

NOTE TECHNIQUE

Institut pour la répression
des ravageurs forestiers

No 8

Juin 1988

Méthodes de laboratoire

MISE EN ÉVIDENCE, PAR LE NOIR DE NAPHTALÈNE 12B, DE LA PRÉSENCE D'INCLUSIONS DU VIRUS DE LA POLYÉDROSE NUCLÉAIRE DANS DES COUPES ÉPAISSES

Il est difficile d'observer les inclusions du virus de la polyédrose nucléaire dans les coupes épaisses (0,5 µm) d'échantillons partiellement purifiés, confectionnés avec l'Araldite. Le bleu de toluidine (0,5 %) est habituellement appliqué avec du borax à 1 % aux coupes épaisses pour la coloration générale du matériel cellulaire préalablement à la confection de coupes fines destinées à l'examen au microscope électronique. Cependant, le bleu de toluidine ne met pas en évidence les inclusions virales, ce qui peut faire que le matériel qui conviendrait le mieux à la confection de coupes fines puisse ne pas être décelé ou que la durée de son traitement puisse s'étirer, du fait que plusieurs de ses parties sont choisies et soumises à la coupe fine. Nous avons constaté que la coloration au noir de naphthalène 12B corrigeait ces inconvénients.

Les inclusions virales s'obtiennent par extraction des larves d'insectes fortement infectées dont on broie les tissus dans de l'eau distillée au moyen d'un broyeur manuel. Le broyat est filtré au travers de quatre couches d'étamine qui retiennent les gros fragments de tissus. Les inclusions sont séparées de la suspension par double centrifugation à 164 et à 2 638 g, respectivement, durant 15 mn, dans un centrifugeur Sorvall HB-4. Le culot de centrifugation contient la plupart des inclusions et une petite quantité de débris cellulaires. Une portion aliquote de ce matériel partiellement purifié est remise en suspension dans 2 mL d'eau distillée, transvasée dans une capsule conique de Beem et centrifugée pendant 15 mn à 2 638 g pour former un culot. Le traitement ultérieur du matériel viral se poursuit dans cette capsule.

Le matériel est fixé durant la nuit à 4° C dans du glutaraldéhyde à 5 % tamponné au cacodylate de sodium 0,05 M contenant du chlorure de calcium 0,01 M et du sucrose à 2 %, à pH de 7,3. Après ajout de fixateur frais, le matériel est recentrifugé dans un appareil Sorvall SS-3 doté d'un rotor SS-34, pendant 30 mn à 1 912 g. Après deux lavages au cacodylate de sodium 0,05 M avec du sucrose à 10 %, le culot est postosmié (tétroxyde d'osmium à 1 %, avec du cacodylate de sodium 0,05 M et du sucrose à 4 %) à 4° C et à pH de 7,3 pendant 2 h, puis à la température ambiante pendant 2 h, les 30 dernières minutes en centrifugation. Le matériel est lavé trois fois, 30 mn chaque fois, à l'eau distillée dans la centrifugeuse. Le matériel qui ne forme pas de culot est inclus dans l'agar (Glaurert, 1978). Il est coloré, en bloc, dans l'acétate d'uranyle à 2,5 %, durant la nuit, à 60° C. Après déshydratation au moyen d'alcools de plus en plus concentrés, les virus sont inclus dans l'Araldite.

On confectionne des coupes épaisses (0,5 µm) en découpant le matériel dans un ultramicrotome Reichert Ultracut à lame de verre. Ces coupes sont ensuite colorées pendant 15 mn dans une solution à 1,5 % de noir de naphthalène 12B dans un mélange 35/65 d'acide acétique glacial et d'eau distillée, rincées à l'eau distillée, puis séchées à l'air. Les coupes colorées sont examinées sous goutte d'huile.

