



LABEX MMCD



Navier

CENTRE DE
RECHERCHE
ET DE
RESTAURATION
DES MUSÉES
DE FRANCE

WORKSHOP « BOIS ET IMAGERIE » - 11 et 12 mai 2016 - PARIS



CR préparé pour : GDR Sciences du Bois
Auteur : Guy COSTA (guy.costa@unilim.fr), MCF-HDR
04 juillet 2016

TECHNIQUES DE MICROSCOPIE

Objectif

L'objectif du groupe « Techniques de Microscopies » était de faire partager les expériences de chacun quant aux techniques de préparation des échantillons, de systèmes de coupe et microscopie optique et électronique.

Résumé de l'activité du groupe

Après une présentation générale par Françoise LAURENS, le groupe s'est focalisé sur les méthodes de préparation des échantillons. Différentes expériences ont été rapportées à la communauté:

La qualité de la préparation des objets à observer est primordiale en microscopie. Cette préparation devant préserver les ultrastructures, la composition biochimique des échantillons à observer. De plus la qualité des échantillons améliorera grandement l'analyse, les immuno-marquages voir les analyses de surface des échantillons.

- Le bois vert peut être coupé sans ramollissement préalable. Des sections entières de bois vert avec du cambium intact et de l'écorce peuvent être obtenus en tamponnant avec un pinceau fin, avant la coupe, la surface avec de l'alcool absolu. (l'alcool durcit le tissu immédiatement).
- Les échantillons de bois « tendres » peuvent être placés pendant 24 h dans des solutions de 30, 60 et 100% de poly (éthylène glycol) 4000. Avant de couper, on colle une petite bande de ruban adhésif sur la surface. Ce faisant, la section mince reste complète.
- Les échantillons de bois « tendres » peuvent être imprégnés dans une solution de carbowax 400 ou 500
- Des échantillons de bois secs mi-durs sont amollis par ébullition pendant 5 à 10 min. Comme les marques d'identification écrites (faites par crayon ou non-imperméable à l'eau stylo-feutre) disparaissent souvent pendant l'ébullition, les échantillons peuvent être placés dans les bas de dames, séparés les uns des autres par des noeuds, comme une rangée de saucisses.
- Des échantillons de bois secs et très durs peuvent être coupés après ébullition pendant plusieurs heures. On peut utiliser une solution à 10% glycérine et conserver l'échantillon pendant plusieurs jours.
- Des échantillons de bois secs et très durs peuvent également porté à saturation dans l'eau froide sous vide pendant plusieurs heures suivant l'état de l'échantillon et sa taille. Cette solution s'avère meilleur pour l'histo chimie que l'eau chaude qui se traduit par une perte de matériel
- Des échantillons de bois secs et très durs peuvent être placés plusieurs heures dans un bain d'alcool à 96%, d'eau et de glycérine (1:1:3, v:v:v)

Des traitements d'échantillons de bois en paraffine voir après inclusion en résine LR white peuvent également être envisagé, mais ici les techniques sont plus longues, la taille des échantillons est elle également obligatoirement plus petite.

Outre la préparation des échantillons, des questions autour des méthodes de coloration des échantillons nous ont été présentées. Parmi celle ci: les colorants sont des produits permettant de teindre une ou plusieurs structures de façon plus ou moins durable. Ils permettent ainsi de détecter au sein d'une coupe végétale, la présence de tel ou tel tissu ou polymère. Aussi, l'association de deux colorants ajoute une distinction supplémentaire à la répartition des polymères au sein de la coupe végétale. Plusieurs techniques de coloration ont ainsi été utilisées pour l'identification et la distribution des lignines et de la cellulose

Bleu de toluidine

Le bleu de toluidine (C.I. 52040) ou chlorhydrate de triméthylthionine est un colorant sulfuré basique. Il génère une coloration métachromatique quelque soit le pH. Ce colorant a été utilisé pour visualiser les structures tissulaires des coupes semi-fines enrésinées ou non. Son utilisation sur ces coupes permet en effet de vérifier le bon positionnement de l'échantillon dans l'appareil de coupe ainsi que la localisation précise de la zone coupée.

