

## Méthodes de coupes anatomiques fines dans les tissus végétaux

GUY AUDERSET & HENRI WIDER

### RÉSUMÉ

Les auteurs présentent de manière détaillée l'appareillage, les procédés et les résultats de leurs essais de coupes anatomiques végétales.

### SUMMARY

The authors present in detail the mechanical requisities and methods used in producing anatomical sections of plant material.

### ZUSAMMENFASSUNG

Der Autoren besprechen die technische Ausrüstung, sowie die Methoden zur Herstellung anatomischer Schnitte von Pflanzenteilen.

### Introduction

L'obtention de coupes anatomiques de bonne qualité, à partir de tissus végétaux, présente souvent de grandes difficultés, en particulier lorsque l'on s'adresse à des tissus lignifiés. La méthode la plus courante consiste à pratiquer des coupes à main levée, avec ou sans l'aide d'un microtome anatomique.

D'autres méthodes nécessitent un enrobage (paraffine, celloïdine, résine époxy) et des manipulations compliquées jusqu'au moment de l'observation microscopique. Ces méthodes ne permettent généralement pas les colorations différentielles usuelles de l'anatomie végétale (carmino-vert, par exemple).

Nous proposons deux méthodes permettant d'obtenir rapidement et sans difficulté de nombreuses coupes dont l'épaisseur varie, selon le choix de l'opérateur,

entre 10 et 20 microns. Ces méthodes ne nécessitent pas la déshydratation des échantillons.

Une méthode s'appliquant à des tissus mous ou moyennement durs est extrêmement rapide. L'autre méthode, nécessaire pour couper des tissus très lignifiés, demande un délai plus long.

### Matériel et méthodes

Divers organes provenant de plantes plus ou moins ligneuses ont été utilisés: des fragments de feuille, tiges, racines prélevées sur buis, hêtre, pin et myriophylle. Les échantillons (dimension: 1 cm/1 cm/0.5 cm) sont fixés au mélange alcool-formol-acide acétique (85%, 10%, 5%) pendant 12 heures environ. On peut également utiliser le fixateur de Heitz (alcool absolu-acide acétique).

Ces fragments sont ensuite lavés à l'eau. On peut les stocker dans l'alcool 70°. Ces méthodes nécessitent l'accès à un "tissue sectioner" TC-2 Sorvall.

#### *Méthode à l'agar (tissus peu ou pas lignifiés)*

Solution à préparer: agar 7% dans l'eau distillée. Cette méthode est directement appliquée de celle que Smith & Farquhar mirent au point dans un but très différent (1965). L'échantillon est fixé sur un papier filtre rond au moyen d'agar à 7% dont la température est de 50-55°C: on place une grosse goutte d'agar liquide sur le papier et l'on y introduit rapidement l'échantillon en le poussant avec la pointe de la pince. Il faut éviter autant que possible la formation d'une couche d'agar entre le spécimen et le papier, ce qui rend le bloc élastique lors de la coupe et pourrait occasionner des irrégularités de section. Les dimensions de l'échantillon (feuille, tige), doivent être assez grandes (longueur, par exemple de 10 à 12 mm) pour assurer une bonne rigidité du bloc. Cette "inclusion" qui nécessite quelques minutes, est suivie d'un bref séjour d'environ dix minutes au froid (4°C) afin de durcir le bloc d'agar. Le papier filtre est ensuite monté sur la table du TC-2. Les manipulations du TC-2 sont simples et le fabricant donne toutes les indications.

La cadence de coupe de l'appareil permet d'obtenir en quelques minutes plusieurs dizaines de coupes, d'épaisseur régulière, dont le choix est fixé par l'opérateur. La durée d'utilisation d'une lame de rasoir peut être assez longue. Elle dépend de la fixation sur le support: elle doit atteindre le papier filtre sans entrer en contact avec le disque de polyéthylène. La force de coupe moyenne convient pour des tissus tels que racines ou tiges primaires. Pour couper le bois secondaire, il est nécessaire de l'augmenter jusqu'à la graduation 3 ou 4.

Cette méthode est cependant insuffisante pour permettre d'obtenir des séries régulières de coupes provenant de tissus végétaux très lignifiés (bois secondaire, sclérenchyme). Dans ces tissus, des régions extrêmement dures voisinent avec des zones histologiques fragiles (cambium). Nous avons développé, dans ce but, une méthode relativement simple mais nécessitant des délais plus longs.

### *Méthode à la gomme arabique*

Solutions à préparer: (1) solution concentrée: 12 à 15% de gomme arabique; (2) solution (1) diluée de moitié; (3) alcool 70%, 80%.

