

Coloration de la cellulose et de la lignine ou Mirande revisité.

Par G.L. Auderset

(Note technique. Anatomie végétale)

• Du côté des Verts :

La coloration combinée du carmin aluné et du vert à l'iode mise au point par Mirande (1920) est connue de tous les micrographes. Son avantage, particulièrement marquant lors de travaux pratiques, est la simplicité d'utilisation. Son inconvénient est un vieillissement rapide surtout en montage à la glycérine gélatinée, ou une disparition plus ou moins importante de la coloration lors de la déshydratation en vue d'un montage au baume ou résine.

M'inspirant d'une méthode de Dop et Gautié (1928) j'ai fait quelques essais systématiques de colorations au carmin aluné et au vert de quelque chose (iode, de méthyle, brillant) suivies de déshydratation et montage à la résine synthétique Entellan de Merck (je suppose que l'Eukitt peut également être utilisé). Les résultats semblent bons et sont comparables selon le « vert » utilisé. Après quelques mois, il n'y a pas d'atténuation de la coloration. Il faudrait attendre plus longtemps pour en être sûr, en attendant je vous livre la méthode.

L'avantage est double : au vert d'iode (No C.I. 42556) qui semble être de plus en plus difficile à trouver, on peut substituer le vert de méthyle (No C.I. 42585), plus courant et moins cher.

Le vert Brillant ou vert d'éthyle (No C.I. 42040) donne des résultats comparables au vert d'iode ou au vert de méthyle.

En cas de « bon » vieillissement (à contrôler d'ici fin 2006), la conservation des coupes pourra être envisagée soit pour collection personnelle soit en vue de TP.

Méthode :

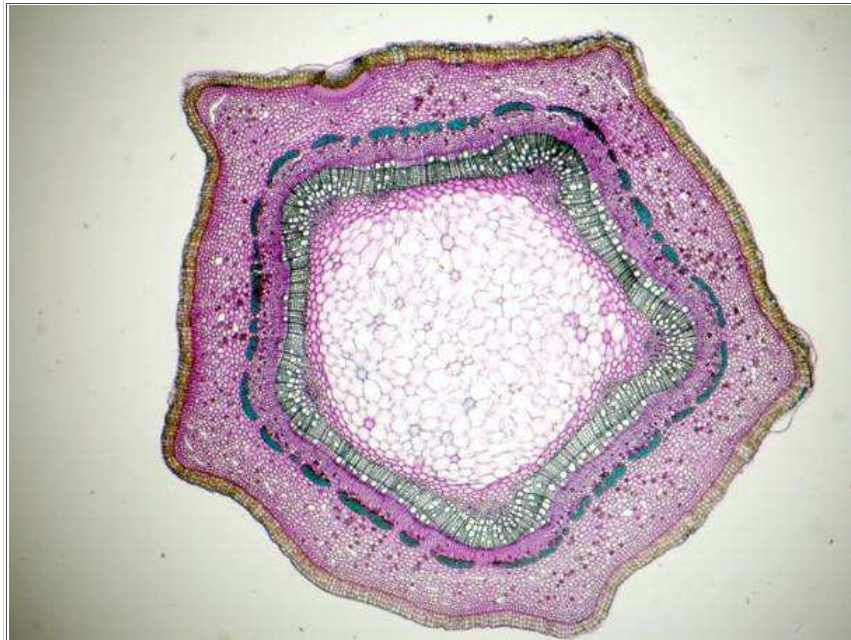
- Les coupes sont obtenues de manière habituelle : rasoir, sureau (1) avec ou sans microtome à main. Elles proviennent de matériel fixé au FAA.
- Elles sont mises 10 à 15 minutes dans de l'eau de Javel du commerce. (2)
- Après deux lavages à l'eau dist. Elles sont mises pendant 5 à 10 minutes dans de l'eau acétique (sol. à 1%). Puis, de là :
- Coloration de 10 à 20 secondes dans une solution à 0.5% de l'un des « verts ».
- Cette surcoloration est différenciée dans de l'alcool éthylique à 90% : changer plusieurs fois l'alcool jusqu'à disparition du relargage d'excédent vert. A ce stade les éléments lignifiés sont colorés.
- Transiter par l'eau distillée puis colorer dans le carmin aluné (Grenacher) pendant 10 à 15 minutes.
- Laver les coupes dans l'eau dist. : changer plusieurs fois jusqu'à disparition du relargage de carmin.
- Déshydrater : 2 bains alcool absolu, remplacer par du **trichloréthylène**(remplace le xylol et le risque d'explosion, mais vapeurs toxiques...)
- Monter sur lame dans une goutte de résine, en appliquant rapidement la lamelle couvre- objet car la diffusion du trinitro dans la résine peut provoquer des contractions de la coupe.

