

Étude critique des colorations en histologie végétale

Autor(en): **Kraft, Marie-Madeleine**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **7 (1941-1943)**

Heft 2

PDF erstellt am: **15.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-287465>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

**Etude critique des colorations en histologie
végétale**

PAR

Marie-Madeleine KRAFT

(Présenté à la séance du 9 juin 1943)

Introduction.

Le présent travail a été exécuté de novembre 1940 à décembre 1942, sous la direction de M. le Professeur Florian Cosandey, à l'Institut de Botanique de l'Université de Lausanne,

Je tiens à exprimer ici à M. le Professeur Cosandey ma profonde gratitude pour ses précieux conseils, et pour l'intérêt bienveillant qu'il n'a cessé de me témoigner au cours de mes recherches.

Ma reconnaissance va aussi à MM. les Professeurs Popoff, Maillefer, Goldstein, Matthey et de Beaumont pour les suggestions qu'ils m'ont prodiguées, la littérature et les produits qu'ils ont bien voulu mettre à ma disposition.

Je remercie enfin mes collègues, le personnel de l'Institut de Botanique, particulièrement M. Dubuis, préparateur, et tous ceux qui, de près ou de loin, ont collaboré à mon travail.

* * *

Au début de nos recherches, nous avons pensé intituler notre travail: Etude des colorants en histologie végétale, mais nous n'avons pas tardé à nous rendre compte que des essais portant seulement sur les colorations donnaient des résultats très inconstants, et conduisaient à de nombreux échecs.

L'état du matériel, la durée de sa conservation dans l'alcool ou dans d'autres liquides, le temps que le matériel sec a passé en herbier, sont autant de facteurs qui influencent la coloration.

Il suffit d'ailleurs de suivre, comme nous en avons eu l'occasion à l'Institut de Botanique, les travaux d'histologie végétale, pour observer les difficultés de la technique, même élémentaire.

En voici quelques-unes, rencontrées journallement en cours d'opération:

Avant la coloration, le matériel est trop fraîchement ou insuffisamment fixé, ou bien les fixateurs ne sont pas appropriés. Les coupes sont trop épaisses; les cellules ont été insuffisamment vidées ou, au contraire, les tissus sont déchirés, contractés ou gonflés par le liquide éclaircissant, ou bien le traitement n'était pas approprié au matériel végétal employé.

La coloration elle-même dépend de la concentration et de l'âge du colorant; de la durée des bains, des lavages et des régressions; de la succession des colorants (colorations combinées).

Après la coloration,

a) le montage à la glycérine gélatinée présente souvent une diffusion des colorants dans le milieu conservateur. On constate aussi la présence de bulles dues à l'ébullition ou au brassage de la glycérine gélatinée, avant ou pendant l'emploi.

b) le montage au baume du Canada nécessite une déshydratation parfaite. Si elle est insuffisante, elle occasionne un précipité dans le xylol; si elle est de durée exagérée, elle contracte les tissus délicats, et provoque souvent la décoloration totale ou partielle de la coupe.

Ce sont, dira-t-on, des difficultés plus techniques que théoriques, dues à l'inexpérience des débutants, et qu'un peu de pratique permet de surmonter. Nous croyons pourtant rendre service en abordant cet important problème sur la base de nombreux essais, et d'une critique des méthodes actuelles.

Il est à remarquer que de bons traités comme ROMÉIS, LANGERON, PÉTERFI, accordent une très grande place à la technique zoologique, mais les précisions manquent lorsqu'il s'agit de matériel végétal. Les méthodes générales sont en effet très souvent inutilisables. De même que l'histologie animale connaît aujourd'hui une quantité de méthodes spécifiques, l'histologie végétale doit également être abordée avec l'idée que les plantes, les organes et tissus végétaux peuvent se présenter sous des états multiples et offrir autant de cas particuliers que dans le domaine animal.

Il est vrai, objectera-t-on, que les cas particuliers impliquent des méthodes particulières, et le débutant est immédiatement embarrassé dans le choix d'une méthode appropriée.

En principe, il faut une méthode générale facile, applicable au plus grand nombre de cas, assez souple pour tenir compte de quelques cas particuliers (travaux pour microphotos et machine à dessiner) et de la diversité du matériel végétal. C'est une telle technique que nous avons cherchée à travers les expériences et la littérature.

Dans d'autres cas spéciaux, par contre, il y a lieu de chercher des techniques appropriées.

Du point de vue bibliographique, un sérieux triage s'est imposé, car nombreuses sont les méthodes trop compliquées ou vieilles citées dans les traités, et qui doivent être abandonnées. La littérature signale une telle quantité d'observations et de méthodes que nous avons jugé utile de donner les références à la fin de chaque chapitre. Nous citons aussi quelques livres résumés dans des comptes rendus, mais que les circonstances ne nous ont pas permis de nous procurer. (—)

L'ordre chronologique des opérations a fourni le plan de la partie générale de notre travail : matériel étudié, fixation, coupes, traitement, coloration, milieux conservateurs; deux chapitres spéciaux traitent ensuite de techniques spéciales pour le pollen et les mousses.

Nous avons laissé de côté les champignons, les algues et les bactéries, les techniques mycologique et bactériennes ayant été largement étudiées par des spécialistes.

Bibliographie générale :

M. LANGERON, Précis de microscopie, Paris, 1934 (et 1942).

T. PÉTERFI, Methodik der wissenschaftlichen Biologie, Berlin, 1928, vol. 1, p. 847-884.

ROMÉIS, Taschenbuch der mikroskopischen Technik, München et Berlin, 1932.

E. SÉGUY, Le microscope (emploi et applications), Paris, 1942.

CHAPITRE I : Matériel étudié.

Nos recherches ont porté sur les techniques applicables d'une manière générale aux racines, tiges et feuilles des Phanérogames : (Angiospermes et Gymnospermes), des Cryptogames vasculaires : (Lycopodiales, Equisetales et Filicales).

Nous avons utilisé soit du matériel frais, turgescant, soit du matériel coupé en fragments, fixé à l'eau bouillante ou à

l'alcool chaud et conservé plus ou moins longtemps à l'alcool, soit du matériel d'herbier.

Nous avons examiné successivement :

des racines de :

Althaea officinalis, fixées à l'eau bouillante et conservées 3 ou 4 mois à l'alcool.

Convolvulus arvensis, récoltées à Lausanne, fixées à l'eau bouillante et conservées 1 mois à l'alcool.

Dendrobium sp., depuis 1936 dans l'alcool.

Iris spuria, 15 mois dans l'alcool; et racines en herbier depuis 1931.

Pisum sativum, depuis des années dans l'alcool.

Primula elatior, récoltées dans le Jura neuchâtelois, fixées et conservées 3 mois à l'alcool; et matériel frais utilisé immédiatement après la récolte; ainsi que des racines en herbier depuis 1920.

Smilax sarsaparillae, conservées à l'alcool depuis 20 mois, et au mélange alcool, glycérine, eau.

Vanda suavis, dans l'alcool depuis 6 années.

des tiges de :

Aegopodium podagraria, tiges et pétioles récoltés au printemps à Lausanne et utilisés frais; ou fixés seulement à l'eau bouillante.

Aristolochia Siphon, depuis 2 ans dans l'alcool (tiges âgées); ou conservées au mélange alcool, glycérine, eau (tiges jeunes).

Botrychium lunaria, depuis plusieurs années dans l'alcool.

Bryonia dioeca, fixées et conservées quelques mois à l'alcool.

Clematis vitalba, depuis 6 mois à l'alcool; et depuis 1938 en herbier.

Cucurbita Pepo, depuis 2 ou 3 ans dans l'alcool; et tiges fraîches récoltées à Lausanne, fixées à l'alcool chaud et utilisées immédiatement.

Convallaria majalis, rhizomes dans l'alcool depuis 15 à 18 mois.

Cydonia japonica, bois conservé depuis quelques années à l'alcool.

Dryopteris Filix mas, rhizomes à l'alcool depuis 2 ans.

Equisetum arvense, rameaux stériles récoltés aux environs de Lausanne, et fixés à l'eau bouillante seulement.

Equisetum hiemale, rameaux à l'alcool depuis des années.

Evonymus europaeus, dans l'alcool depuis des années.

Hedera Helix, conservées à l'alcool pendant 15 mois environ; et tiges fraîches récoltées à Lausanne en novembre 1940, fixées à l'eau bouillante seulement.

Helianthus annuus, récoltées à Lausanne et utilisées fraîches.

Heracleum sphondylium, tiges florales récoltées à Lausanne et utilisées fraîches; ou fixées à l'eau bouillante seulement.

Iris spuria, récoltées à Lausanne, fixées et conservées à l'alcool 3 ou 4 mois.

Juncus diffusus, dans l'alcool depuis un an environ.

Ludwigia Mulleri, dans l'alcool depuis des années.

Lycopodium annotinum, dans l'alcool depuis des années.

- Nycandra physaloides*, tiges récoltées au Jardin botanique, Lausanne, fixées à l'eau bouillante et conservées à l'alcool: 1^{er} essai après 15 jours; 2^e et 3^e essais après 1 et 18 mois.
- Nuphar luteum*, pétioles à l'alcool depuis 3 ou 4 ans; et pétioles frais récoltés au Jardin botanique, Lausanne, fixés directement à l'alcool chaud.
- Nymphaea alba*, pétioles récoltés au Jardin botanique, fixés à l'eau bouillante et conservés à l'alcool, en changeant ce dernier qui s'est dilué après les 15 premiers jours. Matériel utilisé après 3 ou 4 mois.
- Papaver somniferum*, récoltées à Lausanne, fixées seulement à l'eau bouillante.
- Pinus sylvestris*, bois à l'alcool depuis des années; et bois récolté dans le Jura, fixé à l'eau bouillante seulement.
- Pinus strobus*, bois dans l'alcool depuis des années (coupes transversales, radiales et tangentielles).
- Polypodium vulgare*, récoltées dans le Jura neuchâtelois, fixées à l'eau bouillante, conservées à l'alcool; 1^{er} essai après 3 semaines; 2^e essai après plusieurs mois; et rhizomes fixés directement à l'alcool chaud.
- Psilotum triquetrum*, dans l'alcool depuis des années.
- Ranunculus acris*, tiges jeunes récoltées au printemps à Lausanne, fixées à l'eau bouillante, conservées à l'alcool; 1^{er} essai après une semaine; 2^e essai après 3 mois.
- Rumex acetosella*, tiges florales récoltées à Lausanne, utilisées fraîches; ou fixées à l'eau bouillante seulement.
- Salvia pratensis*, dans l'alcool depuis 8 à 10 mois; tiges en herbier depuis 1924 et depuis juin 1942 (soit depuis 4 mois).
- Sambucus nigra*, bois et lenticelles fixés à l'alcool depuis des années; matériel frais récolté à Chailly vers la fin de l'hiver, utilisé sans fixation; et rameaux utilisés directement après fixation à l'alcool chaud et ramollissement à l'eau bouillante.
- Scirpus sp.*, dans l'alcool depuis 18 mois environ.
- Selaginella emmeliana*, dans l'alcool depuis des années.
- Tradescantia virginica*, tiges fraîches, ou fixées à l'eau bouillante seulement.
- Tropaeolum majus*, pétioles récoltés à Chailly en mai et septembre, utilisés frais; et fixés à l'eau bouillante seulement; ou directement à l'alcool chaud.
- Typha minima*, dans l'alcool depuis 2 ans environ.
- Vitis vinifera*, sarments déjà coupés, récoltés dans les vignes de Lavaux en février, fixés à l'eau et conservés à l'alcool pendant 4 mois; sarments d'une treille pris en octobre, fixés directement à l'alcool chaud et ramollis à l'eau bouillante; sarments conservés depuis des années dans le mélange alcool, glycérine, eau.
- Zea Mays*, conservées à l'alcool depuis des années; tiges fraîches récoltées à Chailly (octobre 1942); ces mêmes tiges fixées directement à l'alcool chaud et utilisées immédiatement.

des feuilles de :

Cedrus Libani, aiguilles récoltées à Chailly et fixées directement à l'alcool chaud.

Ficus elastica, dans l'alcool depuis des années.

Hedera Helix, conservées à l'alcool depuis 18 mois environ; ou récoltées fraîches à Chailly en hiver.

Ilex aquifolium, dans l'alcool depuis des années.

