus ou moins sclérifiés. Les parois de la bourse peuvent être minces ou épaisses, plissées ou lisses. Elles portent parfois des épines (signum) ou des zones sclérifiées garnies de nombreuses petites épines, plus ou moins fortes, appelées laminae dentatae.

De la bourse copulatrice (ou du ductus bursae) est issu un très fin conduit, le ductus seminalis, qui aboutit aux ovaires. Il permet aux spermatozoïdes de migrer pour féconder les ovules, à la demande de la femelle. Lors de l'étude des genitalia de la femelle, on observe souvent des vestiges de plu-

sieurs spermatophores. C'est le résultat de plusieurs accouplements de la femelle durant sa vie éphémère qui dure environ 3 semaines.

La ponte se fait par l'orifice de ponte qui est encadré par deux processus appelés lobes de l'oviporus. Ces lobes membraneux sont couverts de poils sensitifs très nombreux qui aident la femelle à positionner ses oeufs sur la feuille de la plante hôte.

PRÉALABLE

++ Il est nécessaire de disposer d'une loupe binoculaire et d'une plaque chauffante.

++ Un colorant spécifique : le noir chlorazol (à conserver en flacon brun, car il ne supporte pas la lumière). Il peut être remplacé par du vrai mercurochrome (pas de l'éosine).

MODE OPÉRATOIRE

Phase 01

++ Placer l'abdomen, détaché du corps du papillon, dans un bain de potasse ou de soude caustique saturée, colorée avec du mercurochrome. Cette première coloration aidera à repérer les différentes pièces des armures génitales, parfois difficiles à distinguer des amas graisseux résiduels.

++ A froid, cela prendra de 3 à 7 jours, selon le volume de l'abdomen.

++ A chaud (60 à 70° maximum – surtout, ne pas laisser bouillir), 4 à 6 heures suffiront.

Phase 02 : c'est la plus délicate !

++ A l'aide d'un outil adéquat, éliminer les poils et les écailles qui recouvrent l'abdomen..

++ Ensuite, repérer la membrane latérale qui réunit tergites et sternites.

++ Déchirer cette membrane avec une fine pince, afin d'étaler la cuticule de l'abdomen et d'avoir accès aux pièces génitales. Cette opération est indispensable pour dégager les armatures génitales de la femelle. Celles du mâle peuvent être dégagées en saisissant l'uncus et en le tirant vers l'extérieur. Les valves sont alors complètement dégagées.

++ Enlever les graisses restantes, ainsi que les restes des divers organes de la digestion. La pré-coloration des genitalia permet de bien séparer les pièces génitales et d'éviter de les sectionner par inadvertance. Cette opération se fait sous la loupe binoculaire, dans une petite BP en verre avec quelques gouttes d'eau.

Phase 03 : 2 possibilités

Coloration au mercurochrome

++ Laver plusieurs fois les organes génitaux et la cuticule abdominale.

++ Colorer au mercurochrome, pendant 24 heures (solution aqueuse 50/50).

++ En cas de surcoloration, pratiquer une coloration régressive avec quelques gouttes d'eau de Javel.

++ Rincer rapidement 2 ou 3 fois à l'eau bidistillée.

++ Monter dans l'Aquatex, sur une LPO avec calages.

Coloration au noir de chlorazol

++ Laver plusieurs fois les organes génitaux et la cuticule abdominale.

++ Placer une minute dans un bain de méthanol (ou d'éthanol) à 70°.

++ Répéter l'opération dans de l'alcool à 90°.

++ placer durant 1 à 3 minutes dans du noir de chlorazol alcoolique (en cas de surcoloration, il s'avère difficile de régresser : plonger durant plusieurs heures dans de l'alcool à 90°, et surveiller la régression).

++ Laver dans une solution d'alcool à 70°.

++ Rincer rapidement 2 ou 3 fois à l'eau bidistillée.

++ Monter dans Aquatex, sur une LPO avec calages.

OU

..... comme précédent

++ Laver dans une solution d'alcool à 70°.

++ Placer les genitalia et la peau de l'abdomen dans de l'alcool à 95° durant 30 secondes.

++ les plonger ensuite dans du toluène phéniqué (de 30 secondes à 5 minutes, selon le volume des pièces) pour déshydratation totale.

++ Sur une LPO bien dégraissée, munie de calages, poser une goutte de BC mélangée à une goutte de toluène phéniqué.

++ Disposer les armatures génitales et la cuticule abdominale dans le mélange. Le BC ramollit les pièces génitales et facilite leur disposition.

Sous la loupe, à l'aide de minuties, ouvrir les valves (si cela est possible), et disposer l'édéage sous l'armature génitale après l'avoir extrait de sa loge. C'est assez délicat. Si possible, étaler la vesica pour en montrer les spicules et les épines.

Pour les genitalia de la femelle, on veillera à extraire de la bourse copulatrice les spermatophores, en l'incisant légèrement avec les pincettes.

La présence éventuelle de bulles indique un manque de déshydratation → ajouter une goutte de toluène phéniqué.

Poser une goutte de BC au centre de la LCO ; la retourner vivement et poser sur la préparation.

Le séchage peut prendre plusieurs semaines. Le forçage à l'étuve nous paraît inutile et risqué : patience est mère de réussite.

Technique préconisée par Claude Tautel⁶⁶, spécialiste en la matière

L'utilisation du noir de chlorazol permet de distinguer les différents types de tissus, alors que la fuchsine colore l'ensemble de la pièce sans aucun relief.

++ Découper doucement l'abdomen de l'exemplaire (ciseaux fins ou pincettes si l'exemplaire est sec).

++ Plonger l'abdomen dans une solution de potasse (grains de potasse mélangés à l'eau).

2 possibilités :

➤ à froid : laisser tremper une nuit entière.

➤ à chaud : prendre un récipient de type porcelaine (car le verre fait des projections) et faire bouillir (bec bunsen ou simplement lampe à alcool à brûler).

On voit alors l'abdomen devenir "transparent" au bout de 5 à 10 mn. Attention toutefois de ne pas trop laisser dans la potasse bouillante, sinon on risque des déformations fort trompeuses (j'utilise personnellement cette dernière solution).

++ Laver l'abdomen à l'eau.

++ Le poser sur une plaque de verre pour opération sous loupe binoculaire avec un bon éclairage (lampe à led, ou quartz, ou mieux éclairage à lumière froide).

