

**TP SV
B1**
HISTOLOGIE VEGETALE 1

COURS : SV-B-2, SV-C-1, SV-A-2 TP : SV-C1, SV-C2, SV-B2



L'observation morphologique d'Angiospermes montre que ces organismes sont constitués d'organes différenciés. Une observation rapide au microscope optique permet de constater que ces organes sont eux-mêmes formés de cellules présentant des caractéristiques différentes, formant des tissus végétaux.

Le but de ce TP est d'étudier la diversité des tissus primaires des Angiospermes, et d'appliquer cette étude à la compréhension de l'organisation des organes souterrains.

Le TP SV-B2 complètera cette étude, avec l'observation histologique des organes aériens.

Les tissus secondaires seront étudiés en BCPST2.

Programme officiel :

- Réaliser ou exploiter des préparations microscopiques (colorées au carmino-vert ou bleu coton-lactique) pour :
 - Identifier les caractéristiques structurales des ectomycorhizes et endomycorhize
 - Repérer les différents tissus traversés par la solution hydrominérale dans une racine
 - Identifier les tissus conducteurs dans les coupes transversales et/ou longitudinales de racine
 - Identifier les structures de réserve d'un organe végétatif au choix à l'échelle de l'organe, de la cellule, des molécules
 - Mettre en évidence des réserves amylacées
- Identifier dans une coupe d'organe végétatif d'Angiosperme les principaux tissus et relier leur structure avec leur fonction

Compétences :

- Réaliser une préparation de microscopie optique, y compris à main levée, avec ou sans coloration
- Mettre en œuvre un protocole de coloration adapté à la problématique biologique
- Utiliser le colorant adapté pour mettre en évidence un tissu ou des molécules
- Réaliser une observation en microscopie optique : objectifs et grossissement, intensité lumineuse, diaphragme, mise au point
- Déterminer un ordre de grandeur ou la taille d'un objet à partir d'une échelle ou d'un grossissement
- Exploiter des clichés de microscopie : optique, électronique, à fluorescence
- Identifier de manière argumentée un organe, un tissu ou un type cellulaire :
 - Epiderme, rhizoderme, xylème I, phloème I, parenchymes, collenchyme, sclérenchyme, méristèmes
 - BCPST2 : xylème II (bois), phloème II (liber), suber, phelloderme
- Réaliser un schéma avec figurés conventionnels (les figurés restant à la disposition des étudiants)

1. Rappels initiaux : la morphologie des Angiospermes

Voir poly 1 -préparation

2. Les tissus primaires des Angiospermes

Voir poly 1 -préparation

3. Méthodologie 1 : Préparation d'échantillons

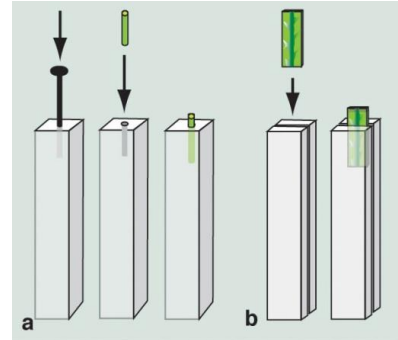
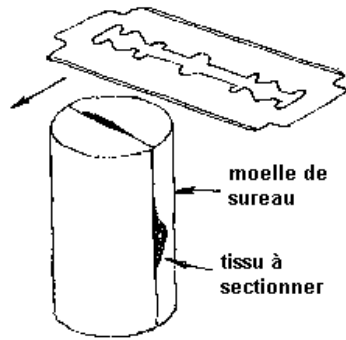
La détermination de l'anatomie d'un organe végétal impose la réalisation d'une préparation microscopique, ce qui inclut en général : réalisation d'une coupe mince, coloration, observation et interprétation.

Les cellules étudiées en anatomie végétale sont le plus souvent vidées de leur contenu : on n'observe alors en réalité que les parois squelettiques.

3.1. Réalisation de coupes minces

Le but est de réaliser des coupes **les plus fines possibles** (dans l'idéal entre 5 et 10 μm), soit transversales à l'organe étudié soit longitudinales. Les coupes sont réalisées avec une lame de rasoir, et doivent être parfaitement **perpendiculaires** à l'axe ou au plan de symétrie de l'organe étudié ; les coupes ne doivent pas être obliques.

Pour plus de commodité, on inclut en général l'échantillon dans de la moelle de sureau pour le couper ; on réalise pour cela une petite loge au préalable dans la moelle de sureau.



Inclusion dans de la moelle de sureau

3.2. Coloration

Les tissus végétaux se reconnaissent à leur paroi squelettique, qui diffère en termes de forme, d'épaisseur et de composition.

La technique de coloration utilisée consiste donc en une mise en évidence de la forme et de la nature des parois. Pour cela, les cellules sont dans un premier temps vidées de leurs contenus, puis les parois sont colorées en utilisant des colorants de différents composants pariétaux :

- Le carmin aluné : colore de manière peu spécifique toutes les parois (coloration non spécifique de la cellulose).
- Le vert d'iode : coloration non spécifique de composés pariétaux : la lignine est colorée en vert, la subérine en marron. La coloration par le vert d'iode masque la coloration rose du carmin aluné.