Iris spuria, feuilles fraîches récoltées en juin à Lausanne, fixées à l'eau bouillante et conservées à l'alcool; 1^{er} essai après 3 jours; 2^e essai après quelques mois; et matériel en herbier depuis 1931.

Morina longifolia, dans l'alcool depuis des années.

Phormium tenax, dans l'alcool depuis des années.

Pinus sylvestris, aiguilles jeunes et plus âgées, récoltées dans le Jura neuchâtelois; 1^{er} essai: fixation seulement à l'eau bouillante; 2^e essai: fixation directe à l'alcool chaud.

Taraxacum officinale, récoltées à Lausanne: essai sur l'épiderme frais.

Tradescantia sp., fixées à l'eau bouillante seulement; non fixées, essai sur l'épiderme frais.

Ces techniques, ainsi que d'autres spécialisées, ont été appliquées à des Hépatiques et à des Mousses; au pollen des Angiospermes et des Gymnospermes, et à des spores de Cryptogames vasculaires et de Mousses.

Hépatiques et Mousses :

Marchantia polymorpha, thalles à l'alcool depuis des années.

Mnium sp., tiges feuillées récoltées à Chailly, fixées à l'eau bouillante et conservées 2 mois à l'alcool.

Polytrichum commune, récoltées dans la forêt de Sauvabelin, fixées à l'alcool chaud: 1^{er} essai immédiatement après fixation; 2^e essai après 3 mois dans l'alcool; et matériel d'herbier ramolli à l'eau bouillante.

Sphagnum squarrosum, matériel d'herbier, ramolli à l'eau bouillante ou au mélange glycérolé.

Pollen et spores :

(Les grains de pollen et les spores ont tous été séchés et conservés dans des tubes jusqu'à l'emploi.)

Acer platanoides, environs de Lausanne.

Anemone alpina, Chasseron.

Betula pendula, environs de Lausanne.

Campanula rapunculus, Chailly.

Cedrus Libani, cultivé, Chailly.

Convolvulus sepium, Chailly.

Corylus avellana, bois de Belmont.

Dryopteris Filix—mas (spores), Jura neuchâtelois.

Epilobium hirsutum, Chailly.

Equisetum maximum (spores), gorges de la Paudèze.

Helianthemum leucanthemum, Chailly.
Helianthus annuus, Chailly.
Juglans regia, cultivé, La Rosiaz.
Lycopodium Selago (spores), Jura.
Nuphar luteum, Jardin botanique, Lausanne.
Picea excelsa, Jura neuchâtelois.
Pinus montana et *sylvestris*, pollen conservé à l'Institut de Botanique.
Plantago media, Chailly.
Rosa canina, forêt du Jura neuchâtelois.
Sambucus nigra, Chailly.
Sarracenia purpurea, tourbière des Tenasses.
Scabiosa columbaria, Jura neuchâtelois.
Sphagnum sp. (spores), tourbière des Tenasses.
Trollius europaeus, Le Mont/Lausanne.
Tropaeolum majus, Chailly.
Tulipa sp., cultivée.

Miels :

Rucher de la Scie, Aigle, alt. 417 m. (M. Louis Roussy).
 Rucher des Afforêts, Aigle, alt. 600 m. (M. Louis Roussy).
 Rucher des Diablerets, alt. 1140 m. (M. Louis Roussy).
 Rucher du col du Pillon, alt. 1550 m., le plus haut du canton
 (M. R. de Siebenthal).
 Miel de sapin du Jura bernois, région des Bois.

CHAPITRE II : Fixation.

A. — *Le matériel frais* est soigneusement coupé au scalpel, en fragments de 3 à 5 cm (racines et tiges). Les feuilles seront laissées entières si leurs dimensions le permettent.

La fixation est-elle nécessaire ?

En parlant de tissus animaux, LANGERON dit (*loc. cit.*, p. 322) : « la fixation est la pierre angulaire, le fondement de toute bonne histologie ». Pour les végétaux, elle est aussi de première importance. De nombreux essais faits avec du matériel frais, non fixé, ont montré que: le tissu frais n'est, en général, pas assez résistant au rasoir ; qu'il se déchire et donne rarement de bonnes coupes minces ; les coupes plus épaisses sont d'autre part, très difficiles à déshydrater, ce qui exclut presque absolument le montage au baume. Seules des coupes faites dans du matériel frais relativement sec, comme des rameaux de *Sambucus nigra* par exemple, ont donné des résultats satisfaisants.

1. — *Fixation à l'eau bouillante*¹:

Le matériel frais, coupé, est plongé dans de l'eau à ébullition et fixé pendant 2 à 15 minutes. Le temps de cette fixation dépend de la résistance du matériel, et du contenu cellulaire. Les sarments de *Vitis vinifera*, au bois très résistant, doivent être fixés longtemps, ainsi que les bois de Conifères, imprégnés de résines. Il en est de même pour les racines de *Smilax* par exemple, bourrées de grains d'amidon. Pour la même raison, les rhizomes (*Convallaria*, *Dryopteris*, *Polypodium*) devront être fixés au moins pendant 10 minutes.

Le matériel ainsi fixé à l'eau bouillante sera conservé dans l'alcool (70 à 90°) en flacons bien bouchés. Si les plantes contenaient beaucoup d'eau, l'alcool se dilue, et doit être changé après une quinzaine de jours, et éventuellement une seconde fois après un mois.

La fixation à l'eau bouillante s'est presque toujours révélée insuffisante. Le traitement ultérieur, bain de NaClO, ne parviendra pas à vider les cellules riches en matières de réserve. Certains tissus, imprégnés de substances diverses (résines ?, latex ?, tanins ?) seront incolorables, ou retiendront mal le colorant. Les membranes lignifiées surtout sont difficiles à colorer. Il est intéressant de constater que les insuccès les plus nets concernent des plantes élaborant soit une résine, soit un latex, par exemple : les tiges d'*Heracleum sphondylium*, d'*Aegopodium podagraria*, de *Papaver somniferum*, le bois de *Pinus sylvestris* et ses aiguilles.

La conservation à l'alcool du matériel fixé à l'eau bouillante constitue une seconde fixation lente, qui rend l'état du matériel plus favorable aux traitements histologiques ultérieurs (cf. action de l'alcool sur les matières de réserve). Il est aussi à remarquer que seule une action durable de l'alcool parvient à décolorer certains tissus fortement colorés par eux-mêmes (par exemple le bois des tiges de *Polytrichum*, écorce des tiges feuillées, et le bois des tiges de *Tropaeolum majus*).

La fixation optimum paraît être obtenue après un séjour de 1 à 20 mois dans l'alcool (70 à 90°).

Avant un mois, les coupes sont difficiles à vider, ce qui peut être dû à la présence de chlorophylle, d'amidon, de gommes, de mucilages, de résines, de latex ou de tanins dans les cellules.

Après 2 ans dans l'alcool, le matériel végétal est souvent durci ou contracté, de ce fait difficile à couper, et impropre à l'étude histologique. On peut partiellement remédier à ce

¹ L'eau bouillante a deux actions distinctes : elle coagule le protoplasme, les albumines et substances de réserve, qui forment soutien lors de la coupe; elle ramollit les bois durs.

durcissement en ramollissant le fragment à l'eau bouillante avant d'en faire la coupe.

Cette *double fixation* à l'eau bouillante puis à l'alcool est-elle la *seule méthode possible*? La fixation à l'alcool est une fixation par déshydratation des tissus, qui semble agir aussi sur le contenu cellulaire, préparant l'action de Na ClO.

Ces mêmes résultats ne pourraient-ils pas être obtenus en renonçant à la fixation rapide à l'eau bouillante, insuffisante par elle-même, et en fixant directement les tissus frais à l'alcool chaud? Nous avons tenté de nombreux essais qui nous permettent de répondre à cette question:

2. — *Fixation à l'alcool chaud:*

La méthode employée a été la suivante: des fragments végétaux sont immergés dans de l'alcool à 90° chaud, et maintenus au B. M. bouillant pendant 10 à 15 minutes. Ils peuvent être coupés immédiatement, ou être conservés dans l'alcool qui a servi à la fixation, en renouvelant cet alcool après une quinzaine, si la plante contenait beaucoup d'eau. Cette méthode n'est cependant pas recommandable pour les objets très délicats, car les tissus tendres sont contractés par cette fixation brutale, ce que nous avons pu constater dans de jeunes tiges de *Tropaeolum majus* où le parenchyme médullaire était même parfois déchiré; et dans des tiges aquatiques (pétioles) de *Nuphar luteum* où le tissu lacuneux était endommagé (moins cependant que l'on eût pu le supposer). Des essais de fixation successive par les alcools à 40, 60, 80, 95°, à chaud, n'ont pas donné de meilleurs résultats.

L'alcool au tiers selon Ranvier (1 partie d'alcool à 95° pour 2 parties d'eau dist.) est un fixateur doux, laissant aux végétaux une consistance trop molle pour la coupe.

Pour les objets de dureté moyenne, des tiges de *Zea Mays* et de *Cucurbita Pepo* par exemple, les résultats obtenus par la fixation à l'alcool à 90° chaud sont très bons; il en est de même pour les objets durs tels que les rameaux de *Vitis vinifera* et de *Sambucus nigra*. Dans ces deux derniers cas, le matériel a été ramolli à l'eau bouillante avant la coupe.

La fixation à l'alcool, favorisant le traitement subséquent, vide partiellement les cellules (de leur chlorophylle par exemple) et agit sur l'amidon contenu dans celles-ci.

Dans le grain d'amidon « les différences de teintes sont dues à des différences d'hydratation, les bandes foncées étant les plus hydratées. Si on traite ces grains par de l'alcool absolu qui leur enlève leur eau, ils prennent une teinte foncée et uniformément brillante » (cit. A. PIZON, Anatomie et physiologie végétales, Paris, 1934, p. 243).

Un essai fait sur une tranche de pomme de terre traitée à l'alcool à 90° à chaud, a nettement montré que les grains d'amidon

diminuaient de volume par ce traitement, et que ceux qui étaient agglomérés se séparaient.

Nous avons voulu nous rendre compte si une fixation à l'alcool réduirait la durée du traitement subséquent dans les tissus difficiles à vider rencontrés au cours de nos travaux. Nous avons, pour cela, fixé des rhizomes de *Polypodium vulgare* et des aiguilles de *Cedrus Libani* à l'alcool chaud. Les coupes obtenues ont été traitées à l'éther pendant 20 minutes, le réactif-test ayant prouvé la présence de matières grasses ou d'essence (voir cas particuliers chapitre IV), et vidées à l'hypochlorite en 10 minutes, temps bien plus court que celui qu'il avait fallu pour « éclaircir » les coupes de même matériel fixé à l'eau bouillante et conservé à l'alcool.

Quant à la coloration, elle n'est en rien modifiée par cette fixation à l'alcool, dans les cas étudiés (*carmin, hémalun, rouge Congo* en coloration combinée avec les *verts* et les *bleus-violets*).

En conclusion, *la fixation à l'alcool chaud paraît être la méthode de choix lorsqu'on se trouve en présence de matériel végétal frais à fixer pour une utilisation immédiate, spécialement lorsque les tissus présentent une certaine résistance, et sont riches en matières de réserve, par conséquent difficiles à vider.*

3. — *Fixation par le mélange alcool, glycérine, eau* (mélange en parties égales).

Ce mélange, souvent préconisé par les traités, peut être employé directement, à froid, pour conserver le matériel frais; ou bien son emploi peut être précédé d'une fixation rapide à l'eau bouillante. Les résultats sont les mêmes: ce mélange empêche le durcissement et semble même ramollir certains tissus. En outre, il agit sur le contenu cellulaire; il gonfle certaines substances de réserve, l'amidon spécialement, contenu dans les cellules, et entrave l'action de NaClO. En un mot, ce mélange semble avoir, sur le contenu cellulaire, une action opposée à celle de l'alcool seul. (Voir plus haut et plus bas.) Des racines de *Smilax sarsaparillae* ont été conservées dans ce mélange, après une rapide fixation à l'eau bouillante. Après une année environ, les grains d'amidon contenus dans le parenchyme s'étaient agglomérés en masses remplissant complètement certaines cellules. Malgré un long traitement à chaud à l'hypochlorite, additionné de KOH concentrée, le parenchyme n'a pu être débarrassé de ces grains. Une prolongation du traitement et un chauffage plus énergique ont provoqué une désagrégation complète des tissus celluloses.

