

# **ESSAI de synthèse des techniques à employer pour arriver à des préparations définitives de pièces traitées pour une coupe au microtome automatique.**

texte de Marcel LECOMTE

Les règles générales et explications théoriques sont à rechercher dans nos fiches techniques publiées sur notre site, et sont basées sur les recherches et théories de DEFLANDRE, SEGUY, LANGERON & LOCQUIN...

Nos chaleureux remerciements sont adressés à G. FANNECHERE qui nous a fait découvrir le Poly Ethylène Glycol, à A. AYEL et J.L. JALLA qui nous ont révélé le PolyVinylic Alcool, à Paul LEROY, pour ses longues et patientes explications relatives au montage de préparations définitives, surtout entomologiques, et au Dr. A. VANDERWEYEN qui nous a enseigné comment utiliser un microtome de laboratoire.

## **MODUS OPERANDI :**

La procédure indiquée en rouge est celle que nous avons mise au point par expérimentation directe et personnelle !

Nous avons travaillé sur des chapeaux de lactaires, en pratiquant des coupes transversales de manière à pouvoir mettre en évidence la trame des lames de l'hyménophore, (sujet difficile s'il en est), de même que les basides, pleurocystides et cheilocystides, éléments que nous avons posés comme objectifs obligatoires et incontournables de notre recherche, le TOUT visible dans une seule préparation ou figurent 8 à 10 lames !

Notre volonté d'utilisation d'un milieu d'inclusion à solvant aqueux se justifie par le fait que l'inclusion à la paraffine exige une déshydratation totale par l'alcool, le trichloréthylène et le xylol, qui génèrent une déformation complète des structures fragiles de l'hyménophore (basides, cystides), et qui peuvent être néfastes pour la santé. Cela implique en outre un mode opératoire lourd et très long, à même de rebuter les plus courageux.

L'utilisation du PEG a sensiblement raccourci la procédure, même si cela demande encore du temps, de la patience et du courage ....

<p>travail en MILIEU AQUEUX pour finaliser dans la glycérine gélatinée, le PVA (Alcool PolyVinylique), le lactochloral, le conservateur de Hoyer....</p>	<p>travail en MILIEU DESHYDRATE pour finaliser dans le Baume du Canada</p>
<p><b>1. LA FIXATION</b></p>	
<p>1. Diviser l'objet à fixer en morceaux d'environ ½ à 1 cm<sup>3</sup> (parallélépipèdes rectangles de 2 à 3 cm de long).</p>	
<p>2. Plonger dans le fixateur durant 24 heures : notre choix s'est porté sur le Bouin-Hollande et sur l'AFA (Alcool Formolé Acétique). La fixation peut se faire à l'étuve, à 37-40°, dans des flacons bouchés (genre flacons à prélèvements) ou des flacons de Borrel, et pourra être ramenée alors à 8 -12 heures.... Nous utilisons personnellement des éprouvettes bouchées, de 10 cc utiles.</p>	
	<p>2b. Plonger les fragments dans le mélange de Bouin-Hollande (picro-formol cuprique), de Dubosq-Brasil (conviennent surtout pour tissus végétaux) ou dans le picroformol de Bouin : (pour les tissus animaux).</p>

3. Laver 1 fois à l'eau distillée (dans une éprouvette, avec 5 à 10 cc par pièce à laver).	3. Laver à l'alcool.
4. Couper les pièces en fragments encore plus petits : cubes de 3 à 5 mm de côté.	
5. Les plonger à nouveau dans le fixateur choisi durant 24 heures.	
6. Laver 3 fois à l'eau distillée.	6. Laver 3 fois à l'alcool.
7. Les pièces fixées seront soumises à la coloration le plus vite possible.	7. Les pièces fixées peuvent se conserver quelques jours dans l'alcool, mais il vaut mieux inclure le plus vite possible.
8. Il faut savoir que les pièces soumises à l'inclusion peuvent se conserver quasi indéfiniment quand elles sont incluses dans le milieu choisi.	
<b>2. LA COLORATION de masse</b>	
Les essais ont été réalisés avec les colorants suivants : bleu de méthyle acétique, orange de méthyle, violet de gentiane, safranine, vert de méthyle, carmin acétique ; au départ, le colorant est redilué 2 à 10 fois par rapport au flacon préparé.	
1. Plonger les pièces dans 5 à 8 cm <sup>3</sup> de colorant dilué et les laisser séjourner 24 heures (dans une éprouvette bouchée).	Lorsqu'on travaille à la paraffine, il est d'usage d'effectuer les colorations après l'inclusion et la coupe, lorsque les coupes sont collées sur la lame de verre (cependant, on peut aussi effectuer une coloration de masse si on le souhaite).
2. Rincer 3 fois de suite à l'eau distillée.	
3. Sécher passivement sur un papier absorbant.	
4. Les pièces fixées seront soumises à l'inclusion le plus vite possible.	
<b>3. L' INCLUSION</b>	
Dans le PEG (Poly Ethylène Glycol)	Dans la PARAFFINE
1. Les pièces ont été rincées 3 fois dans l'eau distillée, puis égouttées.	1. Laver et placer dans l'alcool à 96°
	2. Répéter les bains d'alcool de 3 à 9 fois, selon la taille de l'objet à déshydrater.

