

TP 4 : LA DOUBLE COLORATION

INTRODUCTION

Le terme « histologie » signifie « Discours sur les tissus ». Il recouvre la description des caractères particuliers qui font que certains « groupes » de cellules sont bien distincts par rapport à d'autres « groupes ». Le terme dérive du Grec « Histo » signifiant « tissu » et « logos » signifiant « Science »

L'étude microscopique des organes permet de connaître l'organisation et les structures internes des plantes primaires et secondaires, des différents organes, ainsi que leurs modifications ou adaptations.

On appelle plan ligneux d'une essence, le groupement et la nature des différents éléments constitutifs de son bois ; vaisseaux, rayons ligneux, fibres, parenchymes dont l'agencement reste constant pour une espèce donnée, permettant de caractériser les espèces ligneuses.

LA METHODE

Un grand nombre de méthodes ont été mises au point, lesquelles permettent de connaître les tissus végétaux. Le problème reste au niveau de la confection des coupes transversales de différentes parties de la plante et le contrôle de la qualité des coupes concernant leur épaisseur ainsi que leur déformation lors de la coupe.

La qualité de l'observation microscopique dépend de leur nature. Plus la coupe est mince, plus elle est bonne pour la coloration.

Dans toute démarche d'ordre histologique, quatre étapes se succèdent :

- ✓ Le choix du matériel à étudier ;
- ✓ La technique permettant de visualiser les structures ou les phénomènes que l'on veut étudier ;
- ✓ La production d'images de ces structures ou de ces phénomènes, par des moyens optiques et l'interprétation de ces images ;
- ✓ Les méthodes utilisées en histologie varient selon l'échantillon à étudier et les objectifs de l'examen.

MATERIELS ET SOLUTIONS

- ✓ Rameaux, feuilles, tiges et racines : Échantillons végétaux à étudier ;
- ✓ Lames de rasoir neuves ;
- ✓ Boîtes de pétri, verrerie et quelques petits verres de montre vides ou capsules propres (quatre au minimum) ;
- ✓ Une bande de papier filtre ou une bande de tissu filtre ;
- ✓ Un tamis pour filtrer les coupes fines ;
- ✓ Eau de javel ;
- ✓ Une pince fine et un chiffon ;
- ✓ Eau distillée (Rinçage) ;

FILIÈRES : SCIENCES ALIMENTAIRES ET ECOLOGIE

- ✓ Acide acétique à 1% (Fixateur) ;
- ✓ Vert d'iode, carmin aluné ou vert de Méthyle et rouge Congo (Colorants) ;
- ✓ Lames (porte-objets) ;
- ✓ Lames (couvre-objets) ou lamelles ;
- ✓ Un microscope optique à grossissement multiple, photo-microscope et appareil photo numérique ;
- ✓ Le vernis à ongles ou la glycérine pour la conservation des coupes fines obtenues ;
- ✓ Microscope optique à grossissement multiple ;
- ✓ Micromètre pour effectuer les mesures histométriques et appareil photo numérique ;
- ✓ Toutes les activités histologiques ont en commun l'action d'observer et d'interpréter ce qui est vu.

LA DOUBLE COLORATION

Parmi les techniques de coloration, une seule reste plus utilisées. Elle permet de réaliser la différenciation de certains tissus qui est la technique dite de double coloration au vert de méthyle - rouge Congo. Elle comprend les différentes étapes et les temps suivants :

Nous trempions les coupes dans un verre de montre, contenant de l'eau de Javel, et ce durant 10 à 20 minutes pour détruire le contenu cellulaire et blanchir les membranes. Nous rinçons les coupes à l'eau distillée pour éliminer l'eau de Javel.

Acide acétique à 1 % pendant 5 à 10 minutes pour éliminer les traces d'eau de Javel et fixer les autres colorants.

Vert d'Iode pendant une minute au maximum pour les tissus lignifiés.
Nous rinçons les coupes avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.

Carmin aluné pendant 10 à 15 minutes puis rincer à l'eau distillée.

