

Il s'agit d'un exercice de préparation assez facile à conduire à bon terme, et qui donne des résultats spectaculaires et motivants.

Nous tenons cependant à préciser immédiatement que ce mode opératoire ne concerne dans un premier temps que des colorations de masse permettant simplement de "voir" nettement le grain de pollen, qui très souvent est hyalin et peu visible sans marquage par coloration.

La pratique du métier ardu d'instituteur nous a appris à partir du simple pour aller vers le compliqué, en essayant d'entraîner un maximum d'élèves vers le but à atteindre, en ne laissant si possible personne à la traîne. C'est là toute la difficulté de l'initiation !

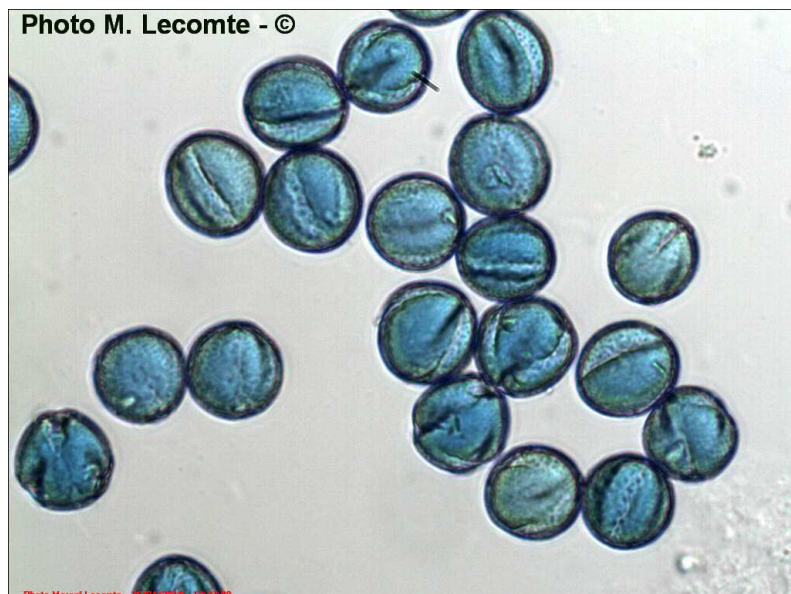


Photo M. Lecomte - ©

← Pollen de pavot

C'est le premier pas qui est le plus important pour quelqu'un qui aborde un nouveau domaine en microscopie ... le second consiste à aller plus loin, lorsqu'on maîtrise le sujet !

Aller plus loin, c'est effectivement mettre en évidence des détails de structure externe ou interne, donc pratiquer des colorations sélectives, suivies de régression ou précédées de mordantage, appliquer des doubles colorations, utiliser des colorants métachromatiques pour ne citer que ceux-là !

La constitution de lames référentielles implique la parfaite connaissance de la plante récoltée et nous avons le sentiment que chaque pré-

paration doit être accompagnée d'une photo numérique ou d'un scan pour lever toute ambiguïté ou problème futur de détermination. Cela peut conduire également à la constitution d'un herbier.

N'oublions pas cependant que certaines plantes relèvent d'un plan de protection et que leur cueillette est en principe interdite : cependant, il n'est rien mentionné pour le prélèvement du pollen !

Question idiote peut-être : **Qu'est-ce qu'un grain de pollen ?**

C'est l'élément sexuel mâle de la fécondation chez les plantes phanérogames (c'est-à-dire les plantes dont les organes de fructification sont apparents, qui portent des fleurs à un moment donné de leur développement et qui se reproduisent par graines). Le pollen est produit par les anthères².

Du fait que la fécondation est confiée à des agents extérieurs comme le vent ou les insectes par exemple, la quantité de grains est parfois phénoménale et est appelée, dans certaines régions « pluie de soufre ».

Le grain de pollen se dépose sur le stigmate du pistil et il émet alors un tube pollinique qui va aller jusqu'à l'ovule.

