

Microscopie générale des végétaux

Marcel Lecomte

Des milieux de montage

Notre souci essentiel est d'aller vers la simplicité, et nous choisissons, chaque fois que c'est possible, de ne pas utiliser les procédures longues et fastidieuses nécessitées par le montage dans des produits dont le solvant est le xylène.

Nous disposons d'une panoplie intéressante de produits à solvant aqueux : Aquatex, PVA, et ...

Glycérine gélatinée (GG)

Gélatine pure	15 g
Eau bidistillée	90 cc
Chauffer l'eau à 60°C, y ajouter la gélatine et laisser 2 h à l'étuve	
Glycérine	100 cc
Ajouter la glycérine puis filtrer sur 2 couches de gaze hydrophile	
Phénol sous forme cristalline	2,5 g
Hydrate de chloral	50 g
Mélanger longuement en secouant, après y avoir incorporé un barreau magnétique	

Il est possible également de colorer la GG dans la masse, en y incorporant, avant mélange, une très petite quantité de colorant. Les meilleurs sont : la safranine, le vert de méthyle,

Des fixateurs intéressants et faciles à préparer

Nous ne reviendrons pas ici sur les techniques de coupes végétales, qui sont supposées être connues et ont été développées dans un autre chapitre.

Lorsque nous souhaitons conserver le contenu cellulaire, il est impératif de fixer le cytoplasme et les noyaux, afin qu'ils ne se modifient et détériorent pas (pas trop ...) lors des multiples manipulations.

Alcool acétique

Alcool éthylique à 95°	60 cc
Acide acétique glacial	10 g
Chloroforme	30 cc
Mélanger rapidement puis sceller dans un flacon très hermétique (bouchon en verre rodé).	

Picroformol acétique

Eau bidistillée	200 cc
Trinitrophénol (acide picrique) – Ce produit est très toxique et doit être manipulé avec beaucoup de précautions.	50 g
Chauffer à 70°, ce qui va permettre d'obtenir une solution saturée (à froid, on peut dissoudre à peine 1,4 g/100 cc) ; conserver dans un flacon bien hermétique. Prélever 75 cc et remettre à niveau avec de l'eau bidistillée.	
solution saturée d'acide picrique	75 cc
Acide acétique glacial	5 cc
Formol de laboratoire (le formol du commerce contient trop d'impuretés).	25 cc
Mélanger rapidement puis conserver dans un flacon très hermétique (bouchon en verre rodé).	

La paroi des cellules végétales, est de nature pectocellulosique ; elle est composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines ; selon l'âge du tissu, on parlera de paroi primaire ou secondaire (dans cette dernière, on trouvera en plus de la lignine).

Elle se montre particulièrement résistance à nombre d'agents chimiques.

Si on s'intéresse uniquement aux parois (ce qui est très souvent le cas), il faut d'abord éliminer tout le contenu cellulaire (cytoplasme). Il suffit de plonger les coupes dans de l'hypochlorite de soude durant 15 à 30'. Laver ensuite à l'eau acétique à 1 %

Coloration de la cellulose par le chlorure de calcium iodé

Chlorure de calcium (saturé à 745 g/litre)	80 cc
Eau bidistillée	100 cc
Formation d'un liquide sirupeux jaunâtre ; filtrer.	
Iodure de potassium	3 g
Iode	1 g

Passer à l'agitateur magnétique durant ½ heure ; ensuite, laisser reposer et décantier. On obtient un liquide brun ambre, à conserver dans un flacon brun, à l'abri de la lumière.

Ce réactif ne gonfle pas les parois ; il colore la cellulose en rose d'abord, puis en violet après quelques heures. Appliquer une goutte sur la coupe toutes les 5 minutes, jusqu'au moment où le réactif de ne décolore plus. La coloration persiste durant plusieurs semaines.

Un exercice intéressant

Laisser macérer des feuilles d'iris dans de l'eau, en les plaçant durant 12 heures à l'étuve à 35°. Cela va provoquer le développement rapide de *Bacillus amylobacter*.

Prélever un morceau de pulpe et traiter au chlorure de Ca ; la cellulose se colore en diverses nuances de bleu ciel ; les bactéries se colorent en violet et le protoplasme¹ en jaune d'or.

Coloration de la cellulose par des colorants non iodés

Déshydrater les coupes au méthanol à 95°.

Plonger les coupes dans un bain alcalin (pH supérieur à 7) → solution alcoolique de soude ou de potasse à 10 %.

Laisser agir durant 10-15 ' et éliminer l'excès de solution alcoolique.

Ajouter le colorant en solution aqueuse (rouge Congo,) et laisser agir durant 15 à 30'.

Laver en 2 bains successifs d'eau bidistillée.

Fixer la coloration en passant les coupes dans une solution aqueuse de sulfate de cuivre à 1 %, durant 15', puis rincer à l'eau.

