

UTILISATION DE LA RESINE EPOXY Pour l'inclusion de champignons destinés à la microtomie

Marcel Lecomte

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

Nous avons tout de suite été séduits par la qualité des coupes (testées jusqu'à $5\ \mu\text{m}$), par la relative simplicité de la mise en œuvre (si on ne tient pas compte du temps) et surtout par la possibilité de conserver les blocs d'inclusion durant des dizaines d'années. En janvier 2010, A. Marchal a réalisé devant moi des coupes dans des blocs datant de 1978.

Par comparaison, l'inclusion à la paraffine, que nous pratiquons, nous paraît beaucoup plus fastidieuse, plus lourde, dévoreuse de temps et souvent décourageante par ses résultats souvent médiocres en mycologie (gros phénomènes de rétraction notamment).

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

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

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

MATERIEL de base nécessaire

- Un microtome automatique de laboratoire (rotatif ou à glissière)
- Une étuve pouvant atteindre 70°C (c'est la température qui sera toujours utilisée)
- 1 litre de 2-méthoxyéthanol (2-MOE) ou éther monoéthylique de l'éthylène glycol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$)
- Paraformaldéhyde en poudre (polyoxyméthylène – trioxyméthylène) ou formol très pur de laboratoire (celui du commerce est à rejeter car il contient trop d'impuretés)
- Tampon : Cacodylate de sodium (introuvable chez nous, car contenant de l'arsenic) → voir l'adresse suivante aux USA, où il se vend « prêt à l'emploi » :
<http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/chemicals/buffers.aspx>
- 1 litre de 1-2 propylène oxyde ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) = (PPO)
- 1 kit de résine epoxy du Dr. Spurr (4 flacons), qu'il est possible de se procurer à cette adresse aux USA : <http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/embedding/kits.aspx>



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

meyer de 100 cc, et divers flacons de stockage (→ des pots à confiture feront très bien l'affaire)

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

Chapitre 1. RECOLTE DES ECHANTILLONS

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

Choisir des exemplaires bien frais et matures, les conditionner selon leur taille, et les placer très rapidement dans le fixateur. Il nous semble nécessaire de tenir un carnet de notes où toutes les expérimentations seront consignées en détail.

Les spécimens récoltés peuvent se conserver très facilement au cours de leur fixation (voir chapitre 3) ; il peut donc s'avérer utile, chaque fois que c'est possible, de se constituer un stock de matériel de travail qui sera bien utile en cas de « disette mycologique » (la météo semble de plus en plus capricieuse...).

Chapitre 2. LA FIXATION et LA DESHYDRATATION

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

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

FIXATION : utilisation du formol

- **Phase préalable 1 : préparation d'une solution tampon (STM) → solution mère**
 - Mélanger 21,4 g de cacodylate de Na, 87,4 cc d'eau distillée, 12,6 cc d'HCl (1 N)
 - On obtient une solution mère 1 m avec pH de 6,9, à diluer 20x → 0,05 m
- **Phase préalable 2 : préparation d'une solution de chlorure de Ca (SCaM) → solution mère**
 - Mélanger 225 cc d'eau distillée et 250 mg de CaCl₂ anhydre (ou 330 mg en cas si on dispose de CaCl₂ 2-hydraté)
- **Phase 1 : préparation du formol pur (FP) → flacon A**
 - mélanger 2 g de paraformaldéhyde avec 25 cc d'eau distillée froide (on obtient un mélange d'un blanc laiteux)
 - chauffer à 60-70° (la température est atteinte lorsqu'on ne peut plus poser le flacon sur la paume de la main)
 - ajouter 2-3 gouttes de KOH à 5 %
 - maintenir la température et agiter jusqu'à clarification
 - refroidir sous l'eau courante
 - éventuellement filtrer
- **Phase 2 : préparation du tampon → flacon B**
 - Mélanger 22,5 cc de SCaM et 2,5 cc de STM
- **Phase 3 : préparation du fixateur**
 - Mélanger le contenu des flacons A et B : cela représente 50 cc de fixateur, qui doit être utilisé immédiatement
- **Phase 4 : refroidir le fixateur dans un bain de glace**
 - Placer le flacon dans un contenant en polystyrène expansé (moins de déperdition de chaleur) et placer le tout dans le réfrigérateur
- **Phase 5 : introduire les spécimens dans le fixateur**
 - Selon le nombre et la taille des spécimens les laisser entre 1 et 12 h dans le bain

