

Fabrication de microtamis et préparation des nématodes pour l'observation au microscope électronique à balayage

Pierre BAUJARD et Antoine PARISELLE

Laboratoire de Nématologie, ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal.

RÉSUMÉ

Une technique de fabrication de microtamis destinés à la préparation des nématodes pour l'observation au microscope électronique à balayage est décrite. Les observations montrent que la fixation des nématodes est inutile; la déshydratation rapide des échantillons à l'acétone suivie du passage au point critique permet d'obtenir rapidement d'excellents résultats.

SUMMARY

Construction of microsieves and preparation of nematodes for observation with the scanning electron microscope

A technique is described for construction of microsieves for preparation of nematodes for scanning electron microscopy. Tests using the method have shown that fixation is not necessary for SEM studies; rapid dehydration with acetone, followed by critical point drying quickly gives good results.

Depuis une dizaine d'années, les techniques de préparation des nématodes pour l'observation au microscope électronique à balayage (MEB) se sont multipliées (Turner & Green, 1973; De Grisse, 1974; Rossner & Porstendorfer, 1974; Clark & Stone, 1975; Green *et al.*, 1975; Hogger & Bird, 1975; Sher & Bell, 1975; Hogger & Estey, 1976; Baujard, 1978). Toutes ces techniques comprennent trois phases essentielles : fixation, déshydratation et métallisation.

Dans le but de simplifier et d'accélérer la préparation des nématodes pour l'observation au MEB, nous avons tenté *i)* de fabriquer un système simple et peu onéreux pour les opérations de fixation et de déshydratation et de passage au point critique, *ii)* d'évaluer la nécessité de la fixation des spécimens dans le processus de préparation.

Matériels et méthodes

FABRICATION DES MICROTAMIS ET DÉPÔT DES NÉMATODES (Fig. 1, 2)

Quatre éléments sont utilisés pour cette fabrication : des embouts de pipette Eppendorf (Eppendorf Standard-Tips[®]), des seringues en plastique (Terumo[®]) de 1 ml, de la toile de tamis nylon à mailles de 5 µm et des trombones (Fig. 1, A).

Deux seringues sont découpées pour constituer des « formes » utilisées ensuite dans l'assemblage des différents éléments du microtamis : la forme 1 est

constituée par suppression de l'embout terminal; la forme 2 est constituée par découpe de l'embout terminal de telle sorte qu'il ne mesure plus que 2 mm de long (Fig. 1, B). D'autres seringues sont découpées en cylindres de 8 mm de hauteur d'une part, et de 14 mm de hauteur d'autre part (Fig. 1, B); ces derniers sont ensuite pourvus d'encoches pour recevoir le système de fixation (Fig. 1, B-C). La forme 1 est enfoncée à force dans l'embout de pipette qui est alors découpé au ras de la forme (Fig. 1, D-E); la forme 1 est ensuite replacée à l'autre extrémité (Fig. 1, F) de telle sorte qu'un tronçon de 7 mm de hauteur soit découpé (Fig. 1, G-H). A l'aide de la forme 2, la toile de tamis, découpée en carrés de 15 mm de côté, est enfoncée dans le tronçon de 7 mm avec le cylindre de 8 mm (Fig. 1, I-J) pour constituer la partie inférieure du microtamis (Fig. 1, K).

Pour déposer les nématodes dans le tamis, une seringue est aménagée afin de pouvoir faire varier le niveau des liquides dans le microtamis (Fig. 2, A) : l'extrémité de la seringue est coupée de telle sorte que l'embout, sur lequel s'adapte normalement l'aiguille, ne mesure plus que 1 mm de long (Fig. 1, L); cette seringue est enfoncée dans un embout de pipette qui est alors découpé au ras de l'embout de la seringue (Fig. 1, M). La partie inférieure du microtamis peut alors s'adapter sur le dispositif (Fig. 1, N), de telle sorte qu'en actionnant le piston de la seringue, il soit possible de faire varier le niveau du liquide dans le microtamis (Fig. 2, A).

Une quantité suffisante de liquide est ainsi apportée dans le microtamis. Les nématodes y sont déposés individuellement.