++ Ouvrir l'abdomen (avec un petit scalpel, ou des ciseaux de chirurgie, ou de simples épingles ou des pincettes) pour en extraire l'extrémité : ce sont les pièces génitales qui sont chitinisées.

++ Les pièces génitales sont soigneusement mis à part, voire également le 8ème sternite des mâles pour certains groupes.

++ Prendre un peu de noir de chlorazol dilué à l'eau bidistillée : faire tomber le mélange sur les pièces génitales jusqu'à ce que la coloration "révèle" les différents tissus.

++ Nettoyer les pièces génitales dans une coupelle d'alcool le plus pur possible.

++ Faire tomber sur une autre lame propre 3 gouttes d'Euparal (on a longtemps employé l'Eukitt mais c'est un produit dangereux et trop toxique, soluble au benzène). Les Anciens utilisaient le baume du Canada, mais il a le désavantage de jaunir à la longue.

++ Installer la pièce génitale dans la goutte d'Euparal et l'étaler sous la bino.

++ Une fois tout bien étalé et disposé (pour les mâles, valves et édéage), positionner doucement la LCO, ronde de préférence (20 mm de Ø).

C'est terminé : laisser à horizontale pour une nuit de séchage. Poser une étiquette provisoire pour éviter toute erreur.

++ Installer l'étiquette définitive : carré de papier collé avec de la colle à papier traditionnel sur le côté gauche de la lame en indiquant la provenance, la date de capture de l'exemplaire, le nom du collecteur et le numéro de la préparation.

++ Créer une étiquette portant le numéro de la préparation à piquer avec l'aiguille entomologique du papillon.

⁶⁶ ctautel@free.fr

++ Tenir un cahier des préparations avec tous les renseignements nécessaires : numéro de la préparation, nom de la collection, provenance précise du papillon, date de capture, sexe de l'individu, détermination, nom du déterminateur et année de la détermination, ou de la préparation.

++ Ranger verticalement la préparation dans une boîte prévue à cet effet.

REMARQUES

++ Les genitalia femelles doivent être préparés dans leur entier : attention aux parties supérieures, les papilles notamment.

++ Idem pour les mâles : étaler les valves à plat et surtout l'édéage dont certains préparateurs font sortir l'intérieur (édéage évaginé) pour mieux observer les cornuti (petites pièces chitinisées).

++ Bien souvent, il peut être utile de préserver l'abdomen dans son entier. Lorsqu'on travaille avec une institution, ceci est désormais obligatoire. L'abdomen sera alors fendu dans sa longueur (ciseaux fins ou pinces), pour être étalé comme si on ouvrait un livre. Pour obtenir un bon résultat, il faut bien débarrasser l'abdomen des écailles restantes et des restes des viscères, en plusieurs allers et retours dans l'eau. On pourra utiliser un pinceau très fin (à poils artificiels et non en martre : poils trop rêches). Une fois l'abdomen nettoyé, il faut le colorer au noir de chlorazol. Nettoyage à l'alcool et installation sous lame et lamelle à côté des pièces génitales ou bien à étaler avec les pièces génitales sous la même lamelle...

Ce n'est pas très difficile : juste une question d'habitude.

Technique plus simple, trouvée sur un forum d'entomologie (auteur inconnu)

++ Couper l'abdomen.

++ Le plonger dans la potasse froide.

++ Porter à ébullition pendant quelques instants (laisser un peu plus longtemps si l'organe est gros).

++ Rincer à l'eau distillée.

++ Dans l'eau et sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une pince fine, séparer les genitalia des débris organiques (intestins, muscles etc..) puis écarter les valves, sans séparer pour autant le pénis au risque de le perdre.

++ Plonger dans la potasse froide.

++ Porter à ébullition quelques instants de façon à parfaire le nettoyage.

++ Rincer dans plusieurs bains d'eau successifs pour éliminer les traces de potasse.

++ Déshydrater dans des bains successifs d'alcool.

++ Faire un bain dans l'essence de lavande plus d'une demi-heure (les genitalia peuvent rester dans ce bain autant de temps que nécessaire).

On finit par le montage entre LPO et LCO dans le BC (le bain dans l'essence de lavande permet d'imprégner les pièces de solvant de ce baume pour faciliter l'étape suivante).

++ Placer une petite goutte de BC au centre de la LPO, suffisante pour qu'ensuite celui-ci s'étale sous la LCO entière.

++ Mettre les pièces génitales dans le BC.

++ Séparer le pénis à ce niveau-là, soit partiellement soit totalement.

++ Disposer correctement les pièces, les valves de chaque côté de la pièce centrale.

++ Placer la LCO en évitant le plus possible les bulles.

++ Rédiger les étiquettes.

Bibliographie

CARAYON J., 1969 - "*Emploi du noir de chlorazol en anatomie microscopique des insectes*", Annales de la Société Entomologique de France, (N. S.), 5 (1), 179 : 193.

GIBEAUX C., - « *Les Genitalia mâle et femelle, Les principaux noms utilisés dans leur étude (Lepidoptera)* », Ent. gall. 1 (2), 110 : 115.

Technique revue vers encore plus de simplification

Après avoir lu très attentivement tout ce qui était écrit sur ce sujet, nous avons commencé à appliquer une méthode hybride, en essayant de simplifier au maximum toutes ces étapes assez lourdes et chronophages, tout en gardant à l'esprit que le résultat serait sans doute moins bon qu'avec des protocoles qui ont fait leurs preuves.



NOTRE MODE OPÉRATEIRE

▲ Bout d'abdomen d'un papillon de nuit femelle

PHASE DE NETTOYAGE ET DE PRÉLÈVEMENT

++ Couper l'abdomen.

++ Le plonger dans la potasse froide et le laisser macérer durant 6 à 10 jours selon la taille de l'insecte → nous avons choisi cette option afin d'éliminer au maximum l'utilisation de potasse très chaude, source de danger et d'accident. Précisons également que nous avons choisi d'œuvrer sur 6 insectes (5 papillons et un hyménoptère) conservés en paillote depuis quasi 20 ans, ce qui n'est pas la solution idéale ; nous avons le sentiment que l'utilisation de matériel frais facilite le travail.

++ Rincer à l'eau distillée.

++ Dans l'eau et sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une pince fine, séparer les genitalia des débris organiques (intestins, muscles etc..) puis écarter les valves, sans séparer pour autant le pénis au risque de le perdre.

++ Remettre dans quelques gouttes la potasse froide, et porter à ébullition quelques instants de façon à parfaire le nettoyage.



++ Rincer dans plusieurs bains d'eau successifs pour éliminer les traces de potasse.