Pour le montage, on utilise la technique du montage entre lame et lamelle dans une goutte d'eau distillée en raison de sa simplicité et la disponibilité des produits et l'observation au microscope les meilleures coupes obtenues pour la fixation avec la résine synthétique.

TRAVAIL A FAIRE :

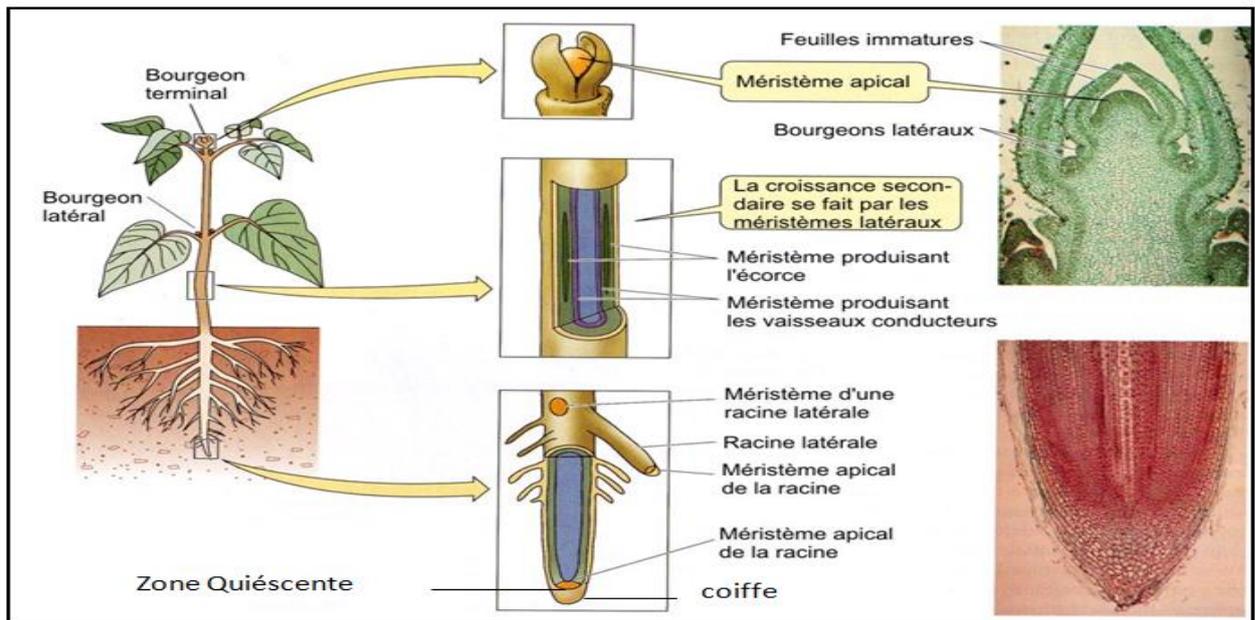
- Réalisation des coupes histologiques des organes fraîches (Racine, Tige et feuille) d'une espèce choisie
- La coloration de ces coupes
- Observation microscopique des différents tissus de ces organes
- Fixation et conservation