Nous nous sommes trouvée dans un cas analogue le jour où nous avons tenté de vider des coupes de tiges d'*Aristolochia Siphon* conservées dans ce mélange glycérimé durant quelques mois. Un lavage d'une demi-heure à l'eau courante¹ du matériel conservé dans ce

¹ V. lavage, chap. V.

mélange permet d'éliminer en grande partie la glycérine et de redonner une certaine résistance au tissu à couper.

Malgré cela, il semble, en principe, que ce mélange, employé comme conservateur à longue échéance, apporte plus d'inconvénients que d'avantages, et doive en général être abandonné.

Exceptionnellement, il peut avoir son utilité pour des bois très durs, comme celui de *Vitis vinifera* par exemple, bien que de nouveau le contenu des rayons médullaires soit difficile à éliminer après ce traitement.

4. — *La formaldéhyde* (formol, LANGERON, *loc. cit.*, p. 333) durcit les objets végétaux et les rend cassants. Selon SÉGUY (p. CIV *loc. cit.*) on utilisera la solution à 4 %, et on pourra ramollir par une solution d'acide citrique à 10 %.

Pourtant, l'emploi généralisé de la formaldéhyde ne paraît pas indiqué en histologie végétale.

5. — *L'acétone n'est pas non plus à recommander.*

Son action déshydratante, encore plus énergique que celle de l'alcool, contracte exagérément les tissus qui, malgré les traitements subséquents, ne reprennent pas leur aspect primitif.

6. — L'histologie animale utilise *d'autres fixateurs*, qui reposent, pour la plupart, sur la précipitation des corps protéiques.

De tels fixateurs ne seront que rarement utilisés en histologie végétale, puisque les membranes cellulaires y sont constituées essentiellement de cellulose et de pectine, imprégnées ou non de lignine, de cutine et de subérine, toutes ces substances étant de nature glucidique ou lipoïdique, donc non azotée. « Für die Annahme eines Proteingehaltes der Membran von lebenden Zellen, besitzen wir daher keinerlei Anhaltspunkte. » (Cit. CZAPEK, Biochemie der Pflanzen, Band I, p. 680.)

Ces fixateurs, comme l'*acide chromique*, l'*acide osmique*, les *sels métalliques*, les *acides organiques*, sont même contre-indiqués pour les tissus végétaux. Ils déforment, gonflent ou contractent certaines parois cellulaires, et vont jusqu'à changer complètement l'aspect de certains tissus, par exemple les collenchymes (tiges de *Salvia* et de *Nicandra*).

A noter que, dès qu'il s'agit de cytologie, les mêmes méthodes sont valables pour la zoologie et pour la botanique.

B. — *Matériel d'herbier.*

Pour les plantes sèches, le temps passé en herbier paraît être un facteur important. Nous avons eu l'occasion de travailler sur du matériel ayant de 4 mois à 22 ans d'herbier; et nous avons pu nous rendre compte que les difficultés rencontrées pour ramollir le matériel étaient très variables.

Le ramollissement des plantes d'herbier dépend aussi de leur nature (plantes aquatiques ou terrestres, herbacées ou ligneuses) et du genre d'organes étudiés.

Les *feuilles*, organes peu épais et peu lignifiés, gonflent très facilement dans n'importe quel milieu liquide pour autant que l'étalement ait été soigneusement fait lors du séchage. Si ce n'est pas le cas, les feuilles, qui ont été plissées en herbier, se déchirent facilement aux plis lors de la coupe.

Les *tiges herbacées* et les *jeunes racines*, plongées dans un milieu liquide approprié, reprennent bien leur aspect primitif, les cellules du parenchyme gonflant facilement.

Les *tiges ligneuses*, de tissu résistant (sarments de *Vitis*, par exemple) sont très peu déformées par leur conservation en herbier; seuls les rayons médullaires paraissent un peu plus écrasés que dans les rameaux frais ou conservés à l'alcool.

Les *racines plus âgées*, par contre, présentent souvent un écrasement du parenchyme cortical tel qu'il est difficile de les ramollir assez pour qu'elles retrouvent leur aspect primitif; les cellules parenchymateuses paraissent avoir été très fortement comprimées entre l'endoderme résistant et l'assise subéreuse. Le cas est typique dans la racine d'*Iris spuria*, où nous avons toujours observé, malgré nos nombreux essais de ramollissement, un écrasement très marqué du parenchyme cortical. Ce tissu fortement comprimé présente, au lieu de cellules arrondies, des cellules polygonales et aplaties (généralement ces cellules sont en forme de losanges, à parois plus ou moins plissées).

N. B. Le fait que les plantes ont été empoisonnées ou non par le sublimé corrosif (HgCl_2) ne paraît pas jouer de rôle marquant dans le ramollissement ultérieur.

Passons rapidement en revue les liquides de ramollissement essayés et les résultats obtenus:

1. — *L'eau bouillante* peut suffire si la plante n'a pas été très longtemps en herbier (quelques mois à un an). La méthode réussit parfois avec des tissus plus vieux, mais donne des résultats inconsistants.

Les fragments végétaux sont plongés pendant 10 à 15 minutes dans de l'eau à ébullition, fragments de 3 à 5 cm., comme pour le matériel frais. Après ce temps, les tissus ont repris leur aspect normal¹. Si on prolonge le traitement, les tissus se déchirent au rasoir, à moins d'être fortement lignifiés.

2. — *Le mélange alcool, glycérine, eau* (en parties égales) employé à froid est peu efficace. A chaud, il présente de gros inconvénients pour le traitement subséquent des coupes par NaClO, surtout si les cellules contiennent de grandes quantités d'amidon. En effet:

« Dans la glycérine aq. l'amidon se gonfle aussi sous l'action de la chaleur en fournissant un empois très épais (pommade à la glycérine) » (cit. TOLLENS et BOURGEOIS, *Hydrates de Carbone*, Paris, 1896, p. 170).

Nous avons essayé, sur une fine tranche de pomme de terre, de former cet empois par l'action du liquide glycérimé; à froid les grains gonflaient déjà, mais sans changer immédiatement de structure au microscope; après quelques mois, ils étaient agglomérés en masses plus ou moins grosses. Après un léger chauffage, les grains s'aggloméraient immédiatement en une pâte telle qu'il fut impossible de vider les cellules par NaClO. Le mélange alcool, glycérine, eau, est donc à éviter pour des organes tels que des rhizomes, connus pour leur richesse en amidon.

Pour les autres organes, nous avons opéré de la manière suivante: les tiges ou racines sont plongées pendant 24 heures à froid dans le mélange, puis chauffées pendant $\frac{1}{4}$ d'heure dans ce liquide au B. M. Un soigneux lavage à l'eau éloignera toute trace de glycérine de l'objet, avant de le soumettre à la coupe.

Nous avons obtenu par ce moyen des résultats satisfaisants pour des tiges plus ou moins lignifiées (par ex. *Clematis vitalba* et *Salvia pratensis*). Les racines d'*Iris* présentaient cependant encore leur parenchyme cortical écrasé, et l'endoderme était rompu en plusieurs endroits aux cellules de passage.

3. — *Le lactophénol d'Amann* (LANGERON, *loc. cit.*, p. 605).

C'est un mélange en parties égales d'acide phénique crist. pur, d'acide lactique et d'eau distillée, auquel on ajoute 2 parties de glycérine.

« Sie leistet vorzüglich Dienste bei getrocknetem (Herbar) Material, welches zuerst mit verdünntem Lactophenol (10 %) erwärmt und schliesslich mit reinem Lactophenol behandelt wird. Sehr empfehlenswerth für Moose, Hepaticae, Fungi, Algen, etc. » (cit. *Zeitschr. f. wissenschaftliche Mikr.* XIII, 1896, p. 18).

¹ Si certains tissus sont restés écrasés, on pourra mettre les coupes dans un bain d'ammoniaque (1 partie NH₃ conc. pr 7 parties d'eau dist.). Cette méthode, déjà utilisée par les anciens histologistes, permet en général un bon rétablissement des tissus.

Ce milieu peut être employé soit dilué, soit pur, ou successivement, mais toujours à chaud; c'est dire, puisqu'il contient aussi de la glycérine, qu'il présente les mêmes inconvénients que le réactif précédent à l'égard des tissus amylofères. Dans les autres cas, nous avons plongé les organes végétaux pendant une dizaine de minutes dans le lactophénol à 10 % maintenu au B. M., puis de même dans le réactif pur. Les parenchymes ont mieux repris leur aspect primitif que dans le mélange précédent, sauf dans le cas de l'*Iris* où même un traitement prolongé est resté sans action.

4. — *Le chlorallactophénol d'Amann* (LANGERON, *loc. cit.*, p. 606) (mélange de deux parties d'hydrate de chloral cristallisé pour une d'acide phénique et une d'acide lactique pur, le tout fondu ensemble au B. M.) nous a donné les meilleurs résultats. Ne contenant pas de glycérine, il est sans inconvénient pour les tissus amylofères. En outre, il rétablit les proportions cellulaires, sans cependant ramollir trop les tissus. C'est ce réactif qui a le mieux ramené le parenchyme cortical de la racine d'*Iris* à son aspect primitif.

Les objets à ramollir ont été traités 24 h. à froid, puis une vingtaine de minutes dans le réactif maintenu au B. M. Pour l'*Iris*, nous avons prolongé le traitement en laissant les coupes plongées pendant quelques heures dans un godet contenant du chlorallactophénol. L'adjonction de salicylate de Na au chlorallactophénol est préconisée par LANGERON « pour les objets lignifiés et très fortement colorés ». Pour ramener les tissus secs à leur aspect primitif, l'adjonction de ce sel ne paraît pas augmenter sensiblement l'efficacité du réactif.

5. — *Le lactochloral d'Amann* (LANGERON, *loc. cit.*, p. 606) est un mélange en parties égales d'hydrate de chloral et d'acide lactique. D'après LANGERON, « on obtient le gonflement maximum des objets végétaux avec le lactochloral ». Ce gonflement maximum peut être intéressant dans certains cas; dans d'autres, il n'est pas sans présenter de sérieux inconvénients: après 24 h. de traitement à froid, nous avons laissé, comme dans les essais précédents, les objets dans notre réactif au B. M. pendant une dizaine de minutes après lesquelles le ramollissement paraissait suffisant. Il était même exagéré puisque l'écorce de *Clematis vitalba* se détachait dans toutes les coupes, ainsi que tous les cylindres centraux de racine d'*Iris*, qui se séparaient de l'écorce au niveau de l'endoderme. Un essai au lactochloral à froid seulement montrait au contraire un gonflement insuffisant des cellules des parenchymes (racine de *Primula elatior*).

Comme on le voit, ce réactif réserve des surprises et demande une surveillance attentive des objets qui y sont plongés. L'auteur lui-même dit à ce sujet:

« Es quellt die Zellwände ziemlich stark auf. Zarte Gewebe schrumpfen dadurch kaum oder nicht zusammen » (cit. *Zeitschr. f. wiss. Mikr.* XVI, 1899, p. 40).

6. — *Le chloralphénol d'Amann* (LANGERON, *loc. cit.*, p. 607) se prépare en faisant fondre ensemble deux parties d'hydrate de chloral avec une d'acide phénique cristallisé pur. L'emploi de ce réactif a donné d'excellents résultats dans le traitement spécial des grains de pollen secs. Pour les plantes d'herbier, les résultats sont moins bons que ceux obtenus par le chlorallactophénol.

En conclusion, le chlorallactophénol nous paraît être le réactif de choix lorsqu'on a affaire à des plantes d'herbier devant servir à une étude histologique.

Voici ce qu'en dit l'auteur lui-même: « Das Chlorallactophenol eignet sich vorzüglich für die mikroskopische Beobachtung herzurichten. Das Material erlangt dadurch seine Turgescenz wieder und nimmt seine ursprüngliche Form wieder an. » (Cit. *Zeitschr. f. Wiss. Mikr.* XVI, 1899.)

A propos des différences de coloration obtenues suivant que le matériel utilisé est frais ou sec, voir note Chap. VIII.

CHAPITRE III : Coupes.

En histologie végétale, les coupes se font généralement sur des organes très petits ou sur des fragments d'organes.