◀ Armature mâle avec pénis

PHASE DE DÉSHYDRATATION

++ Poser les pièces prélevées au centre d'une LPO et les étaler au mieux possible, dans une position « naturelle ».

++ Couvrir avec une seconde LPO et serrer à l'aide de 2 pinces à linge en bois, posées aux extrémités des LPO.

++ Plonger l'ensemble dans un bain

d'alcool à 95°, et le laisser macérer durant plusieurs jours → nous avons travaillé sur 6 insectes différents, et les 6 « montages » sont restés dans le bain alcoolique durant 15 jours.



◀ Genitalia femelle

PHASE DE PRÉPARATION AU MONTAGE

++ Sortir les LPO du bain alcoolique et laisser égoutter.

++ Séparer les 6 LPO avec beaucoup de précaution et transférer les pièces au centre de LPO propres, à l'aide d'une très fine pince (c'est assez facile car l'ensemble est rigidifié par la déshydratation).

++ Sur 2 LPO (1), poser une goutte d'eau durant 5 minutes, puis éponger.

++ Sur les 2 suivantes (2), poser une goutte de xylène et éponger le surplus après 2 ou 3 minutes.

++ Sur les 2 dernières (3), poser une goutte

d'isopropanol et éponger le surplus après 2 ou 3 minutes.

PHASE DE MONTAGE

(1) Les pièces réhydratées sont montées au PVALPh ; poser une goutte de milieu, et disposer correctement les pièces sous la loupe ; placer la LCO en évitant le plus possible les bulles → *un rapide contrôle au microscope montrera qu'il en subsiste malgré tout ; chauffer et refroidir brusquement : elles disparaissent comme par magie.*

(2) Les pièces traitées au xylène sont montées au BC ; poser une goutte de milieu, et disposer correctement les pièces sous la loupe ; placer la LCO en évitant le plus possible les bulles → *un rapide contrôle au microscope montre des bulles évidentes ; un coup d'œil le lendemain nous apprend qu'elles ont complètement disparu, même dans le bout d'abdomen (voir photo p. précédente).*

(3) Les pièces traitées à l'isopropanol sont montées à l'Euparal ; poser une goutte de milieu, et disposer correctement les pièces sous la loupe ; placer la LCO en évitant le plus possible les bulles → *un rapide contrôle au microscope montre des bulles un peu partout autour des pièces ; nous ne désespérons pas car l'Euparal est aussi très avide d'oxygène et a le pouvoir d'absorber l'air présent ; un coup d'œil le lendemain nous indique qu'elles ont complètement disparu également.*

Nous considérons donc cette expérimentation comme une réussite totale.



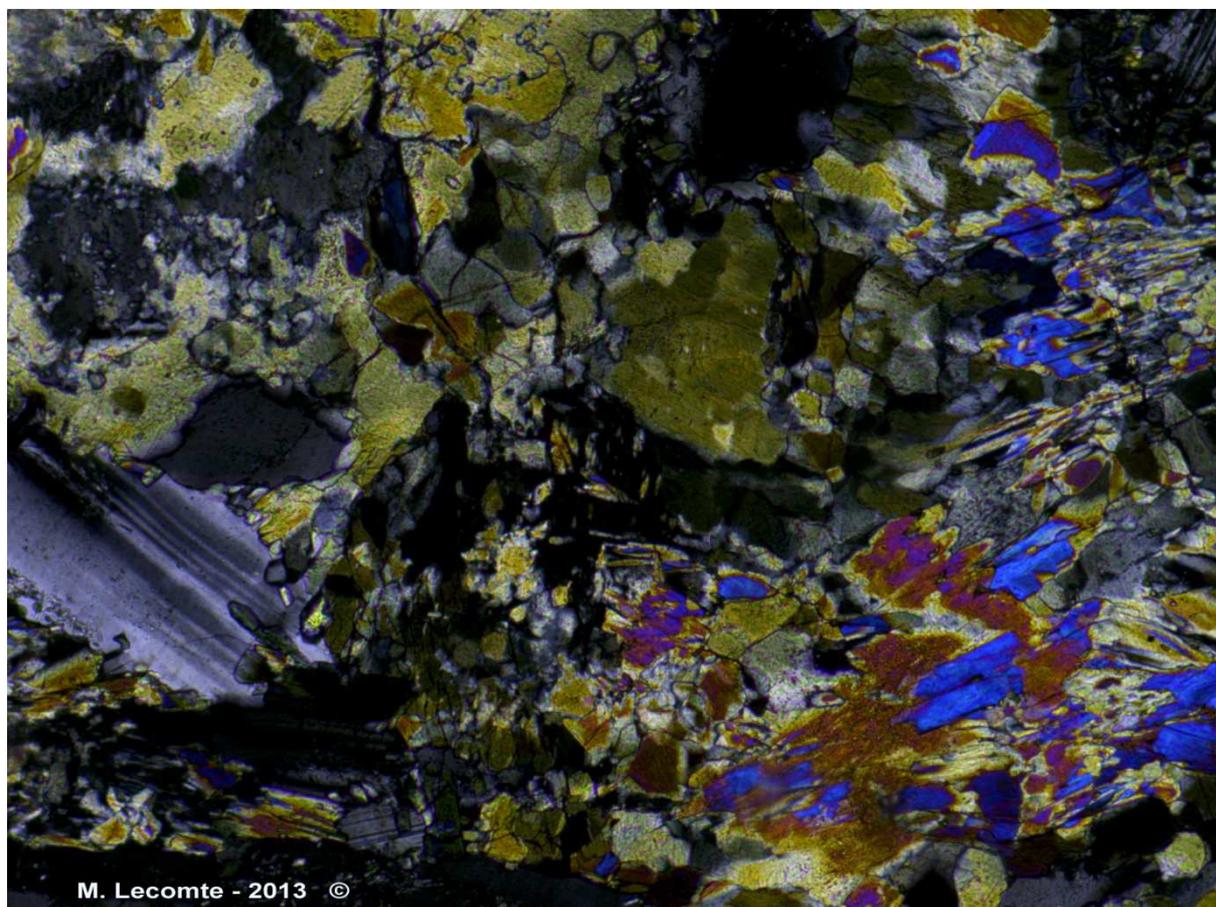
▲ Nous n'avons pu trouver les pièces génitales du bourdon, mais par contre, le dard était encore bien présent dans l'abdomen desséché. Cette image est le résultat d'un simple assemblage de 2 photos dans une plage PowerPoint, avec ensuite une capture d'écran.