MERISTEMES PRIMAIRES RACINAIRES ET CAULINAIRES

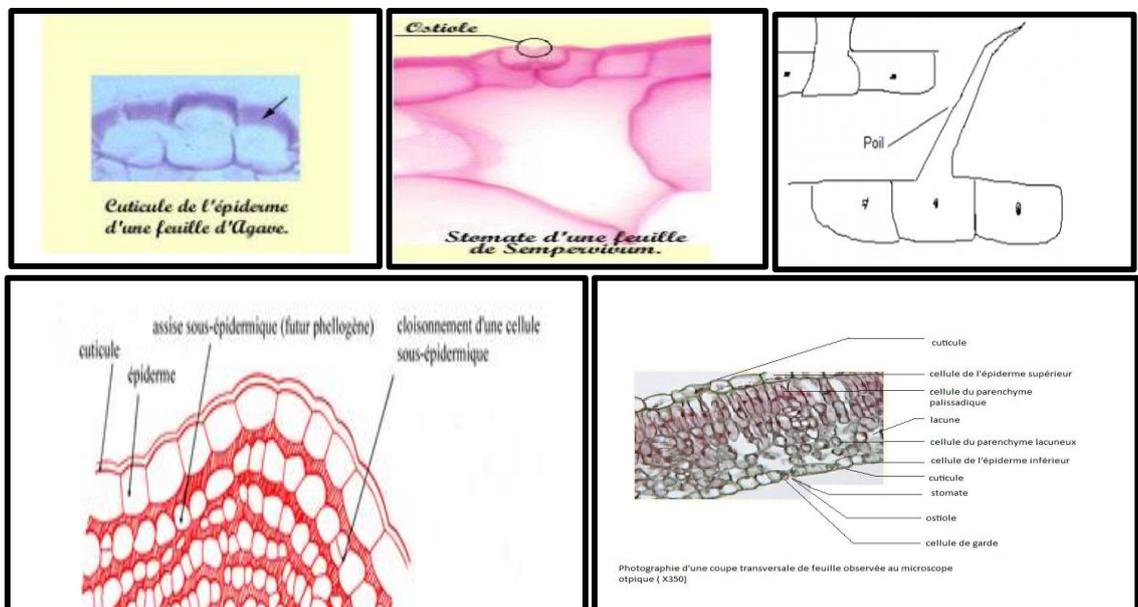
Les **méristèmes** sont formés de cellules embryonnaires indifférenciées, responsables de la croissance des plantes en longueur et en épaisseur.

On reconnaît deux grands types de méristèmes :

- **Méristème apical** : Responsable de la croissance primaire = croissance en longueur localisés dans les bourgeons et à l'extrémité des racines
- **Méristème latéral** : responsable de la croissance secondaire = croissance en épaisseur situés à la périphérie des tiges et racines

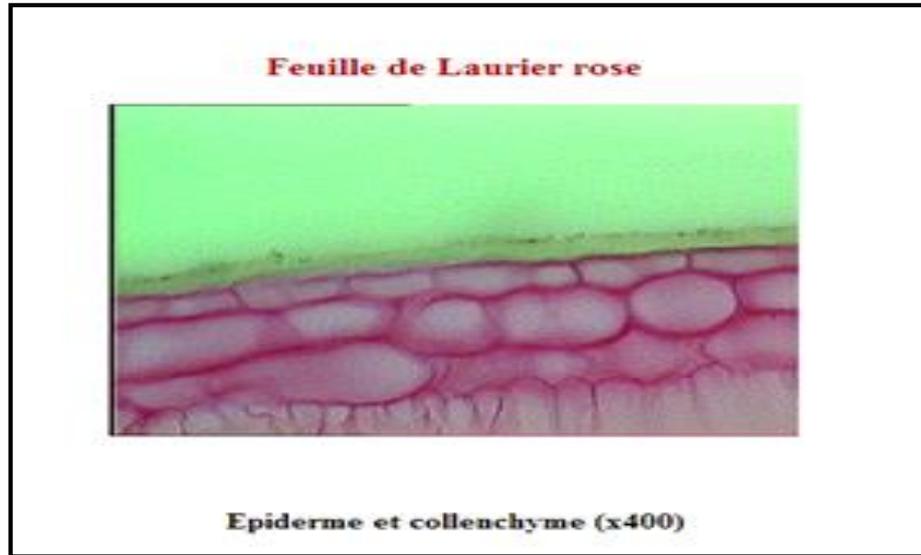


LES TISSUS PROTECTEURS, DE REVETEMENT ET DE SOUTIEN (L'ÉPIDERME, COLLENCHYME ET SCLERENCHYME)

