

Pratique de la microscopie

par Jean LACHAPELLE (†)

Ce texte constitue une synthèse de l'exposé présenté lors de la séance de travail du Cercle de Mycologie de Bruxelles le 18 novembre 2000. Cette conférence était illustrée par une présentation du matériel et accompagnée d'exercices pratiques.

Nous remercions Marcel LECOMTE d'avoir bien voulu faire une lecture attentive de notre texte et d'avoir suggéré de judicieuses additions.

I. - CONDITIONS GENERALES

La microscopie est un exercice difficile qui demande de la concentration et qui sollicite beaucoup les yeux.

- concentration : avoir l'esprit disponible, donc ne pas être dérangé par l'environnement ; être confortablement installé, avec les accessoires et outils bien rangés autour de soi.

- confort des yeux : installation à bonne hauteur pour les yeux ; important : situation plutôt peu éclairée, la lumière venant de l'arrière, l'éclairage du plan de travail éteint lors de l'observation.

Recommandation : être très méthodique et très ordonné ; l'expérience aidant, on peut parfois se permettre quelques libertés avec les règles générales ; s'obliger à travailler avec méthode et avec soin (acquérir des habitudes, des réflexes).

II. - MATERIEL

Pour pratiquer la microscopie dans de bonnes conditions il faut :

- une lampe de bureau avec loupe.
- un stéréoscope, de préférence éclairé par un illuminateur.
- un microscope.

Tant la loupe stéréoscopique que le microscope doivent être installés sur une surface très stable, toute vibration perturbant évidemment l'observation (à cet

égard, on peut même envisager de fixer les appareils) ; il faut aussi penser à ventiler suffisamment l'ampoule et le système électrique (transformateur, etc.) se trouvant éventuellement dans la base du microscope.

- du petit matériel : aiguilles emmanchées et aiguilles lancéolées, des lames de rasoir mécanique (suffisamment rigides, bien aiguisées), une pince à pointes fines (brucelles).
- des lames calibrées : lames porte-objet aux dimensions standard de 3 x 1 inches = environ 76 x 26 mm, d'épaisseur 0,8 à 1 mm et lames couvre-objet aux dimensions de 1,8 x 1,8 ou 2 x 2 cm (des dimensions plus petites gênent la manipulation, des dimensions plus grandes introduisent une difficulté dans la préparation, sauf s'il s'agit de préparer un frottis de spores) ; notez également que les lames couvre-objet rondes sont utilisées pour les préparations définitives !
- du papier essuie-tout (certains ont adopté le papier-toilette !) pour éponger l'excédent de milieu d'observation, de colorant, etc. ; un vieil essuie-mains pour se débarrasser de toutes les saletés indésirables ; des feuilles de papier (1/2 et 1/4 de feuilles de format A4) pour y déposer les champignons à observer ou les préparations en cours, afin de ne pas salir la surface de travail et le stéréoscope.

III. - REVELER L'INFINIMENT PETIT AVEC UNE OPTIQUE ET UN ECLAIRAGE APPROPRIES

- Principe : dans les tâches journalières et dans la vie courante, on jongle avec des longueurs qui se mesurent en kilomètres, en mètres et, à l'occasion de travaux précis, en centimètres et en millimètres. Ici, on va opérer avec des micromètres (= microns). Le micron (μm) est la millième partie du mm. Beaucoup d'hyphes ont un diamètre moyen de 2 μm ; les petites spores ont un diamètre de moins de 5 μm ; il faut donc mettre côte à côte 500 hyphes pour occuper un mm ! Ceci donne - sans jeu de mot - la mesure de ce que l'on demande à son microscope et du soin qu'il faut apporter à l'observation !
- Pour y arriver, on dispose à la fois d'une optique grossissante et d'une source de lumière.
- Oculaires (2 sur les microscopes modernes) et objectifs (3 à 5) constituent les éléments essentiels de l'optique. Sont indispensables : un objectif faible (10 x) pour repérer les éléments de la préparation et deux objectifs d'observation : l'un à sec (40 x), l'autre à immersion (100 x).
- Un ensemble de moyens qui génèrent la lumière et la concentrent : une source lumineuse incorporée, un diaphragme de champ, un condenseur (ou condensateur)

et un diaphragme d'ouverture (ouverture dite "numérique"). Un système de mise au point : une avance rapide et une avance lente.