⇒ Protocole de double coloration carmino-vert

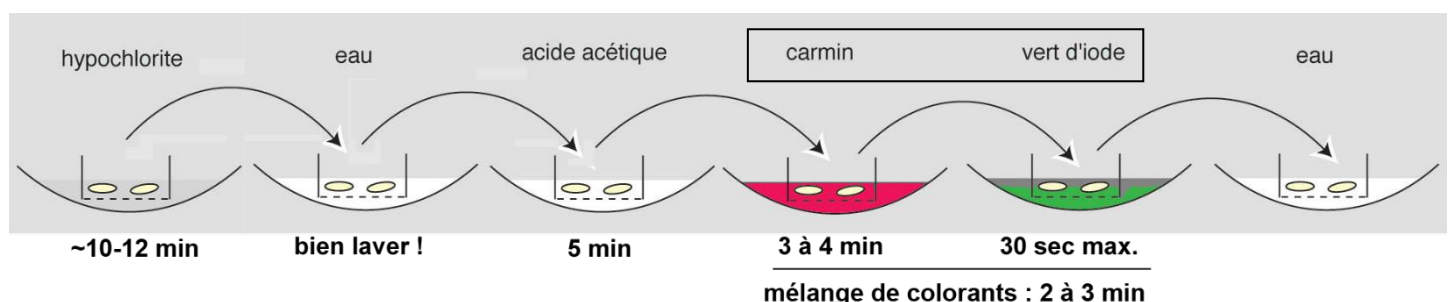
Préparation de la coloration

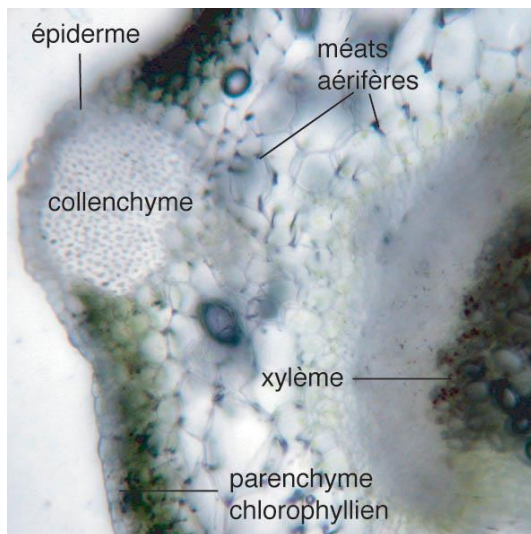
Les coupes fines sont placées délicatement dans un panier métallique (ou autre) placé dans un verre de montre contenant de l'eau. */!\ attention à ne pas pincer ni couper les coupes ! Utiliser une aiguille lancéolée ou un pinceau fin pour manipuler les coupes.*

Vidage et coloration

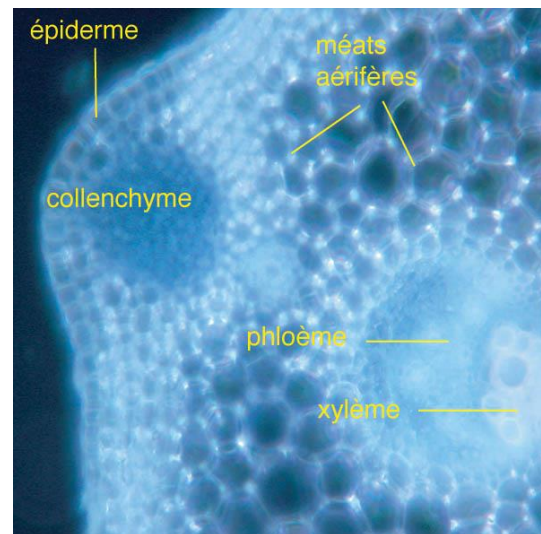
Les coupes sont transportées successivement dans une série de verres de montre, à l'aide du panier :

- ① **Vidage** : Hypochlorite de sodium (= eau de Javel) [la Javel détruit le contenu des cellules tout en préservant les parois] 10 à 12 minutes
 - ② Eau : lavage abondant des coupes (faire des petits mouvements avec le panier pour bien éliminer toute la Javel ; remplacer l'eau de lavage entre deux séries de coloration)
 - ③ **Mordançage** : Acide acétique dilué (1%) pendant 5 minutes [mordançage : l'acide acétique détruit l'excès d'eau de Javel et facilite la fixation des colorants] ; ne pas rincer
 - ④ **Coloration** : Carmin aluné (3 à 4 minutes) puis vert d'iode (ou vert de mirande) (30 secondes maximum), ou mélange des deux colorants (2 à 3 minutes) [coloration des parois]
 - ⑤ Eau [lavage des excès de colorant]
- Puis monter entre lame et lamelle dans de l'eau distillée et observer au microscope. (Sélectionner les coupes les plus fines et -si visible à l'œil nu- celles visiblement mieux colorées)

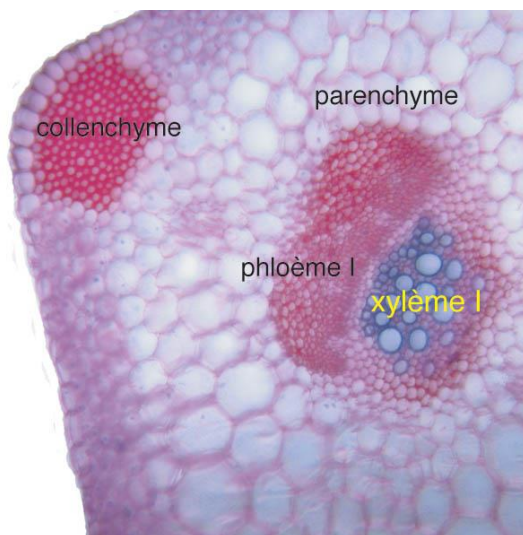


⇒ Exemples de d'observations**Intérêt des colorations en anatomie végétale : quelques observations d'une coupe de pétiole de Céleri**

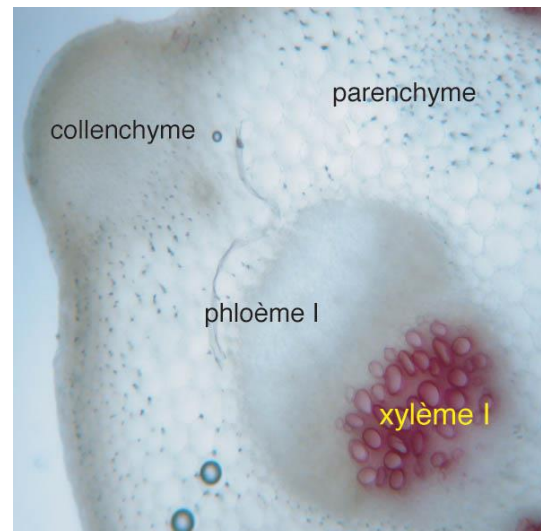
Coupe non colorée



Coupe non colorée en contraste de phase



Coupe colorée au carmin aluné – vert d'iode



Coupe colorée à la phloroglucine chlorhydrique (coloration spécifique de la lignine)

4. Méthodologie 2 : Observation et représentation en histologie végétale**4.1. Méthodologie générale d'observation d'une coupe végétale**

Toujours commencer par une observation au **faible grossissement** :

- Observer l'**organisation générale** de la coupe (transversale, longitudinale, tangentielle, partielle, entière...)
- Observer les éventuelles **symétries** présente (radiale, bilatérale...)

Ensuite, en utilisant si besoin des plus **forts grossissements pour observer des points de détail** (ne pas hésiter à faire des aller - retour entre les différents grossissements : ne pas rester « bloquer » à un trop fort grossissement) :

- Repérer les différents **tissus** présents et, un par un, réfléchir à leur nature
- Repérer l'**organisation** relative des différents tissus → détermination précise des différents tissus (à partir des observations de détail ET de leur position anatomique)

Déterminer le type d'organe présenté.

4.2. Représentations et diagnose

Les observations réalisées peuvent être résumées sous formes de plusieurs schémas et d'une diagnose :

⇒ Schéma conventionnel de la coupe :

On représente en général $\frac{1}{2}$ **ou** $\frac{1}{4}$ de l'organe (réaliser un petit schéma pour préciser quelle portion de l'organe est représentée, et délimiter la portion représentée par des traits tracés à la règle).