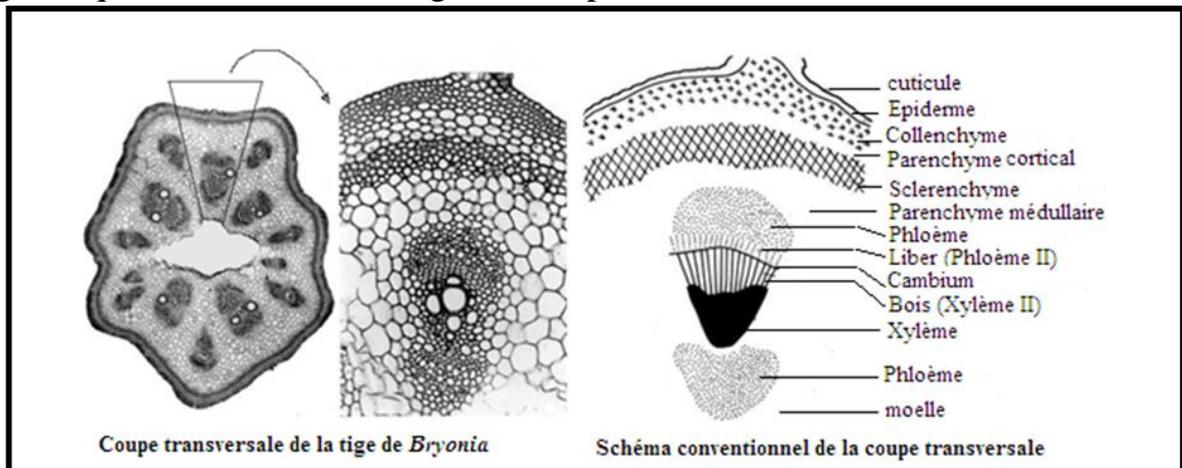


Le collenchyme

Il est généralement situé en anneaux ou en îlots sous l'épiderme des tiges et des pétioles, ou encore accolé à des vaisseaux conducteurs dans les pétioles ou les limbes des feuilles.



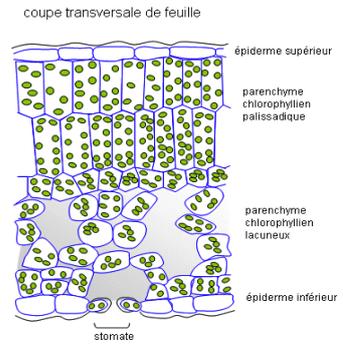
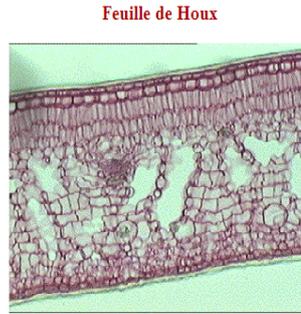
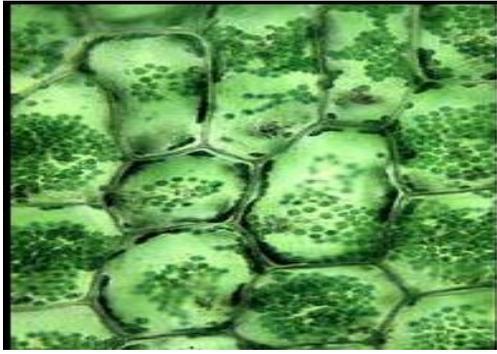
Le sclérenchyme est le tissu de soutien des organes dont l'allongement est achevé. C'est un tissu constitué de cellules mortes dont les parois sont épaissies par un dépôt de lignine qui confère dureté et rigidité à la plante.



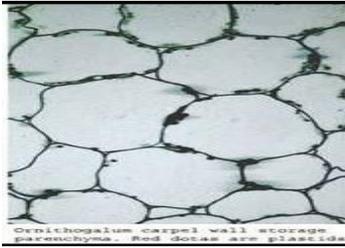
PARENCHYMES (CHLOROPHYLLIEN – RESERVE – AERIFERE – AQUIFERE)

Les parenchymes sont des tissus peu différenciés qui sont le siège des fonctions élaboratrices de la plante (photosynthèse et stockage des réserves). Les cellules parenchymateuses sont en général isodiamétriques ou allongées, plus ou moins arrondies dans les angles. Les espaces qu'elles délimitent alors entre elles sont appelés méats ou lacunes selon leur taille :

* **parenchyme chlorophylliens** ou assimilateurs, palissadique ou lacuneux, ils sont situés dans les régions externes des tiges et dans les feuilles.