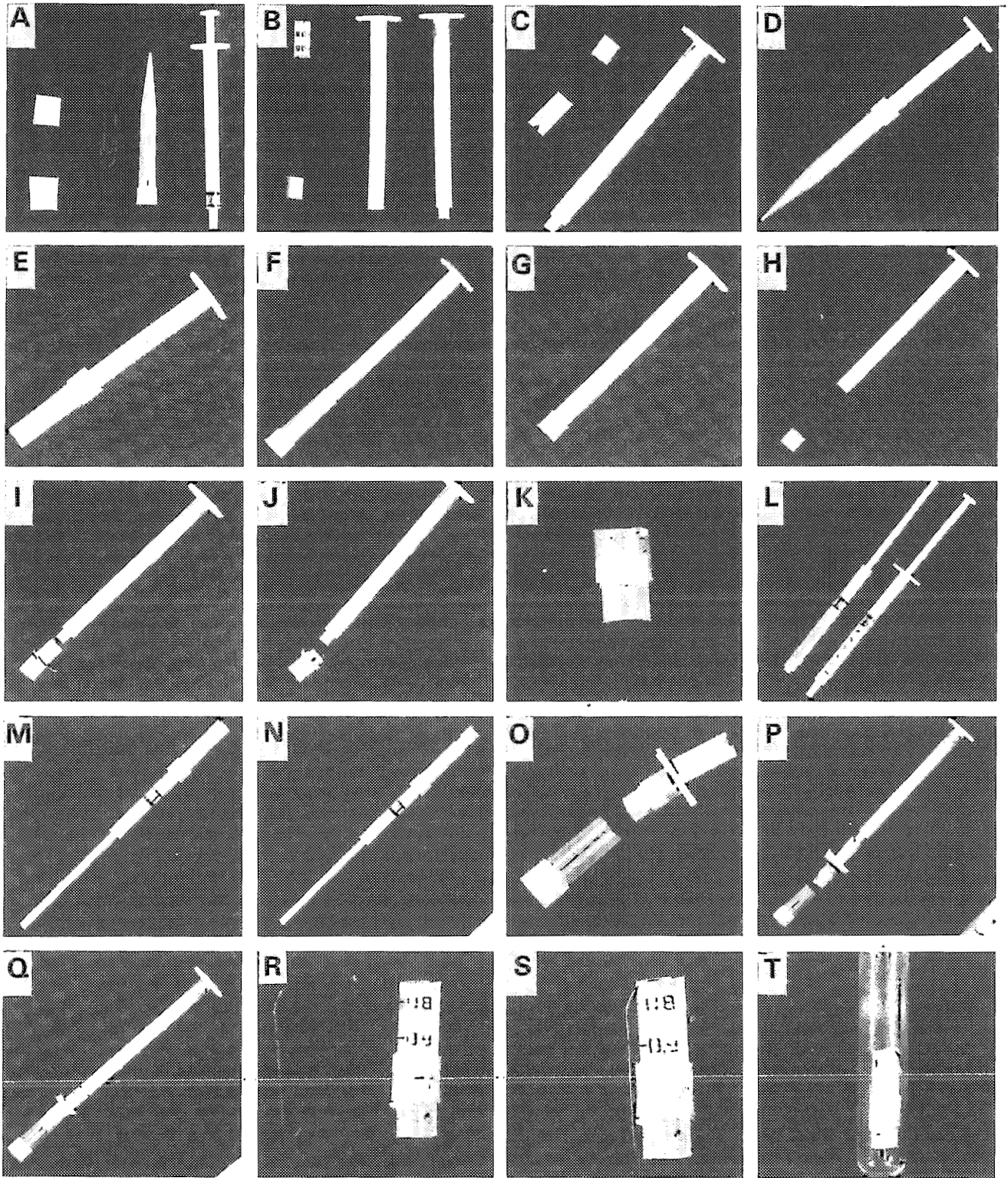


Fig. 1 : Fabrication de microtamis (légende dans le texte).
Construction of microsieves (explanations in the text).