Si, pour la cytologie, le microtome automatique s'impose de plus en plus, en histologie, les coupes peuvent toutes être faites soit directement à *la main*, soit de préférence *au microtome à main*¹.

Ces méthodes gagnent du temps en évitant l'inclusion à la paraffine et le collage des coupes; il est en outre presque impossible de faire subir à des coupes collées le traitement à NaClO. (Voir LANGERON, *loc. cit.*, p. 1146.)

Si les objets sont assez grands, on peut les introduire seuls dans le microtome (sarments de *Vitis*, tiges de *Cucurbita*).

Dans les autres cas, on les introduit dans un cylindre de moelle de sureau. Les tissus frais se couperont mieux dans la moelle de sureau sèche, tandis que les tissus fixés seront, de préférence, inclus dans une moelle de sureau passée à l'eau bouillante et conservée dans l'alcool à 70°.

Si les objets sont très petits, on les introduira dans un morceau de moelle de sureau percé seulement de trous d'aiguilles, ou enfin on coulera de la paraffine autour d'eux dans le microtome sans faire une véritable inclusion (pédicelles et tiges de mousses, aiguilles de Conifères). Après un enrobage à la paraffine, il y a

¹ Les coupes ainsi obtenues auront de 20 à 30 μ , ce qui est suffisant pour l'observation histologique.

lieu, dans les tissus perméables (tiges aquatiques par exemple) d'éliminer la paraffine avant de commencer le traitement usuel. (Pour cela, chauffer la coupe jusqu'à fusion de la paraffine, passer dans 2 bains de xylol, dans 2 bains d'alcool, puis dans l'eau.)

Pour les coupes faites à la main, le rasoir doit attaquer l'objet par la surface et non par la tranche.

Pour les coupes au microtome, le rasoir gagne à être plat sur une face. On peut alors l'appliquer sur la surface du microtome, et l'épaisseur des coupes est réglée par la vis micrométrique.

Les lambeaux d'épiderme s'enlèvent au scalpel et à la pince.

Les coupes longitudinales et radiales doivent être bien parallèles à l'axe de l'objet et les coupes transversales absolument perpendiculaires à cet axe.

Les coupes sont tout d'abord placées dans un récipient large, contenant de l'eau distillée et quelques gouttes d'alcool; leur manipulation se fera avec un pinceau fin, en évitant le plus possible l'emploi de pinces.

On trie les meilleures coupes à la loupe, ou mieux au microscope, en les sériant sur une lame. Cette vérification peut être faite plus tard, après le traitement, ce qui a l'avantage d'éliminer aussi les coupes qui ont été endommagées en cours d'opération.

Bibliographie :

M. LANGERON, *loc. cit.*, p. 1145.

O. TUNMANN, *Pflanzenmikrochemie*, Berlin, 1913, et 2^e éd. revue p. L. ROSENTHALER, Berlin, 1931.

CHAPITRE IV : Réactif-test.

Recherche d'un réactif-test : Pour le traitement et la coloration, la détermination des techniques convenant à chaque cas particulier est restée bien empirique.

Dès le début de nos recherches, nous avons espéré trouver une méthode qui permettrait, par quelques réactions rapides, de déceler le contenu cellulaire, et la qualité des principaux tissus d'une coupe. Une telle méthode déterminerait le traitement préalable et les colorants à utiliser.

Après bien des essais de divers colorants et réactifs prétendus spécifiques, dont l'emploi exige beaucoup de temps, et de nombreuses coupes, nous avons retrouvé, dans le « Bulletin de la Société Botanique de France », un *réactif-test*, préconisé en 1934 par E. STEINMETZ¹ :

¹ Cit. EMILE PIERRE STEINMETZ, chef de travaux Faculté Pharmacie de Nancy, *Bull. Soc. Bot. France*, séance du 13 avril 1934, p. 296.

« Réactif pratique pour l'analyse des coupes végétales.

<i>Formule :</i>	Hydrate de chloral	45 gr
	Alun de fer ammoniacal	4 gr
	Sulfate d'aniline	1 gr
	Iode	0,4 gr
	Rouge Soudan III	0,1 gr
	Alcool à 96°	40 cc
	Eau distillée	25 cc
	Glycérine pure	30 cc

Mode de préparation :

Il est indispensable de suivre strictement le mode de préparation suivant, afin d'éviter la précipitation du réactif sous forme de petites aiguilles rouges.

Mettre le chloral, l'alun de fer et 10 cc d'eau distillée dans un ballon. Chauffer à ébullition pendant quelques minutes. Filtrer sur coton. Dissoudre d'une part l'iode dans l'alcool, d'autre part le sulfate d'aniline dans 15 cc d'eau distillée (à chaud). Mélanger ces trois solutions froides, puis ajouter la glycérine et enfin le rouge Soudan. Mélanger convenablement et laisser en contact pendant 24 heures en agitant de temps en temps. Filtrer et conserver dans un flacon brun bien bouché.

Le réactif, préparé de cette façon, se conserve pendant très longtemps.

Mode d'emploi :

Faire des coupes très minces, et les faire tomber directement, sans traitement préalable dans quelques gouttes de réactif placées sur une lame de verre. Après un contact d'une demi minute, recouvrir d'une lamelle de verre. La préparation est prête à l'observation microscopique. »

Si le contenu cellulaire, qui concerne la microchimie de la cellule (alcaloïdes, amidon, latex, matières grasses, tanins) n'intervient pas directement en histologie, il est utile à connaître pour déterminer le traitement le plus rationnel à employer pour vider la coupe, et obtenir une vue nette des tissus.

Ainsi, malgré les lacunes de nos connaissances actuelles dans la chimie des composants végétaux (lignine, subérine, cutine), nous pouvons déterminer, par une méthode simple et rapide, le traitement et les colorations appropriés à la coupe qui nous intéresse.

Le tableau de la page suivante donne les réactions du réactif de Steinmetz et les directives qu'on en peut tirer.

Les constituants des parois cellulaires ainsi déterminés (cellulose, cutine, lignine, subérine, etc) nous pourrions choisir une méthode de coloration appropriée aux tissus trouvés, pour les mettre en évidence. Si les indications du réactif-test se révèlent insuffisantes, on pourra recourir à des réactifs microchimiques spéciaux.

N. B. — Les préparations obtenues par le réactif-test ne sont pas permanentes, et ne peuvent être déshydratées. Des essais de montage à la glycérine gélatinée n'ont pas donné de bons résultats.

Tableau des résultats obtenus par le réactif de STEINMETZ, dit réactif-test.

Couleur	Constituant du réactif-test qui agit	Contenu cellulaire ¹	Membranes ²
bleu violacé	iode	amidon	
lie de vin	iode	dextrine	
jaune	iode	aleurone	
noir bleu	alun ferrique	tanins	
blanc nacré	—	gommes, mucilages, inuline.	
cristaux blancs	alun (+Calcium forme CaSO ₄)	cristaux de sels de calcium.	
rouge	Soudan III	huiles, matières grasses, essences, résines, latex.	membranes cutinisées <i>cuticule et tissu cireux</i> (parois épidermiques externes et subérfifiées <i>liège ou suber</i> , externe ou interne (cellules aplaties, à parois minces, disposées en plusieurs assises). membranes pecto-cellulosiques <i>parenchymes</i> (à parois minces). <i>liber</i> (tubes criblés en faisceaux). <i>collenchymes</i> (cellules à angles renforcés).
blanc crème	—		membranes lignifiées <i>vaisseaux du bois</i> (en faisceaux) ou <i>trachées et trachéides</i> (Conifères). <i>sclérenchyme</i> (fibres, cellules scléreuses).
jaune d'or	sulfate d'aniline		

¹ Le contenu cellulaire déterminera le traitement.

² La constitution des membranes cellulaires déterminera la coloration.

Pour conserver ces préparations pendant quelques semaines, voici la méthode que nous avons employée avec succès: la coupe est placée dans quelques gouttes de réactif pendant 5 minutes environ; après ce temps, on substitue au réactif de la glycérine pure en établissant un courant sous la lamelle au moyen d'une bande de papier filtre. La coupe ainsi débarrassée de l'excès de réactif, on borde avec de la paraffine la lamelle sur 3 côtés, le 4^e restant libre, pour permettre d'ajouter une goutte de glycérine.

Bibliographie:

- A. BOLLES LEE et F. HENNEGUY, Anatomie microscopique, 1896.
 A. BONNIER et LECLERC DU SABLON, Morphologie végétale (traité).
 R. COMBES, La vie de la cellule végétale, tome III: L'enveloppe de la matière vivante, Paris, 1937.
 F. CZAPEK, Biochemie der Pflanzen, Band I, Iena, 1913.
 E. STRASBURGER, Anatomie végétale, Paris, 1886, et Botan. Praktikum, Iena, 1913.
 C. VAN WISSELINGH, Die Zellmembran, Handbuch der Pflanzenanatomie, K. Linsbauer, 1925.

CHAPITRE V : Traitement préalable des coupes.

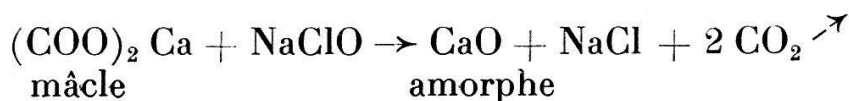
Il consiste à vider les coupes, à les « éclaircir », et à réduire les tissus à leur squelette. Pour cela on utilisera un bain de NaClO ou de KClO, ou, ce qui est moins favorable, d'extrait de Javel (LANGERON, *loc. cit.*, p. 1147) additionné de 5 à 10 gouttes de KOH concentré.

Les coupes sont traitées à froid pendant quelques minutes (10 à 15 en général). La durée du traitement peut varier de 5 à 30 minutes suivant la quantité de matières de réserve prouvées par le réactif-test.

Si les coupes résistent, il faut tiédir le bain pour favoriser l'hydrolyse des substances de réserve par l'alcali. On évitera cependant de trop chauffer, car les coupes deviennent cassantes et certains tissus se détachent au cours des manipulations subséquentes (par exemple épidermes, écorces, cylindres centraux).

Les amidons et dextrines, l'aleurone, sont tous hydrolysables par les alcalis dilués.

Les macles d'oxalate de calcium (oursins) devront être observées sur des coupes non traitées (par ex. dans les tiges d'*Aristolochia Sipo*) car NaClO attaque superficiellement ces cristaux en émoussant les pointes, et en arrondit les arêtes suivant la réaction :



L'action de l'acide acétique dissout partiellement le CaO formé.

Après traitement à l'alcali, les coupes sont lavées rapidement à l'eau distillée, et un passage dans un bain d'acide acétique dilué (acide acétique glacial 10 parties, pour 100 d'eau distillée) ôtera les dernières traces d'alcali.

Enfin un lavage soigné à l'eau distillée ou même à l'eau courante¹ éliminera complètement toute trace d'acide acétique. Celui-ci en effet décolore le *carmin* et fait virer certains colorants, le *rouge Congo* par exemple.

On s'assure au microscope que les coupes sont vides et en bon état: ni contractées, ni fissurées.

Remarque: Ce traitement est assez difficile pour les rhizomes en général, et pour le matériel conservé dans le mélange alcool, glycérine, eau (par exemple: stèles du rhizome de *Polypodium vulgare*, racines de *Smilax*, tiges d'*Aristolochia Siphon* conservées au mélange glycéro-alcoolique).

Cas particuliers.

Si le réactif-test a prouvé la présence de *tanins*, *gommes* ou *mucilages*, les coupes seront, après le traitement général, plongées dans un bain d'acide dilué pendant quelques minutes (par ex. HCl 10 à 20 %). Dans les cas difficiles, on pourra tiédir ce bain, ce qui favorisera l'hydrolyse des substances citées par l'acide dilué.

On lave avec soin à l'eau courante (v. note précédente) pour éloigner toute trace d'acide avant la coloration.

NB: Les cristaux des différents *sels de calcium* seront aussi dissous par ce traitement.

Si le réactif-test a prouvé la présence de *matières grasses* ou *huiles* (exine de pollen, feuilles de mousses) celles-ci seront plus ou moins facilement dissoutes par un bain d'alcool à 95° chaud, ou mieux d'éther ordinaire. Ce bain est plus efficace s'il a lieu avant le traitement général.