- On peut affirmer - et il faut bien s'en pénétrer - qu'une bonne observation résulte pour moitié de l'optique et pour moitié du bon emploi de l'éclairage.

Rappel : lors des observations, la lumière ambiante doit être éteinte à la fois pour ne pas fatiguer la vue et ne pas laisser entrer dans les appareils une lumière parasite.

- Emploi du diaphragme de champ : pleine ouverture pour l'objectif 10 et 40 x, ouverture réduite pour le 100 x.
- Emploi du diaphragme d'ouverture : pleine ouverture pour le maximum de résolution, donc de détails, ouverture \pm fermée pour accroître le contraste et la profondeur de champ mais cela aux dépens de la résolution.
- Donc, la procédure permettant une bonne observation est : une bonne préparation (on va y revenir en détail), repérer les éléments à observer avec l'objectif faible, observer avec l'objectif fort à sec ou à immersion et ici régler très soigneusement l'intensité de l'éclairage, la résolution, le contraste et la profondeur de champ.

IV. - COMMENT REALISER UNE BONNE PREPARATION

Nous allons revenir sur chacune des étapes d'une bonne préparation : d'abord énonçons-les :

- Milieu d'observation : l'eau, soit seule, soit en mélange avec des substances qui colorent, qui dissocient ou qui provoquent une réaction significative ; selon le cas et le but recherché, on peut remplacer l'eau par l'ammoniaque ou des substances qui tendent à éclaircir, ou d'autres qui, moins volatiles, permettent une observation plus longue voire une conservation d'une certaine durée ; à l'eau, on peut aussi ajouter des substances particulières qui facilitent la pénétration, tel un mouillant.
- Pour des raisons qui relèvent de la physique, la préparation doit être aussi mince que possible (elle doit tendre vers la transparence, qui est une exigence du microscope photonique...) et le milieu, aussi peu abondant que possible.
- Méthode de prélèvement : elle est un peu différente selon la partie du champignon à observer.
- L'eau en tant qu'auxiliaire principal du préparateur : l'eau est un nettoyant, un éclaircissant et surtout un moyen de transport idéal des éléments de la préparation.

- L'outil de découpe : la lame de rasoir mécanique est efficace, pratique et bon marché.

V. - LA PRATIQUE

- Il s'agit de la préparation et de l'observation des différentes parties du champignon, étant entendu que nous n'observerons ici que des champignons agaricoïdes. On peut aisément extrapoler vers d'autres familles.
- Observation de l'hyménium (arête, faces, trame, spores), des revêtements (chapeau et stipe), des hyphes.
- Principe : il faut avoir pour objectif théorique d'isoler un élément, à savoir une cystide, une baside, etc. Il est évident qu'on n'y arrive quasi jamais, et il n'y a pas de mal à cela. Mais du moins faut-il penser à la taille de l'élément à observer : sur un mm d'épaisseur, vous trouverez côte à côte une centaine de basides ou de cystides et peut-être 100 à 200 spores. Il faut donc avoir pour objectif de prélever extrêmement peu de matière. On n'y arrive qu'en ayant recours au stéréoscope (à défaut à une forte loupe !).