Le schéma est réalisé en utilisant des **figurés conventionnels** (voir ci-dessous), sans utiliser de couleur. Les légendes doivent être les plus complètes possibles :

- Nom du tissu ou de la structure
- Caractéristiques cellulaires remarquables
- Principale fonction réalisée
- Caractères d'intérêt : spécifiques de l'organe et/ou montrant une adaptation et/ou permettant la classification

⇒ Dessin(s) de détail précis et légendé(s) :

Ou bien coupe allant de l'extérieur vers l'intérieur.

Il est préférable de représenter correctement peu de cellules, mais avec les caractéristiques des types cellulaires bien visibles, plutôt qu'un amas de cellules sans forme précise... Le dessin doit permettre de comprendre les différences d'épaisseur des parois (il est donc possible de représenter les parois fines sous la forme d'un unique trait, afin de les distinguer des parois épaisses).

⇒ Diagnose :

La diagnose présente dans un ordre logique les principaux arguments permettant de définir :

- La nature de l'organe (tige, racine, feuille)
- Les critères de classification (monocotylédone, dicotylédone)
- Les éventuelles adaptations ou particularités biologiques

4.3. Principaux figurés conventionnels

<u>Assises cellulaires unistratifiées</u>			
Epiderme, péricycle, cambium, phellogène		Endoderme	
Assise pilifère / rhizoderme		Canal sécréteur	
<u>Tissus composés de plusieurs couches cellulaires</u>			
Parenchymes (sans figuré)		Collenchyme	
Sclérenchyme (ou autres tissus lignifiés)		Suber ou liège	
<u>Tissus conducteurs</u>			
Xylème I		Xylème II	
Phloème I		Phloème II	
Exemple : un faisceau cribrovasculaire de tige de dicotylédone →			
phloème I^{pre} phloème II^{pre} cambium libéro-ligneux xylème II^{pre} xylème I^{pre}			

5. Les racines des Angiospermes

5.1. Morphologie des racines

La **racine principale** est issue du développement de la radicule de l'embryon.

À partir de la racine principale, des **racines latérales** se développent. On distingue alors :

- Le système **pivotant**, dans lequel la racine principale, très développée, permet un ancrage en profondeur tandis que les racines latérales sont très discrètes.
- Le système **fasciculé**, où il n'est pas possible de distinguer facilement les racines principale et latérales les unes des autres et qui permet un ancrage superficiel.
- Certaines plantes développent en plus des racines au niveau des entre-nœuds de la tige: les racines **adventives**. Elles permettent un ancrage à la partie superficielle du sol ou à un support aérien.

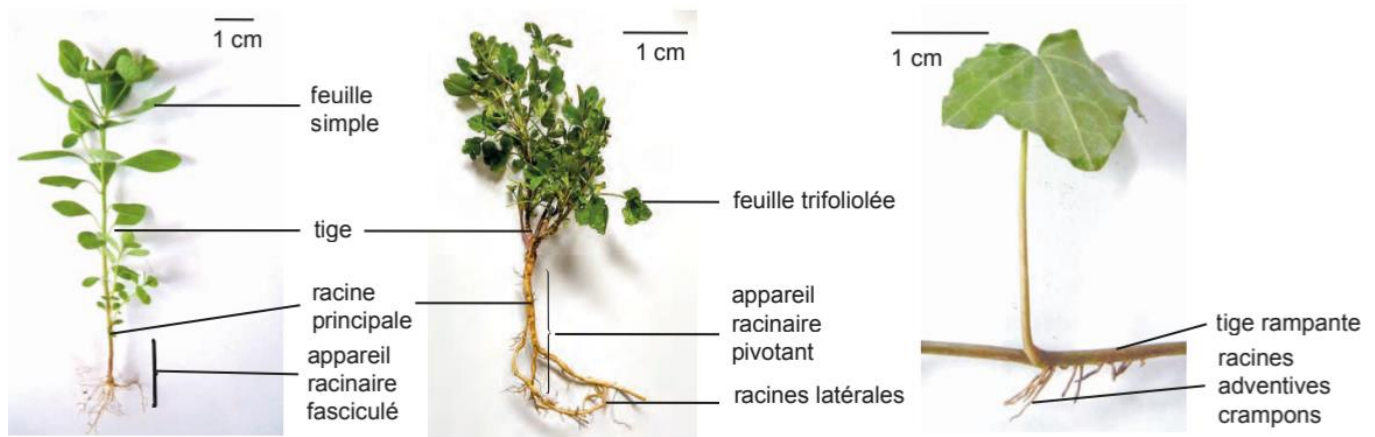
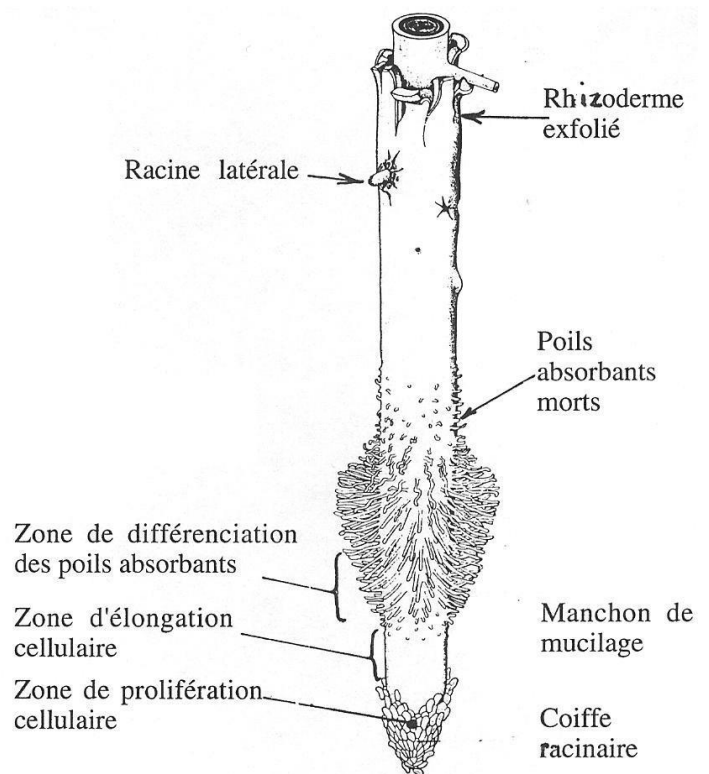


Figure TP5.1 Comparaison de la morphologie d'une euphorbiacée à gauche, d'une luzerne au centre et de lierre à droite.

Comparaison de la morphologie d'une Euphorbiacée (à gauche, système fasciculé), d'une Fabacée (la luzerne, au centre, système pivotant) et du lierre (à droite, racines adventives).