Il en est de même pour les *essences* (si elles sont solides = baumes) et pour les *résines* des Conifères.

Les *latex* (Euphorbiacées, Papavéracées) ayant une constitution chimique mal définie et essentiellement variable, peuvent être dissous partiellement ou totalement par ce traitement.

¹ Pour les lavages à l'eau courante, on utilisera soit un tube fermé aux deux extrémités par de la soie à bluter, soit un godet de porcelaine perforé (« Porzellansieb ») ou un tube de verre avec pour fond un crible de platine. Ce crible, fermé par un bouchon, est maintenu le temps convenable dans un grand récipient placé sous un jet d'eau courante.

Bibliographie :

E. ABDERHALDEN, Biochemisches Handlexikon, Band 2, Berlin, 1911.

W. BEHRENS, Tabellen zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten, 1892.

GUILLERMOND, MANGENOT, PLANTEFOL, Traité de cytologie végétale, Paris, 1933.

M. LANGERON, *loc. cit.*, p. 1146.

CHAPITRE VI : **Coloration.***Généralités.*

Il existe de très nombreuses classifications des colorants et de leurs affinités chimiques, et une énorme bibliographie à ce sujet (voir bibliographie générale, à la fin de ce chapitre).

Nous n'avons pas l'intention de proposer une nouvelle classification, mais de faire une étude critique d'un certain nombre de colorants connus en histologie végétale.

La méthode de coloration des coupes dépend du but que l'on se propose¹. Pour une étude purement histologique², comme celle faisant l'objet de ce travail, deux cas peuvent se présenter :

S'il s'agit de préparations pour le *dessin à la chambre claire*, la *projection* ou la *photographie en noir et blanc*, il importe d'avoir des contours cellulaires nets, et toutes les membranes colorées. On fera une coloration simple progressive (voir plus loin) qui colorera tous les tissus révélés par le réactif-test.

Dans ce but, les meilleurs colorants sont :

les *hématoxylines* et les *violet*s *Dahlia*, *de gentiane*, *de méthyle*.

Le *brun Bismarck*, la *fuchsine crist.* et la *safranine*, bien que donnant des contours cellulaires moins nets, peuvent aussi être utilisés.

L'emploi de ces colorants ne présente aucune difficulté dans ce cas ; les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I et leur préparation dans la liste des colorants.

Mais s'il s'agit avant tout de *différencier certains éléments de la coupe*, on utilisera un ou des colorants spécifiques³.

¹ Pour des objets devant servir à la fois à l'étude des tissus et du contenu cellulaire, on peut procéder à une *coloration en masse* (cf. N. POPOFF. *Bull. Hist. appl.* 13, 1936).

² Etude des membranes seules.

³ Nous n'attribuons pas à ce mot un sens absolu.

Dans quelques cas, l'emploi d'un seul colorant (coloration simple) peut suffire à différencier les éléments mis en évidence par le réactif-test.

1a *Coloration simple progressive.*

Les formules des colorants sont en général indiquées en solution trop concentrée, qui surcolorent la coupe. On utilisera donc ici des solutions *diluées* ou même *très diluées* ; et l'action colorante sera augmentée si on opère à chaud. Le temps du bain variera avec la dilution. La seule difficulté est d'arrêter à temps la coloration, ce qui exige une surveillance continuelle des coupes.

Le tableau I donne les résultats obtenus avec un certain nombre de colorants, parmi les plus usuels.

1b *Coloration simple régressive.*

On fait agir cette fois des solutions colorantes *concentrées*, produisant une surcoloration, puis on provoque la régression de la coloration, par des réactifs appropriés. C'est, en langage technique, la *différenciation*.

Le tableau I donne la liste des dissolvants ou différenciateurs à employer pour chaque colorant.

Il est à noter que cette méthode donne des résultats moins bons, moins durables surtout, que la coloration progressive. Au premier abord, la différenciation des éléments peut paraître meilleure ; mais après quelques mois, les coupes subissent une décoloration plus ou moins généralisée. Tout se passe comme si, malgré les nombreux lavages subséquents, le différenciateur continuait son action en décolorant peu à peu toutes les membranes cellulaires.

Après n'importe quelle coloration, simple ou combinée, la déshydratation par les alcools, en vue du montage au baume, assure à notre avis la meilleure différenciation et les colorations les plus stables. L'alcool, tout en enlevant l'excès de colorant, ne paraît pas continuer son action de décoloration, et semble être le différenciateur recommandable ¹.

¹ Une question pourrait se poser ici au sujet des *colorants* dits *indicateurs* : les tissus végétaux fixés présentent-ils des différences de pH suffisantes pour être perceptibles à la coloration ? Des essais faits avec le *tournesol*, le *méthylorange*, le *rouge neutre*, le *rouge Congo*, le *violet cristal* n'ont donné, dans les différents tissus, aucune différence appréciable à l'œil avec certitude. Il semblerait donc qu'en histologie, les tissus fixés ne présentent pas de différences de pH suffisantes pour permettre l'emploi utile des colorants indicateurs.

Quant à la *métachromasie*, qui est un virage de certaines matières colorantes au contact d'éléments particuliers, elle ne semble pas, sauf pour de rares cas spéciaux, pouvoir être mise à contribution utilement en histologie végétale.

2. Coloration combinée :

C'est un procédé qui consiste à faire agir plusieurs colorants soit *successivement*, soit *simultanément*.

La différenciation des éléments révélés par le réactif-test est plus nette par la coloration combinée, donc préférable à celle obtenue par la coloration simple.

Dans la coloration combinée, chaque colorant agit pour son propre compte, en se fixant sur un tissu donné. Mais souvent aussi le deuxième colorant agit sur le premier, en le chassant de certains éléments pour lesquels il a lui-même plus d'affinité.

Ex. : l'*hémalun* colore tous les éléments d'une coupe en violet, mais le *vert malachite* chassera l'*hémalun* des éléments lignifiés, subérifiés et cutinisés, et prendra sa place.

Dans la coloration combinée, la méthode progressive est aussi préférable.

2a. Les résultats des *colorations combinées successives* sont consignés dans le tableau II. Seuls les résultats durables et réussissant dans la majorité des cas y sont indiqués. Certains essais n'ont pas résisté à l'épreuve du temps. D'autre part, de nombreuses méthodes, souvent citées dans la bibliographie nous ont donné des colorations pâles et, surtout, des contrastes insuffisants, malgré de nombreux essais avec des concentrations variées du colorant, une prolongation du bain, ou une différenciation prolongée. Ces résultats négatifs sont consignés sous le titre : insuccès. Toutes les méthodes citées par LANGERON ont été passées en revue, sauf celle du *rouge de ruthénium*, colorant actuellement introuvable, et de prix inabordable pour la pratique courante.

2b. Nous avons tenté l'application de *colorations combinées simultanées*, c'est-à-dire des mélanges de deux ou plusieurs colorants, signalés par la littérature; nous avons essayé aussi quelques autres méthodes.

A noter que le *violet neutre de Godfrin* (LANGERON, *loc. cit.*, p. 1149) est resté introuvable malgré bien des recherches bibliographiques.

Le résultat des colorations simultanées est rarement bon; il n'est jamais aussi net que celui obtenu par des colorations successives. Les colorations simultanées sont données par le tableau III.

« Dans les colorations simultanées, chaque élément agit généralement pour son compte, du moins dans les formules rationnelles, car il faut se dé-

fier de certains liquides donnant automatiquement des colorations triples ou quadruples, dont le résultat est presque toujours défectueux ou inconstant » (LANGERON, *loc. cit.*, p. 456).

La plupart des mélanges colorants sont d'ailleurs instables et précipitent après quelque temps. « Les solutions aqueuses des colorants basiques sont précipitées par de nombreux colorants acides » (cit. art. L. PELET-JOLIVET. Sur la dissociation des combinaisons de colorants acides aux colorants basiques par les substances adsorbantes).

Dans la plupart des cas, les mélanges employés en histologie végétale sont précisément formés d'un colorant acide et d'un colorant basique. Il se produit sans doute une combinaison chimique entre les colorants, peut-être une simple neutralisation.

On sait que bien des colorants forment des solutions colloïdales (par exemple le *bleu de méthylène*, le *rouge Congo*, les *violetts cristal* et *de méthyle*). Deux colloïdes de signes contraires montrent une attraction électrostatique, donc les micelles peuvent se neutraliser. Au moment où les micelles ne sont plus chargées (point isoélectrique), la solution atteint un maximum d'instabilité, et il y a, dans la plupart des cas, floculation.

La floculation n'intervient pas seulement lors du mélange de deux colloïdes de signes contraires. Elle peut aussi être produite par l'adjonction d'un électrolyte à la solution colorante. Les ions H^+ et les ions OH^- sont spécialement actifs. Comme nos colorants sont souvent en solution acide (*vert de méthyle acétique* par exemple) ou en solution alcaline (*rouge Congo ammoniacal*, et colorants voisins, dérivés de la benzidine), la présence d'électrolytes peut aussi jouer un rôle dans l'instabilité des mélanges de ces colorants. Cette instabilité ne se manifeste pas toujours immédiatement; la solution paraît stable au début, puis un dépôt se forme au fond, et souvent après quelques mois, le liquide est complètement décoloré et les colorants précipités au fond du flacon.

En conclusion, les coloration combinées successives sont, en histologie végétale, généralement préférables aux colorations combinées simultanées. Si elles sont rationnellement pratiquées, elles ne provoquent aucune perte de temps appréciable (voir note au § suivant : technique).

Technique (coloration en 1, 2 et 3 temps).

Prendre les coupes vidées (NaClO, puis acide acétique) et lavées, avec un pinceau ou à plat sur un scalpel; les introduire dans un godet-crible. Eviter d'y mettre plus d'une dizaine de coupes. Agiter le godet dans chaque bain, pour séparer les coupes qui pourraient s'être collées les unes aux autres. Plonger le godet dans le *premier colorant*. (Le temps du bain est indiqué dans les tableaux.)

Laver à l'eau distillée ou à l'eau courante, éventuellement à l'alcool ordinaire, ou chlorhydrique pour différencier¹.

¹ Voir différenciateur, tableau I.

Plonger le godet bien propre dans le 2^e *colorant*, laver, etc.
3^e *colorant*, laver, etc.

Monter directement à la glycérine gélatinée, ou déshydrater et monter au baume du Canada (voir chapitre IX, Milieux conservateurs).

L'ordre successif de l'emploi des colorants n'est pas absolu; on utilisera avec avantage celui cité par les tableaux, bien qu'une autre succession soit possible dans la plupart des cas.

Note: Les colorants seront conservés avec avantage dans des poudriers bas à large ouverture, sauf dans les cas où le verre brun est indispensable à leur bonne conservation. Cette méthode économise les colorants, cela pour autant que l'opérateur travaille avec une parfaite propreté, et n'introduit aucun réactif étranger dans les poudriers.

Bibliographie générale:

P. CASTAN, La chimie des matières colorantes organiques, Paris, 1926.

(—) H.-J. CONN, Progress in the standardization of stains, *Stain Technol.* 14, 1939.

MCE DOLADHLE, Contribution à l'étude de la fixation des matières colorantes (thèse, Dijon, 1931).

* L. KRALL, Les colorants en microscopie, Zofingue, 1921.

LANGERON, *loc. cit.*, p. 437-536 et 1157.

G. MARTINET, Couleur et constitution chimique (?).

L. PELET-JOLIVET, Die Theorie des Färbeprozesses, Dresden, 1910.

* G. SCHULZ, Farbstofftabellen, Leipzig, 1931.

A. SEYWETZ et P. SISLEY, Chimie des matières colorantes artificielles, Paris, 1896.

C.-L. TASSART, Matières colorantes et chimie de la teinture, Paris, 1890.

* Les deux ouvrages ainsi marqués sont ceux qui nous ont servi à classer nos colorants (voir liste).

Bibliographie spéciale:

(—) BÖHM et OPPEL, Taschenbuch der Mikroskopischen Technik, Munich, 1928.

P. BUGNON, Sur l'emploi du vert lumière en histologie végétale, *Bull. Soc. Bot. France*, LXVI, 1919, et *C. R. Acad. Sc.* CLXVIII, 1919.

Sur l'emploi des encres commerciales en histologie végétale, *C. R. Acad. Sc.*, CLXIX, 1919.

