

Micro Coupes à l'aide de Polyéthylène Glycol (PEG)

par Georges FANNECHERE

Pour effectuer une préparation de lames à fin d'examen microscopique, il est le plus souvent procédé par écrasement ou par percussion, éventuellement avec une dilacération préalable. Mais ces méthodes qui permettent d'examiner facilement et rapidement les spores, et quelquefois certaines cystides, a cependant le gros inconvénient de casser les éléments, d'éjecter les spores des stérigmates et de modifier fortement leur disposition.

C'est pourquoi il est toujours préférable d'effectuer une coupe. Mais le problème reste que cette opération demeure un exercice difficile parce que la coupe doit être la plus mince possible.

Si la coupe « à la volée », avec une lame souple de rasoir, est une technique facile à mettre en œuvre, ses résultats sont très aléatoires. La simple torsion de la lame souple modifie l'épaisseur de la coupe de plusieurs dixièmes de mm. Quant à la coupe guidée « contre l'ongle », elle nous a donné des résultats certes quelquefois presque convenables, mais rarement, il faut l'admettre.

Nous avons testé successivement plusieurs dispositifs d'aide à la coupe microscopique, dits « microtomes » :

Dans un premier temps nous avons utilisé un microtome de type « Ranvier » qui est le plus simple, mais qui ne fut pas vraiment satisfaisant. Nous avons alors construit un microtome « à rampe ». Comme pour le microtome de Ranvier, l'échantillon est coincé dans un bloc de mousse de sureau, mais malgré un réglage plus facile, la coupe restait difficilement régulière, car le matériau, trop mou, glissait sous la lame.

Nous avons alors cherché une méthode permettant, sans le dégrader, de rendre le matériel plus ferme à la coupe.

A/ La paraffine

On fait dessécher l'échantillon que l'on fige ensuite dans un bloc de paraffine fondue. On effectue la coupe dans le bloc, puis on dégage le copeau dans un bain de xylène. Inconvénients : préparation longue et détérioration de l'échantillon par le dessèchement et le xylène. Nous avons donc écarté cette technique.

B/ L'alcool polyvinylique (PVA)

Cette fois, l'échantillon est incorporé au PVA à l'état humide, et le copeau dégagé à l'eau. On évite alors la plupart des inconvénients de la méthode à la paraffine. Une fois sec, l'échantillon est enrobé d'une mince couche de PVA qui lui donne une meilleure rigidité pour la coupe. Reste que cette méthode demande un délai de séchage d'au moins 24 heures, donc inutilisable en extemporané.

C/ Le Polyéthylène Glycol (PEG)

Le PEG (Polyéthylène Glycol) 4000 se présente sous forme de petits copeaux, de consistance rappelant la paraffine. Nous avons choisi le PEG 4000 qui se solidifie à 53-56 °C.

Matériel nécessaire (ou très recommandé)

- Une chaufferette réglable autour de 50-70 °C
- Un ou deux verres de montre.
- Microtome, aiguille emmanchée, pincettes ...

Méthode proposée

- Tailler un petit morceau du matériel.
- Mettre un verre de montre sur la plaque chauffante.
- Mettre une pincée de PEG dans le verre de montre : la fusion est immédiate (comme de la bougie, mais en plus fluide).
- Y plonger l'échantillon et bien le retourner pour qu'il s'imbibe entièrement du PEG. L'opération est aisée, compte tenu de l'avidité du PEG pour l'eau.
- Retirer le morceau enrobé et le poser sur une lame pour le laisser durcir en refroidissant. Il se fige comme de la paraffine.
- L'insérer dans le microtome (dans la fente d'une mousse synthétique ou de sureau) et prélever un copeau.

Lorsque la coupe a été effectuée :

- Mettre quelques gouttes d'eau sur une lame.
- Y faire tomber le copeau, puis écarter la mousse en surplus qui se sépare toute seule de l'échantillon.
- Relaver soigneusement pour enlever le maximum de PEG dilué.
- Recouvrir d'une lamelle (indispensable, car si la coupe est très mince, elle se dessèche très vite), sans trop presser afin de ne pas abîmer la structure de l'échantillon.
- Observer au microscope immédiatement.