	<p>3. Terminer par un bain de trichloréthylène, qui est préférable à l'éthanol absolu.</p> <p>On peut aussi déshydrater au dioxane ou à l'acétone : ces deux produits présentent même des avantages incontestables, MAIS ils se révèlent dangereux à l'utilisation si on ne dispose pas d'un laboratoire équipé.</p> <p>N B : toutes ces opérations sont effectuées sur une période de 24 heures !</p>
<p><b>A partir d'ici, tout le travail s'effectue sur plaque chauffante !</b> Nous utilisons à cet effet une plaque chauffante de laboratoire (qui a l'avantage d'être munie d'un thermostat) ou, à défaut, une plaque chauffante de cafetière électrique de 750 W).</p>	
<p><b>2. Faire fondre du PEG 4000</b> pur dans une coupelle en pyrex (on obtient un liquide complètement transparent) : le point de fusion est à 54-58° C.</p>	<p>4. Préparer un mélange de trichloréthylène (25 %) et de paraffine (75 %) et maintenir légèrement au-dessus du point de fusion (+/- 55 °) ; y laisser les pièces au moins 24 heures, jusqu'à élimination complète du solvant.</p>
<p><b>3. Y laisser les pièces durant 6 heures</b> afin de permettre une bonne imprégnation.</p>	<p>5. Transférer ensuite dans 1 bain de paraffine pure, bien fondue, durant le même laps de temps au moins.</p>
<p><b>4. Faire fondre du PEG 20000 pur</b> dans une autre coupelle en pyrex (le point de fusion est à 58-63 ° C.) <b>et y placer les pièces durant 1 heure</b> en les sortant directement de l'autre bain.</p>	
<p>IMPORTANT :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• la pince qui sert à passer d'un bain à l'autre doit être bien chaude également</li> <li>• l'objet doit être bien immergé dans le liquide d'inclusion</li> </ul>	
<p><b>5. Verser le PEG 20000 bien chaud dans un moule</b> (les bacs à glaçon en PVC conviennent parfaitement) <b>et y</b></p>	<p>6. Verser la paraffine chaude dans un moule, y placer les pièces, et les orienter.</p>

<p>placer la pièce en prenant bien soin de l'orienter pour les futures coupes (c'est assez facile car le liquide est transparent à chaud).</p>	
<p>6. Refroidir le moule à l'air puis à l'eau (le PEG prend une coloration beige jaunâtre) ATTENTION ! très peu de temps en contact avec l'eau, qui est le solvant du PEG.</p>	<p>7. Refroidir le moule à l'air puis à l'eau.</p>
<p>Ces opérations (2 à 6) seront effectuées en 7 heures !</p>	<p>Ces opérations (4 à 7) vont demander au moins 48 heures !</p>
<p>7. Démouler et essuyer les blocs soigneusement.</p>	<p>8. Démouler.</p>
<h3>4. La COUPE</h3>	
<p>Elle est effectuée à l'aide d'un microtome automatique du modèle MI NOT.</p>	
<p>1. La lame du microtome doit être parfaitement aiguisée (c'est la condition première et essentielle de coupes régulières : il faut apporter un soin minutieux et extrême à l'aiguisage).</p>	
<p>2. Préparer le bloc de PEG ou de paraffine :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• le tailler en forme de prisme de +/- 1 cm<sup>3</sup>, selon la taille du fragment inclus et déjà amincir autour de la pièce qui est visible dans le substrat)</li> <li>• effectuer cette opération à l'aide d'une lame très coupante</li> <li>• l'excédent de PEG ou de paraffine sera soigneusement récupéré pour être fondu et réutilisé</li> <li>• nous avons choisi, dans un premier temps, de conserver entière la surface d'appui du bloc brut, afin de garder une meilleure attache sur le support du microtome</li> </ul>	
<p>3. Fixer le petit prisme obtenu sur le plateau du microtome, préalablement enduit de produit chauffé, pour faciliter l'adhérence ou directement chauffé à la flamme. ATTENTION ! il faut apporter beaucoup de soin à cette opération de manière à ce que le bloc ne se détache pas lorsque le microtome fonctionne).</p>	
<p>4. Refroidir la pièce métallique à l'eau puis mettre le plateau support en place.</p>	
<p>5. Régler la molette d'épaisseur des coupes.</p>	