DIVERS

Les falsifications

Les fibres textiles naturelles ou artificielles
et le papier

Les cristaux



M. Lecomte - 2013 ©

Lame de pierre, originaire du Burundi (Afrique), observée en polarisation.

Falsification de substances alimentaires : le poivre moulu

Le poivre est une épice que nous utilisons tous, sans nécessairement bien la connaître. C'est le nom du fruit de diverses lianes exotiques de la famille des Pipéracées. Mais seules les baies de *Piper nigrum*, *P. cubeba* et *P. longum* ont légalement le droit de porter cette appellation ; la première est de loin la plus cultivée.



◀ **Diverses baies de poivre** – photo de Rainer ZENZ - selon les termes de la GNU Free Documentation License.

Les baies immatures conservées en milieu humide sont appelées poivre vert.

Le poivre blanc est obtenu en broyant des baies mûres débarrassées de leur péricarpe.

Pour le noir, on utilise des baies parvenues presque à maturité, fermentées puis séchées. Le poivre noir moulu, est aussi appelé poivre gris. C'est le mélange du péricarpe noir et du cœur blanc qui donne cette couleur grise particulière.

Le rouge est une baie de poivre arrivée à maturité. Le poivre contient de la pipérine (1-Piperoyl-piperidine), qui est un alcaloïde⁶⁷ au goût piquant.

Tout cela coûte très cher (prix client aux alentours de 220-300 €/kg) et bien évidemment, fait l'objet de falsifications lucratives, surtout depuis l'avènement des ventes difficilement contrôlables sur Internet.

Poivre noir moulu, 40x : les parties sombres constituent les débris du péricarpe. ▶

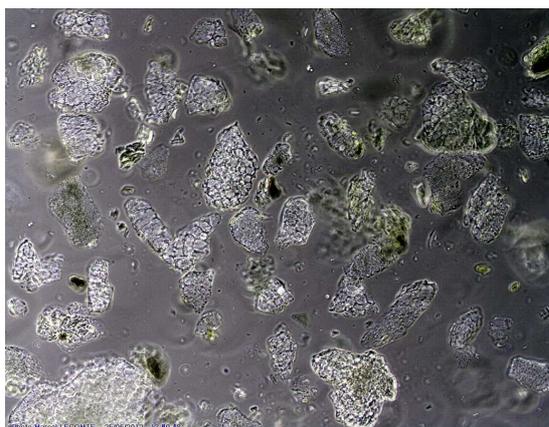
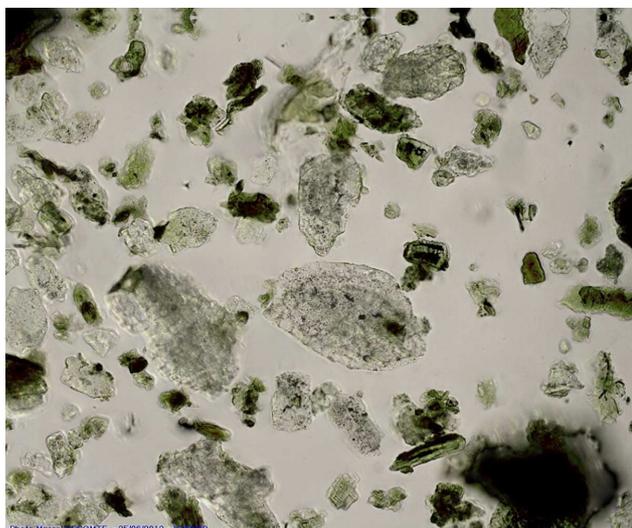
MODE OPÉRATOIRE

++ Prélever une pointe de scalpel de poudre de poivre.

++ Afin d'éviter les agglomérats, mélanger soigneusement dans une goutte de lactoglycérol, sur une LPO.

++ Poser délicatement une LCO, sans la presser (risque de casse, surtout s'il y a des grains de sable dans le produit expertisé). La présence de résidus minéraux est encore mise plus facilement en évidence avec un microscope à polarisation.

++ Pour une préparation définitive, monter dans glycérine gélatinée, Aquatex ou PVALPh.



Si on souhaite monter dans une résine synthétique ou du BC :

++ mélanger la poudre de poivre dans de l'alcool à 95°.

++ Laisser évaporer.

++ Poser une goutte de xylène.

++ Laisser évaporer.

++ Poser une goutte de BC ou de résine.

++ Poser une LCO et luter au vernis à ongles, après quelques jours.

◀ **Poivre blanc moulu, 40x, en DIC : les impuretés sont très rares.**

Depuis 1992, Une maladie provoquée par *Phytophthora capsici* ravage les plants de poivrier. C'est un champignon qui contamine le sol et provoque le pourrissement brutal des racines.

⁶⁷ Les alcaloïdes sont des molécules organiques azotées pouvant avoir une activité pharmacologique. On peut les rencontrer chez les plantes, certains champignons et certains animaux. Citons : aconitine, strychnine, codéine, caféine, morphine, quinine, atropine, nicotine, cocaïne, scopolamine, solanine, héroïne, méthadone, histamine, sérotonine ; mescaline, psilocybine, sérotonine, LSD, émétine, muscarine ; batrachotoxine, tétrodoxine ... parmi les plus connus.

Les fibres textiles naturelles ou artificielles et le papier

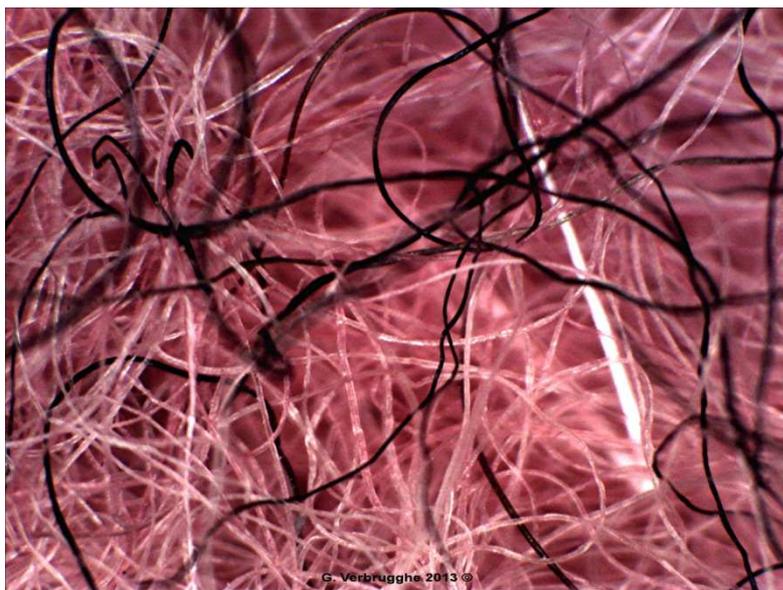
LE PAPIER : différentes qualités



▲ Trame d'un papier de médiocre qualité, ici du papier absorbant (type Sopalin) pour cuisine ; les fibres sont lâches et informes (à gauche, coloration au lugol).