(1) : la moelle de sureau est avantageusement remplacée par de la moelle de tournesol (faites vos réserves dans les champs en septembre !)

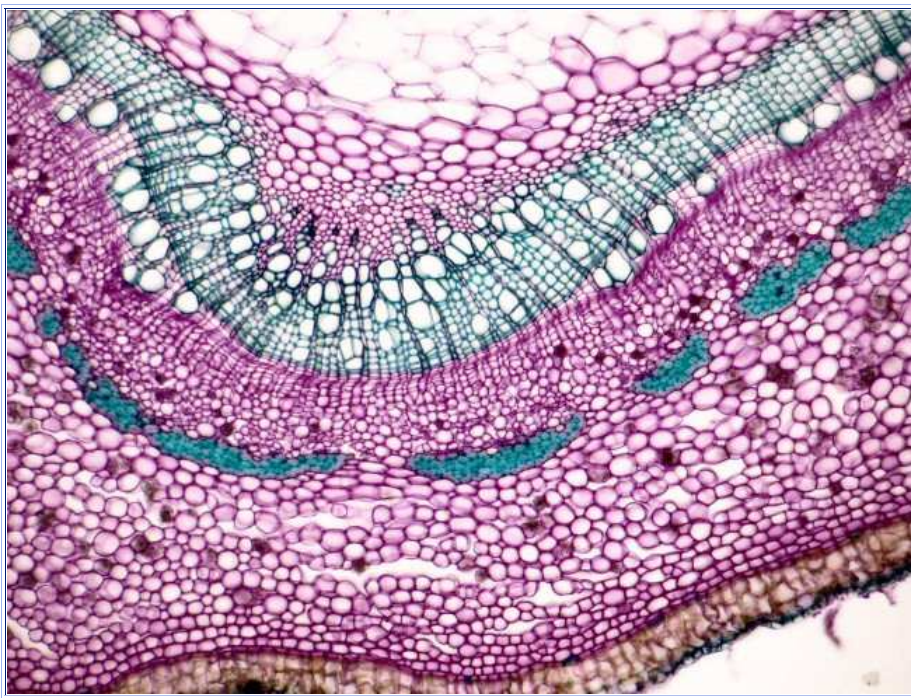
(2) : j'ai mené toutes les opérations dans le même verre de montre. Il faut juste prévoir quelques pipettes différentes pour éviter des contaminations (en particulier Javel). Ne pas lésiner sur les quantités de liquides.

Résultats :

deux photos (a et b) illustrent le résultat : coloration au carmin et au vert de méthyle (de Chroma, Stuttgart), jeune tige de Peuplier. Les verts d'iode et vert Brillant donnent des résultats tout à fait comparables.



Grossissement 25 x : vue d'ensemble montrant les différentes zones. Vert de méthyle-carmin aluné.



Grossissement 100 x : identification des tissus lignifiés (xylème, fibres lignifiées) et cellulosiques (parenchymes divers, cambium, liber). Vert de méthyle-carmin aluné.

• Chez les « Bleus »

