

## **Techniques méconnues ou nouvelles en Anatomie végétale.**

par Thierry DEROIN\*

**Résumé :** Mise au point sur quelques procédés de restauration, éclaircissement, coloration et montage des tissus végétaux.

**Mot-clé :** techniques de laboratoire botanique.

**Summary :** Clarification on some processes in restoration, clearing, dyeing and mounting of plant tissues.

**Key-word :** botanical laboratory techniques.

La mise en évidence des structures végétales - quel qu'en soit l'objectif (recherche, enseignement, muséologie) - peut nécessiter des procédés spéciaux, exposés dans des ouvrages oubliés ou parfois même à établir. Il m'a donc semblé intéressant de décrire brièvement quelques protocoles efficaces et économiques.

### **1. Restauration du matériel desséché.**

Il est important de pouvoir restituer rapidement et sûrement la morphologie des organes - notamment les fleurs - prélevés sur des spécimens d'herbier. De nombreuses techniques ont été proposées par DOP et GAUTIE (1928) :

- passage à l'eau bouillante pendant quelques minutes : l'échantillon est souvent endommagé par l'expulsion brutale de l'air qu'il renferme, il n'est pas éclairci.
- séjour dans une solution aqueuse très diluée d'ammoniaque ou de potasse à froid, pendant plusieurs jours : le procédé est excellent, mais long ; le matériel est un peu éclairci.
- séjour dans le liquide de Strasburger (mélange à volumes égaux d'eau, de glycérine et d'alcool à 90°), à froid pendant 1 semaine à 1 mois) : ce liquide est peu pénétrant et n'éclaircit presque pas.
- séjour dans le lactophénol d'Ammann ou ses dérivés (LANGERON, 1942), à chaud : ces liquides sont très utiles pour les Cryptogames ou comme milieux de montage. Ils gonflent rapidement les tissus, mais éclaircissent difficilement des organes épais riches en tannins. Le matériel restauré est parfois impossible à couper à la paraffine (durcissement des tissus scléifiés).

D'excellents résultats ont été obtenus en combinant et modifiant les 2 premiers procédés (DEROIN, 1993) :

---

\* T. D. : Laboratoire de Phanérogamie, Muséum National d'Histoire naturelle, 16, rue Buffon, 75005 PARIS.

- a - le matériel sec est plongé dans une solution aqueuse à 10-20 % d'ammoniaque du commerce, à froid.
- b - l'ensemble, contenu dans un flacon hermétique, est porté à l'étuve maintenue à 60°.
- c - la solution ammoniacale solubilise progressivement les tannins, et peut être changée plusieurs fois par décantation. On obtient alors un éclaircissement beaucoup plus poussé qu'avec le chlorallactophénol salicylé, pourtant très puissant.
- d - en général 8 à 24 h suffisent pour une restauration optimale. L'échantillon est rincé à l'eau courante, toujours par décantation (le matériel est un peu mou), puis lavé à l'eau acidulée (1 goutte d'acide acétique pour 10 ml d'eau, 1 h), enfin plongé dans le liquide de Strasburger (pour dissection) ou dans le fixateur : formol alcool - acide acétique (avant inclusion à la paraffine).

Ce protocole permet donc d'étudier la morphologie et l'anatomie sur le même spécimen. L'éclaircissement est maîtrisé, on ne craint pas une désintégration des tissus, comme cela peut se produire avec la potasse et la soude. Néanmoins, certains types de poils peuvent se détacher des épidermes (comme d'ailleurs sous l'effet de certains fixateurs).

## **2 - Emploi de l'eau de Javel sur coupes collées.**

On peut avoir besoin de vider des coupes déjà collées sur lames - mais encore trop sombres -, avant d'effectuer des colorations spécifiques. L'eau de Javel est un agent efficace mais qui détruit presque toutes les colles à base protéique. LANGERON (1942) recommande la gélatine formolée de Masson, mais le matériel végétal très lignifié se décolle quand même. Dès 1901, CHALON avait pourtant proposé une colle à base de gélose : 1 g de gélose + 1 000 ml d'eau + 0,5 g de phénol, fabriquée comme suit :

a - on laisse la gélose en poudre gonfler dans l'eau froide.

b - on chauffe à ébullition, puis on ajoute du phénol (ou du camphre, du thymol, etc.).