La taille d'un grain de pollen varie de 2,5 µm chez le myosotis à 200 µm chez certaines Cucurbitacées, comme la courge.

Chez certaines personnes, le pollen peut provoquer des réactions allergiques graves se manifestant par le rhume des foins ou un asthme pollinique.

Pour les pollens d'origine inconnue, il faut se référer à une palynothèque. Pour ceux qui sont intéressés, il est possible de consulter le remarquable site conçu par Michel VEROLLET, qui est palynologue et où il vous présente sa passion : <http://perso.wanadoo.fr/pollens/>

Vous y trouverez notamment des informations sur les capteurs, sur les allergies ainsi que les bulletins de répartition des pollens de différentes régions de France. Notons également la présence de liens vers deux clés de détermination très efficaces, conçues par l'Académie de Bordeaux et de Montpellier.

¹ Cet article est une révision et une adaptation d'un texte paru sur mon site personnel il y a quelques années ; cela se justifie par l'apport de nouvelles informations et la mise à jour de certains modes opératoires.

² Chez les Algues, les Champignons, les Mousses, les Prêles et les Fougères, on parlera de spores.

BIOLOGIE

Il faut savoir qu'un grain de pollen présente 2 parties essentielles :

- une partie centrale vivante, qui renferme les éléments sexuels mâles destinés à la reproduction ;
- une membrane complexe dont l'ensemble constitue le **sporoderme**, qui est lui-même composé de 2 couches :

l'intine, qui ne survit pas au contenu cellulaire,

l'exine, qui est un des matériaux les plus résistants du monde organique (elle résiste aux agents corrosifs) et qui se compose de deux couches superposées: **l'endexine** et **l'extectine**,

Cette enveloppe doit sa remarquable capacité de conservation à une substance singulière : **la sporopolénine**.

On va également observer (quasi chez toutes les espèces) l'**aperture**, qui est une zone de moindre résistance, qui va permettre la sortie du tube pollinique. On parlera de **pore** s'il est de forme arrondie, ou de **colpus** s'il se présente sous la forme d'un sillon (bien visible sur le pollen de pavot, à la page précédente).

Pollen de rose trémière →

EN PRATIQUE

Il est préférable d'acquérir le « tour de main » en travaillant sur des grains de pollen faciles à récolter et spectaculaires à regarder : nous vous conseillons de vous tourner vers la rose trémière (*Althaea rosea*, - Malvacée), intéressante par la taille des grains. On pourrait aussi se diriger vers la famille des Cucurbitacées (potiron, courge, etc...) à grains énormes également, ou encore, dans les plantes ornementales, choisir *Hibiscus syriacus* (le Ketmie de Syrie).

Nous avons récolté du pollen, nous connaissons la plante : il ne reste plus qu'à œuvrer !