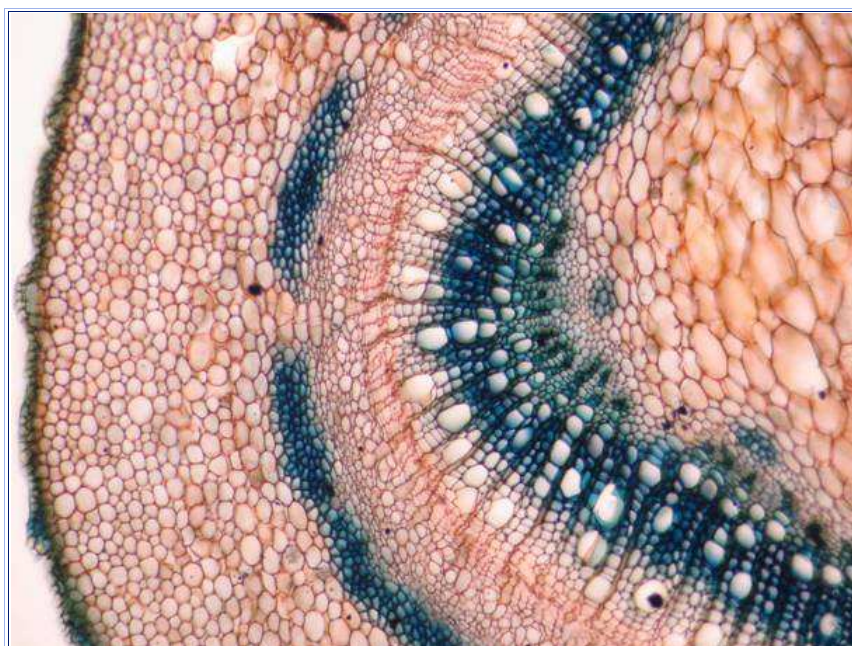
Les essais pratiqués en utilisant différents bleus ont donné des résultats divers, parfois décevants. Cela paraît lié à la déshydratation, pourtant rapide, qui « efface » une grande partie de la couleur bleue. Cela a été le cas avec le Bleu de Lyon (No C.I. 42775) et le bleu de méthyle (No C.I. 42780) où les éléments lignifiés sont bleus très pâle.

Locquin et Langeron (1978) développent une méthode très appropriée pour les coupes paraffinées : méthode au bleu de méthylène aluné et au rouge de Ruthénium.

Dans notre cas, en appliquant la méthode « anatomique » de préparation expliquée plus haut, les résultats sont satisfaisants (Photo c).

Le bleu de méthylène (No C.I. 52015) à raison de 1 gramme dans une solution à 10% d'alun de K, colore les éléments lignifiés de manière spécifique. Temps 5 à 10 minutes. Après différenciation à l'eau, les coupes sont mises dans une solution très diluée de rouge de Ruthénium, dont le prix astronomique incite à la modération, genre pointe d'aiguille lancéolée dans un ou deux cc d'eau du verre de montre ! Cette solution de sesquichlorure de Ru ammoniacal est instable (désolé, je n'ai pas la formule !). Temps 2-5 minutes. Puis lavage à l'eau.

Ce colorant minéral ne colore que les matières pectiques et de ce fait donne une coloration très fine des parois cellulaires. Déshydratation et montage comme vu plus haut.

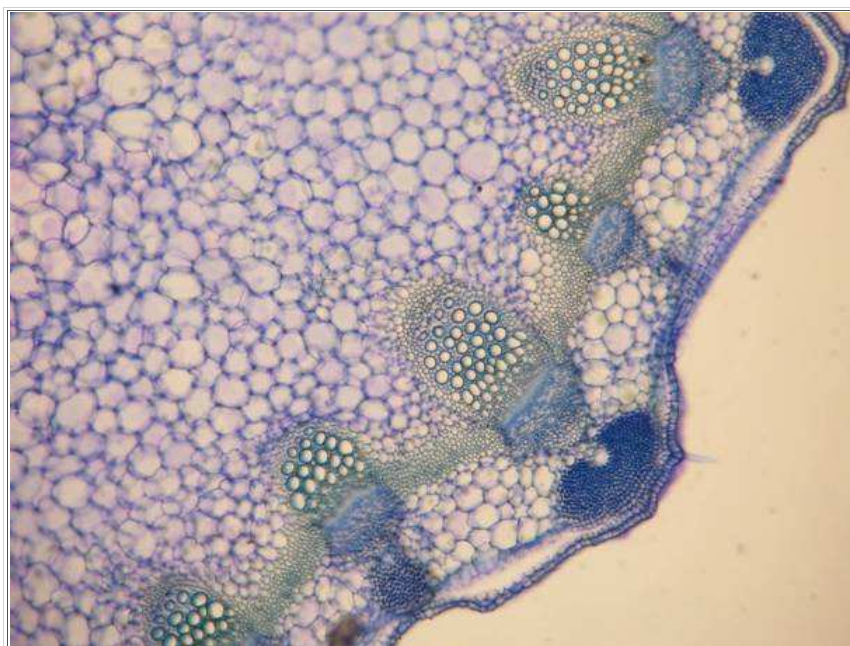


Tige de Peuplier, Grossissement 100x . Bleu de méthylène aluné- rouge de Ru.