Les sections sérieées étalées et collées par ce liquide peuvent être traitées, sans décollement pendant 1 à 2 heures, par l'eau de Javel (ou la potasse).

## **3 - Coloration et infiltration par le bleu Astra.**

Le bleu Astra (phtalocyanine de cuivre sulfonée) est un colorant des parois pecto-cellulosiques largement utilisé par les botanistes de langue allemande (GERLACH, 1984 ; GERLACH et LIEDER, 1979 ; ZBÄREN et ZBÄREN, 1979). GERLACH conseille d'employer le mélange suivant : 0,5 g de bleu Astra + 100 ml d'une solution aqueuse d'acide tartrique à 2 %, qui moisit très facilement, à moins de rajouter un peu de phénol ou de thymol. Ce colorant est efficace sur les coupes à la main (env. 30 s), comme sur les coupes collées sur lame (env. 5 mn), il est facile à rincer à l'eau. Les tissus lignifiés peuvent alors être colorés par la safranine, mais les résultats sont bien meilleurs (tenue du colorant, pas d'empâtement) avec la fuchsine phéniquée de Ziehl-Neelsen à 10 % ; 0,1 g de fuchsine basique + 1 ml d'alcool à 90° + 0,5 g de phénol + 100 ml d'eau, comme le recommandait déjà NOVELLI en 1954. Les temps d'action sont les mêmes que pour le bleu Astra, on différencie par l'eau, puis l'alcool (éventuellement formolé, pour obtenir un noircissement de la fuchsine).

Ce protocole est intéressant pour les travaux pratiques, puisqu'une préparation de coupes à la main vidées peut être exécutée en 2 mn, au lieu de 15 pour le classique "carmin aluné-vert d'iode" (DOP et GAUTIE, 1928 ; DEYSSON, 1954). L'une de nos collègues, de l'Université de Paris 12-Créteil, a même utilisé avec succès cette double-coloration lors de T.P. sur les nodules des Légumineuses, la fuchsine se fixant énergiquement sur les bactéries. Les préparations se conservent bien et longtemps dans la glycérine ou les résines.

Le bleu Astra forme des solutions aqueuses colloïdales - et donc peu diffusibles (BONNEMAY, 1967) - d'un coloris intense à très faibles concentrations. Il était donc tentant d'exploiter ces propriétés pour infiltrer les tissus vasculaires *in vivo*, seule façon de les colorer spécifiquement, lorsque du sclérenchyme est également présent.

Le principe n'est pas nouveau : déjà au XVIII<sup>e</sup> siècle, DE LABAISSE avait utilisé les pigments anthocyaniques du fruit de *Phytolacca* (in GUYENOT, 1941) pour étudier l'ascension de la sève. On a ensuite beaucoup employé l'éosine (CHALON, 1907). CHAMBERLAIN (1920) mettait ainsi en évidence la vascularisation externe des ovules de *Cycas*, mais regrettait qu'on ne puisse fixer l'infiltration. Tout colorant en solution vraie diffuse nécessairement au cours de manipulations ultérieures. DOP et GAUTIE (1928) ont suggéré de coaguler des solutions colorées par le formol ou l'alcool, mais ils ne donnent aucun protocole précis. On ne peut pas non plus adapter les fluides mis au point pour l'appareil circulatoire des animaux (LANGERON, 1934), à cause de leur pression osmotique trop élevée.

Le procédé suivant, très simple, donne de bons résultats :

- a - le matériel vivant - éventuellement débité en sections de 2 à 5 mm - est plongé dans une solution aqueuse de Bleu Astra à 0,25-1 %.
- b - le liquide pénètre les vaisseaux, il n'est pas toxique pour les tissus.
- c - le temps d'infiltration est déterminé empiriquement, le spécimen est alors rincé à l'eau (le colorant n'a aucune affinité pour les épidermes), les sections parenchymateuses exposées sont éliminées au rasoir (les parois fixent énergiquement le pigment).
- d - l'infiltration est stabilisée par le fixateur : formol, alcool, acide acétique (ou encore par le formol ou l'alcool seuls, voire l'acétone si on ne craint pas les déformations dues à une déshydratation brutale).
- e - les tissus peuvent être éclaircis par la glycérine, l'alcool, l'acétone, le toluène et le terpinéol.