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

ATTENTION ! Pas de rinçage entre la fixation et la déshydratation

DESHYDRATATION : utilisation du 2-méthoxyéthanol

- Poser l'objet fixé durant quelques secondes sur du papier absorbant
- Refroidir une quantité adéquate de 2-MOE sur bain de glace
- Ensuite, y transférer l'objet et laisser 1 à 12 heures à 0°C.
- Réchauffement à température ambiante
- Changer le 2-MOE et y replacer les pièces
- **On peut stocker dans ce second bain durant très longtemps, en flacon bien fermé, soit à température ambiante ou dans le freezer**
- Si on choisit de continuer tout de suite : placer les pièces, à température ambiante, dans un 1^{er} bain de PPO durant 1 à 12 heures (on peut le remplacer par de l'acétone très pur) → le propylène oxyde permet d'éliminer toute trace de 2-MOA... des traces de celui-ci ne peuvent pas se retrouver dans la résine qui ne durcirait pas bien lors de la polymérisation...
- 2^{ème} bain de PPO durant 1 à 12 heures
- Inclure ensuite dans le mélange suivant : résine + PPO (25/50) et suivre la démarche du § 5 (inclusion)

2ème méthode, dite METHODE « LENTE B » → un peu moins longue, mais reste onéreuse

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

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

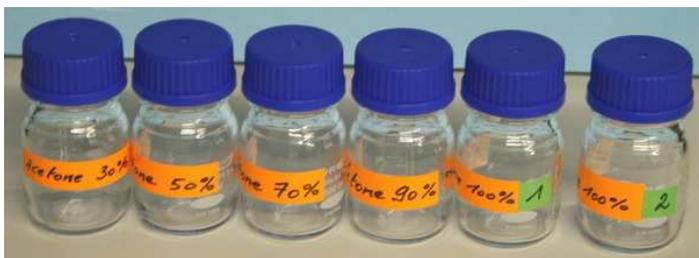
- Laisser l'objet descendre dans la résine par gravitation et par imprégnation progressive
- Des blocs de petite taille (jusque 6 mm) sont complètement imprégnés après 10-12 heures, à température ambiante
- Pour de plus gros blocs, cela peut prendre plusieurs jours ; les placer alors au réfrigérateur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

Cette méthode est à expérimenter, car nous n'avons pas de passé à son sujet.

3ème méthode, dite METHODE « RAPIDE A » → c'est plus rapide et plus économique

FIXATION : on reprend le mode opératoire de la méthode lente

DESHYDRATATION : utilisation de l'acétone



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

INCLUSION :

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

Cette méthode n'a pas d'avantages semble-t-il par rapport au 2-MOE, sinon qu'elle permet de se passer de produits assez coûteux (2-MOE & PPO) et difficiles à trouver.

Selon CLEMENCON, elle est utile si l'objet est difficile à pénétrer (sclérotés, pieds de marasmes, spores à paroi épaisse).

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

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

FIXATION : utilisation de $KMnO_4$

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

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

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

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

Chapitre 3. L'IMPREGNATION

METHODE 2-MOE :

