

### Produits

Calcofluor white M2R ou Fluorescent Brightner 28 (Sigma F3543)  
Milieu de montage : Vectashield (« antifading mounting medium »)

### Type de coupes

Paraffine dans des tissus fixés au FAA ou avec des aldéhydes.

### Colorant

Solution à 0.01 ou 0,005% dans de l'eau, protégée de la lumière

### Procédure de coloration

- Déparaffiner et réhydrater les coupes.
- Entourer les coupes d'un trait avec le crayon de diamant, sans les laisser sécher, pour éviter la diffusion du colorant.  
*A partir de cette étape travailler à l'abri de la lumière.*
- Eponger délicatement l'eau sur la lame
- Déposer directement sur chaque coupe environ 100 µl de colorant. Prévoir une coupe témoin (autofluorescence) sur laquelle on dépose environ 100 µl d'eau distillée.
- Colorer 1 min puis passer les coupes dans un bain d'eau distillée en agitant
- Procéder au montage entre lame et lamelle avec du Vectashield.

### 5. Observation

Au microscope à fluorescence Leica DMIRE 2 : filtre A pour l'excitation (340-380 nm), et LP 425 nm pour l'émission.

Au microscope confocal Leica SP2 : excitation Laser 405 nm, émission 450 nm à 547 nm.

### 6. Résultat de la coloration

Le calcofluor White est capable de se lier par lien hydrogène aux polysaccharides  $\beta$  (1→4) et  $\beta$  (1→3). Il montre une affinité élevée pour la cellulose formant des liens hydrogènes avec les groupes hydroxyles libres.

Dans le cas des coupes de racines de *Zea mays*, on observe une fluorescence bleue des parois cellulaires riches en cellulose. L'examen des coupes témoins révèle une auto fluorescence des parois des cellules riches en lignine ou subérine, aux  $\lambda$  d'excitation et d'émission ci-dessus. En biologie végétale il est utilisé pour colorer les parois des algues et des plantes supérieures. Il est aussi utilisé en médecine et biologie animale pour identifier des champignons dans des tissus car il se lie à la chitine de leurs parois.