

Préparation définitive de coupes botaniques

Marc Libin

FIXATION

Placer la pièce prélevée (racine, tige, feuille) pendant environ **24 heures dans une solution A.F.A.** dont la composition est la suivante :

Alcool éthylique 96 °	80 cc.	OU	Alcool éthylique 70 °	90 cc.
Formol 30 %	15 cc.		Formol 30 %	5 cc.
Acide acétique glacial	5 cc.		Acide acétique glacial	5 cc.

Travailler dans un local bien aéré ou sous une hotte aspirante car certains de ces produits sont nocifs. Le formol est considéré maintenant comme un produit très toxique, et l'acide acétique glacial est très irritant pour les voies respiratoires.

Quoi qu'il en soit, ne jamais fumer quand on travaille avec des produits chimiques.

COUPES

Effectuer les coupes au moyen d'un microtome de type Ranvier et les placer dans un petit récipient (verre de montre ou autre) contenant de l'eau déminéralisée (eau pour fer à repasser).

Pour toutes les manipulations suivantes, j'utilise un bricolage maison à savoir les deux demi sphères d'une pince à thé que j'ai séparées des branches de la pince. Ce système permet de passer d'une étape à la suivante sans devoir manipuler les coupes avec un pinceau, ce qui risquerait de les endommager.



VIDAGE DES COUPES

Les coupes (placées comme mentionné ci-dessus dans une demi-sphère) sont déposées dans un mélange d'hypochlorite de soude (**eau de javel** du commerce) et d'**eau** (50 % de chaque).

+++ Laisser agir **10 minutes tout en surveillant régulièrement**. Lorsque les coupes sont devenues blanches, en observer une au microscope afin de vérifier qu'elle est exempte de tout reste de contenu dans les cellules.

+++ Les tremper ensuite **3 fois 10 minutes dans de l'eau déminéralisée**. (ces 3 étapes sont indispensables sinon les colorations ne « prennent » pas bien).

+++ Enfin, neutraliser pendant **10 minutes dans du vinaigre blanc dilué de moitié**.

COLORATION

1. Le VERT

+++ Passer **directement** les coupes dans du vert de méthyle acétique ou du vert d'Iode, donc sans les laver pour qu'elles gardent un peu d'acide acétique.

+++ Laisser macérer durant **10 minutes**.

+++ Ensuite, les transférer dans de l'alcool **éthylrique à 96°** pour supprimer l'excédent de coloration (c'est donc une coloration régressive). Renouveler une fois si nécessaire.

+++ **Réhydrater** en les plaçant dans de l'eau **déminéralisée**. Les y laisser **10 minutes**.

2. Le ROUGE

+++ Déposer les coupes dans du **rouge carmin acétique** et les y laisser de **15 à 45 minutes**. Tester la coloration toutes les 10 minutes et arrêter lorsque, vues au microscope, les coupes présentent une coloration rouge bien uniforme. (ce qui n'est pas toujours le cas selon le type de cellules).

+++ Eliminer le surplus de coloration en lavant les coupes à l'eau déminéralisée.

Résultat : → la cellulose et la pectine sont colorées en rose-rouge ;
→ la lignine et la subérine (xylème) sont colorées en vert.

MONTAGE

Déshydrater parfaitement les coupes comme suit :

+++ **10 minutes** dans de l'**alcool éthylrique à 70°**

+++ **3 x 10 minutes** dans de l'**alcool éthylrique à 96°**

+++ **10 minutes** dans du **xylène**

Sélectionner les meilleures coupes sous la loupe binoculaire.

Nous vous conseillons très vivement d'utiliser des lames rondes de 18 ou 20 mm de diamètre, car la répartition du milieu de montage est beaucoup plus uniforme et cela demande nettement moins de produit, donc moins de débordement possible.

1. Baume de Canada

L'avantage de ce milieu de montage est qu'il est très avide d'oxygène et que les éventuelles bulles d'air disparaissent toutes seules au fil du temps.

+++ Déposer une goutte de baume de Canada dilué sur la coupe.

+++ Déposer ce même baume sur la lame couvre objet (LCO) et placer celle-ci de manière traditionnelle c.à.d. en l'inclinant et en la déposant délicatement à l'aide d'une pince (surtout ne pas laisser tomber).

+++ Luter (utilisez du vernis à ongle incolore). Dans le cas présent, cette opération est indispensable, car le baume du Canada va mettre des mois à des années pour sécher.

2. Eukitt

C'est un milieu de montage synthétique complètement transparent, qui polymérise en 20 minutes selon le fabricant (pratiquement, nous avons constaté que cela peut prendre 2 à 3 heures), et qui ne fait pas de bulles. Nous conseillons cependant vivement de prendre un maximum de précautions pour déposer la LCO.

Appuyer légèrement au centre de la LCO afin de provoquer un petit débordement de produit, une sorte de bourrelet qui va sécher très vite et servira de lutage.

Dans ce cas, il n'est donc pas nécessaire d'appliquer du vernis à ongles.