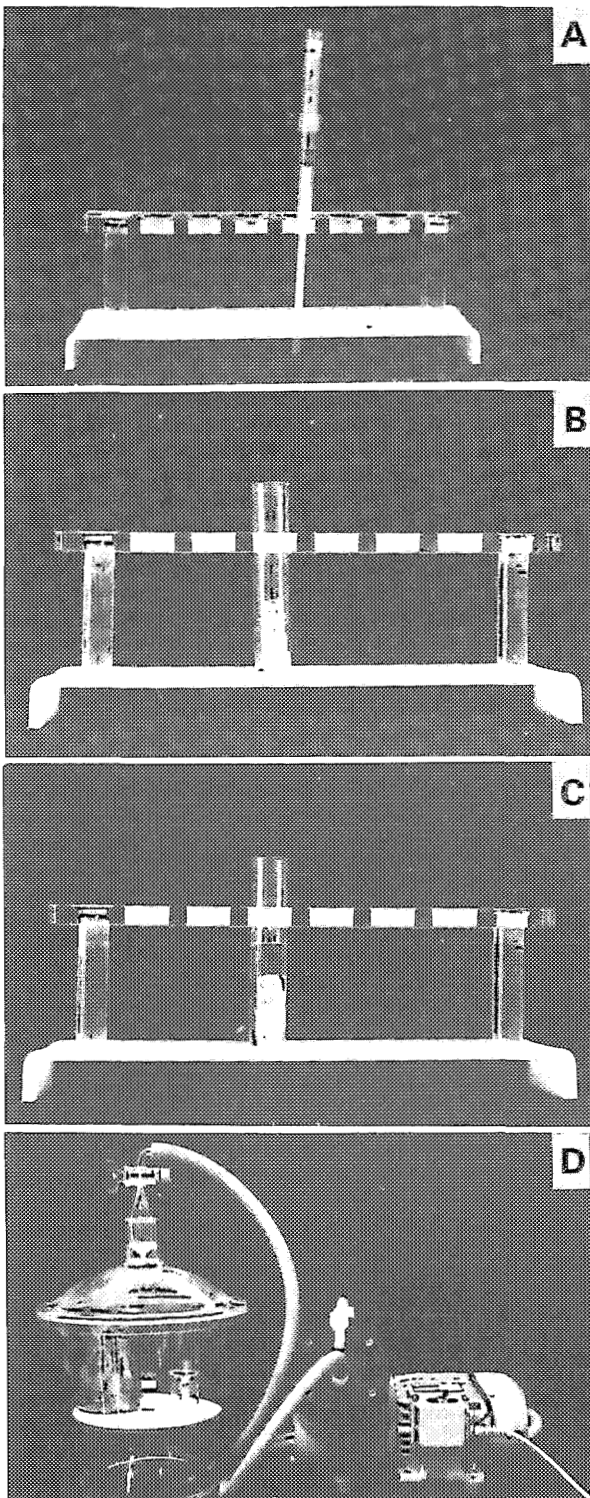


Fig. 2 : Introduction des nématodes dans le microtamis et déshydratation (légende dans le texte).

Introduction of nematode into the microsieve and dehydration (explanations in the text).

Revue Nématol. 10 (4) : 477-481 (1987)

A l'aide de la forme 2, la partie supérieure du tamis (toile + cylindre de 14 mm de hauteur) est mise en place (Fig. 1, O-P-Q); pendant cette opération, le maintien de la partie inférieure du microtamis peut être assuré soit par la seringue de remplissage (Fig. 2, A), soit par la découpe de l'embout de pipette Eppendorf (Fig. 1, O). En actionnant à nouveau le piston de la seringue, le liquide est propulsé dans le microtamis de telle sorte que l'ensemble de la cavité soit remplie de liquide et qu'il n'y ait pas de risque de dessèchement. Le microtamis est séparé de la seringue et équipé d'un étrier fabriqué à partir du trombone de telle sorte que le tamis ne puisse s'ouvrir accidentellement dans les remous de la chambre lors du passage au point critique (Fig. 1, R-S).

Le microtamis est ensuite placé dans un tube à hémolyse (Fig. 1, T) avec 1 ml de liquide (même liquide que dans le microtamis). Le processus de déshydratation peut alors débiter.

DÉSHYDRATATION

Le tube à hémolyse est placé dans un dessiccateur rempli avec de l'acétone pure, relié à une pompe à vide (Fig. 2, D). La dépression est provoquée jusqu'à l'entrée en ébullition de l'acétone (Sitte, 1962). Le dessiccateur est alors fermé jusqu'à ce que le liquide remonte dans le tube à hémolyse, résultat obtenu en 24 à 48 heures (Fig. 2, B-C).

Le dessiccateur est alors ouvert; le microtamis peut être récupéré (ou stocké pour un usage ultérieur) et le passage au point critique peut débiter.