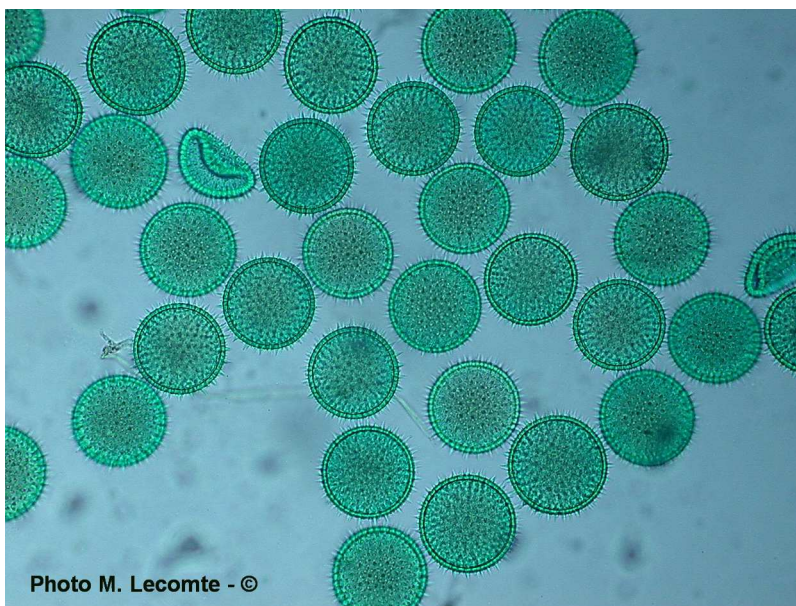


Photo M. Lecomte - ©

Suite à l'information transmise par un ami, modérateur d'un forum de microscopie, il y a une douzaine d'années, nous nous sommes d'abord dirigé vers la méthode de WODEHOUSE (1935), qui nous paraissait la plus simple, et que nous avons un peu adaptée à nos préférences, car nous n'aimons pas la glycérine gélatinée qui implique de devoir chauffer les lames...

Cependant, nous avons été amené à revoir très vite notre position, car le heureux (ou malheureux) hasard a fait que nous avons beaucoup expérimenté sur des grains de pollen prélevés sur la rose trémière. Une conclusion trop hâtive, nous avait amené à déclarer que l'usage répété de l'alcool à 95° pour déshydrater les préparations et monter au baume du Canada était sans incidence sur les grains ; si c'est le cas effectivement pour la plante mentionnée ci-dessus, et nombre d'autres d'ailleurs, nous avons eu grand tort d'élever ce principe en règle générale. Chez certaines plantes, le sporoderme du grain de pollen est mince et souple et peut se déformer considérablement sous l'effet de la dessiccation, comme chez le maïs (*Zea mays* L.) par exemple.

Par obligation donc, (puisque eau et baume du Canada ne font pas bon ménage...), nous avons dû revenir vers la glycérine gélatinée, comme milieu de montage ! Un rapide bricolage nous a permis de récupérer la plaque chauffante d'une ancienne cafetière électrique et nous voici paré pour explorer d'autres horizons.

MODE OPERATOIRE 01

1. Récolter le pollen.

2. Le réunir en petit tas au centre de la lame de verre avec une lame de rasoir (ne pas oublier de bien nettoyer cette lame après l'opération, sous peine de polluer la lame suivante avec des grains parasites).

3. Déposer délicatement une goutte d'éthanol à 95° sur le tas de pollen.

→ Oublions l'alcool absolu, car il est tellement hygroscopique que dès qu'on ouvre le flacon il absorbe l'humidité de l'air et n'est donc plus "absolu" (sa conservation implique l'utilisation d'un flacon spécial avec un déshydratant puissant, comme le sodium, et relève d'un laboratoire).

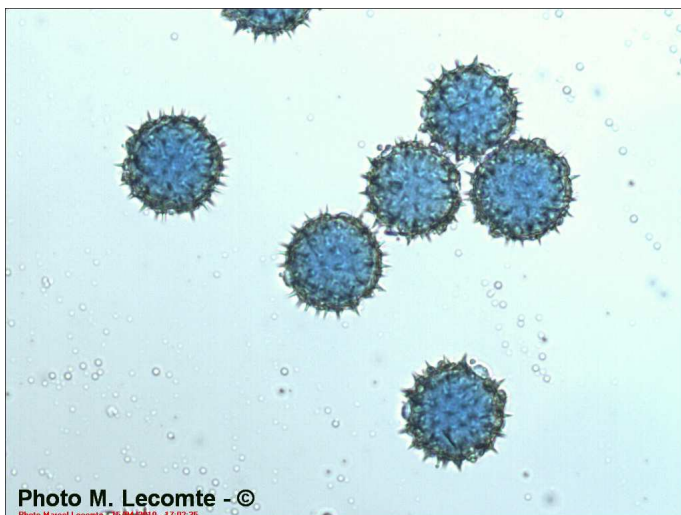
- Ne pas placer la goutte en contact direct avec le pollen, qui risque de rentrer dans la pipette et polluer ainsi tout le flacon.
- Si vous placez trop d'alcool sur le pollen, il va se répartir sur toute la lame et vous en perdrez une bonne partie.
- Ce traitement est appliqué afin de nettoyer l'enveloppe du grain de la couche huileuse qui masque les détails ornementaux et empêcherait le colorant de pénétrer.