Une extrémité racinaire (= apex racinaire) se compose :

- D'une **coiffe**, formé de cellules « protégeant » l'apex racinaire. La coiffe facilite la progression de la racine dans le sol, et permet de détecter la gravité.
- D'un **méristème apical racinaire (MAR)**, formé de cellules en mitoses. C'est la zone de **mérèse**.
- D'une zone d'élongation = **auxèse**. Les cellules formées par le méristème s'allongent : l'ensemble mérèse + auxèse permet ainsi la croissance en longueur de la racine.
- D'une zone de **différenciation**, visible morphologiquement par l'apparition des **poils absorbants**.



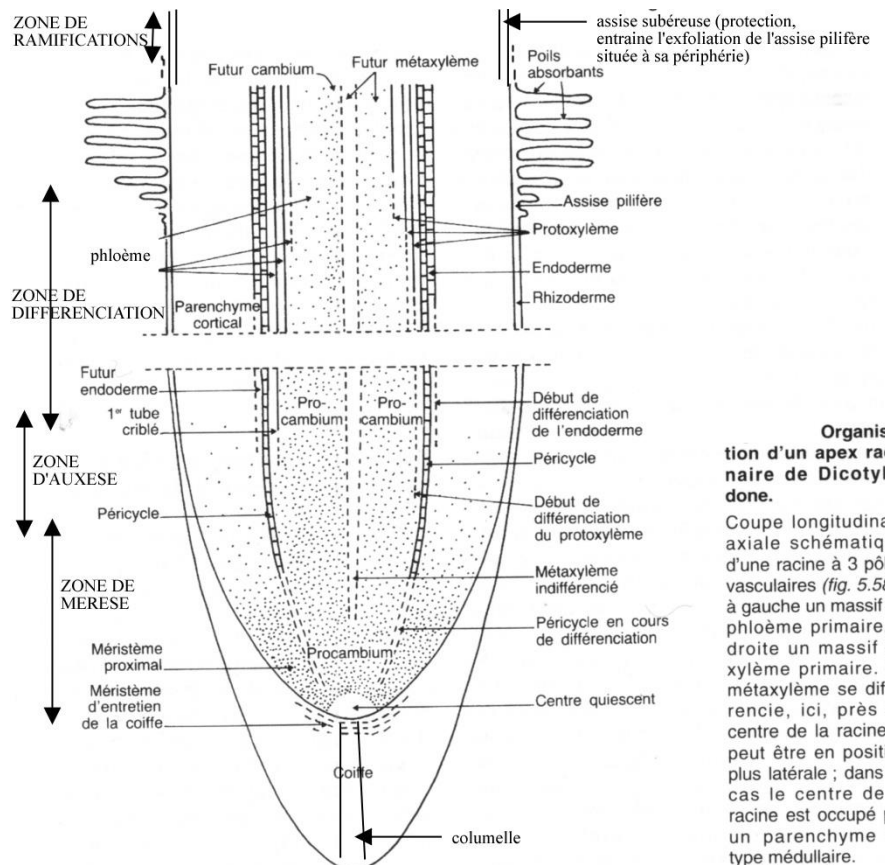
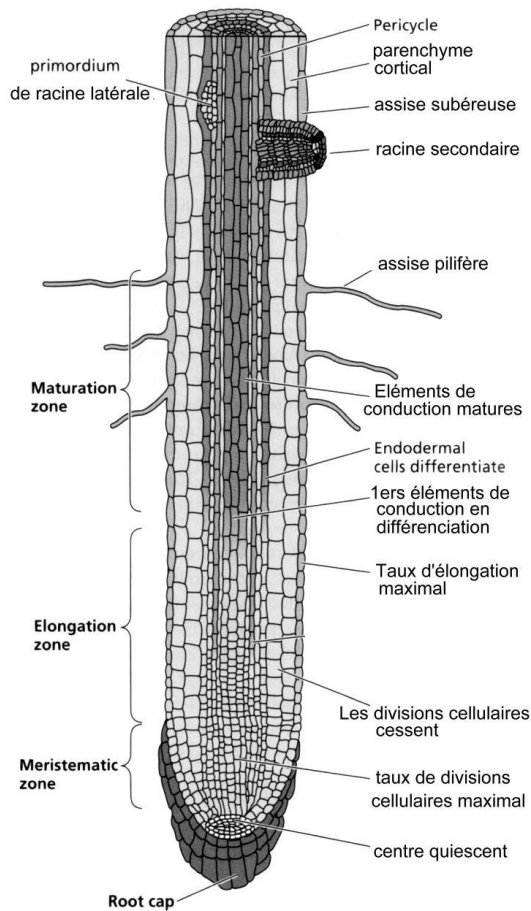
On peut aussi observer, en fonction du stade de développement de la racine, la présence de **champignons** qui réalisent une symbiose avec la plante : Ils étendent leur réseau filamenteux dans le sol, et réalisent l'absorption d'eau et d'ions minéraux, ensuite transférés à la plante. Cette association **symbiotique** (le champignon, hétérotrophe, reçoit de la matière organique de la plante, autotrophe) permet une absorption beaucoup plus importante que la plante ne pourrait le faire toute seule. Dans le cas d'une **ectomycorhize**, le champignon forme un manchon autour de la racine, nettement visible.