Le noir de naphthalène 12B a auparavant servi à colorer les inclusions en vue de leur comptage (Wigley, 1980). Nous avons ainsi coloré les inclusions virales en bleu pâle et noir et, comme peu d'autres organelles se colorent de même, il est

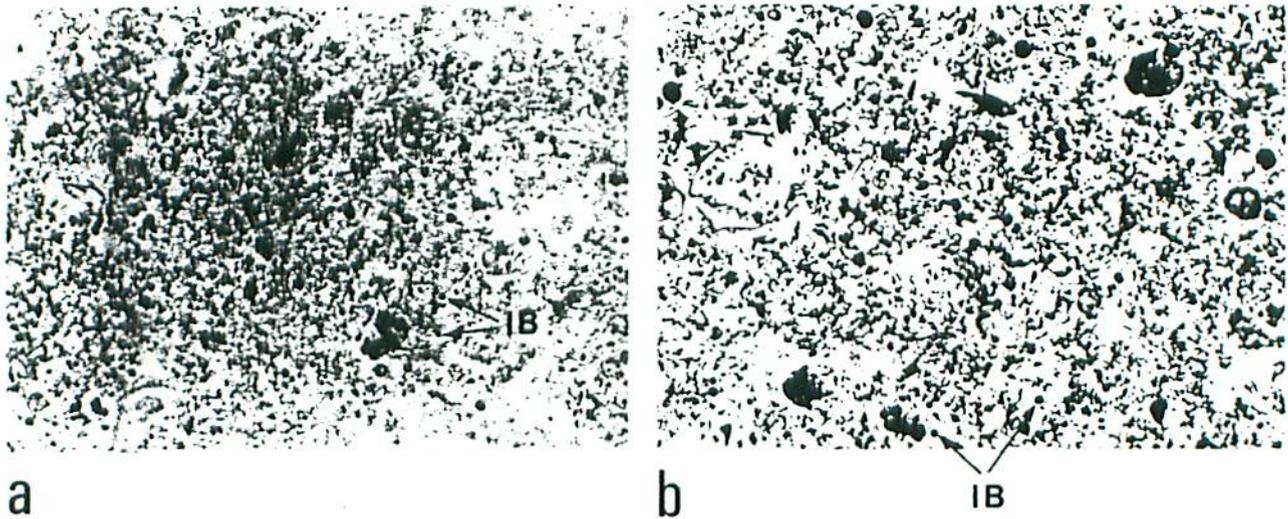


Figure 1. Coupe épaisse contenant des inclusions partiellement purifiées, colorées au noir de naphthalène 12B (a) et au bleu de toluidine (b). I = inclusions. $\times 294$.

plus facile d'identifier les premières (figure 1a). Le reste de la pièce est faiblement coloré par le noir de naphthalène, mais cela ne nuit pas à la détection des inclusions. D'autre part, le bleu de toluidine (de Martino et coll., 1968) est absorbé par toutes les matières cellulaires, ce qui rend très difficile le repérage des inclusions et, par conséquent, la sélection du matériel destiné à la confection de coupes fines (figure 1b). Des résultats similaires sont obtenus avec les inclusions d'un virus de la granulose, mais ceux-ci sont difficiles à observer à cause de leur petitesse. La coloration, par le bleu de toluidine, de coupes de tissus infectés ne confère aucun avantage, car la présence de virus est d'abord décelée par la pathologie des cellules, plus facile à déterminer que par la coloration ordinaire au bleu de toluidine.

Nous recommandons donc l'utilisation du noir de naphthalène 12B pour colorer les coupes épaisses renfermant des inclusions, notamment lorsque le matériel est partiellement purifié et que le degré d'infection est faible afin de faciliter la détermination des pièces destinées à la coupe fine.

W. Kaupp et D. Nicholson

Références

- de Martino, C.; Natali, P.G.; Bruni, C.B.; Accini, L. 1968. Influence of plastic embedding media on staining and morphology of lipid bodies. *Histochemie* 16:350-360.
- Glaurert, A.M. 1978. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In *Practical Methods in Electron Microscopy*. Vol. 3(1). (ed. A. Glaurert). North-Holland Press, Amsterdam.
- Wigley, P.J. 1980. Counting microorganisms. In *Microbial Control of Insect Pests*. (J. Kalmakoff et J. Longworth, eds.). New Zealand Dept. of Scientific and Industrial Research DSIR Bull. 228. Wellington (Nouvelle-Zélande).