De gauche à droite, ↑ récolte d'un tas de pollen) ; apparition ↑ de l'auréole générée par l'alcool ; ↑ action de colorants divers) ; surplus de colorant ↓ à nettoyer ; lame identifiée, lutée et vernie ↓



4. Nettoyer les précipités ou cristaux formés à l'extérieur de la goutte (sous forme d'auréole) → utiliser pour cela un bâtonnet pour oreilles (coton tige), ou un bout d'essuie-tout, imbibé légèrement de méthanol.
5. Déposer délicatement une goutte de colorant (voir liste ci-dessous) et laisser agir durant 2 à 5 minutes → mêmes précautions que pour l'alcool, sous peine de trop étaler le pollen.
6. Poser la lame couvre objet avec les précautions d'usage, afin d'éviter au maximum les bulles d'air, car il sera très difficile de les faire disparaître dans ce milieu de montage. Nous avons choisi définitivement de travailler avec des lames rondes, qui permettent une répartition beaucoup plus uniforme du milieu.
7. Luter au vernis à ongles transparent.
8. Poser la (les) étiquette(s) d'identification et les vernir également.
→ Il est impératif d'indiquer sur la préparation le nom de la plante et éventuellement la date de préparation ainsi que le colorant utilisé (nous utilisons de petites étiquettes auto collantes, aux dimensions de la largeur de la lame porte objet).



Vous êtes maintenant l'heureux possesseur d'une préparation définitive qui risque de vous survivre (des préparations que nous avons réalisées en 1969, au Baume du Canada sont toujours impeccables)

← Pollen de tournesol

Les colorants à utiliser

Nous en avons expérimenté toute une série, sans déboires majeurs ; tout cela fonctionne à merveille et constitue un régal pour les yeux.

- la **safranine formolée de Sémichon** (elle colore en rouge +/- foncé),
- la **phloxine B alcoolique** (elle colore en fuchsia),
- le **rouge Congo SDS** (il colore en rouge clair et met remarquablement en évidence le revêtement cuticulaire) ; SDS signifie Sodium Dodécyl Sulfate,

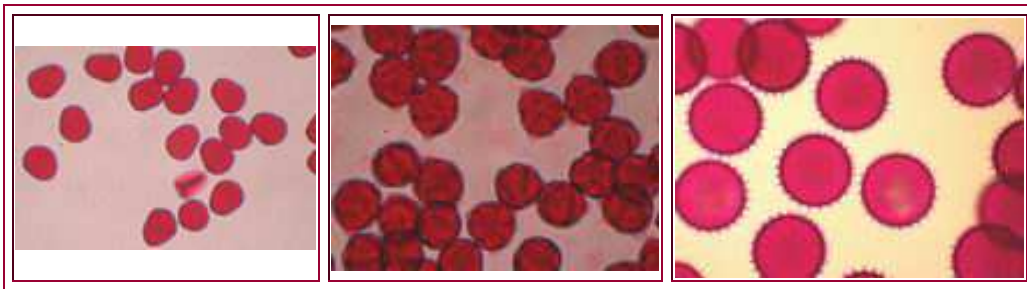
- le **vert d'iode** (il colore en vert tendre),
- le **vert de Méthyle acétique** (il colore en vert plus nettement émeraude),
- l' **éosine aqueuse à 2 %** (elle colore en rouge clair),
- le **rouge neutre** (il colore en rose rouge),
- la **fuchsine phéniquée de Ziehl**, préparée à base de fuchsine basique (elle colore en bleu violet et peut être régressée avec de l'acide chlorhydrique à 5 %, en cas de surcoloration).