- Préparation de la résine : voir le chapitre 5 (inclusion) juste avant l'emploi.
- Elle peut être stockée dans des pipettes à échantillons de 2,5 cc qui, bien fermées, se conservent durant plusieurs semaines dans le bac à glaçons d'un frigidaire
 - **A** = mélanger deux volumes de PPO et un volume de résine (50/25) → utiliser des flacons en verre car le PPO dissout plastique et PVC
 - Y placer l'objet et attendre 1 à 12 heures
 - **B** : ajouter un volume de résine (= 75 %)
 - attendre 1 à 12 heures
 - **C** : prélever 2 volumes de B et ajouter un volume de résine
 - Attendre 1 à 12 heures
 - **D** : prélever 1 volume de C et ajouter un volume de résine
 - Attendre 1 à 12 heures
 - **E** : ajouter 2 volumes de résine neuve
 - Attendre 1 à 12 heures
 - **F** : ajouter 2 volumes de résine neuve
 - Attendre 1 à 12 heures
- Polymériser durant 12 heures à 70°, à l'étuve (la vitesse de polymérisation est une fonction directe de la température : à 50°, il faudra 18 à 24 heures ; à température ambiante, cela prendra des semaines)

Chapitre 4. L'INCLUSION

Préparation de la résine :

- Manipuler avec précaution, dans un endroit ventilé
- Le kit du Dr. Spurr est composé de 4 éléments : ERL-4206 / DER-736 / NSA / S-1
- Selon la quantité désirée, il faut les mélanger dans les proportions suivantes : utiliser une balance de précision pour la pesée
- Le mélange se réalise dans des petits récipients jetables (gobelets PVC cristal par exemple)

- Les mesures ci-dessous sont exprimées en grammes (gouttes pour S-1), à mesurer avec une balance de précision
- Les valeurs surlignées en rouge sont intéressantes car elles représentent un nombre entier de gouttes

Chez le fournisseur américain (Electron Microscopy Sciences), le ERL 4206 est maintenant remplacé par ERL 4221 ; S-1 est appelé DMAE (diméthylaminoéthanol).

ERL-4221	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,25	2,50	2,75	3,00	3,25
DER-736	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,40	2,60
NSA	1,30	1,95	2,60	3,25	3,90	4,55	5,20	5,85	6,50	7,15	7,80	8,45
S-1 (gouttes)	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	2,80	3,20	3,60	4,00	4,40	4,80	5,20
TOTAL	2,20	3,30	4,40	5,50	6,60	7,70	8,80	9,90	11,00	12,10	13,20	14,30

ERL-4221	3,50	3,75	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00	6,25
DER-736	2,80	3,00	3,20	3,40	3,60	3,80	4,00	4,20	4,40	4,60	4,80	5,00
NSA	9,10	9,75	10,40	11,05	11,70	12,35	13,00	13,65	14,30	14,95	15,60	16,25
S-1 (gouttes)	5,60	6,00	6,40	6,80	7,20	7,60	8,00	8,40	8,80	9,20	9,60	10,00
TOTAL	15,40	16,50	17,60	18,70	19,80	20,90	22,00	23,10	24,20	25,30	26,40	27,50

ERL-4221	6,50	6,75	7,00	7,25	7,50	7,75	8,00	8,25	8,50	8,75	9,00	9,25
DER-736	5,20	5,40	5,60	5,80	6,00	6,20	6,40	6,60	6,80	7,00	7,20	7,40
NSA	16,90	17,55	18,20	18,85	19,50	20,15	20,80	21,45	22,10	22,75	23,40	24,05
S-1 (gouttes)	10,40	10,80	11,20	11,60	12,00	12,40	12,80	13,20	13,60	14,00	14,40	14,80
TOTAL	28,60	29,70	30,80	31,90	33,00	34,10	35,20	36,30	37,40	38,50	39,60	40,70



- Placer l'objet dans de la résine pure, dans un moule adéquat
 - Trouver des objets de la vie courante adaptés (petits godets en alu de 3 – 4 cm de diamètre contenant à l'origine une bougie pour chauffe-plat)
- Polymériser à 70°C. durant 12 heures

Chapitre 5. PREPARATION DES BLOCS

- Découper la latte de bois en morceaux de 3 ou 4 cm de longueur (futur support des blocs de résine) selon la taille des mâchoires de votre microtome
- Démouler l'objet et le façonner à l'aide d'une petite scie à lame fine (cette opération est très importante, car c'est ici qu'on va orienter l'objet pour les futures coupes)