▲ Trame d'un papier de qualité très moyenne, ici du papier journal ; les fibres sont déjà nettement plus serrées, et en majorité, à parois parallèles (à gauche, coloration au lugol).



◀ Fibres de laine naturelle.

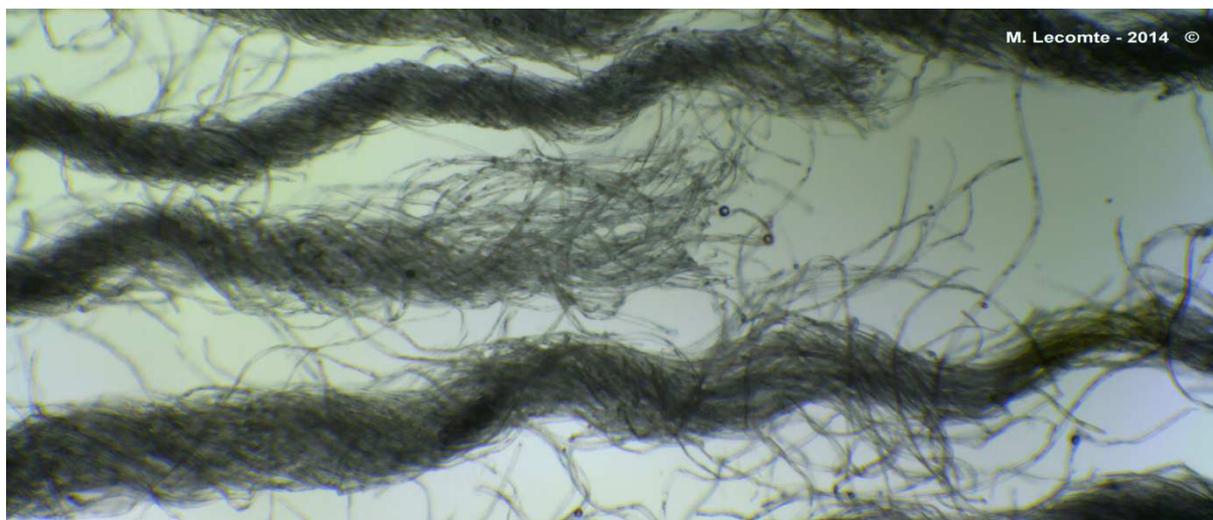
MODE OPÉRATOIRE

++ Imprégnation au CLP
++ Monter dans glycérine gélifiée

OU

++ Coloration faible au bleu de méthylène aqueux (1 g. colorant + 1 g. eau)

++ Montage dans Aquatex



◀ ▲ Le lin textile est une plante cultivée (*Linum usitatissimum*), qui donne des fibres servant à fabriquer la toile de lin. Pour cela, on pratiquait une opération appelée rouissage, qui consistait à laisser pourrir les tiges de la plante afin de séparer l'écorce filamenteuse de la tige.

La technique de transformation a évolué, dans un plus grand respect environnemental et en recyclant les déchets en produits dérivés, comme une pâte à papier, et de l'huile. Les traitements de finissage ont aussi considérablement progressé, conservant aux fibres leurs qualités, dans le

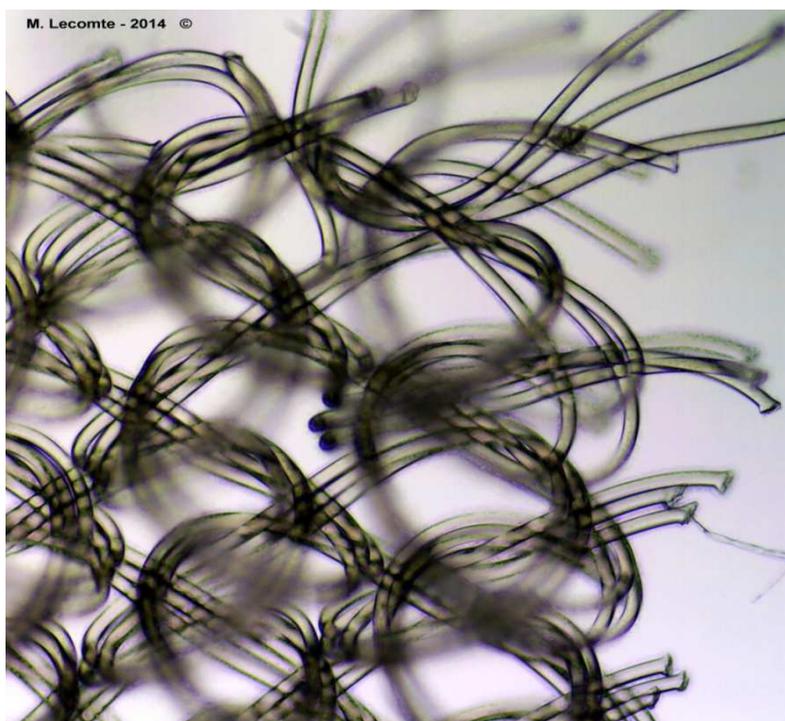
temps.

Fibres de nylon tissées ► pour la fabrication de bas.

Le nylon est une fibre de matière plastique, dite polyamide, qui est utilisée notamment pour la fabrication de textile.

Il a été mis au point dans une firme américaine (Du Pont De Nemours) en 1935, par Wallace Carothers. Il connaît un succès sans précédent en 1940, avec les premiers bas pour femmes, et aussi pour la fabrication de toiles de parachutes.