Caractéristiques générales du PEG :

Fusion au dessus de 53-56 °C.

Retrait à la solidification : environ 7 % du volume.

Toxicité : aucune. Ce produit est utilisé pour la fabrication de suppositoires, pommades, etc...

Conservation : à l'abri de l'humidité.

Avantages du PEG : préparation très rapide (par rapport au PVA, par exemple, qui demande plus de 24 h de séchage)

Inconvénient : la plaque chauffante est nécessaire pour faire du bon travail

Conservation des coupes : aucun essai effectué à l'heure actuelle avec le PEG. Noter que des solutions ont été testées avec l'alcool polyvinylique lactophénolé (PVALPh) (1)

Remarques :

Le matériel

- Il convient d'avoir du matériel pas trop humide. Sinon il est préférable de le faire s'égoutter sur un morceau de buvard. Il convient aussi d'éliminer, pour les mêmes raisons, toutes les parties inutiles, afin de ne pas apporter un complément d'eau inutile et gênant. En effet le PEG étant très hygrophile, il risque de ne plus durcir immédiatement avec un échantillon trop imbu.
- En cas d'insuffisance d'enrobage, on peut replonger rapidement l'échantillon dans le PEG juste fondant.
- Il est important de bien attendre la solidification complète du PEG

La chaufferette

- La plaque chauffante d'une cafetière électrique peut dépanner, en coupant l'alimentation de temps à autre.
- Autre solution : le fer à repasser électrique, qui a l'avantage d'être réglable en continu.

Le PEG

- Le matériel enrobé de PEG peut être fait à l'avance et conservé quelque temps à l'abri de l'humidité.
- On pourrait aussi faire une inclusion totale dans un bloc de PEG. Il n'est pas certain que ce soit toujours la meilleure solution, car le produit semblant très isolant, le temps de refroidissement fera perdre de l'intérêt à la méthode.

Le microtome

Le microtome de « Ranvier » est un tube muni d'une collerette et d'un piston à vis. Le matériel est coincé dans un bloc de mousse de sureau et est poussé vers l'extérieur par le piston. Si, par exemple, le pas de vis est de 1 mm, 1/10^{ème} de tour fait avancer, en théorie, le bloc de 0,100 mm. Si son usage est une avancée certaine par rapport à la coupe « à la volée », nous ne l'avons pas trouvé assez satisfaisant.

Le microtome « à rampe » : deux rampes inclinées sont superposées tête-bêche. Lorsque l'on écarte les deux plans inclinés, la hauteur diminue. On obtient facilement des incréments de l'ordre de 1/100^{ème} de mm (notre microtome a un rapport 130/1, c'est à dire que pour un tour complet de la molette, la platine baisse de 130 microns).

Le microtome à piston a l'avantage de la simplicité et de la légèreté. Le microtome à rampe permet des incréments plus précis et donc de meilleurs résultats. En fait, le microtome de Ranvier a été conçu pour être utilisé avec de la moelle de sureau. Le faible diamètre de la moelle de sureau ne lui donne pas assez de résistance à la flexion, et elle a tendance à se coucher lors de la coupe, d'autant plus que sa consistance n'est pas toujours constante. Nous pensons qu'un microtome de type « Ranvier amélioré » devrait, à coût raisonnable, donner de meilleurs résultats : on garderait la technique du piston et de la vis au pas de 1 mm, mais on augmenterait le diamètre du piston à 15 ou 20 mm, ce qui donnera plus de rigidité à la mousse synthétique.