La solution est préparée à 0,1% dans l'eau dont quelques gouttes sont versées sur les coupes placées sur lame. Après 30 sec, ces dernières sont lavées à l'eau ultra-pure et la lame séchée sur plaque chauffante. Ainsi, les tissus prennent différentes teintes de bleu au niveau des parois suivant leur composition et leur acidité. Une paroi lignifiée apparaît bleu foncée intense or une paroi riche en pectine (acide) est plus claire.

Phloroglucine Chloride

Cette coloration permet la mise évidence de la présence des lignines dans la paroi végétale. C'est une coloration fugace qui demande une observation rapide au microscope. Dans un premier temps, les coupes sont posées sur lame auxquelles on ajoute quelques gouttes de phloroglucine 1%. Après 5 minutes à l'obscurité, quelques gouttes d'HCl à 18% sont ajoutées et une coloration rose est observée au niveau des zones lignifiées. Le montage s'effectue par ajout de PBS/glycerol entre lame et lamelle.

Maïle

Cette méthode permet de colorer les lignines et de distinguer leur richesse en monolignols de type S (syringyl) ou de type G (guaiacyl). Les premières développent une couleur rouge et les secondes une couleur brune.

Après imprégnation des coupes et incubation de 10 min dans une solution de permanganate de potassium à 1%, cette dernière est éliminée et deux lavages à l'eau distillée sont effectués. Un ajout d'acide chlorhydrique à 18% pendant 2 min permet la décoloration des coupes. Finalement, les coupes sont traitées par de l'ammoniaque pur puis montées entre lame et lamelle en présence de PBS/glycérol (v/v). La conservation des coupes colorées est d'environ une journée.

Les techniques permettant une double coloration: Lignine et cellulose

Il existe plusieurs techniques de coloration des coupes permettant de voir les cellules lignifiées des cellules non lignifiées: FASGA,

- FASGA (Tolivia et Tolivia 1987)

La coloration au fasga, mise en évidence Tolivia et Tolivia en 1987, correspond à l'association de deux colorants : (i) la safranine (C.I. 50240) qui colore en rouge le bois et le suber. Elle donne une coloration métachromatique et (ii) le bleu alcian (C.I. 74240) qui est un colorant basique donnant une couleur bleue. Il se lie aux anions sulfates et carboxyliques des tissus grâce à des liaisons électrostatiques et permet la mise en évidence des glucides acides.

Quelques gouttes de fasga dilué au 1/2 additionnées d'une goutte d'acides acétique sont déposées sur les coupes présentes sur lame. Pour assurer l'imprégnation des tissus par les colorants, les coupes doivent avoir été conservées dans une solution d'éthanol 70% au préalable. Les lames sont ensuite placées à l'obscurité toute la nuit en atmosphère humide puis sont lavées à l'eau distillée. Finalement, une lamelle est positionnée sur les coupes après avoir ajouté préalablement une goutte de PBS/glycérol (v/v)

Solution Safranine 1% (qsp 100 ml)		Solution de Bleu alcalin 0,5% (qsp 100 ml)	
Safranine O	1 g	Bleu alcalin	50 mg
Acétate de sodium	1 g	Éthanol absolu	100 ml
Éthanol absolu	75 ml		
Formaldéhyde	25 ml		
Solution mère FASGA (qsp 65 ml)			
Solution safranine 1 %	3 ml		
Solution bleu alcian 0,5 %	11 ml		
Glycérine 99 %	30 ml		
H2O	20 ml		
Acide acétique glacial	1 ml		
Solution mère FASGA à diluer au 1/4 avant utilisation			

Proposition

1-Le groupe a décidé de tester les méthodes pratiquées par les uns et les autres sur 2 échantillons:

- du peuplier — échantillon d'Orléans
- du douglas — échantillon de Limoges

Tous les laboratoires le souhaitant peuvent participer à cet échange technique en réalisant des coupes au microtome suivant leur protocole habituel à partir de cube de bois 1 cm de coté.

Contact : Guy Costa, guy.costa@unilim.fr

2-Limoges propose d'organiser pour 2018 un workshop imagerie autour de la microscopie vibrationnelle.