Pratique du stéréoscope (loupe binoculaire)

La loupe binoculaire doit permettre, sous un grossissement de l'ordre de 10 à 50 x, de procéder à ces minuscules prélèvements. Ici, nous recommandons la règle pratique suivante : nous avons tous dans l'œil, la distance qui sépare deux traits écartés d'un mm. Il faut donc réaliser sous le stéréoscope des coupes qui, à l'œil, ont l'air d'être d'un mm mais étant grossies 10 fois, ont en réalité 100 μm d'épaisseur. Donc, par extrapolation, sous un grossissement de 50 x, la coupe qui, à l'œil, a l'air d'être épaisse d'un mm est en réalité épaisse de 20 μm . Cette coupe-ci peut être considérée comme fine, elle pourrait comporter 2 basides ou cystides côte à côte ou quelques spores seulement.

En pratique, le mm que nous appellerons "mm-oculaire" peut être découpé sous un grossissement de 10 à 20 x pour plusieurs types de prélèvements ; on ne passera à un grossissement de 50 x qui exige un très bon éclairage (utilité de l'illuminateur !) et une certaine adresse, que pour des coupes très fines dans les revêtements cuticulaires ou la trame des lames.

Sous le stéréoscope,

- on examine un premier prélèvement : on choisit une lame de l'hyménophore intacte, une partie du chapeau propre et non rongée par une limace, etc.

- on dépose alors une lame porte-objet sous le stéréoscope. A proximité d'un coin de la lame de verre, on laisse tomber une goutte d'eau : si le prélèvement est intact mais sale, on l'y débarrasse des grains de sable et autres souillures.
- à l'aide de l'index gauche, on immobilise le fragment et on y pratique les coupes : si la lamelle est réticente, on peut la faire adhérer à la lame en l'imprégnant d'un peu d'eau par une dérivation de la goutte d'eau ; les coupes sont alors transportées - si nécessaire, par voie d'eau - dans une goutte d'eau où on sélectionnera les coupes convenables.
- dans la partie centrale de la lame, on dépose une goutte du milieu d'observation ; on y amène - toujours par voie d'eau - les coupes à observer ; il est souvent préférable d'amener ces coupes non pas directement dans le milieu mais tout à côté, dans une petite dérivation, où on trie ou vérifie une dernière fois et où surtout on dispose d'une manière ordonnée les divers éléments à observer (généralement un bout de cuticule en haut, une arête à droite, les faces de lamelles en bas, selon un modus operandi personnel...). Enfin, avec les brucelles, on dépose la lame couvre-objet de biais en ayant soin de ne pas provoquer trop de bulles ; on est alors prêt à passer la lame sous le microscope.
- Petits trucs pour éviter les bulles : à l'aide des brucelles, un côté de la face de la lame qui sera en contact avec le milieu y est trempé sur une largeur de 2 mm puis la lame est déposée lentement de biais : ceci amorce un étalement en continu du milieu ; on élimine les éventuelles bulles par tapotement ou pression de l'aiguille emmanchée.
- si un excédent de liquide a débordé du couvre-objet, l'éponger avec le papier prévu à cet effet, afin d'éviter toute pollution de la lentille de l'objectif.
- si on veut placer sur la lame porte-objet plusieurs éléments à observer sans risquer de les confondre, on peut éventuellement disposer la lame couvre-objet avec les angles pointés vers le N, le S, l'E et l'O.
- l'usage du carnet de notes nous paraît impératif (ne jamais faire confiance à la mémoire...).

Pratique du microscope

- **repérer les éléments à observer** à l'aide de l'objectif 10 x et noter à l'aide du vernier leurs coordonnées X et Y. Un élément translucide dans un milieu clair est quasiment invisible et demande donc une coloration. En revanche, cette **coloration** peut être inutile lorsque l'élément est naturellement coloré. Pour repérer un élément, on descend le **condenseur** et on ouvre le **diaphragme d'ouverture** de manière à bien éclairer la préparation par le bas : on recherche cet

élément visuellement, puis on referme alors le diaphragme sur lui tout en manipulant les axes X et Y de la platine pour bien cerner sa position et l'amener dans l'axe de l'objectif.

- observer ensuite à **l'objectif à sec** de 40 x.
- si nécessaire observer à l'objectif à immersion.
- Pourquoi observer à **l'objectif à immersion** ?