J. CHALON, Notes de botanique expérimentale, 1897.

A. DAUFRESNE, Guide pratique pour les travaux de microscopie agricole.

GRÖNLAND, CORNU et RIVET, Des préparations microscopiques végétales, 1872.

H. HAGER, Handbuch der praktischen Mikroskopie, Berlin, 1932.

(—) JOHANSEN, DONALD ALEXANDER, Plant microtechnique, New-York, 1940.

M. LANGERON, *loc. cit.*, p. 1147-1152.

(—) MAC CLUNG, Handbook of microscopical technique, New-York, 1937.

L. MANGIN, Sur les réactifs colorants des substances fondamentales de la membrane, *C. R. Acad. Sc.*, juillet 1890.

Id., Sur l'emploi du rouge de ruthénium, *C. R. Acad. Sc.*, 1893.

P. MARTENS, Notes de botanique microscopique.

(—) MARTIN et JOHNSON, Practical microscopy, London, 1931.

A. MEYER, Erstes mikroskopisches Praktikum, Iena, 1898.

L. OLIVIER, Procédés opératoires en histologie végétale, 1885.

A. POULSEN, Microchimie végétale, 1883.

ROMÉIS, *loc. cit.*

(—) SCALES et SHILLINGTON, Practical microscopy, London, 1926.

R. SOUÈGES, Analyse micrographique, Paris, 1939.

J. TEMPÈRE, *Le micrographe préparateur*, périodique de 1893 à 1906.

O. TUNMANN (éd. 1931 revue p. ROSENTHALER), *loc. cit.*

A. ZIMMERMANN, Die botanische Mikrotechnik, 1892.

(—) Nous rappelons que les ouvrages ainsi marqués sont ceux dont, vu les circonstances actuelles, nous n'avons pu lire que des comptes rendus.

CHAPITRE VII : Les constituants de la membrane cellulaire et leurs affinités chimiques.

Généralités : Avant de parler de la membrane d'un point de vue chimique, et physico-chimique, il est intéressant de voir d'où elle vient, et dans quel état elle se trouve du point de vue biologique.

Quelle est l'origine de la membrane ?

Différentes hypothèses se trouvent en présence. Certains auteurs pensent que la membrane cellulaire se forme aux dépens du protoplasme seul; d'autres prétendent que l'élaboration de la membrane par le protoplasme est soumise à une action du noyau cellulaire; d'autres enfin ne veulent voir dans la formation d'une membrane qu'un simple phénomène de polymérisation des glucides.

Autre question: la membrane *est-elle vivante* ?

D'après RAOUL COMBES, « La substance végétale ne se laisse pas diviser en matière vivante et en matière non vivante; elle comprend des parties qui, en quelque sorte, vivent activement et d'autres qui nous paraissent vivre plus faiblement » (cit. R. COMBES, La vie de la cellule végétale, III).

Il semble bien que nous ayons affaire à des membranes cellulaires vivant d'une vie ralentie dans la plupart des cas; font exception les

cellules du liège et les bois fortement lignifiés qui forment des tissus « morts »¹.

Cependant on rencontre quelquefois des cellules mortes au milieu d'un parenchyme vivant (moelle d'*Helianthus annuus* par exemple). Ces membranes prennent très légèrement les colorants du bois, bien qu'étant cellulosiques; peut-être peut-on rapprocher de ce cas la faible colorabilité du velamen des racines aériennes (*Vanda suavis*, *Dendrobium*), velamen formé d'un tissu mort.

Ainsi la membrane végétale semble présenter tous les stades entre la vie et la mort. Elle est, sans nul doute, le siège de phénomènes physico-chimiques en relation avec l'activité cellulaire.

« Der Uebergang vom Lebendigen zum Toten liegt bei der Bildung der Mizelle » (E. KÜSTER, *loc. cit.*).

Quelle est la structure de cette membrane?

« La membrane glucidique, comme toutes les autres parties de la cellule... a une structure colloïdale » (cit. R. COMBES, *ibid.*).

D'après ce qui vient d'être dit, nous pouvons conclure que la plupart des phénomènes de fixation et de coloration de la membrane cellulaire peuvent être ramenés à des processus colloïdaux : phénomènes d'adsorption à la surface de séparation de deux phases et phénomènes d'attraction électrostatique entre deux colloïdes de signes contraires (voir art. cit., L. PELET).

Il existe en effet des colorants qui possèdent une affinité particulière pour certains tissus, et permettent la mise en évidence de ces derniers.

En principe, « un colorant basique aura une affinité pour les tissus acides ; un colorant acide se combinera avec les tissus basiques » (L. KRALL, *loc. cit.*, p. 14).

Les colorants basiques sont généralement des *chlorhydrates* de bases organiques colorées (ion colorant positif). Ex. : *Chrysoïdine*.

Les colorants acides sont, pour la plupart, des sels de Na ou de K de corps organiques sulfonés (ion colorant négatif). Ex. : *Rouge Congo*.

Les colorants dits « neutres » possèdent deux groupements colorés, l'un acide et l'autre basique. Ex. : *Picrate de bleu de méthylène*.

Certains *colorants* sont dits « indifférents » ; ils ont, au lieu d'un groupement acide ou basique, un groupement indifférent, comme : —OCH₃, —OC₂H₅, etc. Ex. : *Ecarlate R*.

Il est intéressant de constater que les colorants, s'ils nous permettent de différencier les éléments d'une coupe, peuvent

¹ Sont considérés comme tels les tissus formés de cellules où le protoplasme a disparu.

aussi nous faire pressentir des analogies et des différences chimiques entre les composants de la membrane végétale. A noter que les colorants ne permettent pas l'identification absolue des constituants chimiques, mais ouvrent des voies à la microchimie et à ses réactifs spécifiques.

Bibliographie générale :

A. FREY-WYSSLING, Mikroskopische Technik der Micellaruntersuchung von Zellmembran, *Zeitschrift f. wiss. Mikrosk.*, 1930, B. 47.

Id., Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate, Berlin, 1938.

GUILLERMOND, MANGENOT, PLANTEFOL, Traité de cytologie végétale, 1933.

G. KLEIN, Handbuch der Pflanzenanalyse III^{er} Band/I, II, Wien, 1932.

E. KÜSTER, Ergebnisse und Aufgaben der Zellmorphologie, Dresden und Leipzig, 1942.

L. MANGIN, Observations sur la membrane cellulosique, 1891.

Id., Observations sur la présence de callose chez les Phanérogames.

Id., Observations sur la constitution de la membrane.

Id., Nouvelles observations sur la membrane. Extr. *Bull. Soc. Bot. France*, 1892-93.

Id., Sur la présence des composés pectiques chez les végétaux, *C. R. Acad. Sc.*, oct. 1893.

L. PELET-JOLIVET, Sur la dissociation des combinaisons de colorants acides aux colorants basiques par les substances adsorbantes. *C. R. Acad. Sc.*, 1907.

WASIKY, Leitfaden für die pharmakognostischen Untersuchungen in Unterricht und Praxis, Leipzig u. Wien, 1936.

J. VON WIESNER, Die Rohstoffe des Pflanzenreiches, Leipzig, 1928.

C. VAN WISSELINGH, Die Zellmembran, *loc. cit.*

Constituants :

1. *Cellulose.*

Les *cellules jeunes* ont toujours leurs *membranes en cellulose*, plus ou moins *associée à des composés pectiques*.

Dans la suite, ces membranes peuvent s'imprégner de *lignine*, de *cutine*, de *subérine*, ou *se gélifier et disparaître*.

Chimie. — La cellulose est une substance ternaire très polymérisée $(C_6H_{10}O_5)_n$. On peut probablement parler des celluloses, formant un groupe caractérisé par un ensemble de propriétés bien déterminées.

Suivant la conception actuelle, la cellulose est formée de groupes glucose reliés par des liaisons holosides 1-4 (comme

les deux groupes formant le cellobiose) (cf. CHAMPETIER, *loc. cit.*).

Les celluloses ont un faible pouvoir réducteur, dû peut-être à un groupe aldéhydique libre au bout de la chaîne (?)

Le poids moléculaire est encore indéterminé.

La cellulose est une substance blanche, amorphe, insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther, les alcalis dilués. Par l'action de la soude caustique, on obtient un produit de transformation, la cellulose mercerisée. Les acides concentrés, à chaud, la transforment en cellobiose, puis en deux molécules de glucose. Le dissolvant habituel de la cellulose est la Liqueur de Schweizer (solution ammoniacale de sulfate de cuivre). Il en existe plusieurs autres, tous employés dans l'industrie de la soie artificielle.

La cellulose présente de très nombreuses réactions d'addition, par exemple avec l'eau, les alcalis, les acides, les sulfocyanates alcalins, etc.

«Die meist verschiedenen chemischen Körper greifen bei der gewöhnlichen Temperatur, oder beim Erhitzen die Cellulose an. Die Modifikationen und Zersetzungen, welche die Cellulose dabei erleidet, sind sehr verschiedener Art, was mit der chemischen Natur der Körper, der Konzentration ihrer Lösungen und der Temperatur zusammenhängt. Die zahlreichen Abkömmlinge, die man von der Cellulose erhalten hat, sind in der Literatur mit verschiedenen Namen angedeutet. Man nennt sie: Hydratcellulosen, Hydrocellulosen, Oxycellulosen, Acidcellulosen, Celluloseester, usw.» (C. VAN WISSELINGH, *loc. cit.*, p. 2).

La cellulose est donc, d'après sa formule, une substance neutre. Mais elle se transforme facilement au contact de l'eau, des acides et des bases, selon la concentration et la température. C'est dire qu'après le traitement à NaClO, à froid ou à chaud, puis à l'acide acétique, la cellulose des membranes cellulaires a probablement subi déjà de multiples transformations moléculaires, bien que son apparence n'ait pas changé.

On constate, après le traitement préalable des coupes, que *la cellulose manifeste spécialement son affinité pour les colorants azoïques de la classe du rouge Congo, colorants légèrement acides*, utilisés en solution neutre ou alcaline.

En nous référant à la loi générale énoncée précédemment, on pourrait conclure que *le traitement a conféré à la cellulose une légère basicité (?)* (acidophilie). Cette question n'est pas encore résolue.

Une autre hypothèse est que *la cellulose se colorerait par adsorption*.

En effet, ceux qui ont étudié la structure de la cellulose

ont déterminé une structure cristalline qui, dans certaines conditions, et sous l'action de certains réactifs, paraît devenir une structure micellaire. CHAMPETIER nous dit à ce sujet : « Rien ne s'oppose d'ailleurs à ce qu'une même chaîne cellulosique ressortisse à la fois à une région cristalline et à une région amorphe (*loc. cit.*, p. 622).

Plus récemment, FREY-WYSSLING a fait une étude spectrale des gels sous l'action des rayons X (p. 98 et suiv). Cette étude révèle un arrangement des atomes d'une grande régularité, une structure se rapprochant des substances cristallines.

Ainsi, de nombreuses interprétations de la structure de la membrane cellulosique ont été données depuis PAYEN en 1834 jusqu'à nos jours. Les auteurs paraissent s'accorder actuellement sur la structure colloïdale de la cellulose; et l'état actuel de nos connaissances est résumé dans une publication toute récente (E. KÜSTER, *loc. cit.*, p. 86) :

«Die Hauptvalenzketten treten zu Mizellen zusammen, die röntgenometrisch als Gebiete ungestörter Gitterbereiche zu definieren sind. Die Zelluloseketten sind länger als Gitterbereiche und die Mizelle daher keine individualisierten Kristallite, sondern miteinander zu einem von intermizellaren Räumen durchsetzten Mischkörper verbunden; seitlich haften sie durch Kohäsionskräfte zusammen « wie die Fasern eines gesponnenen Fadens »; dieses zusammenhängende Mizellgerüst gibt den Wänden ihre « mizellare Textur »...

Das Mizellargerüst der Membranen ist nicht kompakt und gleichmässig dicht sondern wird von Spalten aller Art, « Lockerstellen », verschiedenster Grössenordnung durchsetzt. An solchen liegt die Zellulose minder dicht, allerhand Inkrusten sind zwischen die Mizelle gelagert. Farbstoffe aller Art und andere Fremdstoffe finden den Weg in die Membran, indem sie die Lockerstellen einnehmen » (E. KÜSTER, *loc. cit.*, p. 86).