Conserver dans la glycérine ou monter dans la GG.

Coloration de la pectine

Passer les coupes ou dans de l'eau acétique à 1 % maximum, puis rincer dans l'eau bidistillée.

Ajouter le colorant en solution aqueuse (safranine, bleu de méthylène) et laisser agir durant 15 à 30'.

Rincer puis observer dans l'eau.

On peut conserver les coupes colorées et montées dans une solution aqueuse d'acide borique à 2 % durant plusieurs mois, à condition de les luter à la paraffine (utiliser le triangle de Drigalski²)

Une goutte d'acide acétique ou lactique (notre préférence va à ce dernier qui sert de milieu d'observation) fait disparaître la coloration des pectines.

<i>Colorant</i>	<i>Matières azotées, lignine, subérine, cutine</i>	<i>Composés pectiques</i>
Safranine	Rouge cerise	Jaune orangé
Bleu de méthylène	Bleu clair	Bleu violet

Une autre technique intéressante

Traiter les coupes à l'hypochlorite de soude, puis rincer dans l'eau bidistillée.

Laisser durant 24 heures dans une solution aqueuse de chlorure de fer à 5 %, puis rincer plusieurs fois dans l'eau bidistillée.

Rincer ensuite 2x dans l'eau acétique à 1 %.

Plonger les coupes dans une solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 5 % durant 30 à 60'. Les membranes du collenchyme prennent une belle coloration bleue. Celle-ci est accentuée si on ajoute une goutte d'acide chlorhydrique ou d'acide nitrique.

Laver à l'eau puis monter dans la GG ; la coloration est définitive.

Autre possibilité : remplacer le chlorure de fer par de l'acétate de cuivre aqueux à 5 % → on obtient alors une coloration rouge.

¹ Ensemble du cytoplasme, du noyau et des organites vivants de la cellule

² C'est en fait un agitateur à extrémité triangulaire, utilisé comme fer à luter et composé d'une tige de métal courbée trois fois ; chauffer à la flamme puis poser un coin sur un bloc de paraffine et poser le long de la LCO

Coloration de la lignine : le réactif de Maule. Il permet une coloration élective de la lignine.

Placer les coupes dans du permanganate de potassium à 1 %, durant 5', puis rincer dans l'eau bidistillée.
Placer dans de l'acide chlorhydrique en solution à 5 %, jusqu'à disparition complète de la coloration.
Rincer à l'eau 3x de suite.
Observer dans une goutte d'ammoniaque à 25 % OU Exposer la coupe aux vapeurs d'ammoniaque pure, juste au-dessus du flacon ouvert, puis observer dans l'eau, ou mieux, dans l'eau glycinée → les éléments contenant de la lignine se colorent en rouge.

Seconde possibilité : la fuchsine ammoniacale.

Préparer une alcoolique à 95° de fuchsine acide à 1 %.
Ajouter de l'ammoniaque pure, jusqu'à obtention d'un liquide de couleur jaune fauve.
Plonger les coupes dans ce réactif durant 20 secondes → apparemment rien ne se passe !
Observer dans de l'eau pure → les éléments contenant de la lignine se colorent en rouge.

Cependant, cette technique n'est pas sélective, car elle colore également des éléments tels la subérine³ et la cutine⁴.

Troisième possibilité : la double coloration, vert d'iode + carmin aluné.

C'est une des colorations les plus utilisées en histologie végétale → les tissus lignifiés se colorent en vert. On peut simplifier les opérations en utilisant un réactif contenant les deux colorants : le carminovert de Mirande⁵, ou réactif de Mirande.

Plonger les coupes dans de l'hypochlorite de soude durant 15'.
Rincer dans de l'eau acétique à 1 % durant 2'.
Plonger les coupes dans du vert d'iode aqueux à 1 %, durant 5'.
Rincer à l'eau bidistillée : 2x 1'.
Plonger les coupes dans du carmin aluné ⁶ aqueux, durant 5'.
Rincer à l'eau bidistillée : 2x 1'.
Rincer durant 1' à l'alcool éthylique à 95°.
Monter dans la glycérine.

Coloration de la subérine

La réaction de Höhnel

Préparer une solution aqueuse de potasse à 30 %..
Chauffer et y plonger les coupes → le tissu subéreux se colore en jaune.

La réaction de Van Wisselingh

Préparer une solution aqueuse de potasse à 30 %..
Chauffer et y plonger les coupes
Plonger ensuite les coupe dans du lugol → la couche secondaire des cellules de liège (la seule à contenir de la subérine) se colore d'abord en rose violacé, puis ensuite en jaune orangé rougeâtre.

- Le vert d'iode colore les tissus subéreux en vert foncé.
- La fuchsine ammoniacale colore les tissus subéreux en rouge.
- On peut indirectement utiliser également le Soudan III qui colore les substances lipidiques présentes dans les tissus subéreux.