Principe : la lumière qui sort du condenseur doit traverser une couche d'air, une lame porte-objet, le milieu dans lequel baigne la préparation et une lame couvre-objet. Ce parcours entraîne des distorsions optiques que l'immersion élimine largement, car l'huile possède un indice de réfraction nettement supérieur à l'air. En outre, l'objectif à immersion a un pouvoir de résolution plus grand (cela s'exprime par le nombre porté sur l'objectif : 0,35 pour l'objectif 10 x, 0,65 pour l'objectif 40 x et 1,2 à 1,3 pour l'objectif à immersion de 100 x). Pour des raisons que la physique explique, la plus petite distance ou épaisseur que l'on peut observer est celle qui sépare deux points écartés d'environ **0,25 μm** : ceci est la limite absolue de la microscopie optique. La physique et les possibilités des optiques prouvent également que l'on n'a pas intérêt à rechercher des grossissements de plus de **1000 à 1200** fois. Les performances des oculaires et des objectifs sont telles que la meilleure manière d'arriver à ce grossissement de 1000 consiste à employer des oculaires de 10 x et un objectif de 100 x. Des oculaires 15 ou 20 x peuvent parfois apporter un certain confort d'observation (pour de minuscules détails ou pour des mesures) mais n'enrichissent pas l'observation : ils ne font pas découvrir des détails qui passeraient inaperçus ; en revanche, ils réduisent le diamètre du champ observé, la profondeur de champ, et augmentent nettement l'impression de flou.

- Pour bénéficier de tout le **pouvoir de résolution** des objectifs, il faut ouvrir complètement le diaphragme d'ouverture : on voit alors un maximum de détails mais, en revanche, l'abondance de lumière fait qu'on perçoit mal le contour des cellules observées (elles sont écrasées par la lumière comme en photographie le soleil de midi écrase le sujet en été). Donc si on souhaite voir les détails, on ouvre ce diaphragme. Ceci étant fait, on peut alors souhaiter compléter l'observation en recherchant la forme et les contours exacts : il faut alors diaphragmer, c'est-à-dire fermer insensiblement ce diaphragme jusqu'à un point qui apporte le **contraste** recherché.
- La **profondeur de champ** est extrêmement réduite en microscopie : elle est particulièrement réduite au plus fort grossissement - tout comme en photographie quand on s'approche du sujet. Pour observer complètement une spore de russule (qui a en moyenne 6 à 8 μm de diamètre), on peut calculer qu'il faut près de 20 coupes optiques, soit 20 observations à des profondeurs successives dans la

préparation, à l'aide du mouvement lent de la mise au point. Donc, pour "faire le tour" d'un élément, on en est souvent réduit à manœuvrer dans un sens puis dans l'autre avec ce **mouvement lent** qui fait pénétrer plus avant ou revenir en arrière d'un certain plan - on peut d'ailleurs bénéficier ainsi de la mémoire rétinienne de l'œil qui relie en quelque sorte les coupes successives pour former une image en 3 dimensions.

Colorations et milieux particuliers

Une cellule claire dans un milieu clair n'est pas visible : on peut souvent arriver à déceler une telle cellule en diaphragmant assez fort mais, comme déjà expliqué, c'est au prix d'une perte de résolution.

Le remède est une **coloration** qui fait ressortir les parois, les formes, etc. S'il y a de nombreux colorants, il n'en demeure pas moins que l'on reste dans quelques couleurs telles :

- le jaune ± brun dû à la présence d'iode (Lugol ou Melzer).
- le rouge (ou ses nuances) dû à la présence du rouge Congo.
- le bleu ou le violet, couleurs que communiquent plusieurs colorants.