Les préparations obtenues sont très démonstratives pour l'étude de l'anatomie vasculaire nodale et florale.

#### 4 - Un milieu de montage au polystyrène et au paradichlorobenzène.

En 1957, SOUDET a proposé la formule d'une résine de montage au polystyrène : 20 g de polystyrène concassé + 50 ml de toluène + 12 ml de dibutylphtalate (plastificateur).

Celle-ci durcit rapidement et le nettoyage des préparations est plus aisé qu'avec les résines usuelles (Euparal, Eukitt, Baume du Canada, etc.), puisqu'il suffit de gratter avec un vaccinostyle, sans employer de solvant.

On obtient aussi de bons résultats avec le procédé original suivant, inspiré du précédent :

- a - on réalise une dissolution de 10 g de polystyrène expansé blanc (emballages

- recyclés) pour 50 ml de toluène : le processus est lent et doit être entrepris sous hotte aspirante.
- b - le liquide est maintenu au repos dans une bouteille fermée, jusqu'à élimination des bulles d'air.
  - c - on ajoute alors 6 ml de dibutylphtalate et 24 g de paradichlorobenzène (antimite des droguistes), dont la dissolution pourra être activée par la chaleur (étuve ou radiateur).
  - d - le liquide visqueux obtenu est parfaitement transparent et peut servir au montage de toutes sortes d'objets anhydres. Il convient aussi au lutage des lamelles couvrant des milieux liquides glycérinés, sans exiger un nettoyage parfait de la lame.
- Ce milieu est peu coûteux. Il est facile à enlever au vaccinostyle (grattage) ou avec un chiffon et de l'acétone (gommage, comme avec le "rubber cement" utilisé pour le montage des photos ) .

### Bibliographie

- BONNEMAY, M., 1967 - Les colloïdes. *Que sais-je ?* n° 104. P. U. F., 128 p.
- CHALON, J., 1901 - Notes de Botanique expérimentale, 2<sup>ème</sup> éd. Wesmael-Charlier, Namur, 339 p.
- CHAMBERLAIN, C. J., 1920 - Vascular bundles in living tissues in *Methods in Plant Histology*, 3e éd. The University of Chicago Press, 314 p. : 135.
- DEROIN, T., 1993 - Anatomie florale de *Humbertia madagascariensis* Lam. *Bull. Mus. nat. Hist. nat., Paris*, 4<sup>ème</sup> sér., 14, section B, *Adansonia*, n° 2 : 235-255.
- DEYSSON, G., 1954 - Eléments d'anatomie des plantes vasculaires. S.E.D.E.S., Paris, 266 p.
- DOP, P. et GAUTIE, A., 1928 - Manuel de Technique botanique, 2<sup>ème</sup> éd. Lamarre, Paris, 594 p.
- GERLACH, D., 1984 - Botanische Mikrotechnik, 3<sup>ème</sup> éd. Thieme, Stuttgart, 311 p.
- GERLACH, D. et LIEDER, J., 1979.- Taschenatlas zur Pflanzenanatomie. Kosmos Franckh, Stuttgart, 71 p.
- GUYENOT, E., 1941 - Les Sciences de la Vie aux XVIIe et XVIIIe siècles. "L'Évolution de l'Humanité", LXVIII, Albin Michel, Paris, 462 p.
- LANGERON, M., 1934 - Méthodes des injections physiologiques. In *Précis de Microscopie*, 5<sup>ème</sup> éd., Masson, Paris, 1205 p. : 1064-1072.
- LANGERON, M., 1942 - Précis de Microscopie, 6<sup>ème</sup> éd., Masson, Paris, 1340 p.
- NOVELLI, A., 1954.- Le comportement fonctionnel des cellules dans les tissus démontré par une nouvelle méthode de coloration. *Bull. Micr. appl.*, sér.2, 4 : 89-94.
- SOUDET, P., 1957 - Emploi d'un milieu de montage au polystyrène comme succédané du baume de Canada pour les préparations histologiques. *Bull. Micr. appl.*, sér.2, 7 : 34-35.
- ZBÄREN, D. et ZBÄREN, J., 1979 - Mikroskopieren. Taschenbuch 28. Hallwag, Berne, 96 p.