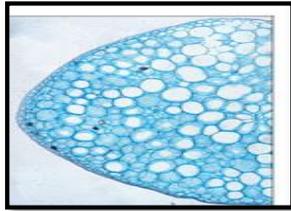


Parenchyme chlorophyllien



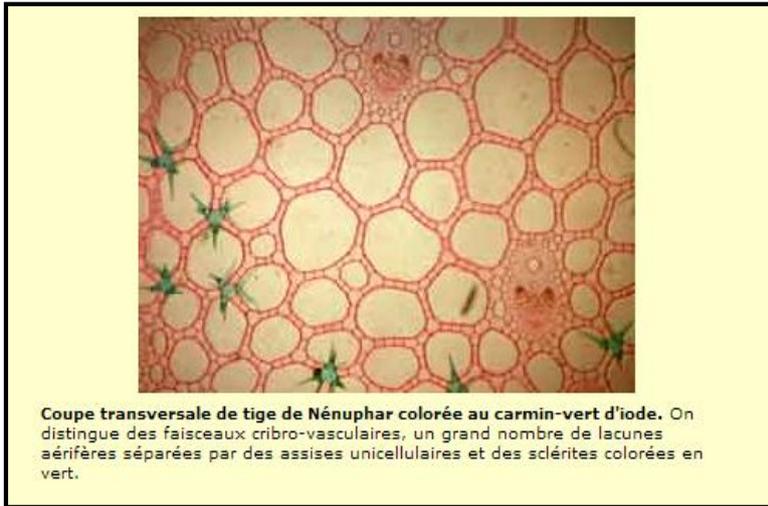
* **Parenchymes de réserve**, rôle dans la mise en réserve de matériaux élaborés par les cellules chlorophylliennes, ils sont présents dans de nombreux organes tels que les racines, les tiges souterraines (ou rhizomes), les tubercules, les tiges

aériennes, les fruits et les graines.



* **Parenchyme aquifère**, constitués de cellules volumineuses, pourvues d'une vacuole très développée, abondants dans les tiges ou les feuilles des plantes grasses où ils constituent une réserve d'eau ;

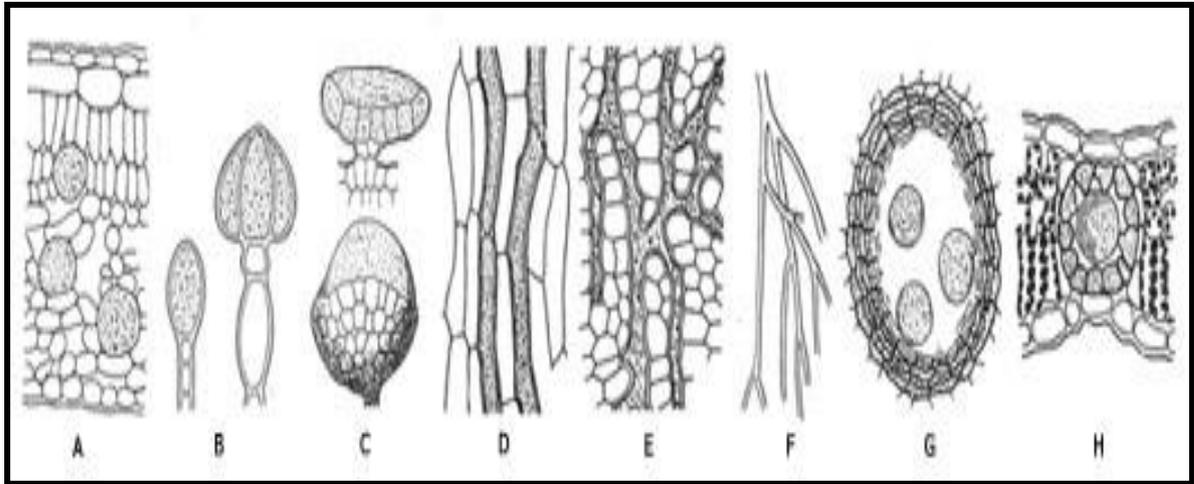
* **Parenchyme aérifère**, variétés de tissus lacuneux qui emprisonnent de l'air (plantes aquatiques).