Les colorants agissent soit en colorant le **contenu des cellules** (c'est le cas de l'éosine) ou en colorant **les parois** (boucles, hyphes, cystides, basides, etc.) (c'est le cas du rouge Congo). Les colorants n'en sont plus vraiment s'ils provoquent une réaction colorée : c'est le cas de l'iode qui noircit l'ornementation sporale des lactaires et des russules parce qu'elle est amyloïde ; on peut ici parler de **réactifs**.

Les milieux particuliers utiles aux observations sont notamment ceux qui tendent à **regonfler**, donc faisant en sorte que les cellules soient plus turgides ; c'est le cas de l'ammoniaque, de la potasse ou de la soude, du lactophénol, de l'hydrate de chloral, qui tendent à attendrir et donc aident à **dissocier** : c'est le cas des regonflants qui, en fait, jouent un double rôle.

On regonfle lorsque les cellules sont collapsées, comme fanées, desséchées : on essaie alors de leur restituer l'aspect qu'elles avaient étant fraîches.

On attendrit pour mieux dissocier lorsque la structure est ferme voire dure en raison de la nature ou de l'agencement des cellules, en l'occurrence il s'agit généralement des hyphes qui sont à ce point serrées qu'elles ne se laissent pas aisément séparer. L'avantage de cette **dissociation chimique**, c'est que bien conduite, elle ne modifie pas le rapport des éléments entre eux. A l'inverse, la **dissociation mécanique**, le "squash" par percussion, translation, écrasement,

tendent à mélanger les éléments et parfois cela peut rendre la préparation difficilement interprétable.

VI. - ENTRETIEN ET NETTOYAGE

Les poussières sont indésirables dans le microscope et le stéréoscope : lorsque la séance de microscopie est terminée prendre soin de couvrir les appareils d'une housse.

L'immersion de l'objectif 100 x laisse des traces d'huile qu'il faut éliminer après chaque usage, s'il s'agit d'huile naturelle (cèdre par exemple), soit de temps en temps selon l'usage qui a été fait du microscope, s'il s'agit d'huile synthétique ; si celle-ci ne se corrompt pas, il vaut néanmoins mieux l'éliminer car il arrive qu'une observation un peu floue soit due à une accumulation d'huile. On essuie l'objectif à l'aide d'un linge doux non pelucheux puis, à l'aide de la pulpe de l'index (à condition qu'il soit propre !), mouillée de salive, on parachève le nettoyage.

Les lames couvre-objet et porte-objet sont salies après usage. Il existe de nombreuses solutions pour les nettoyer. Nous en décrivons une très simple.

Après usage, séparer lames couvre-objet et lames porte-objet et les conserver dans des récipients différents dans l'attente du nettoyage (ne pas heurter les lames porte-objet entre elles car elles risquent de se griffer). Un premier traitement consiste à déposer dans les récipients de l'eau additionnée d'un peu de détergent de vaisselle. Les graisses et autres produits sont ainsi dissous. Lorsqu'on est disposé à faire le nettoyage final, on dépose les lames préalablement rincées (porte-objet et couvre-objet séparés) dans un récipient allant au four à micro-ondes et l'on couvre les lames d'eau additionnée d'un peu de détergent : on chauffe 1 à 2 minutes. On répète l'opération dans de l'eau, après avoir une nouvelle fois bien rincé les lames. De temps à autre, on peut remplacer le détergent par du carbonate de soude (ancien produit bon marché, utilisé comme dégraissant par nos grands-mères ; s'en procurer dans une droguerie). On sèche les lames porte-objet avec un vieil essuie-mains ou un linge non pelucheux. Les lames couvre-objet doivent être séchées dans un linge fin et non pelucheux (vieux mouchoir par exemple) en les plaçant délicatement entre le pouce et l'index de manière à ne pas les briser ; les lames qui ont été un peu détériorées lors de la préparation microscopique souvent se brisent à cette occasion : faire attention à ne pas se couper ! Pour ces nettoyages, n'utiliser que de petites quantités de détergent (souvent concentré) et rincer abondamment avant séchage : à défaut, il y a un risque de formation de bulles dans les préparations.