TRES IMPORTANT (voire même ESSENTIEL)

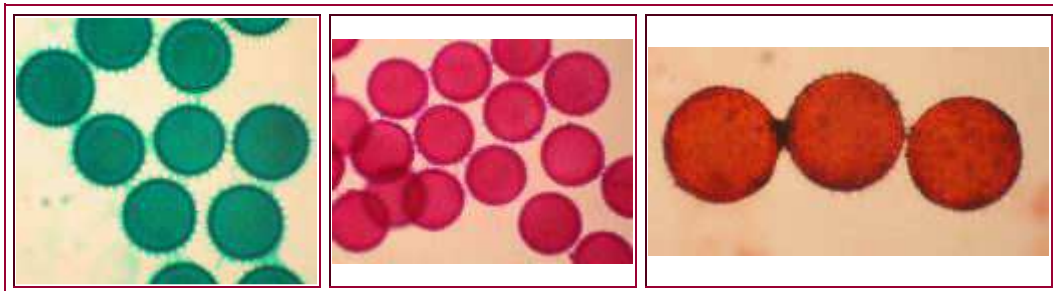
Il n'y a pas de miracle : l'utilisation de colorants en microscopie implique des dosages précis (nous utilisons une balance électronique au 1/100 de gramme près) avec des dilutions, selon les colorants, de l'ordre de 1:100 (1 g de colorant pour 100 cc d'eau distillée ou d'alcool, ou autre solvant ou mélange de solvants), 1:200, 1:500, 1:1.000, voire 1:10.000 ...

Le non respect de ces dosages (c'est à dire la technique de l'"à peu près") génère des surcolorations désagréables et décourageantes, et les résultats ne sont pas constants !

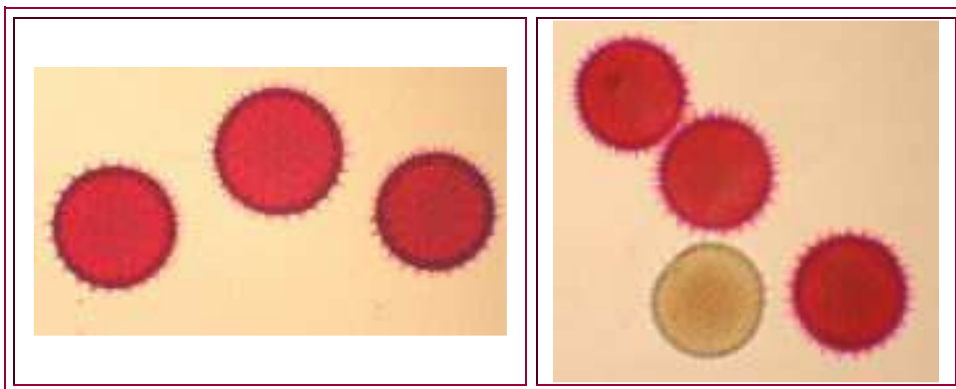
Voici une série de photos exemplatives, réalisées avec le pollen de rose trémière, *Echium vulgare* (vipérine vulgaire), ou *Convolvulus sepium* (liseron des haies).



Vipérine ↑(safranine) - liseron des haies ↑(safranine) - rose trémière, ↑ fuchsine de Ziehl



Rose trémière : ↑ vert d'iode - phloxine B ↑ alcoolique - rouge Congo SDS ↑



Rose trémière : rouge neutre ↑ et safranine, avec un grain non coloré ↑

DU TEMPS a passé et nous avons exploré d'AUTRES PISTES

Au fil du temps, nous avons découvert deux milieux de montage remarquables : le PVA (alcool polyvinylique) et l'Aquatex, ainsi qu'un nouveau colorant, la fuchsine acide (rien à voir avec la fuchsine basique).