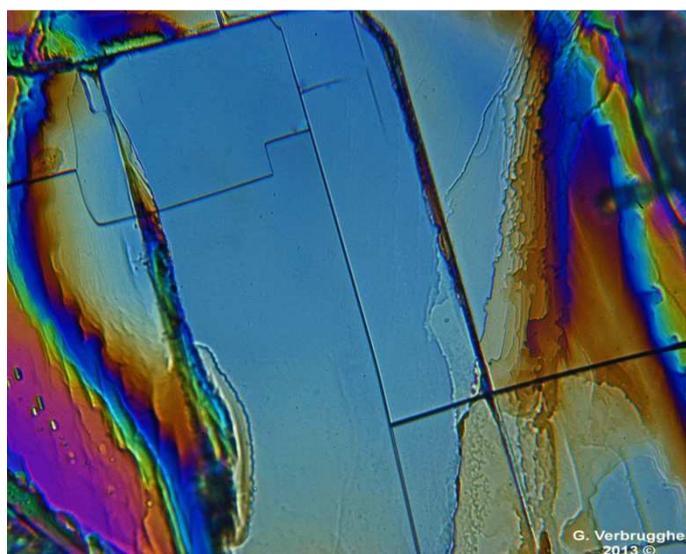
Nombre de légendes courent à propos de la signification de cet acronyme ; nous opterons pour celle qui dit que le nom est formé par les initiales des prénoms des épouses des cinq chimistes américains qui ont collaboré à la découverte de la fibre, à savoir **N**ancy, **Y**vonne, **L**ouella, **O**livia et **N**ina.



Cristaux et polarisation

Idéalement, l'observation des cristaux nécessite l'utilisation d'un microscope équipé pour la polarisation. Certains appareils récents disposent d'un kit polarisant additionnel, et peu coûteux. Avec beaucoup de produits, l'évaporation à froid (EF) donne des cristaux ; l'évaporation rapide à chaud (ERC), donne des arborescences (dans ce dernier cas, toujours couvrir avec une LCO).

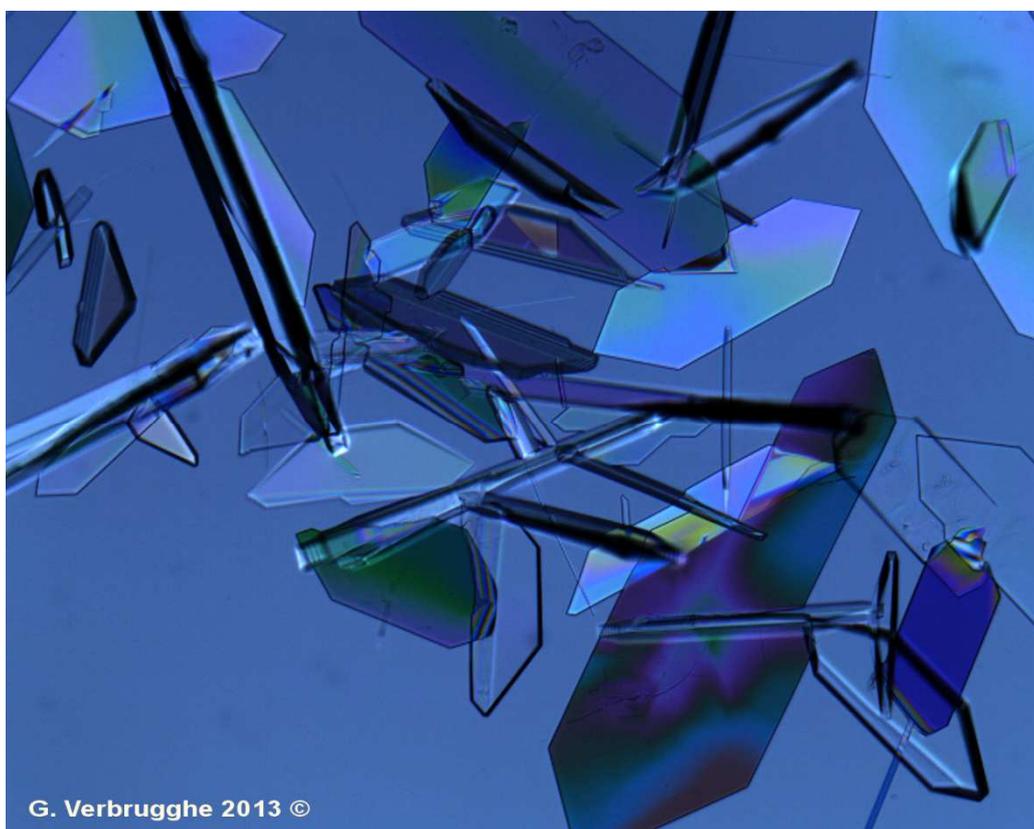
En principe, toute substance pure, réduite en poudre, peut être examinée au microscope. Certains corps pulvérulents ne donneront pas des formes cristallines bien nettes. Dans d'autres cas, le spectacle va s'avérer très intéressant, même si on ne dispose pas de la polarisation.



◀ cristallisation de paracétamol pur ▲ (le solvant est l'eau).