hyphes mycorrhiziens

m

5.2. Anatomie de la racine : vue longitudinale de l'apex

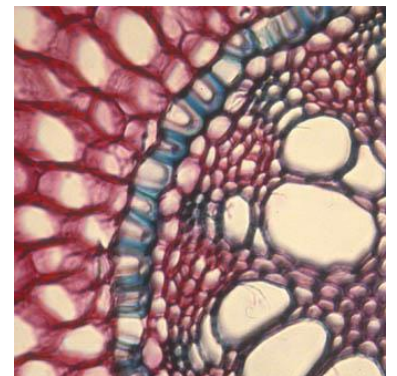
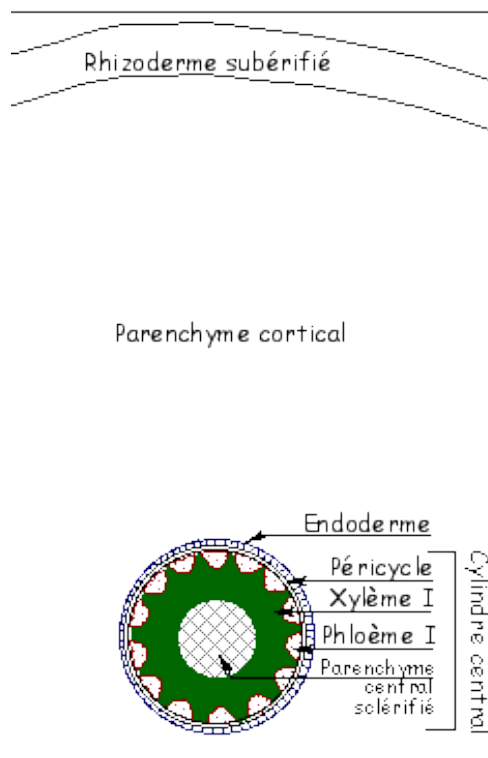
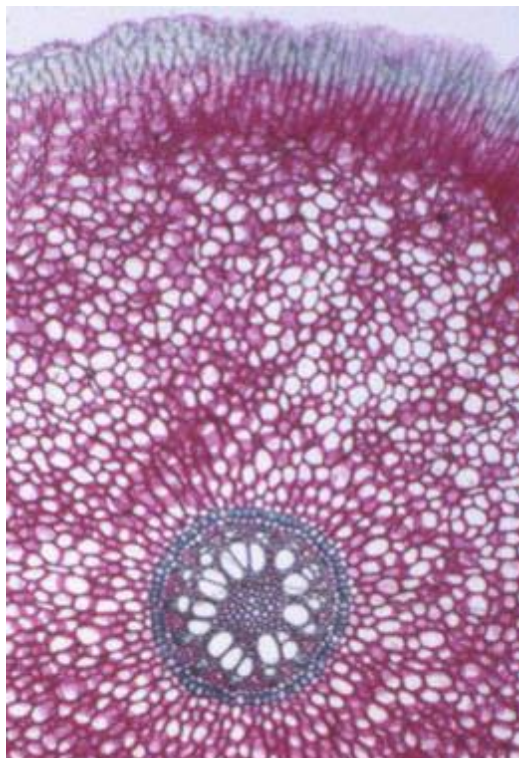


Organisation d'un apex racinaire de Dicotylédone.

Coupe longitudinale axiale schématisée d'une racine à 3 pôles vasculaires (fig. 5.58) ; à gauche un massif de phloème primaire, à droite un massif de xylème primaire. Le métaxylème se différencie, ici, près du centre de la racine. Il peut être en position plus latérale ; dans ce cas le centre de la racine est occupé par un parenchyme de type médullaire.

Robert et Catesson

5.3. Structure primaire d'une racine de monocotylédone



Racine d'Iris (Iridacées, Monocotylédones)

Vue au microscope optique ; schéma conventionnel ; détail de la bordure du cylindre central, montrant l'endoderme en U

⇒ Observations

- **Réaliser** une coupe colorée au carmin aluné – vert d'iode de racine de monocotylédone et **observer** au microscope.
- **Observer** une coupe du commerce de racine de monocotylédone.
- **Repérer** les différents tissus présents.
- Réaliser un **schéma conventionnel** d'une des coupes. Conclure par une **diagnose**.

Méthode : étude d'une coupe de végétal

- 1- Réaliser le schéma conventionnel
- 2- Légender le schéma conventionnel, en notant au brouillon (par exemple) dans quelle catégorie (cf. ci-dessous) ranger les différents éléments descriptifs
- 3- Organiser la diagnose en trois listes successives, en listant les caractères et en concluant (soit par une accolade, soit par une implication " $\Rightarrow$: *caractère de ...*")
 - a. Caractères de tige/racine/pétiole/feuille
 - b. Caractères de monocotylédone/dicotylédone
 - c. Particularités et/ou adaptations

⇒ Un cortex développé

- **Assise pilifère** : ou rhizoderme. Cellules aplaties, dont beaucoup se prolongent en formant un poil $\rightarrow$ les poils absorbants, qui possèdent une paroi cellulosique mince. Les poils s'allongent à mesure que la croissance de la racine les éloigne de l'apex racinaire ; ils sont renouvelés au cours de la croissance de la racine, ce qui conduit les plus anciens à flétrir et disparaître.
- **Assise subéreuse** : remplace le rhizoderme au-dessus de la zone pilifère. Tissu protecteur formé de cellules subérifiées.
- **Parenchyme cortical** : cellules à parois cellulosiques minces, souvent arrondies et laissant des méats entre elles.
- **Endoderme en U** : assise de cellules limitant le parenchyme cortical. Les cellules sont collées les unes contre les autres, et présentent une paroi imprégnée de subérine (paroi **subérifiée**) :
 - Soit en cadre de Caspary : cadre faisant le tour de la cellule ; en coupe, on voit uniquement les deux montants du cadre. *Caractère de dicotylédone*
 - Soit en fer à cheval (en « U »). Il existe alors des cellules de passage qui permettent le transit des ions et de l'eau du parenchyme cortical vers le cylindre central. *Caractère de monocotylédone*