Tissus conducteurs secondaires

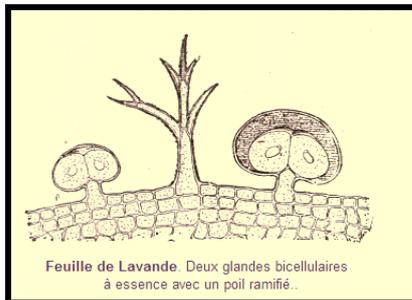
Tissus sécréteurs (Poils – Glandes – Cellules à tanins – laticifères)

Les tissus de sécrétion sont formés de **cellules spécialisées** dans la synthèse de certaines substances telles que les essences, les tanins, la résine ou encore le latex. Il existe aussi de la même manière des poils sécréteurs (fleur de lavande) ou encore des laticifère et des glandes digestives chez les plantes carnivores. Enfin, on parle de **poche sécrétrice ou canon sécréteur** lorsque les sécrétions sont rejetées dans l'espace intercellulaire.

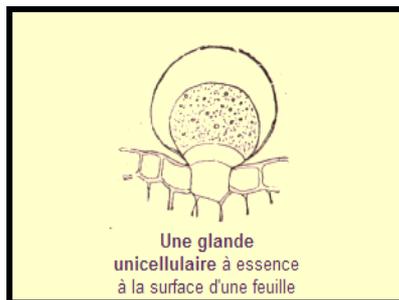


Cellules sécrétrices et tissus sécréteurs

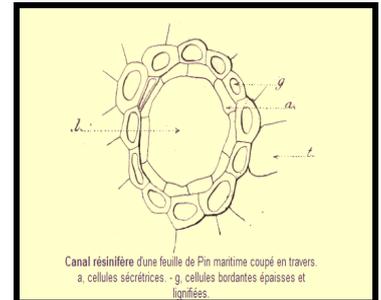
- **Poches sécrétrices** tapissées d'une ou de plusieurs couches de cellules sécrétrices.
- **Canaux sécréteurs résinifère** : ce sont des poches très allongées et de faible diamètre. Entourées de cellules épithéliales sécrétrices



Feuille de Lavande. Deux glandes bicellulaires à essence avec un poil ramifié.