PRÉPARATION DES NÉMATODES POUR L'OBSERVATION AL MEB

Les nématodes sont extraits du sol par élutriation (Seinhorst, 1962); ils sont ensuite déposés sur un tamis à mailles de 100 μm recouvert d'une triple épaisseur de mouchoir de cellulose afin de séparer au maximum les nématodes des débris organiques ou inorganiques de la suspension. Les nématodes sont ensuite récupérés et déposés individuellement dans le microtamis. Celui-ci est fermé, pourvu de son étrier métallique et placé dans un tube à hémolyse avec 1 ml d'eau distillée.

Le tube à hémolyse est plongé pendant 20 secondes dans un bain-marie porté à ébullition afin de tuer les nématodes pour qu'ils acquièrent leur habitus normal. Après refroidissement (5 mn à température ambiante), le tube à hémolyse est placé dans le dessiccateur pour le processus de déshydratation à l'acétone.

Après passage au point critique (Tousimis[®], Samdri 790), les nématodes sont déposés sur un portoir métallique pourvu d'une pellicule d'adhésif, orientés et soumis à la métallisation (Jeol[®], Fine coat ion sputter JFC-1100).

Les observations sont faites sur un microscope Jeol[®] JSM 35 CF sous une tension d'accélération de 10 kV.