⇒ Un cylindre central réduit

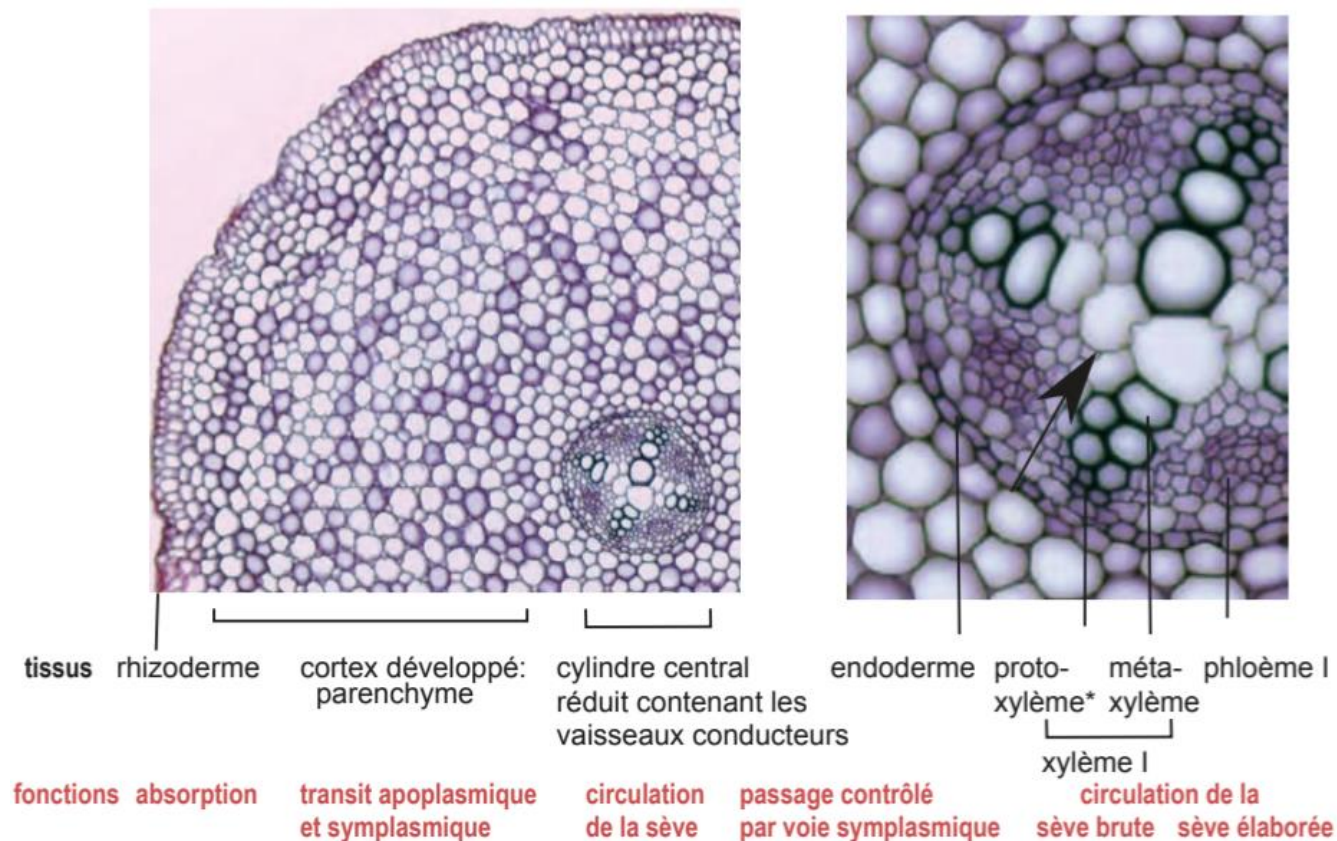
- **Péricycle** : une seule assise de cellules à parois cellulosiques minces.
- **Tissus conducteurs** : disposition alterne entre le xylème et le phloème primaires (caractère de racine).
 - **Faisceaux de Xylème primaire** : Tissu responsable de la conduction de la sève brute ; cellules à parois lignifiées, mortes. Les premiers éléments apparaissent près du péricycle : c'est le protoxylème, essentiellement formé de cellules de petit diamètre (trachéides, vaisseaux imparfaits). Le xylème se différencie donc du côté externe du cylindre central, et vers l'intérieur : il s'agit d'une différenciation centripète (caractère de racine) ; le xylème est exarche. Les éléments de plus gros diamètre qui apparaissent ensuite forment le métaxylème.
 - **Massifs de Phloème primaire** : Tissu responsable de la conduction de la sève élaborée ; cellules à parois cellulosiques, vivantes. On distingue tubes criblés, cellules compagnes et parenchyme. La différenciation est également centripète, avec le protophloème près du péricycle et le métaphloème plus central.
- **Parenchyme médullaire** : peu abondant (caractère de racine), il forme la moelle. Dans les parties âgées, on peut observer parfois une lignification, conduisant à un parenchyme sclérifié. La moelle se prolonge entre les faisceaux de xylème et les massifs de phloème : ce sont les « rayons médullaires ».

5.4. Structure primaire d'une racine de dicotylédone⇒ Observations

- **Observer** une coupe du commerce de racine de dicotylédone à structure primaire.
- Réaliser un **schéma conventionnel** d'une des coupes. Conclure par une **diagnose**.

⇒ Le cortex

- **Assise pilifère** ou **assise subéreuse**
- **Parenchyme cortical** développé
- **Endoderme à cadre de Caspary**



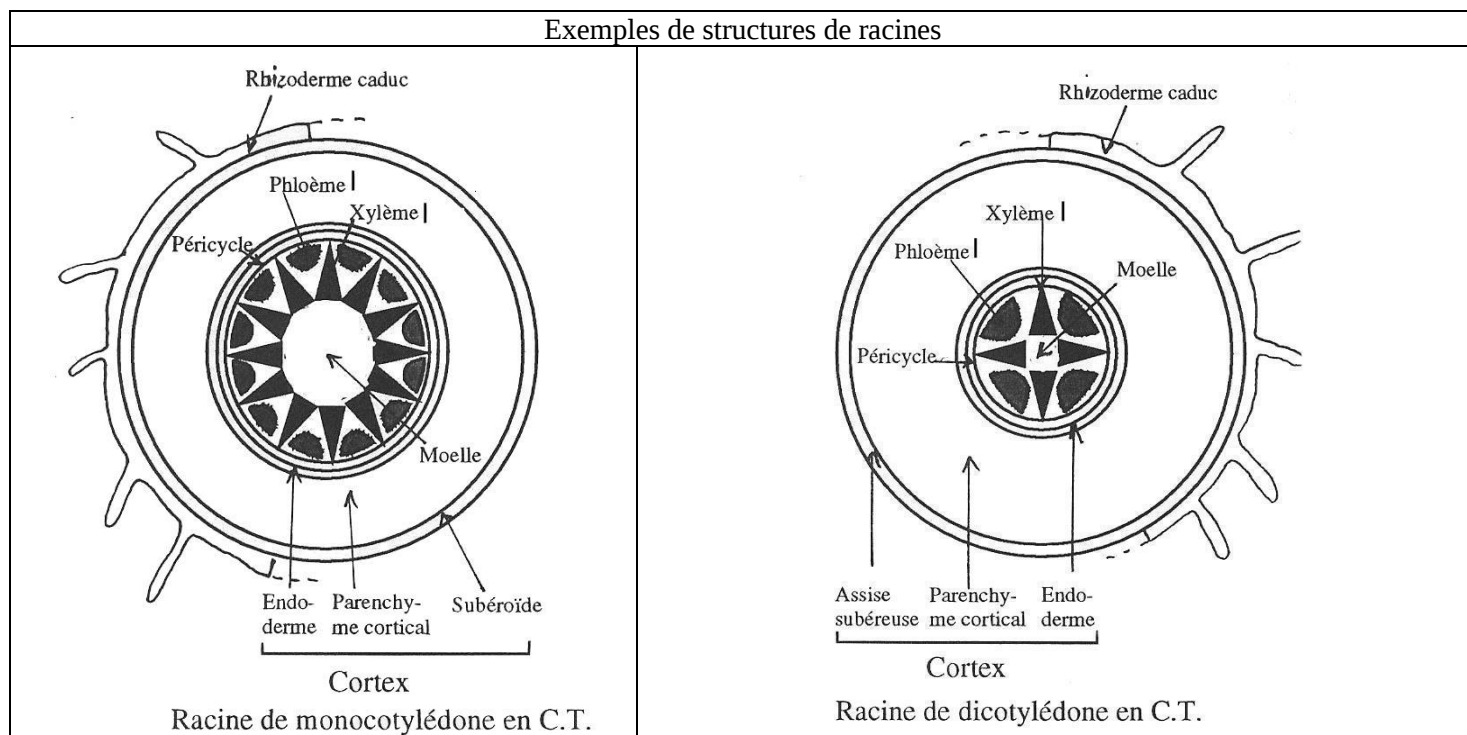
Relation structure-fonction dans une racine de Renoncule (Dicotylédone)