#### *Infiltration*

Placer les échantillons fixés dans la solution (2) pendant 3 jours, les mettre ensuite dans la solution (1) pendant 3 à 6 jours.

#### *Enrobage*

L'objet sorti de la solution (1), est placé directement sur un petit morceau de papier filtre auquel il doit adhérer. Eviter autant que possible, une épaisseur de gomme arabique entre l'objet et le papier pour les mêmes raisons indiquées dans la méthode de l'agar. Laisser couler sur l'objet une assez grande quantité de gomme (rétraction dans l'étape suivante). Plonger rapidement le tout dans l'alcool 80° et laisser séjourner 4 à 5 jours. La dureté de la gomme étant proportionnelle à la durée du séjour, les blocs lignifiés (bois secondaire, par exemple) y séjourneront plus longtemps.

#### *Montage sur le TC-2*

Sortir le bloc de l'alcool et le sécher au papier buvard. Laisser sécher quelques minutes le papier filtre servant de support puis l'enduire de colle (type Duco Household Cement, fournie avec l'appareil). Le papier doit être imprégné de colle. Coller le papier buvard sur le disque polyéthylène de la table de coupe TC-2. Couper sous attendre.

#### *Obtention des coupes*

Avec un pinceau fin, humecter la face supérieure du bloc et le rasoir au moyen d'alcool 70%. On peut effectuer 15 à 20 coupes successives qui adhèrent au rasoir. On les enlève au moyen du pinceau humide et on les dépose dans de l'alcool 70%. Répéter ces deux opérations aussi longtemps que l'on désire, couper tout en prenant garde que la colle du papier support soit humectée d'alcool. Sèche, elle devient cassante.

#### *Manipulation des coupes*

Les coupes, encore imprégnées de gomme, peuvent être stockées dans l'alcool 70%. Pour l'observation microscopique, on doit les débarasser de la gomme. Pour cela on les place dans un récipient contenant de l'alcool 50°. On ajoute goutte à goutte, de l'eau distillée: la gomme arabique se dissout rapidement dans l'eau; les

coupes de tissus se détachent progressivement sans se déchirer. Cette hydratation ne doit pas être trop rapide sinon elle risque, par les tensions qu'elle provoque, de déchirer les tissus. Après dissolution de la gomme, les coupes sont transportées dans l'eau distillée. On peut dès lors leur appliquer les techniques de colorations classiques de l'anatomie végétale (traitement à l'hypochlorite, carmino-vert, rouge de ruthénium, bleu de méthylène, etc.). Ces coupes peuvent être par la suite, soit directement observées entre lame et lamelle (eau), soit montées en gélatine, sirop d'Apathy, ou déshydratées et montées au baume de Canada pour obtenir des préparations permanentes.

### Résultats et discussions

En observant strictement la technique décrite ci-dessus utilisant la gomme arabique, nous avons pu couper sans difficulté des tiges secondaires de hêtre, pin, buis, et obtenir 100 à 200 coupes du même bloc, l'épaisseur était de 10 à 15 microns (pl. Ia-d, pl. IIa).

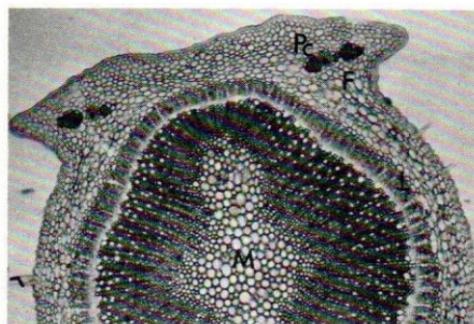
Cette méthode utilisant la gomme arabique peut naturellement être appliquée à des tissus "mous". Un bloc comprenant un segment de tige de myriophylle, nous a permis, après un séjour de 8 jours dans l'alcool, d'obtenir une grande quantité de coupes de 7 microns, avec une parfaite régularité (pl. IIb).

La méthode à l'agar a l'avantage d'être extrêmement rapide. En moins d'une demi-heure, les échantillons préalablement fixés fournissent un nombre considérable de coupes. Cette méthode est cependant peu fiable pour des tissus lignifiés. La méthode à la gomme arabique est utilisable dans tous les cas. Elle demande cependant un délai de l'ordre de 10 jours (imprégnation). Les manipulations qu'elle nécessite sont extrêmement réduites si on compare cette méthode avec celle de l'histologie classique. Ces deux méthodes permettent en outre les colorations usuelles de l'anatomie végétale.