Cet édifice colloïdal et lacunaire de la cellulose rend assez plausible l'hypothèse de l'adsorption des colorants par la membrane.

Coloration :

Les colorants cellulosiques sont indiqués comme colorant A dans les tableaux 2 et 3. (On trouvera au chapitre VIII quelques notes à propos de ces colorants.)

Il est intéressant de constater que l'état de la membrane ne paraît pas indifférent à la coloration: les tissus cellulosiques frais, non fixés, se colorent mal ou pas du tout. Les tissus fixés à l'eau bouillante, à l'alcool ou au mélange glycérolé se colorent généralement bien, moins nettement cependant que les tissus secs qui ont été ramollis. (Voir note chap. VIII.)

Pour distinguer la membrane cellulosique des constituants secondaires, voir aux § suivants.

La distinction *cellulose/callose* est très bien mise en évidence, sur des coupes de *Vitis* par exemple (sarments pris en février) par la coloration double suivante: (LANGERON, *loc. cit.*, p. 1155).

(Le mélange de deux solutions, l'une de *bleu d'aniline*, l'autre d'*orseilline BB*, acidifié par 3 % d'acide acétique.)

Les vaisseaux libériens (cellulosiques) sont roses, et on voit une série de cribles, bouchés par la callose, ressortir en bleu vif; examiner de préférence les coupes à la glycérine, le montage à la glycérine gélatinée enlevant la netteté du contraste.

Bibliographie :

CHAMPETIER, *Bull. Soc. Chim. de France*, 1934, p. 613.

P. CRISTOL, Précis de chimie biologique médicale, Paris, 1935.

A. FREY-WYSSLING, *Sübmikroskopische Morphologie*, p. 99 et 212.

C. VAN WISSELINGH, *Die Zellmembran*, p. 1-44.

2. Composés pectiques.

Les composés pectiques se trouvent essentiellement dans les tissus jeunes, associés à la cellulose (collenchymes, lamelles moyennes, pulpes des fruits mûrs)¹.

Chimie. — Ces composés forment un groupe plus ou moins vaste suivant les auteurs. Leur constitution chimique est certainement voisine de celle des hémicelluloses, de la callose, des gommés et des mucilages (cf. VAN WISSELINGH, *loc. cit.*, p. 65 et 67).

Les composés pectiques proprement dits *sont des corps ternaires* (C, H, O) à *fonction acide*.

On a distingué : *la pectose*, substance voisine de la cellulose, mais insoluble dans la Liqueur de Schweizer. Elle gonfle peu au contact de l'eau. Sous l'action des acides, elle se transforme en *pectine*, substance voisine des mucilages, gonflant fortement sous l'action de l'eau. La pectine est soluble dans le suc cellulaire des fruits mûrs. Sous l'action de différents réactifs, elle se transforme en *acide pectique*, acide faible contenant beaucoup d'alcool méthylique, acide qui se combinerait, selon certains auteurs, avec du calcium (pectate de Ca) pour former les lamelles moyennes des cloisons cellulaires (ciment intercellulaire). D'autres auteurs voient dans cet acide un produit de transformation de la pectine, produit qui n'existerait pas dans la nature. Par hydrolyse, les

¹ Le phénomène appelé « différenciation nacréée » (cit, CHAUVEAUD, *Ann. Sc. nat.* XIII) est probablement dû à la présence de ces composés en forte proportion dans les tissus jeunes.

composés pectiques fournissent de l'arabinose, du xylose, du galactose, de l'acide galacturonique, etc.

Coloration : Les composés pectiques sont donc acides. D'après la loi générale, ils manifestent une forte affinité pour les colorants basiques, en solution neutre ou légèrement acide.

L'association des composés pectiques et de la cellulose en membranes pecto-cellulosiques provoque la difficulté de savoir, à priori, quels colorants (acides ou basiques) agiront sur ces membranes.

Les auteurs ne se sont d'ailleurs pas encore mis d'accord sur la constitution chimique des lamelles moyennes des membranes cellulaires : certains parlent de pectate de calcium, d'autres de pectose. « Nach MANGIN kann man die Eigenschaften der Pektose nicht genau feststellen, denn man kann sie nicht von der Cellulose trennen, ohne sie zu modifizieren » (C. VAN WISSELINGH, *loc. cit.*, p. 71).

Les substances pectiques se modifient en outre facilement, avec passage des unes aux autres, sous l'action de différents réactifs. Rien ne prouve que les composés pectiques ne soient pas modifiés par l'action successive de NaClO et de l'acide acétique.

Dans les tissus cellulosiques, avec les colorations doubles usuelles, les lamelles se différencient à peine en plus foncé des couches de cellulose voisines.

Dans les tissus lignifiés, les lamelles moyennes ne se distinguent pas ou à peine en plus nacré, des membranes lignifiées voisines, ce qui paraît normal, puisque les composés pectiques, comme la lignine, présentent des affinités pour les colorants basiques.

Il semble donc qu'en coloration double, les lamelles pectiques de la plupart des cellules se colorent selon leur voisinage : comme la lignine dans le bois et les fibres, comme la cellulose dans les parenchymes et autres tissus cellulosiques.

C'est un phénomène curieux si l'on pense que la cellulose a une affinité chimique pour les colorants acides, tandis que les composés pectiques isolés se colorent, comme le veut leur caractère acide, par les colorants basiques.

En 1893, MANGIN disait « Les réactifs qui se combinent aux composés pectiques ne manifestent leur élection que dans certaines conditions ». Il faut signaler que, de toute façon, l'affinité des composés pectiques pour les colorants basiques est faible, et facilement modifiée par des traces d'acide ou de base.

Nous avons voulu nous rendre compte comment les colorants agissaient sur les *lamelles pectiques débarrassées de la cellulose*. Nous avons, dans ce but, traité des coupes de moelle de sureau, des racines de primevère (*Primula elatior*) et des tiges de *Zea Mays* par la Liqueur de Schweizer, à froid, puis en chauffant légèrement. Nous avons vérifié l'absence de cellulose par l'acide sulfurique iodé, qui ne donnait plus aucune coloration bleue.

Le *bleu d'aniline*, colorant basique, colorait comme prévu les lamelles moyennes, qui restaient les seuls éléments des parenchymes, en bleu vif. Le *carmin*, colorant de la cellulose, devait, semblait-il, rester sans action; l'expérience a montré, au contraire, une coloration rose des membranes. Le *vert d'iode*, colorant basique, colorait en vert toutes les membranes. Sur la coupe colorée au *carmin*, le *vert d'iode* chassait ce dernier, du moins partiellement, donnant aux membranes pectiques une couleur vert un peu violacé. — Le *rouge Congo*, colorant nettement acide, colorait toutes les lamelles en rouge; il était en grande partie chassé de celles-ci par le *bleu de méthylène*, colorant basique. — De même la *benzoazurine* (acide) colorait la coupe en rose violet, coloration qui, sous l'effet du *vert de méthyle* (basique) devenait bleu vert. — Nous avons alors employé le *réactif genevois* (coloration double simultanée) dans l'espoir d'obtenir une bonne coloration jaune, la *chrysoïdine* étant le colorant basique qui devait dominer, et chasser le *rouge Congo* (acide). Nos prévisions ne se vérifièrent pas, et la coupe prit une couleur rouge orangé.

De nos expériences sur les lamelles pectiques débarrassées de la cellulose par la Liqueur de Schweizer, nous pouvons tirer les faits suivants: les colorants, quelle que soit leur nature, paraissent prendre indifféremment sur les lamelles moyennes. Notons cependant que si les colorants basiques chassent les colorants acides, la réciproque n'est pas certaine.

Plusieurs hypothèses se présentent pour expliquer la faible affinité des composés pectiques pour tous les colorants, avec affinité plus marquée pour les colorants basiques: quelques auteurs supposent que les lamelles moyennes sont formées de pectate de calcium; s'il en est ainsi, l'acide pectique étant un acide faible serait déplacé par l'acide acétique lors du traitement préalable, et mis ainsi en liberté, augmenterait l'affinité du tissu pour le colorant basique; cela expliquerait la coloration au *vert d'iode*, mais pas celle au *carmin*, ou au *rouge Congo*. On peut d'ailleurs soutenir le raisonnement inverse; la base serait mise en liberté par le traitement à l'hypochlorite de Na, et cette base calcique libre augmenterait l'affinité des membranes pour les colorants acides, le *rouge Congo* par exemple. La coexistence de ces deux phénomènes est d'ailleurs concevable.

Les lamelles moyennes, neutres ou à peu près, seraient ainsi transformées par le traitement préalable, cela suivant sa durée,

ce qui déterminerait leur affinité pour certains colorants, de préférence à d'autres.

Peut-être s'agit-il plutôt d'un phénomène d'adsorption des composés pectiques, adsorption qui serait positive ou négative selon le milieu environnant. S'il s'agit de lignine, ce milieu a un caractère acide; s'il s'agit de cellulose, il acquiert probablement une certaine alcalinité par le traitement préalable¹. Il est difficile de dire si le milieu influencerait la coloration des lamelles pectiques par son pH, ou si, dans les tissus lignifiés, il s'agirait d'une véritable lignification des lamelles moyennes. Il est certain qu'*en coloration double*, nous avons pu noter dans nos expériences, un certain retard dans la coloration des lamelles par les colorants basiques, c'est-à-dire que dans des tissus incomplètement lignifiés (fibres par exemple) la lamelle moyenne prenait encore le colorant cellulosique; si la lignification se fait dans la membrane de l'intérieur vers l'extérieur, ce retard s'expliquerait par le fait que le pH de la lignine en formation² n'aurait pas encore atteint le bord extérieur de la membrane, donc la lamelle pectique. *L'adsorption selon le milieu est la seule hypothèse qui expliquerait les colorations différentes des lamelles moyennes des tissus lignifiés et des tissus cellulosiques* (coloration rose des lamelles et des membranes cellulosiques au *carmin*, coloration verte des lamelles et des membranes lignifiées au *vert d'iode*). Cette coloration variable des composés pectiques suivant le voisinage est difficilement explicable autrement. Puisque, sur les composés pectiques isolés, les colorants basiques chassent les colorants acides, il devrait en être de même dans toutes les colorations doubles. Cela voudrait dire que, en coloration combinée, *toutes* les lamelles moyennes d'une coupe devraient être colorées en vert au *vert d'iode*, en bleu violet au *violet cristal*, ce qui n'est pas le cas.

On peut supposer aussi que les composés pectiques posséderaient un caractère amphotère qui leur permettrait de réagir soit avec les acides, soit avec les bases; mais cette hypothèse n'expliquerait pas non plus la coloration variable des lamelles pectiques selon leur voisinage cellulosique ou lignifié.

Il pourrait aussi être question d'une fixation d'ions au niveau de la lamelle moyenne, fixation d'ions différents selon les tissus, fixés lors du traitement préalable de ces derniers, et déterminant leur coloration.

Que faut-il donc conclure à propos de la coloration des composés pectiques? (Cf. R. MIRANDE, *C. R. Acad. Sc.*, CLXX, 1920, p. 199.)

Afin de vérifier l'importance des composés pectiques dans les colorations usuelles, nous avons essayé d'éliminer complètement ces

¹ C'est un fait connu et utilisé en teinturerie que le milieu, bain acide, alcalin ou neutre, peut favoriser ou empêcher la coloration d'une fibre colloïdale par les colorants colloïdaux.

² Ou la lignification elle-même.

derniers par l'action successive des acides et des bases, préconisée par R. MIRANDE. Nous avons toujours, malgré l'élimination des composés pectiques ainsi réalisée, pu colorer les membranes cellulaires restantes par les colorants dits celluloses : *carmin*, *rouge Congo*, *benzoazurine*, *hémalun*. De même toutes les membranes lignifiées débarrassées des composés pectiques ont pu être colorées par le *vert d'iode* et les autres colorants basiques.

La macération¹ des trachéides de *Pinus* (bois) et des tiges de *Zea Mays* sépare les cellules les unes des autres par dissolution du ciment intercellulaire (lamelles pectiques). Il semble que, par ce traitement énergique, tous les composés pectiques doivent avoir été éliminés. Les membranes cellulaires se colorent cependant au *carmin*, *rouge Congo*, etc. *La thèse soutenant que la présence des composés pectiques permet seule d'expliquer la double coloration carmin/vert d'iode paraît bien absolue*, et semble négliger des facteurs importants, tels que l'affinité chimique d'un colorant basique pour un tissu acide, et réciproquement, et les modifications, d'ordre colloïdal probablement, que les tissus subissent lors d'un traitement par les acides, les bases, et tous autres réactifs.