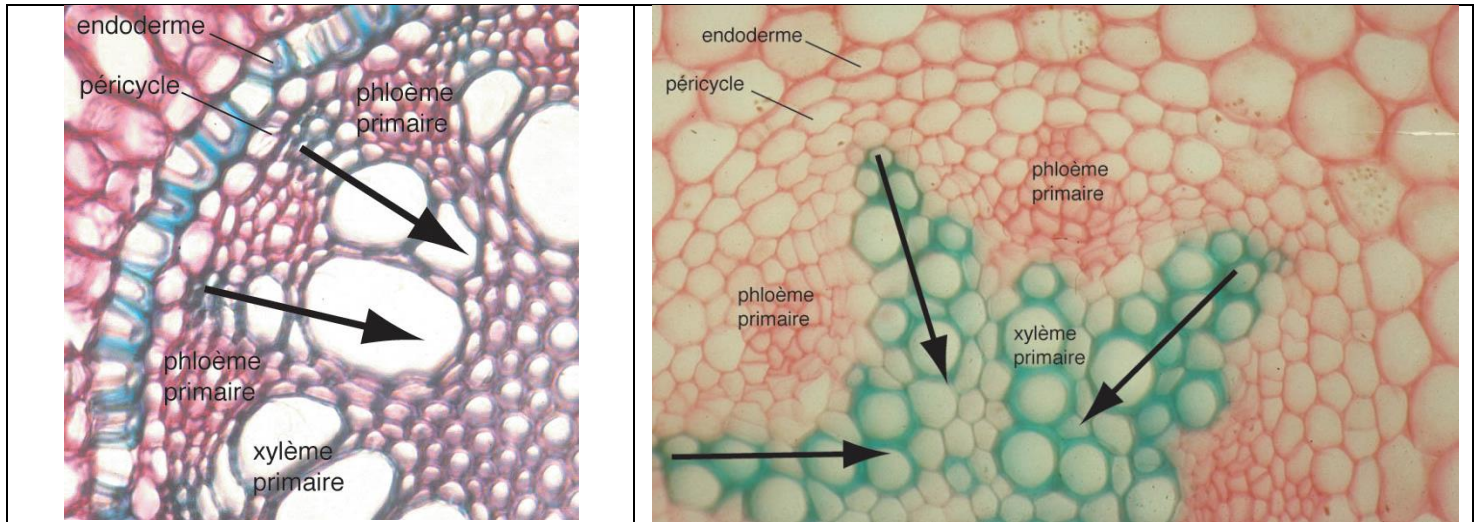
⇒ Le cylindre central

- **Péricycle** : une ou deux assises de cellules.
- **Tissus conducteurs** : disposition alterne. Xylème exarche. Chez les dicotylédones :
 - Le nombre de faisceaux de xylème et de massifs de phloème est moins important que chez les monocotylédones (= moins de pôles ligneux ; un pôle ligneux correspond à un faisceau de xylème).
 - Les vaisseaux du métaxylème sont d'un diamètre moins important que chez les monocotylédones.
- **Parenchyme médullaire** : réduit.

5.5. Bilan : caractères de racine, caractères de mono- ou dicotylédone

Exemples de structures de racines





⇒ Caractères de racine :

- Organe à symétrie radiale
- Xylème I et Phloème I alternes
- Xylème I à différenciation centripète
- Cortex développé, cylindre central réduit
- Assise pilifère
- Endoderme

⇒ Critères de classification

Monocotylédone

- Peu de pôles ligneux
- Endoderme à différenciation pariétale en U

Dicotylédone

- Nombreux pôles ligneux
- Endoderme à cadre de Caspary
- Possibilité de structures secondaires

Voir le TP SV-B2 pour un bilan comparatif complet tige/racine-monocotylédone/dicotylédone.

6. Les mycorhizes : association symbiotique d'un champignon avec un Embryophyte

Chez les plantes, la zone d'absorption correspond aux poils absorbants de la racine chez la jeune plantule. Beaucoup de plantes adultes n'ont plus de poil absorbant, l'absorption est alors facilitée par la présence d'un feutrage de champignons (mycorhize).

Une **mycorhize** est un organe mixte formé par la racine d'une plante et un champignon du sol. L'association mycorhizienne est un exemple de **symbiose** (association de deux individus à bénéfice réciproque).

Dans cette symbiose, le champignon (eumycètes) bénéficie de l'apport trophique d'une plante autotrophe (glucides issus de la photosynthèse). Réciproquement, les hyphes, qui se substituent plus ou moins aux poils absorbants de la racine, facilitent l'approvisionnement en eau et le drainage du sol en sels minéraux, en particulier ceux qui sont peu mobiles comme le phosphore.

6.1. Ectomycorhize et endomycorhize

⇒ Ectomycorhize

Le champignon forme un **manchon dense autour de la racine**, c'est le **manteau**. Puis les hyphes du champignon s'insinuent entre les cellules du cortex racinaire et édifient une sorte de réseau **entre** les cellules, c'est le **réseau de Hartig**. Ce réseau peut, suivant les partenaires en présence, être très développé et s'étendre jusqu'au cylindre central, ou au contraire rester limité aux premières assises cellulaires.

En général, la racine qui héberge le champignon est profondément transformée. Son allongement est réduit et elle présente la morphologie d'une racine courte. Dans beaucoup de mycorhizes, les cellules corticales superficielles modifient leur morphogenèse et s'allongent dans le sens radial en prenant une disposition caractéristique en "arêtes de poisson". Par contre, aucun filament mycélien ne pénètre dans les cellules ni dans le cylindre central.

Ceci caractérise une **mycorhize ectotrophe**, ou **ectomycorhize**.