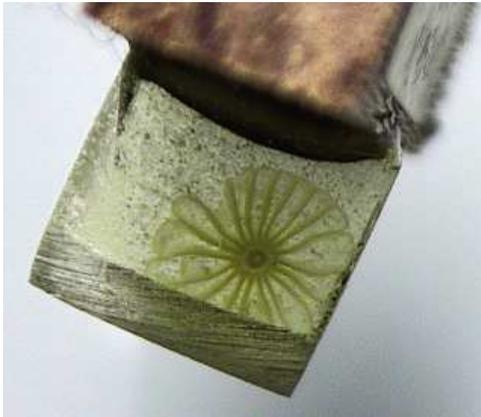
les blocs d'inclusion fixés sur son support en bois



- Passer le bloc sur du papier de verre à grain fin, pour lisser les arêtes
- Mélanger 2 gouttes de chaque composant d'une colle époxy (Araldite ou autre ...)
- Fixer le bloc sur la réglette en bois
- Laisser à l'étuve (70°) durant 1 à 2 heures pour polymérisation de la colle
- Le bloc est prêt à être fixé dans les mors du microtome

Chapitre 6. LES COUPES

- Fixer le support en bois dans les mors du microtome
- Il est indispensable d'utiliser un couteau spécial, adapté à la résine (en principe, ceux utilisés pour la paraffine ne conviennent pas)
- La première fois, bien régler la position transversale du couteau (nous ne reprenons pas ici la théorie relative à la qualité de l'aiguisage de la lame, et à l'utilisation générale d'un microtome automatique ... voir d'autres articles personnels écrits sur ce sujet)
- La majorité des coupes sera réalisée avec un réglage de 10 à 8 μm (parfois 5)



un chapeau de *Marasmius rotula* inclus dans la résine

- Les coupes, d'aspect un peu laiteux, vont adhérer au couteau par électricité statique (pas possible ici de réaliser des rubans comme avec la paraffine)
- Les ranger une à une sur le dessus du couteau avec une aiguille montée, durant quelques minutes
- Après 4-5 minutes, les coupes peuvent être enlevées avec une fine pincette, sans danger d'enroulement
- Éliminer les éventuels déchets avec un petit pinceau

Chapitre 7. RECONSTITUTION DE LA FORME de la coupe



- Prendre de l'eau bien chaude, dans un flacon à col bien large (7-8 cm de diamètre)
- Y déposer les coupes une à une
- Après quelques minutes, elles ont retrouvé leur forme originale
- Laisser refroidir
- Elles acquièrent maintenant leur forme définitive, bien plane
- Les coupes sont prêtes pour une observation en contraste de phase
- Si on décide de les colorer, passer directement de l'eau chaude au flacon de colorant (toujours à col large)

Chapitre 8. LA COLORATION

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

Notre méthode de coloration (les résultats obtenus sont remarquables)

- Les coupes sont colorées en les flottant sur les divers colorants

- Les transferts sont réalisés avec une pincette à becs fins
- Laisser durant 12 à 24 h dans le bac à colorant (certaines colorations se feront à l'étuve à 70°)

1. la plus simple :

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



2. coloration au bleu Azur A ou Azur II :

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

3. coloration à la fuchsine basique :

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

4. possibilité d'utiliser d'autres colorants :

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



5. les coupes sont colorées :

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

Chapitre 9. LE MONTAGE DES COUPES

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

Technique :

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

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

- Changer la couche de papier absorbant et y positionner à nouveau les lames, face vers le bas