<p><b>6. Effectuer les coupes</b> (ne pas aller trop vite pour tourner la manivelle : une coupe par seconde au grand maximum...).</p>	
<p>ATTENTION : le rasoir (la lame) doit toujours rester très propre ! Nettoyer chaque fois que c'est nécessaire à l'eau (pour le PEG) ou au toluène (ou au xylol) pour la paraffine.</p>	
<p><b>7. Les coupes s'enroulent sur elles-mêmes comme des feuilles de papier à cigarettes ! Les plonger telles quelles dans une coupelle d'eau distillée glycérinée à 0,1 %,</b> et elles se déroulent naturellement tandis que le PEG fond.</p>	<p>Les coupes s'enroulent sur elles-mêmes comme des feuilles de papier à cigarettes ou sont plissées ! Les plonger telles quelles dans une coupelle d'eau distillée albuminée ou glycérinée à 0,1 %.</p>
<p><b>5. Le COLLAGE</b></p>	
<p><b>1. Sortir la coupe et l'étaler sur une lame porte-objet</b> dans une nouvelle goutte d'eau glycérinée (travailler avec une aiguille entomologique très fine (ou une aiguille d'acupuncture) et au binoculaire si ce sont des pièces délicates <b>à</b> ici pour mettre en place les lames du champignon).</p>	<p>1. Sortir la coupe et l'étaler sur une lame porte-objet dans une nouvelle goutte d'eau glycérinée.</p>
<p><b>2. Laisser évaporer quasi complètement,</b> mais en gardant la coupe humide, sinon on verra apparaître des bulles d'air dans la préparation (surtout, ne pas chauffer).</p>	<p>2. Passer à l'étuve pour rendre la paraffine molle.</p>
	<p>3. Dissoudre la paraffine par 3 bains successifs dans un solvant : benzène, xylol, toluène ou trichloréthylène (on utilise pour cela des cuvettes à coloration ou des tubes de Borrel).</p>
	<p>4. Rincer trois fois dans de l'éthanol ou du méthanol. 5. Laver à l'eau durant 15 minutes (sauf si le colorant est une solution alcoolique).</p>
<p><b>6. La COLORATION des coupes</b></p>	
<p>Utiliser à cet effet des cuvettes à coloration si on travaille sur plusieurs lames à la fois (dans ce cas précis, les coupes doivent être bien collées, sinon elles risquent de se détacher du support), ou déposer une goutte de colorant sur la lame.</p>	

Travailler de préférence avec des colorants aqueux !	Colorants aqueux ou alcooliques (voir point 5 ci-dessus) !
1. Si on estime qu'il ne faut pas recolorer, passer directement au montage.	
1a. S'il nous apparaît intéressant de recolorer au rouge Congo SDS, au bleu de crésyl ou au bleu coton lactophénol, poser directement une goutte sur la lame de verre.	1. Colorer.
2. Rincer à l'eau.	2. rincer à l'eau ou à l'alcool
3. Eliminer avec un papier absorbant l'essentiel de l'eau, sans toucher la coupe.	3. déshydrater dans un bain d'alcool à 80°
	4. déshydrater dans un second bain d'alcool à 90-95°
	5. déshydrater dans un 3 <sup>ème</sup> bain de trichloréthylène
	6. plonger dans un bain de xylol
	7. plonger dans un bain de xylol et de baume du Canada (50-50) durant 2 heures
<b>7. Le MONTAGE de la préparation</b>	
Dans un milieu aqueux, on va parler de « préparations semi-définitives » qui vont durer quelques années, 3 - 5 - 10 - 15 ans, selon le milieu utilisé.	Dans le baume du Canada, on va parler de « préparations définitives » car, conservées dans de bonnes conditions, elles vont durer des dizaines d'années,..
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Travailler avec des lames couvre-objet rondes.</li> <li>• Si ce sont des coupes qui ne nécessiteront pas d'observation à des grossissements importants, on peut poser la lame simplement.</li> <li>• Sinon, il est nécessaire d'utiliser un moyen de pression pour bien aplatir le tout (pince à linge « fatiguée » par exemple).</li> <li>• La taille de la goutte du milieu d'inclusion est très importante : il faut qu'il y ait le moins de débordement possible à si non, il est impératif de nettoyer ! (seules l'expérience et la pratique répétées permettent d'arriver au bon dosage).</li> </ul>	
1. Poser la goutte bien dosée du milieu choisi (conservateur de Hoyer, PVA lactophénolé, glycérine gélatinée, lactochloral) sur la coupe.	1. Poser la goutte de Baume du Canada.

2. Poser la lame couvre-objet de biais afin d'éviter la formation de bulles.	
3. Placer l'instrument de pression choisi et le laisser durant 2 à 3 heures.	
4. Eliminer le liquide de débordement à l'eau (sauf pour le PVA ou le Hoyer : il servira de lutage).	4. Eliminer le surplus de baume au xylol (sauf si on veut le laisser comme lutage : mais pas conseillé, car cela colle aux doigts durant des semaines !).
	5. Nettoyer les traces blanches à l'eau.
5. Luter au vernis à ongles, si nécessaire...	
6. Placer les étiquettes : y indiquer la numérotation dans la boîte de rangement, le nom de la pièce, le colorant utilisé, la référence vers un carnet de notes ... C'est très important, sinon la préparation n'aura aucune valeur scientifique ! Ecriture à l'encre indélébile...	
7. Vernir les étiquettes au vernis à ongles transparent de manière à pouvoir nettoyer la lame chaque fois qu'elle est utilisée, et sans dommage pour les étiquettes.	