Les éléments lignifiés sont colorés en bleu, les tissus cellulosiques en rose : cette coloration des matières pectiques est de nature plus fine que celle obtenue avec le carmin aluné.

Un bon résultat, quant à sa simplicité et rapidité, est obtenu avec le bleu de toluidine (No C.I. 52040). Les coupes, à la sortie de l'eau acétique, sont mises quelques minutes dans une solution à 0.5% de bleu de toluidine, puis différenciées à l'eau, déshydratées et montées comme plus haut. La coloration différentielle des éléments lignifiés (vert à vert émeraude) et cellulosique (bleu d'intensité variable) est due aux propriétés métachromatiques de ce colorant. L'étude

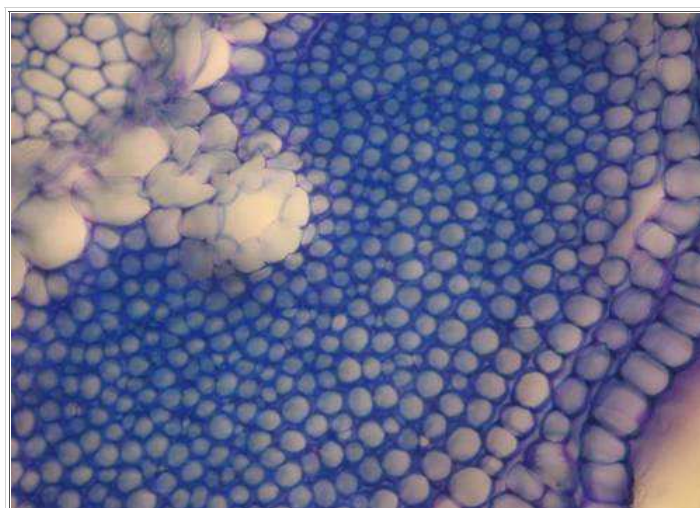
topographique et même détaillée est très facile (Photos d et e).



Grossissement 50x. Coupe de tige d'Ombellifère. Cette vue topographique permet une identification rapide des tissus révélés par le bleu de toluidine.

Les éléments lignifiés, xylème, xylème interfasciculaire sont colorés en vert. Les tissus cellulotiques en bleu variable.

Je dois avouer que je n'ai pas de recul dans le temps quant à la conservation des coupes « bleues ». Après une quinzaine de jours, il n'y a pas d'effacement ou de diffusion de colorants dans le milieu de montage. A suivre...



Grossissement 400x. Même matériel que d. Les faisceaux de collenchyme en bleu intense, sont particulièrement bien visibles.

Conclusion :

L'objectif était de mettre en évidence l'une ou l'autre méthode fiable et facile, destinée aux études et travaux d'anatomie végétale. Il convient de voir deux situations :

- celle, par exemple, de travaux pratiques avec de nombreux élèves où l'observation momentanée suffit. Dans ce cas, on ne peut que recommander le

carmino-vert en un temps de Mirande, avec montage à la glycérine ou gélatine glycerinée. Conservation : quelques mois. On peut également pratiquer la coloration au bleu de toluidine seul.

• L'autre cas est celui de l'établissement de collection permanente (ou au moins de longue durée) : l'investissement en temps est un peu plus long (méthode développée plus haut) : utilisation du vert de méthyle & carmin aluné, ou du bleu de toluidine, ou du bleu de méthylène & rouge de Ruthénium.

A vous de choisir ! G.L. Auderset (www.microresolution.net)

Références :

Mirande R. (1920) : C.R. Académie des Sciences, p. 197, février 1920 (Cité par Langeron)

Dop P., Gautié A.. (1928) : Manuel de techniques botaniques. Lamarre ed. Paris

Lillie R.D. (1969) Conn 's Biological Stains. Waverly Press, Baltimore (pour les ref. numériques C.I.).

Locquin M., Langeron M. (1978) . Manuel de Microscopie. Masson ed. Paris