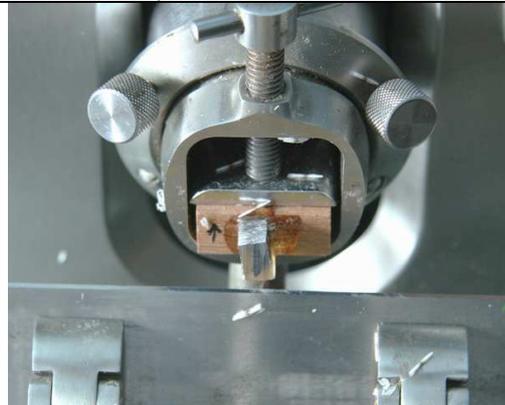
- Poser une petite masse métallique sur la lame préparée (par exemple un poids de 5 g), durant 12 h, afin d'éliminer le solde du surplus de résine (cela permet d'observer au grossissement 100x, sans toucher la lame avec l'objectif) → personnellement, j'utilise plutôt une pince à linge (beaucoup plus facile à manipuler)
- Retourner les lames face vers le haut, les numéroter éventuellement, les marquer des indications nécessaires et suffisantes, vérifier le bon état de la coupe au microscope
- S'il manque de la résine (c'est fréquent dans les coins des lames CO carrées), il suffit alors d'en déposer une gouttelette avec la baguette en verre juste au bord de la lamelle → le vide se comble par diffusion
- Laisser polymériser durant 2-3 jours à température ambiante
- Eventuellement, luter au vernis à ongle incolore
- Ranger les préparations dans une boîte ad hoc durant 3 à 4 semaines jusqu'à polymérisation totale
- Nettoyer les surplus de résine et les taches avec un morceau de chiffon ou de papier absorbant imbibé d'acétone
- Vous êtes maintenant l'heureux possesseur d'une coupe qui va se conserver durant des dizaines d'années (32 ans de recul à ce jour)



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



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



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



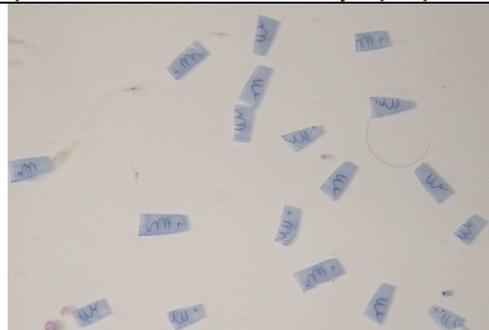
Moulage des blocs dans des capsules PVC (couvre-capsules de boîtes à médicaments) → difficile à démouler