MODE OPÉRATOIRE 01

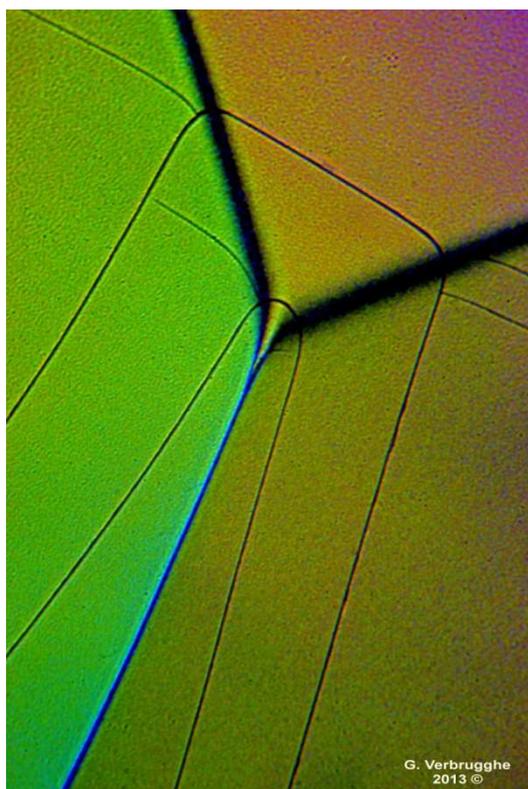
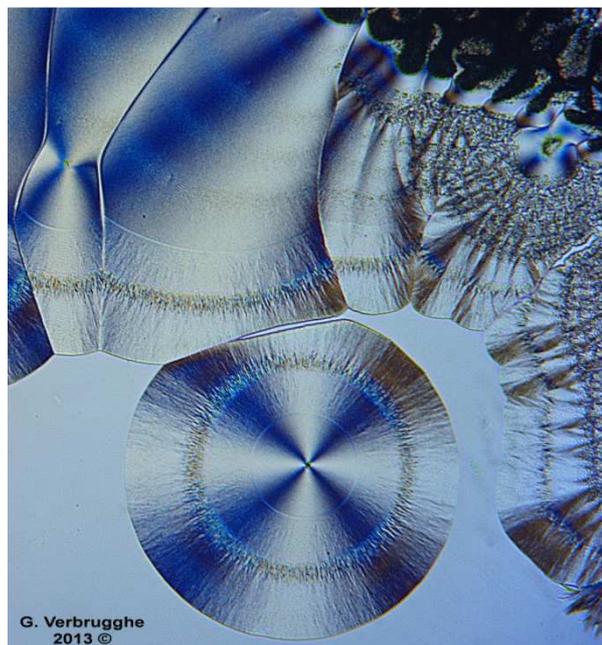
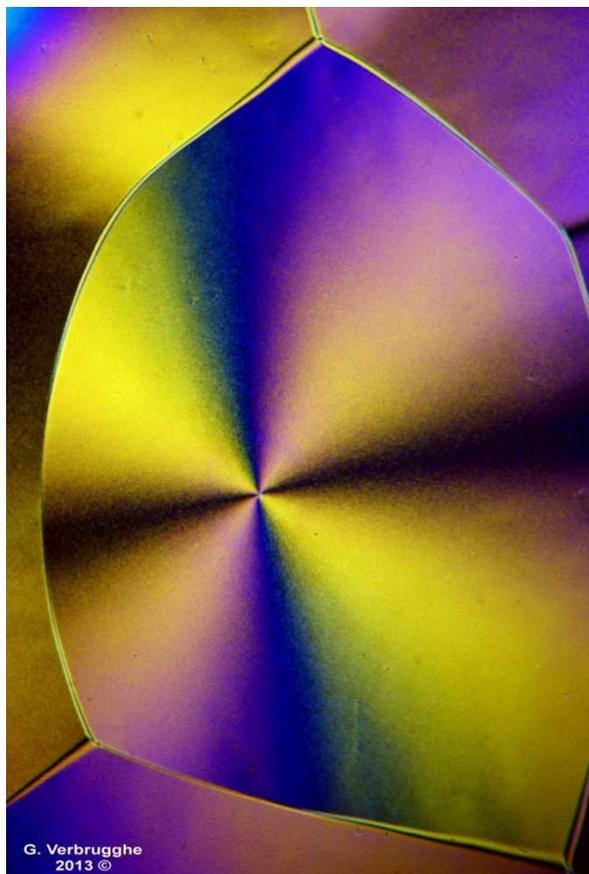
- ++ Déposer un peu de « poudre » sur la LPO.
- ++ Poser une LCO et observer à sec.



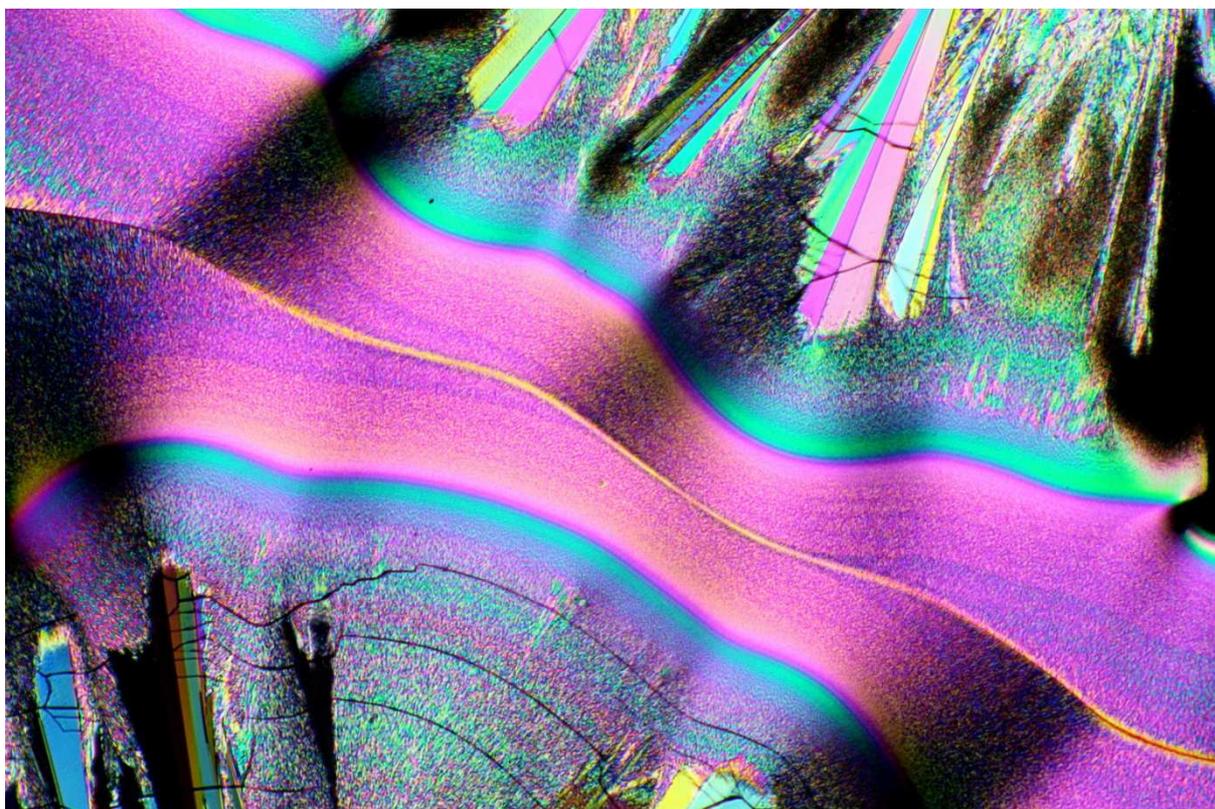
▲ Cristaux d'hydroxyde de sodium (soude) → le solvant est l'eau.