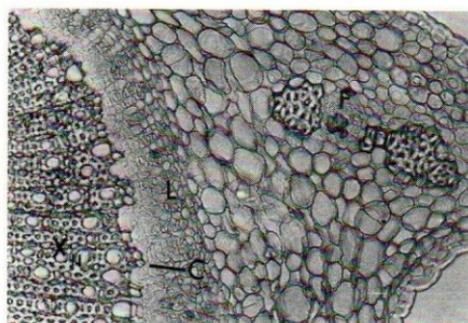
Nous pensons pouvoir leur trouver une application soit dans les cas où la recherche nécessite la confection rapide de nombreuses coupes d'organes, éventuellement sériées, soit dans les cas où l'enseignement pratique implique la préparation de nombreuses coupes d'origines diverses.

### RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

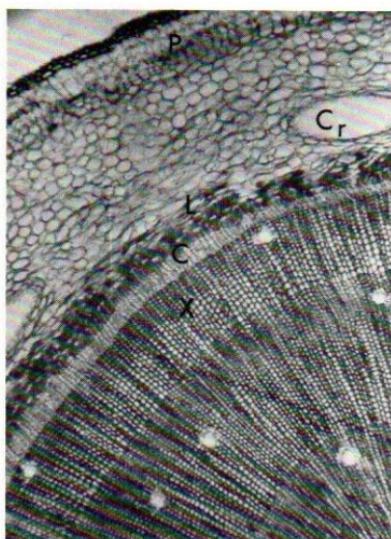
Smith, R. & M. Farquhar (1965) Preparation of no frozen sections for electron microscope cytochemistry. *Sci. Industr. News* 10: 13-18.



a ————— 200 $\mu$



b ————— 100 $\mu$



c ————— 200 $\mu$



d ————— 20 $\mu$

a, buis (*Buxus sempervirens* L.), tige secondaire, coupe transversale. Coloration au carminovert, vue d'ensemble. Epaisseur 15 microns. M, moëlle; XII, xylème secondaire; C, cambium; L, liber; Pc, parenchyme cortical, avec deux faisceaux libero-ligneux corticaux, flanqués de faisceaux de sclérenchyme (F).

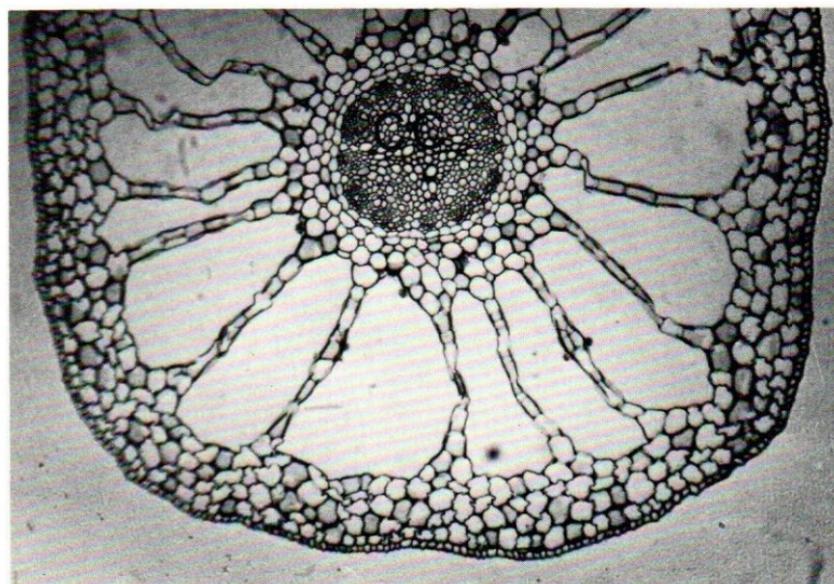
b, détail de la préparation précédente, région corticale. Noter l'absence de désorganisation des tissus denses et des tissus fragiles.

c, pin (*Pinus sylvestris* L.), tige secondaire de troisième année, coupe transversale, carminovert. Epaisseur: 15 microns. Abréviations comme (a) avec en plus: Cr, canaux résinifères; P, phelloderme.

d, matériel identique à (c) mais coupe longitudinale. Pa, ponctuation aérolee; P, pore; T, torus, 10 microns.



a



b

a, hêtre pourpre (*Fagus silvestris* L.), tige secondaire, coupe transversale, coloration au carmin-vert. Épaisseur 15 microns.

b, *Myriophyllum verticillatum* L. Tige aquatique, coupe transversale coloration rouge de tuthénium-bleu de méthylène. Épaisseur: 7 microns. CC, cylindre central. Le parenchyme cortical est réduit à des rayons formés d'une seule couche cellulaire.