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

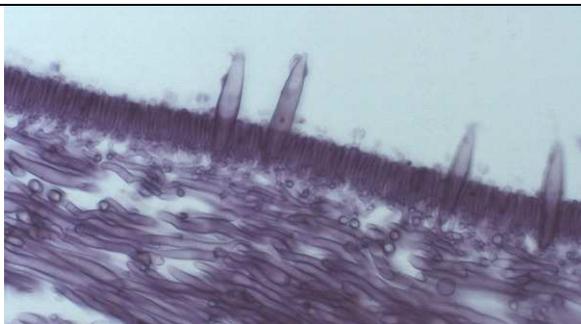
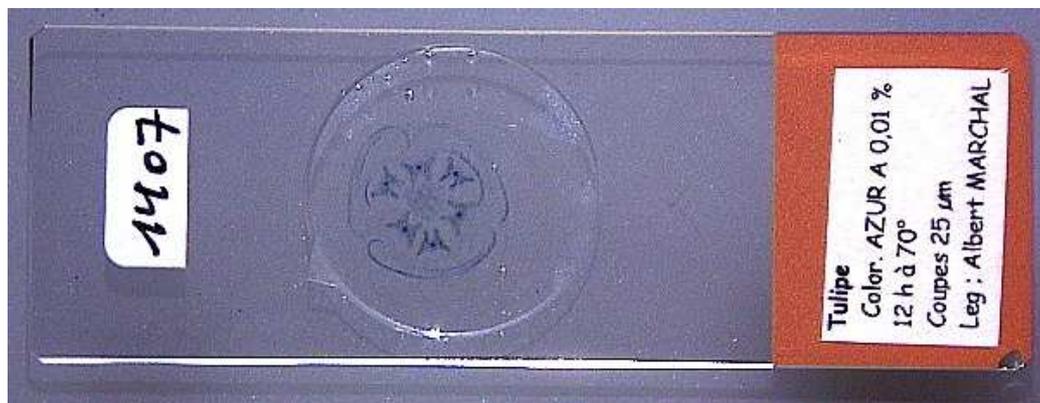
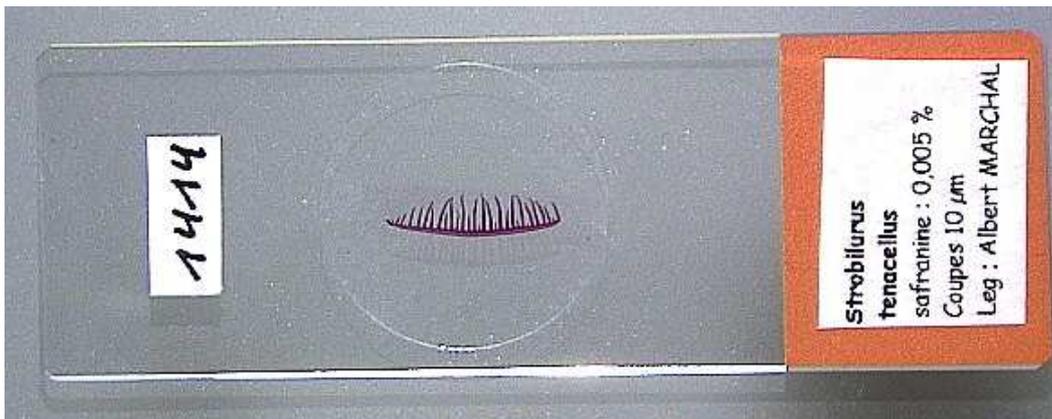


