

Protocole pour coupes à main levée

Marcel Lecomte

Cas d'utilisation : matériel trop dur pour être coupé par la méthode paraffine : tiges ou racines lignifiées par exemple.

Avantage : rapidité de la méthode : avec un peu de dextérité, les résultats sont obtenus en 30 à 60 minutes. On peut couper soit des tissus prélevés directement sur la plante ou, ce qui est mieux, des tissus fixés au préalable par le FAA.

But de la méthode : observation uniquement des parois cellulaires dont les composantes (lignine, cellulose, subérine) sont révélées par coloration spécifique. La nature et la structure des parois renseignent sur la nature des tissus observés.

Inconvénient : aucune information sur le contenu cellulaire (noyaux, organelles, cytoplasme) qui sont détruits pendant la préparation.

Méthode :

1. Coupe :

On pratique des coupes à main levée au moyen d'une lame de rasoir type Gillette, perpendiculairement à l'axe de l'organe. Les coupes utilisables doivent être les plus fines possible...ce qui n'est pas évident : en faire plusieurs dizaines et choisir sous la loupe celles qui paraissent les plus fines, voire même des coupes partielles, les meilleures. Les organes plus ou moins durs se coupent plus facilement que les organes mous. Dans ce cas, il peut être utile d'envelopper l'objet dans de la moelle de sureau ou de tournesol qui maintiendra l'objet pendant la coupe.

2. « Vidage » :

Les coupes fines sélectionnées sont transportées au moyen d'une pince fine dans un verre de montre contenant de l'eau de javel, pendant 5 à 10 minutes. Cette opération détruit tout ce qui n'est pas de nature pariétale et en facilitera l'observation.

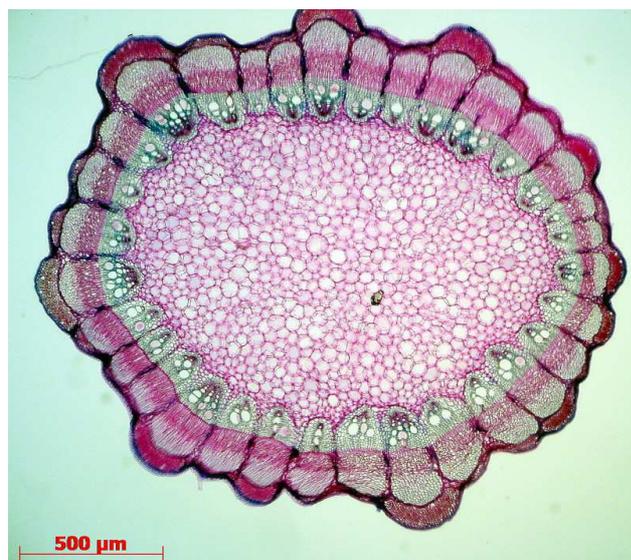
Enlever l'eau de javel au moyen d'une pipette et la remplacer par de l'eau distillée. Répéter au moins trois fois cette opération : le lavage doit être parfait, la moindre trace d'eau de javel compromet la coloration. Terminer par un bain de 5 minutes d'eau acétique (1%).

3. Coloration :

Enlever l'eau acétique et la remplacer par une solution aqueuse à 1% de vert d'iode ou de vert de méthyle pendant 3-5 minutes (coloration de la lignine et de la subérine). Enlever le colorant au moyen d'une pipette (*attention : on ne voit pas bien les coupes !*) et le remplacer par de l'alcool à 95 % et ceci plusieurs fois (différenciation = on enlève l'excès de colorant).

Remettre les coupes dans de l'eau distillée puis la remplacer par la solution de carmin aluné pendant 10 minutes. Laver en changeant plusieurs fois l'eau, jusqu'à ce que les coupes ne libèrent plus de colorant.

On peut remplacer cela avantageusement par le carmino-vert de Mirande qui regroupe du vert d'iode et du carmin aluné.



Coupe transversale dans une tige de *Vitis vinifera*
- photo de l'auteur

Pour une observation momentanée, les monter dans de l'eau ou de la glycérine entre lame et lamelle ; pour les conserver un peu plus longtemps, quelques mois, les monter à chaud dans de la gélatine glycinée. Pour une conservation à longue durée, les déshydrater et les monter dans une résine de type Entellan.

Résultats : cellulose et pectines : rose-rouge

lignine et subérine : vert nuancé