³ C'est un composé organique imperméable imprégnant les parois cellululosiques de certaines cellules végétales, et dont la transformation aboutit à l'élaboration du liège.

⁴ C'est une substance imperméable lipidique, voisine de la subérine, constituant la cuticule des feuilles et provenant de la modification de la cellulose. C'est elle qui donne cet aspect souvent cireux.

⁵

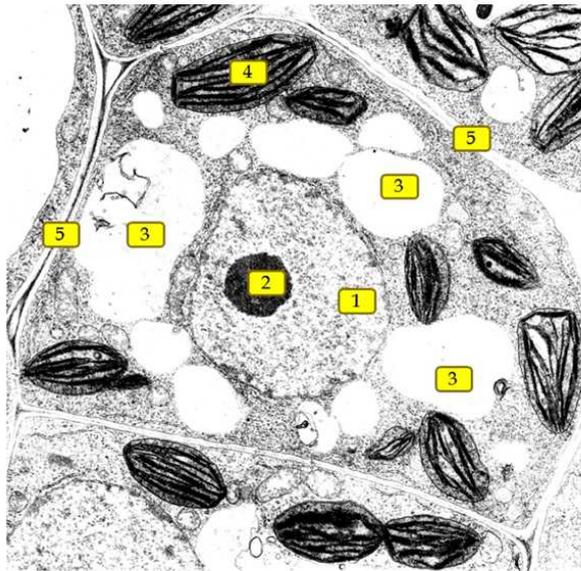
Préparer à chaud une solution aqueuse d'alun de potasse ; laisser refroidir durant 24 heures puis filtrer.
Dissoudre du carmin à saturation dans cette solution alunée, et laisser bouillir durant 30', puis filtrer.
Mélanger 1 volume de vert d'iode aqueux à 1 % avec 10 volumes de carmin aluné ; bien agiter.
Ajouter 1 % de phénol ou de thymol.

Le réactif se conserve durant très longtemps et est encore plus efficace en vieillissant.

⁶ L'alun de potasse, ou alun ordinaire, est un sulfate double d'aluminium et de potassium : $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$.

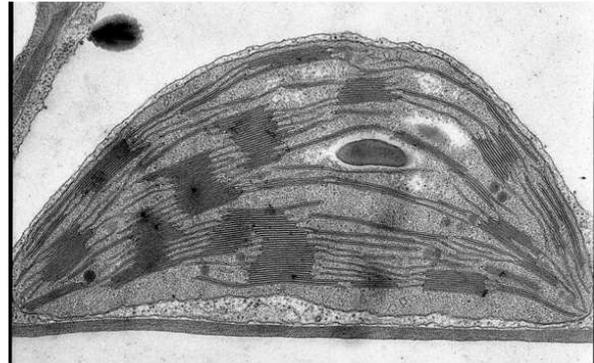
Notez que la cutine présente quasi les mêmes réactions que la subérine

Considérations à propos du noyau



◀ Cellule de soja, observée au ME, 3000x et chloroplaste de feuille d'épinard, au ME 7000x. ▼ (photos G. Auderset)

1. Noyau
2. Nucléole
3. Vacuoles (ce sont les poubelles cellulaires).
4. Chloroplastes, contenant la chlorophylle.
5. Paroi composée de pectine et de cellulose.



Le noyau est déjà observable sans coloration, mais les détails sont peu évidents. On va travailler sur du matériel frais (coupe ou lambeau de tissu).

Plusieurs possibilités

Sur du matériel frais

Préparer une solution alcoolique de vert de méthyle (100 cc eau bidistillée – 1 g vert de méthyle – 25 cc éthanol à 95°).

Y plonger coupes ou tissu durant 15'.

Passer ensuite dans de l'eau acétique à 1 % durant 15' → les noyaux sont colorés en vert et le protoplasme reste incolore.

OU

Préparer une solution aqueuse de rouge neutre (100 cc eau bidistillée – 2 g rouge neutre).

Y plonger coupes ou tissu durant 30'.

Observer dans l'eau glycinée → les noyaux sont colorés en rouge et le protoplasme en rose.

Sur du matériel fixé et inclus dans la paraffine

Fixation : notre préférence va au Fixateur de Hollande (ou picro-formol cuprique) → y laisser la pièce entre 8 et 24 heures, selon l'épaisseur.

Acide acétique cristallisable :	1,5 cc
Eau bidistillée :	100 cc
Acétate neutre de cuivre :	2,5 g
Trinitrophénol :	4 g
Formol à 40 % :	10 cc

Coloration

De nombreuses possibilités s'offrent à nous :

- Safranine : 24 heures
- Vert de méthyle : 10'
- Fuchsine acide
- Violet de gentiane
- Eosine + hématoxyline
- Hématoxyline + orange G

- Hématoxyline + safranine
- Vert de méthyle + éosine
- Vert de méthyle + fuchsine acide