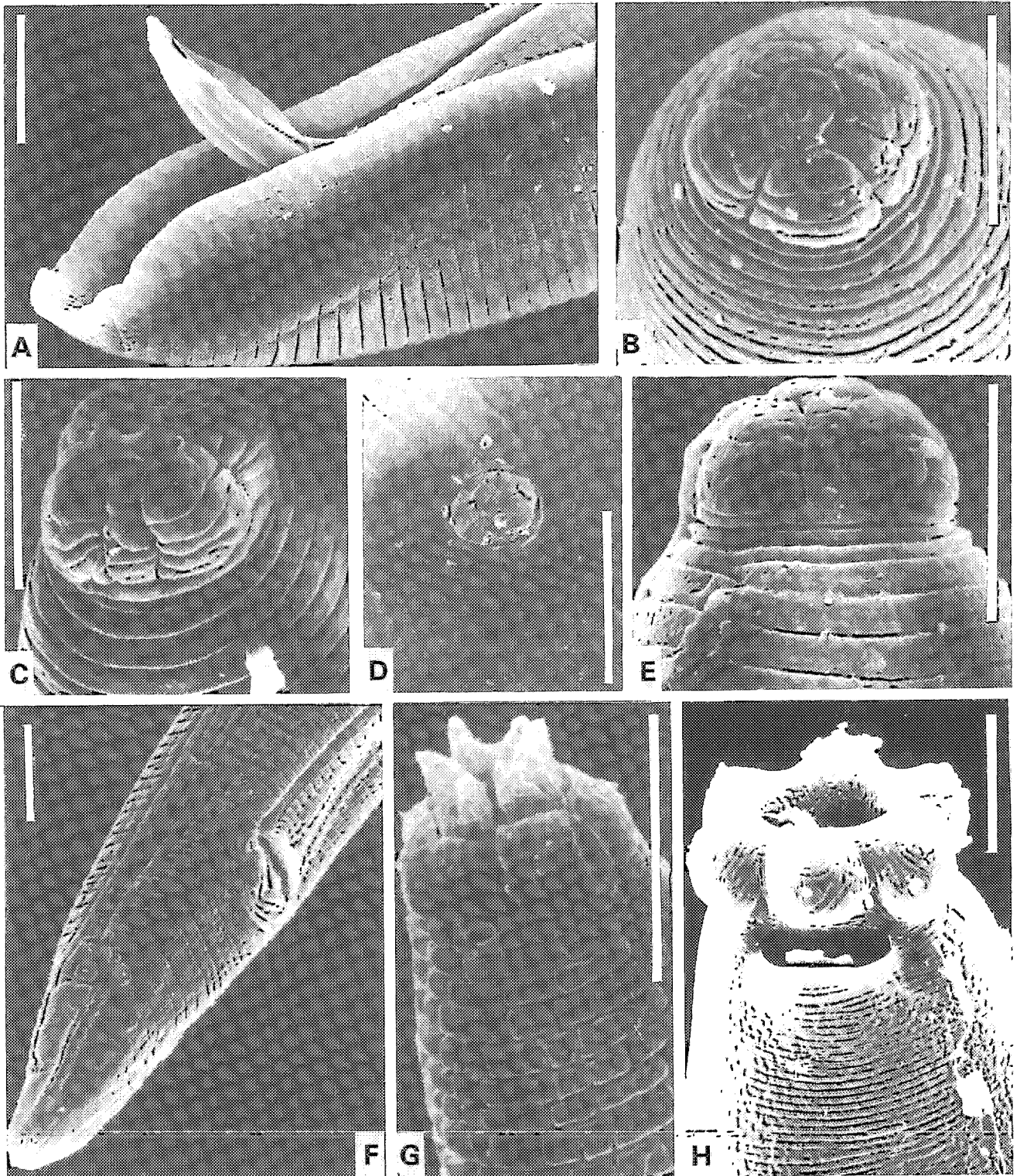


Fig. 3 : A-E, *Hoplolaimus pararobustus*. A : mâle, extrémité antérieure; B, C, E : femelle, extrémité antérieure; D : phasme; F-G, *Cephalobina*, mâle — F : extrémité postérieure; G : extrémité antérieure; H : *Dorylaimoidea*, juvénile, extrémité antérieure (l'échelle représente 10 μ m).

A-E, *Hoplolaimus pararobustus*. A : male, anterior region; B, C, E : female, anterior region; D : phasmid; F-G, *Cephalobina*, male — F : posterior region; G : anterior region; H : *Dorylaimoidea*, juvenile, anterior region (bars represent 10 μ m).

Résultats

Les nématodes ainsi préparés permettent des observations d'une qualité identique à celles réalisées par les autres techniques (Fig. 3).

Des essais de préparation des nématodes vivants, déshydratés sans être préalablement tués ont été également réalisés avec des résultats identiques aux précédents (Fig. 3, E, H), sauf sur deux points : *i*) l'habitus n'est pas celui des spécimens tués à la chaleur; *ii*) chez les mâles, il est très rare d'observer les spicules extrudés, alors que, dans le cas de nématodes tués à la chaleur, les spicules et/ou le gubernaculum sont sortis dans plus de 80 % des spécimens.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Service de Microscopie Électronique et le Laboratoire de Zoologie du Département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences de Dakar où la préparation (passage au point critique, métallisation) et l'observation au MEB ont été réalisées.

RÉFÉRENCES

- BAUJARD, P. (1978). Technique modifiée de préparation des nématodes pour l'observation au microscope électronique à balayage. *Revue Nématol.*, 1 : 265-267.
- CLARK, S. A. & STONE, A. R. (1975). A simple method of preparing nematodes for scanning electron microscopy, using Spuur's low viscosity epoxy resin. *Nematologica*, 21 : 256-257.
- DE GRISSE, A. T. (1974). A method for preparing nematodes and other soft tissues for scanning electron microscopy. *Meded. Fak. Landbouwwet., Gent*, 38 : 1685-1695.
- HOGGER, C. H. & ESTEY, R. H. (1976). Chamber for critical-point drying of nematodes and other biological specimens. *J. Nematol.*, 8 : 357-358.
- GREEN, C. D., STONE, A. R., TURNER, R. H. & CLARK, S. A. (1975). Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. *J. Microscopy*, 103 : 89-99.
- HOGGER, C. H. & BIRD, R. H. (1975). Preparation of *Xiphinema americanum* for scanning electron microscopy. *J. Nematol.*, 7 : 324.
- ROSSNER, J. & PORSTENDORFER, J. (1974). Raster Elektronen-mikroskopische Analyse des Oberflächen normal turgeszenter und infolge von Austrocknung geschrumpfter pflanzenparasitärer Nematoden. *Nematologica*, 19 : 468-476.
- SEINHORST, J. W. (1962). Modifications of the elutriation method for extracting nematodes from soil. *Nematologica*, 8 : 117-128.
- SHER, S. A. & BELL, A. H. (1975). Scanning electron micrographs of the anterior region of some species of Tylenchoidea (Tylenchida : Nematoda). *J. Nematol.*, 7 : 69-83.
- SITTE, P. (1962). Einfaches Verfahren zur Stufelosen Gewebe Entwässerung für die elektronmikroskopische Präparation. *Naturwissenschaften*, 49 : 402-403.
- TURNER, R. H. & GREEN, C. D. (1973). Preparation of biological material for scanning electron microscopy by critical point drying from water miscible solvents. *J. Microscopy*, 93 : 357-363.

Accepté pour publication le 13 février 1987.