MODE OPÉRATOIRE 02

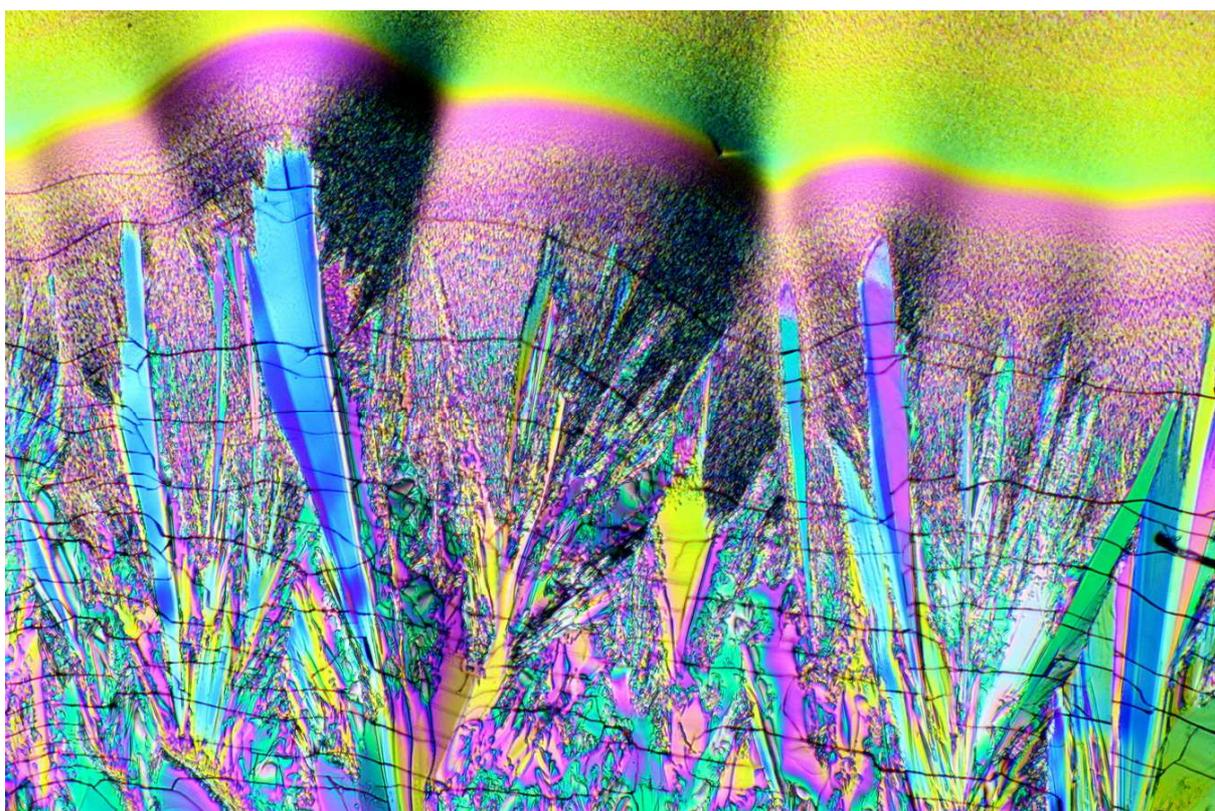
- ++ Dissoudre le produit choisi dans le solvant approprié (souvent l'eau, parfois l'alcool).
- ++ Placer une goutte de la solution sur une LPO.
- ++ Laisser le solvant s'évaporer naturellement sur la lame.
- ++ Poser une LCO et observer à sec.
- La multiplicité des formes est très grande, et diffère selon chaque substance.
- En polarisation, très grande diversité de couleurs également.



4 photos de cristallisation de la vitamine C pure (de synthèse), soluble dans l'eau.



▲ Mélange d'acide ascorbique (vitamine C) et de menthol - photos P. Leroy ▼



Quelques autres substances à observer, et faciles à trouver : sucre, sel marin, salpêtre (nitrate de potassium), lugol (iode), bicarbonate de soude, caféine, sulfate de zinc, vanilline.

Acide benzoïque en poudre + alcool à 95°.

Sulfate de cuivre : solution aqueuse à 5 % (EF) ou solution saturée (ERC).

Aspirine (acide acétylsalicylique) : solution aqueuse ou éthylique.

Benzaldéhyde en solution alcoolique (éthanol).

MA BIBLIOTHÈQUE PERSONNELLE POUR LA MICROSCOPIE

- 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.
- BAILENGER J.**, 1973 - *Coprologie parasitaire et fonctionnelle*, Bordeaux, Drouillard, 373 p.
- BAILENGER J.**, 1952 - *Atlas de travaux pratiques de parasitologie humaine*, Bordeaux, 75 p.
- BASSO M.T.**, 1999 - *Manuale di Microscopia dei Funghi*, vol. 1, Mykoflora, 302 p.
- BASSO M.T.**, 2012 - *Manuale di Microscopia dei Funghi*, vol. 2, Mykoflora, 581 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.
- BLASZKOWSKI J.**, 2012 - *Glomeromycota*, Institute of Botany, Krakow, 303 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. Ghyselinck, 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, Baillière, 406 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 Hymenomyces*, Berlin, Cramer, 488 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2012 - *Citology and Plectology of the Hymenomyces*, (2nd revised edition), Berlin, Cramer, 520 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2009 - *Methods for working with Macrofungi*, IHW Verlag, 88 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2012 - *Grossspilze im Mikroskop*, IHW Verlag, 176 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.
- GARBAYE J.**, 2013 - *La symbiose mycorhizienne, une association entre les plantes et les champignons*, Ed. Quae, 253 p.
- GIROD P.**, 1895 - *Manipulations de botanique*, Paris, Baillière, 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.
- TROUËSSART 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.

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 François CORHAY - francois@corhay.eu

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

André FRAITURE, président

Jardin Botanique National de Belgique, Domaine de Bouchout

B-1860 MEISE fraiture@br.fgov.be

Paul PIROT, vice-président

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

Raymond NOTTE, secrétaire fb494497@skynet.be

Avenue du Champ des Monts, 6 - B-1300 WAVRE

Claude QUINTIN, trésorier

Rue du Pays Minier, 9 – 4400 FLEMALLE claude.quintin@teledisnet.be

Marcel LECOMTE, rédacteur en chef

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

Alfred LOSS

Camille MERTENS

Joseph PELLICANI

Jean-Marie PIRLOT

David VALLEE

Nous publions un bulletin annuel de 72 pages en format A4.

Pour tout renseignement consulter Raymond Notte par mail, ou notre site.

Éditeur responsable : A.M.F.B. (Association des Mycologues Francophones de Belgique)
Rédacteur en chef : Marcel Lecomte
Publié le 15 mars 2014

Les articles signés engagent uniquement la responsabilité de leurs auteurs.