Prix : Microtome de Ranvier : de 20 à 150,00 Euro

Microtome à rampe professionnel : au moins 2.000,00 Euro

La mousse

- La moelle de sureau a été avantageusement remplacée par un bloc de mousse synthétique : l'avantage est que nous avons alors affaire à un matériau de consistance constante, et permettant de tailler des blocs de la taille désirée.
- Toutes les mousses synthétiques ne conviennent pas. En fait, tout dépend du matériel à trancher (par ex. pour *Panellus stypticus* et *Tremella mesenterica*, nous avons dû prendre une mousse assez dure). Nous nous sommes aperçu que la coupe était d'autant plus aisée que le bloc de mousse était plus épais. En effet, un bloc de mousse trop petit est trop souple (« compliant » en jargon technique anglais) ; un support plus rigide permet une attaque franche de la lame, pour obtenir un copeau de moins de 0,1 mm.
- Des essais sont nécessaires pour trouver la mousse de consistance optimale. Nous avons essayé la mousse de fleuriste et des mousses plus denses (polystyrène expansé, extrudé... notre menuisier nous a fourni quelques chutes pour essais). La mousse de type polystyrène extrudé, assez ferme, semblerait donner les meilleurs résultats.

Le rasoir

- La lame de rasoir « de sûreté » est à proscrire car la souplesse de la lame nuit à la régularité de la coupe. On choisira un rasoir à manche (« coupe chou »), à lame bien droite, rigide et bien affûtée.
- On obtiendra de meilleurs résultats en plaçant la lame en biais par rapport au mouvement et en la tirant légèrement en arrière à fur et à mesure de la coupe.
- L'épaisseur d'une coupe devrait faire 0,05 mm au plus (voisine du diamètre d'un cheveu).
- Lorsque la coupe est "réussie", le copeau s'enroule comme une écorce de cannelle, sur un diamètre d'environ 1 mm.

Divers

Nous avons obtenu une coupe réussie sur *Tremella mesenterica* (à l'état frais !) pourtant très élastique.

La vue ci-contre montre une fraction de la coupe d'une lame d'un petit exemplaire d'*Agrocybe pediades* (objectif x40 , Canon G2 , mise au point manuelle, 1/10 sec, f 1 : 2.2).

Lorsque le matériel est très clair, il est difficile, sans binoculaire, de distinguer le fragment de matériel de la mousse. On peut alors déposer le colorant sur le matériel avant de l'enrober de PEG, ce qui se fait sans difficulté, puisque les colorants sont pratiquement tous solubles dans l'eau.

Bibliographie :

(1) (1) : Fiche technique du PVA par Marcel LECOMTE

(voir http://users.skynet.be/Champignons_passion ou mlecomte@skynet.be)

(2): Introduction à l'étude microscopique des champignons par Z.de Izzarra, S.M. du Poutou

(3) Les deux microtomes photographiés sont de fabrication personnelle

Annexe :

Préparation par dissociation et écrasement

Rappelons cette technique simple et rapide, conseillée aux débutants, pour la plupart des espèces courantes (c'est à dire suffisamment fragile pour être écrasées sans difficulté) :

- Prélever un échantillon de matériel : plus il sera petit, meilleurs seront les résultats (la grosseur d'une tête d'épingle est un maximum).
- Dilacérer éventuellement le matériel (aiguilles emmanchées et loupe binoculaire conseillées).
- Poser l'échantillon sur une lame, mettre une goutte d'eau ou de colorant et le recouvrir d'un couvre lame.

Pour écraser, on peut :

- soit poser un morceau de papier absorbant (hygiénique ou ménager) intermédiaire et tapoter doucement avec le bout du doigt sur la lamelle (attention, procéder avec grande délicatesse compte tenu de la fragilité du verre)
- soit utiliser une gomme emmanchée ou encore la gomme d'un stylo mine rétractable.

Il est généralement préférable de faire la première observation sans colorant ni réactif. Si l'on désire rajouter du colorant sur la même préparation, poser une goutte de colorant sur le bord du couvre lame, tapoter pour aider l'absorption par capillarité, et récupérer l'excédent de colorant par l'autre côté de la lamelle avec un morceau de papier buvard. Pour être utilisable, l'épaisseur de la préparation ne doit pas dépasser celle de une ou deux spores, c'est à dire quelques dizaines de microns (à l'œil, elle doit être presque transparente, puisque le microscope est utilisé par transmission).