Des coupes en train de sécher, à la sortie du bain de coloration



Les coupes retallées et mises en forme, prêtes pour le montage

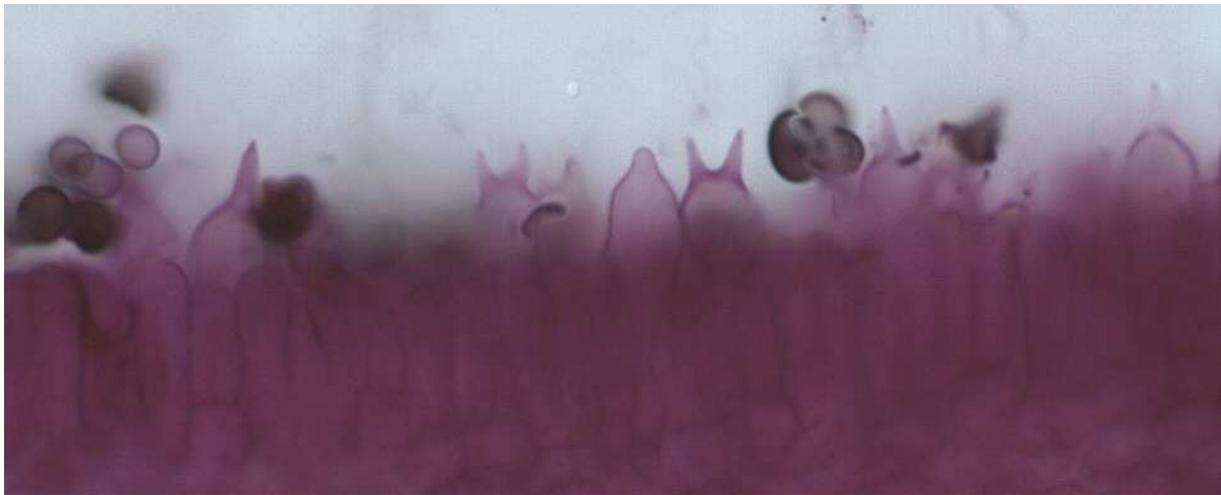
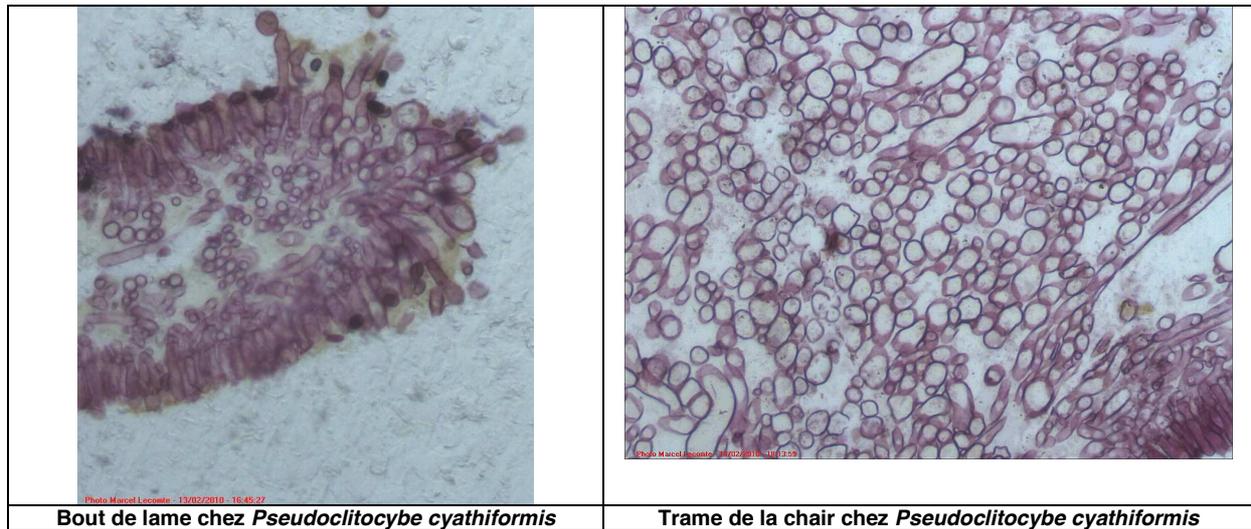
Chapitre 10 : LES RESULTATS



Macrocystides de *Strobilurus tenacellus*



Macrocystides multidigitées de *Mycena metata*



Chapitre 11 : Une page « archive » d'un précieux carnet de notes

Voici la transcription de la page 418 du carnet de notes d'A. Marchal, qui vous donne une idée de l'évolution du développement dans le temps de cette technique.

Récoltes du 09/09/1978 : *Lepiota hetieri*, *Crucibulum laeve*, feuille de *Senecio vulgaris* parasitée par une rouille

Immerger dans le fixateur au moment de la récolte.

- Fixateur (bain de glace) : samedi 09/09, 10h30 du matin
- 1^{er} bain de 2-MOA (sur glace) : samedi soir
- 2^{ème} bain de 2-MOA (à température ambiante) : dimanche matin
- 1^{er} bain de 2-PPO (ou acétone) : lundi matin
- 2^{ème} bain de 2-PPO : lundi matin
- Imprégnation A : lundi soir → 1 volume de 2-PPO + 1 volume de Spurr (1 volume = 3 pipettes dans ce cas)
- Impr. B : mardi soir → ajouter 1 volume de Spurr
- Impr. C : mercredi soir → enlever 2 volumes de B et ajouter 1 volume de Spurr
- Impr. D : samedi 16/09 matin → enlever 1 volume de C et ajouter 1 volume de Spurr
- Impr. E : dimanche matin → ajouter 2 volumes de Spurr
- Impr. F : mardi soir → ajouter 2 volumes de Spurr
- Jeudi matin : placer la pièce dans du Spurr 100 %, dans le moule choisi et polymérisation à 70°
- Vendredi midi : démouler le bloc

Cela représente une succession d'opérations réparties sur 14 jours, mais avec des temps d'intervention très limités : chaque phase ne demande que quelques minutes ! C'est simplement une question de rigueur et de méthode.