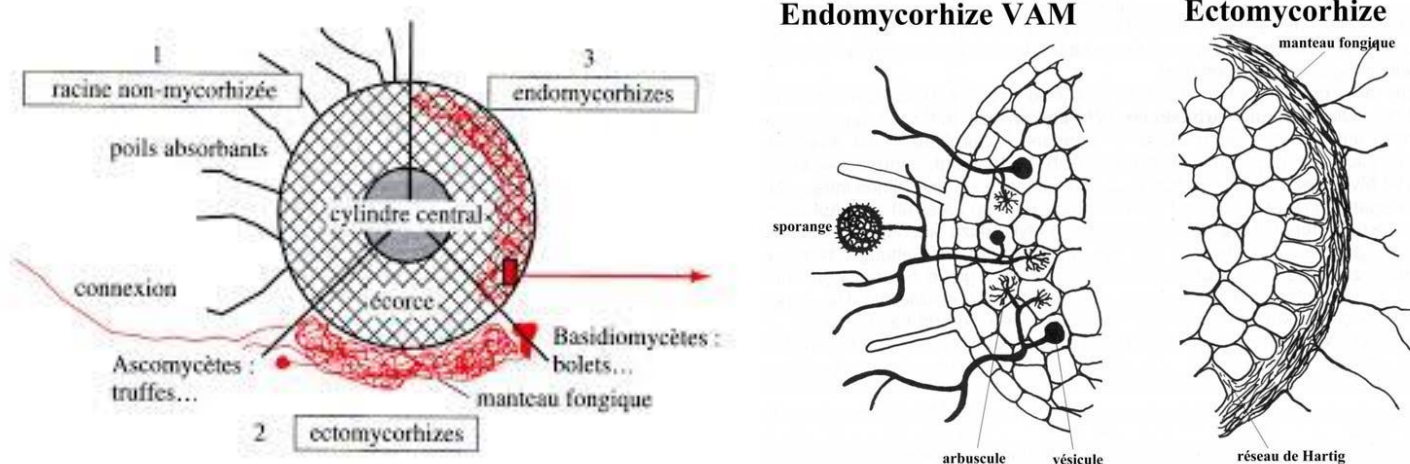
⇒ Endomycorhize

Le champignon ne forme pas de manchon. Les hyphes pénètrent les cellules corticales de la racine, en repoussant la membrane plasmique des cellules de l'Angiosperme, sans la percer. Les hyphes se ramifient alors, en formant des **arbuscules**.

ectomycorhize	endomycorhize
Manchon autour de la racine	Pas de manchon
Réseau de Hartig	Arbuscules
<i>Se rencontrent chez la plupart des arbres et arbustes</i>	<i>Les mycorhizes les plus fréquentes</i>

6.2.Observations

Il est possible de colorer les mycorhizes au **bleu coton lactique**, ou éventuellement au **bleu coton acétique**. Le bleu coton lactique colore la **callose** et la **chitine** présentes dans la paroi du champignon.



Remarque : Il existe en réalité une diversité un peu plus importante de mycorhizes ☺

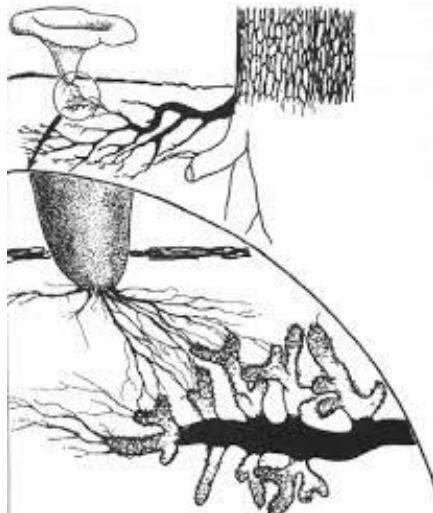
Coloration d'endomycorhize (bleu coton)

- A l'aide de ciseaux, tailler les racines en **petits bouts** (1 cm de long au maximum) et ne garder que les radicelles les plus fines.
- Les placer dans un tube à essai, avec de la **potasse à 10 %** et chauffer au bain-marie à **90°C** durant **15 à 30 minutes**, selon la fragilité du matériel (*le contenu des cellules végétales est détruit et les tanins brunâtres sont éliminés*).
- Jeter la solution qui est devenue brun rougeâtre, en **filtrant** dans un tamis métallique à mailles fines.
- **Rincer 2 fois** de suite à l'**eau acétifiée** (solution d'acide acétique glacial à 2 %).
- Coloration : recouvrir les échantillons, dans le tube à essai, de **bleu coton acétique**.
- Remettre au bain-marie durant **10-15 minutes**.
- **Filtrer** au tamis et **rincer** à l'eau distillée.
- Dissocier et **observer** à 400X dans l'eau (pour une observation extemporanée).

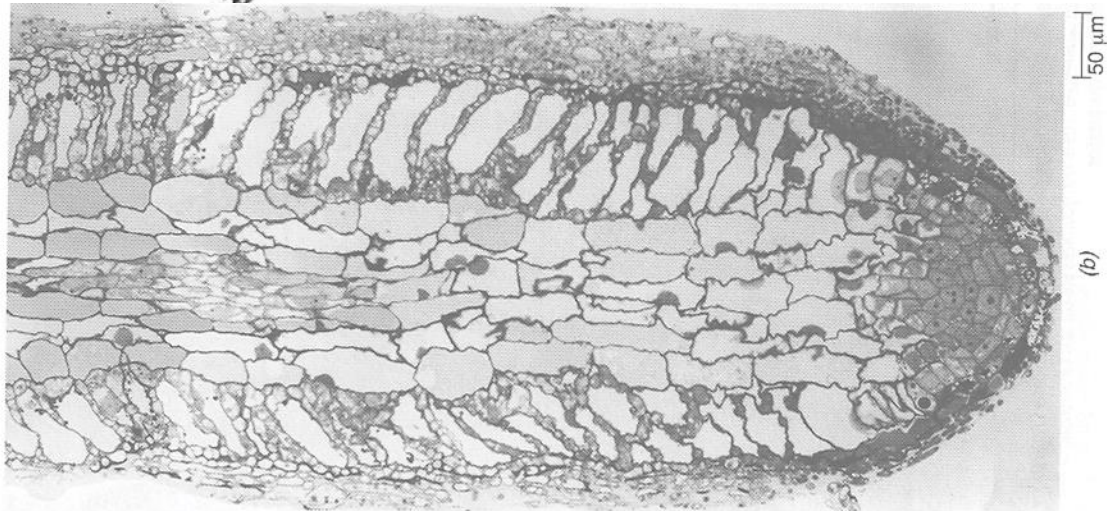
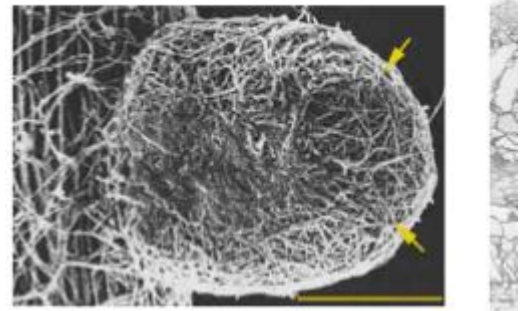
⇒ (en fonction du matériel disponible) **Réaliser** un montage de racine mycorhizée dans du bleu coton acétique et observer.

⇒ **Observer** les lames commerciales de mycorhizes.

Ectomycorhizes



Manteau d'hyphes autour d'une racine de pin (MEB) – barre d'échelle = 100 μm



Endomycorhizes