Pollen de chicorée sauvage
(*Cichorium intybus*) →

Le PVA s'avère très intéressant car son solvant est l'eau ; nous allons y ajouter de l'acide lactique pour améliorer l'indice de réfraction, ainsi que du phénol en solution aqueuse, afin de protéger la préparation définitive des bactéries et des moisissures. Paul Leroy, ami et microscopiste exceptionnel, nous conseille très vite de colorer le milieu dans la masse, ce qui apporte une coloration beaucoup plus délicate aux pièces traitées. Les colorants les plus adaptés sont la fuchsine acide (c'est notre préféré), et puis dans l'ordre, le bleu d'aniline, le bleu de méthyle et la phloxine. La préparation du milieu est délicate car il ne faut y incorporer que très peu de colorant.

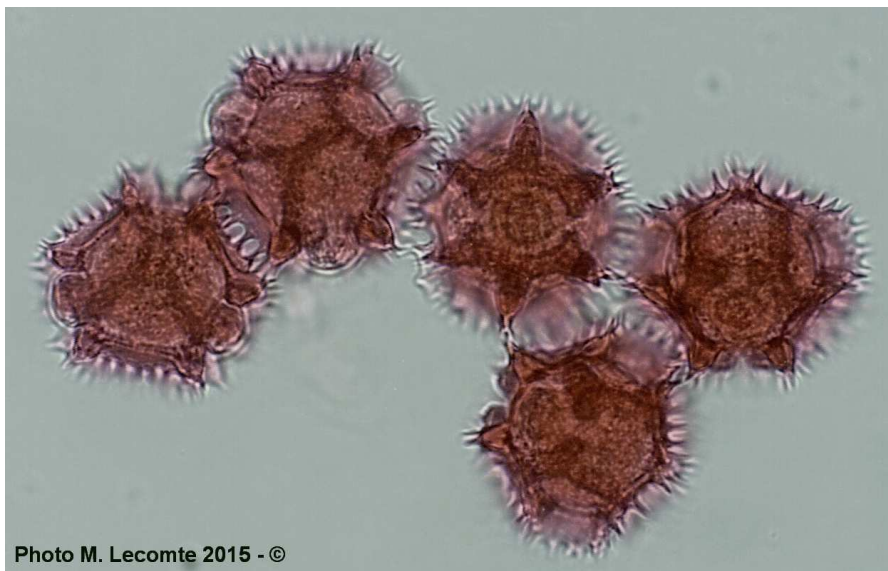


Photo M. Lecomte 2015 - ©

Photo M. Lecomte 2015 - ©

MODE OPERATOIRE 02

1. - 2. - 3. - 4. ... comme dans mode opératoire 01.
5. Déposer délicatement une petite goutte de PVA coloré.
6. Poser la lame couvre objet ronde avec les précautions d'usage, afin d'éviter au maximum les bulles d'air ; cependant, il sera assez facile de les faire disparaître dans ce milieu de montage, par chauffage.
7. Luter au vernis à ongles transparent après quelques heures (c'est impératif).
8. Poser la (les) étiquette(s) d'identification et les vernir également.

L' AQUATEX est tout aussi intéressant car son solvant est également l'eau ; il polymérise très rapidement (moins d'une heure) ; nous ne le colorons pas dans la masse, car les essais se sont révélés très décevants. Il faut donc colorer précédemment.

MODE OPERATOIRE 03

1. - 2. - 3. - 4. ... comme dans mode opératoire 01.
5. Déposer délicatement une goutte de colorant (voir liste ci-dessus) et laisser agir durant 2 à 5 minutes → mêmes précautions que pour l'alcool, sous peine de trop étaler le pollen.
6. Eponger au maximum le liquide de coloration et puis sécher la préparation en la secouant de haut en bas, avec des gestes amples, non saccadés.
7. Déposer délicatement une petite goutte d'Aquatex.
6. Poser la lame couvre objet ronde avec beaucoup de précautions, car il sera impossible de faire disparaître des bulles dans ce milieu de montage.
7. Inutile de luter la préparation ; appuyer très légèrement sur la LCO, ce qui va provoquer un petit bourrelet circulaire, qui fera office de lut.
8. Poser la (les) étiquette(s) d'identification et les vernir également.