Une glande unicellulaire à essence à la surface d'une feuille

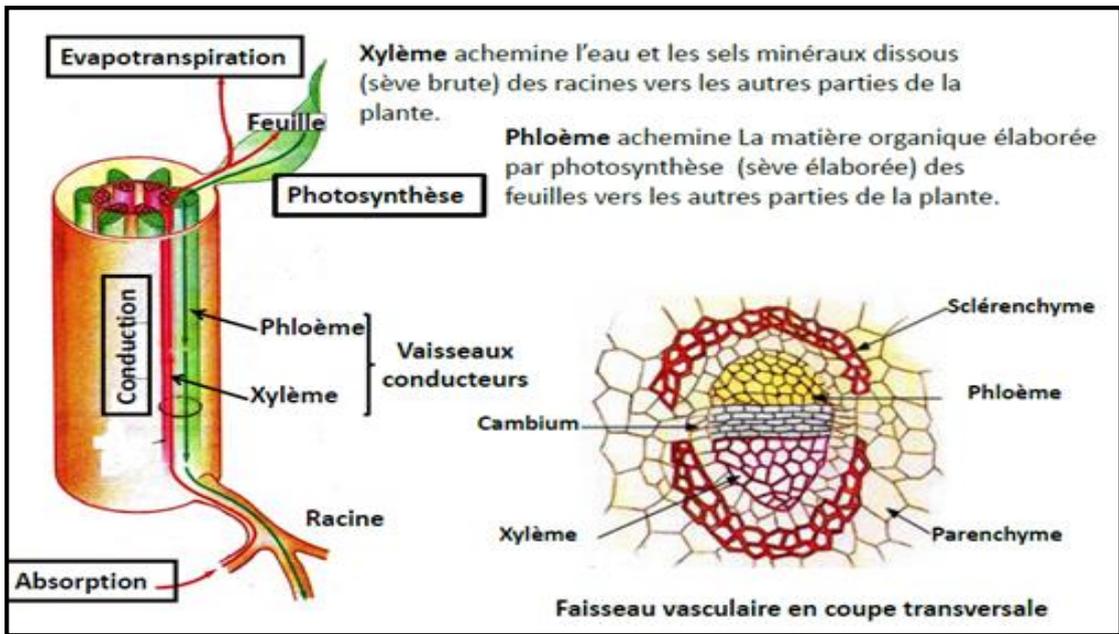


Canal résinifère d'une feuille de Pin maritime coupé en travers. a. cellules sécrétrices - g. cellules bordantes épaisses et lignifiées.

Schéma d'un canal résinifère d'un pin

TISSUS CONDUCTEURS PRIMAIRE (XYLÈME, PHLOÈME)

On peut dire que l'ensemble du végétal est parcouru par un double courant de liquides qui sont les sèves : la sève brute est une solution de sels minéraux puisés dans le sol au niveau des racines et circule de bas en haut pour atteindre les tissus assimilateurs, la sève élaborée est une solution organique riche en glucide, formée par les tissus assimilateurs, et circulant de haut en bas.



Ces deux circulations se font séparément, grâce à deux types de tissus conducteurs : le xylème pour la sève brute, le phloème pour la sève élaborée.

Malgré leur diversité, xylème et phloème ont une origine commune, car ils se différencient d'un même tissu embryonnaire pro conducteur : le pro-cambium ou le cambium.

Le phloème est constitué de tubes criblés : ce sont des cellules allongées, vivantes, dont la membrane restée cellulosique est percée par endroits de ponctuations groupées dans des plages qui ont l'apparence de cribles.

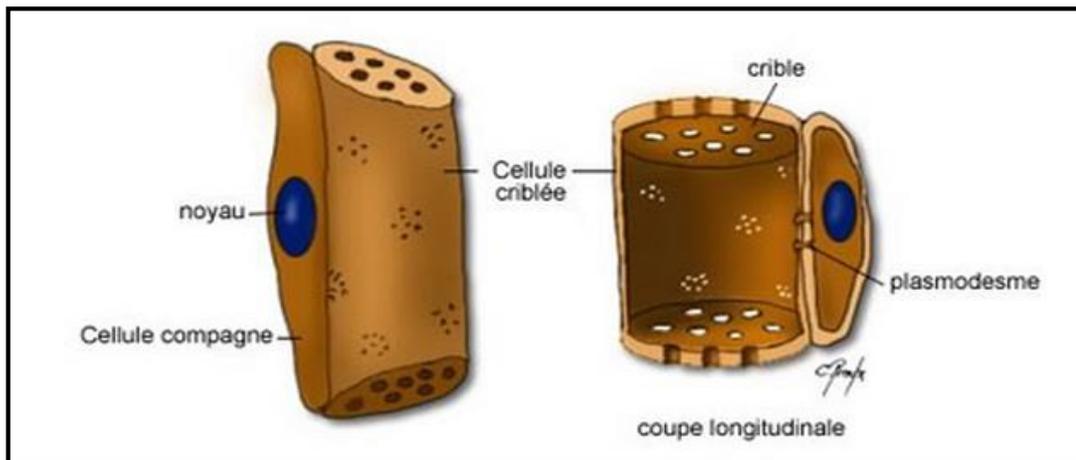


Schéma de tube criblé du phloème