Nous en sommes encore à des hypothèses cherchant à expliquer les faits observés. Il existe certainement, dans la membrane, des complexes pecto-cellulosiques et pecto-ligneux, qui ont probablement acquis des propriétés différentes de celles de leurs constituants simples. D'autre part le traitement préalable des membranes cellulaires par divers réactifs peut avoir encore modifié la constitution des complexes eux-mêmes.

Il ne s'agit donc pas d'un problème simple, et, si les chimistes ont étudié les constituants de la membrane (cellulose, composés pectiques, lignine, etc.), ils se sont placés dans des conditions autres que le biologiste. L'étude des constituants isolés, de leurs produits de transformation et de désintégration est singulièrement éloignée de la complexité des membranes vivantes.

Une méthode spéciale de coloration permet de prouver l'imprégnation généralisée des *composés pectiques* par la *cellulose* (LANGERON, *loc. cit.*, p. 1158) : colorer par une solution de *benzoazurine* aq. — fixer par CuSO_4 1 %, laver à l'eau dist., colorer au *rouge de ruthénium*, monter à la glycérine gélatinée ou, de préférence, examiner frais.

La distinction des *composés pectiques* d'avec la *lignine*, la *subérine* et la *cutine* est obtenue soit par une coloration simple de *safranine*, qui colore en jaune orangé les composés pectiques, en rouge cerise la lignine, la subérine et la cutine, soit par une colo-

¹ HNO_3 conc : 30 cc, KClO_3 : 1 gr. Chauffer avec tissus végétaux 3 à 5 min.

ration double de *bleu naphtylène R* en cristaux et de *vert acide de Poirrier*, méthode qui colorera en violet les composés pectiques, et en vert la lignine, la subérine et la cutine. Ces méthodes ont donné les résultats les plus nets sur des coupes de tiges présentant des collenchymes (*Nicandra, Salvia, Cucurbita*), coupes non déshydratées, examinées directement à la glycérine.

Bibliographie :

A. DAUPHINÉ, Sur le mode de formation de la membrane pecto-cellulosique, *C. R. Acad. Sc.*, 199, 1934, p. 307.

Id., Origine et évolution de la lamelle moyenne dans les membranes pecto-cellulosiques. *Rev. Gén. Bot.*, 51, 1939, p. 321.

R. MIRANDE, art. *C. R. Acad. Sc.*, 1920, p. 197.

L. MANGIN, Sur la présence des composés pectiques chez les végétaux, *C. R. Acad. Sc.*, oct. 1893, et *Journal de Bot.*, 1893, VII.

C. VAN WISSELINGH, Die Zellmembran, p. 44-89.

3. Lignine.

Toutes les membranes cellulaires sont d'abord pectiques, puis pecto-cellulosiques; ensuite le cytoplasme (?) paraît élaborer *la lignine, qui imprègne la cellulose*, avec laquelle elle semble se combiner.

En se basant sur les travaux récents, on peut se demander s'il s'agit vraiment d'une incrustation de la membrane pecto-cellulosique par la lignine; d'une combinaison (ether-sel?) de la cellulose ou des composés pectiques avec la lignine; ou d'une adsorption de la lignine par la cellulose, voire même une transformation de la cellulose en lignine (ce qui s'expliquerait difficilement au point de vue chimique).

La lignine serait une matière brune, cassante, incrustant les parois des éléments cellulaires de soutien, constituant ce que l'on appelle généralement le bois.

Chimie. — La constitution chimique de la lignine n'est pas encore définie avec certitude. Il s'agit très probablement d'une substance ternaire (C, H, O) dérivée du phénylpropane.

« Als die Träger der Farbenreaktionen des Holzes mit aromatischen Aminen und Phenolen, haben meistens aromatische Körper gegolten, besonders Vanillin, Coniferin und Hadromal » (C. v. WISSELINGH, *loc. cit.*, p. 107). « Für die Kenntniss der Verholzung ist die Anwesenheit der methoxyl Gruppen ins Holz von grosser Bedeutung » (*ibid.* p. 112).

La lignine, par hydrolyse, donne du glucose et des pentoses (xylose, etc.).

D'après les recherches actuelles (Cf. R. JOULIA, M. FONTAINE, *loc. cit.*, 1938), peut-être faut-il plutôt parler *des lignines*, qui formeraient non pas une seule substance, mais

un groupe de composés voisins par leur constitution chimique, ayant un pH entre 3 et 5.

« L'un des faits les mieux établis touchant le processus de lignification est la complexité de la substance lignifiante¹ ».

Dans un article, MAX FONTAINE (Cf. *Rev. Gén. Bot.*, 1938, 50, p. 645) note que: « L'hypochlorite de soude déterminerait donc une simplification progressive du complexe lignifiant: chez les plantes que nous avons étudiées, les constituants D et E disparaissent au bout de peu de temps; puis, après 42 heures, le constituant C est éliminé, en même temps que le constituant B subit des modifications qui lui enlèvent certaines de ses réactions. Le constituant A subsiste². »

Sous l'action de l'acide nitrique ou de la potasse caustique concentrés, la lignine paraît se dissoudre complètement, laissant un squelette cassant, déchiré par endroits, qui donne, semble-t-il, les réactions de la cellulose. Nous avons essayé de traiter des tiges de *Vitis vinifera* et de *Cucurbita Pepo* par l'acide nitrique, 24 heures à froid, puis 1/4 d'heure à chaud. Le tissu a été rendu très cassant par ce traitement. Le squelette restant, traité par de l'acide sulfurique, puis par KI iodé, donne très nettement la coloration bleue de la cellulose dans les tissus antérieurement lignifiés. Le *carmin* colore ces mêmes tissus en rose, la *benzoazurine* en bleu, le *rouge Congo* en rouge. La *phloroglucine chlorhydrique*, qui colorait le bois en rouge, ne donne plus aucune réaction, tandis que le *vert d'iode* ne colore plus que le liège interne du *Vitis*.

La macération prolongée à chaud³ enlève non seulement les lamelles pectiques, mais aussi la lignine, laissant intactes les parois cellulosiques. Nous avons fait nos essais avec des tiges de *Cucurbita* et du bois de *Pinus*. Les vaisseaux de *Cucurbita* laissaient voir, sur la coupe longitudinale, leurs anneaux et leurs spirales comme des épaissements cellulosiques, se colorant par les réactifs iodés en bleu, et en rose par le *carmin*. — Les trachéides aréolées du *Pinus*, montraient après macération les mêmes réactions.

Ces résultats parleraient en faveur d'une simple imprégnation de la cellulose par la lignine, sans aucune transformation chimique. Un ouvrage tout récent explique ainsi cette imprégnation:

¹ Cf. art. R. JOULIA, p. 262 et 274.

² C'est là un fait intéressant, qui nous prouve que, comme nous l'avions prévu, l'hypochlorite ne débarrasse pas seulement les cellules de leur contenu, mais agit aussi sur les membranes cellulaires et peut leur faire subir des transformations assez profondes. Le mécanisme des transformations et colorations de la lignine est expliqué par G. KLEIN (cf. biblio. gén.).

³ Voir macération plus haut.

« Der Bau « inkrustierter » Zellwände findet im Rahmen der von FREY-WYSSLING gegebenen Auffassung ihre Erklärung durch die Annahme, dass Lignin, Pektinstoff oder Kieselsäure die zwischen den Zellulosesträngen liegenden Räume füllen und daher, ebenso wie die Zelluloseanteile der Membran ein zusammenhängendes Ganzes bilden: zerstört man die Zellulose, so bleiben die Inkrusten als kohärentes Skelett erhalten » (E. KÜSTER, *loc. cit.*, p. 93).

Coloration. — *Les membranes lignifiées se colorent généralement par les colorants basiques. Le vert Lumière, avec différenciation à l'eau, fait exception. (Voir plus bas.)*

La présence de lignine, habituelle chez les Phanérogames et les Cryptogames vasculaires, n'a pas été définitivement prouvée chez les Cryptogames cellulaires. Nous avons essayé de déceler la présence de lignine chez les mousses. Cette recherche fera le sujet du chapitre XI de ce travail.

Les colorations doubles permettent d'observer tous les passages de la membrane cellulosique à la membrane lignifiée, spécialement dans les bois jeunes, et dans certains tissus de soutien comme les fibres (par exemple jeunes tiges de *Ranunculus acer*, et jeunes aiguilles de *Pinus sylvestris*¹).

Bibliographie:

M. FONTAINE, Recherches histochimiques sur le complexe lignifiant, *Rev. Gén. Bot.*, 50, 1938, p. 636.

FREUDENBERG, art. *Angewandte Chemie*, 1939, p. 362.

R. JOULIA, Recherches histochimiques sur la composition et la formation du complexe lignifiant, *Rev. Gén. Bot.*, 50, 1938, p. 261.

L. KRALL, Les colorants en microscopie, 1921, p. 48.

C. VAN WISSELINGH, Die Zellmembran, p. 90-132.

4. *Subérine et cutine.*

« Früher meinte man dass Kutin und Suberin identisch wären... » (C. VAN WISSELINGH, *loc. cit.*, p. 135).

On distinguait ces deux substances par leur localisation dans les tissus. Actuellement on sait que, tout en étant très voisines, elles présentent cependant des différences de constitution.

Subérine.

Cette substance constitue les parois cellulaires du liège ou *suber*. Elle joue avant tout un rôle protecteur.

On ignore encore si la cellulose est masquée, ou si elle a complètement disparu des membranes subérifiées.

¹ Il semble même, dans certains cas, qu'il est possible d'observer la marche de la lignification dans la membrane, marche allant de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur, ce qui confirmerait l'origine cytoplasmique de la lignine.

Nous avons essayé d'éliminer la subérine, soit par les solvants des matières grasses, soit en la saponifiant par la potasse concentrée. Malgré de nombreux essais, nous ne sommes jamais parvenue à l'éliminer complètement des membranes.

Chimie. — La subérine est une *substance ternaire* (C, H, O) de nature *lipoïdique*.

Son origine n'est pas connue. On peut l'isoler par extraction fractionnée, séparant ainsi les divers constituants (extrait au chloroforme, à l'alcool, à la potasse alcoolique, à l'eau, etc.). — Elle est saponifiée par les lessives de soude ou de potasse concentrées. (Solubilisation totale.)

Son pH varie entre 3 et 4.

Elle est formée d'acides gras à poids moléculaire élevé (par exemple acides phellonique, stéarique, etc.), de glycérides, de cérine (= cire) et de tanins.

Peut-être existe-t-il plusieurs subérines, suivant les proportions de ces composés.

Selon la loi générale, *la subérine* (acide) *se colore par les colorants basiques*, mais *plus spécifiquement par les colorants des matières grasses*. (Alkanna, Soudan III, Ecarlate R.)

Cutine.

La cutine recouvre les cellules épidermiques des tiges, des feuilles et des fruits des plantes supérieures, exposés à l'air, ce qui augmente leur résistance et les rend imperméables.

La formation de cutine atteint son maximum dans les feuilles persistantes comme celles du houx ou du lierre; c'est *la cuticule*.

Chimie. — La cutine est une *substance ternaire, de nature lipoïdique*, à pH variant entre 3 et 5. Sa constitution probable est $(C_6 H_{10} O)_n$.

Certains auteurs supposent que c'est un produit de transformation de la cellulose; d'autres que cette substance, élaborée par le cytoplasme, masquerait la cellulose. « ... Die submikroskopische Struktur der kutinisierten Zellmembranen » nous donne les renseignements suivants: « Die Kutikularschicht aller 4 untersuchten Objekte besteht aus 2 Teilen, einem innern Zellulose- und Pektinhaltigen, und einem äussern Zellulose freien... Beide Schichten enthalten Kutin und Wachs. » (M. MEYER, *loc. cit.*, p. 584.)

On extrait la cutine par les lessives alcalines, dans lesquelles elle est plus difficilement soluble que la subérine,

quelquefois seulement partiellement saponifiée par ce traitement.

Du point de vue chimique, sa constitution est un peu différente de celle de la subérine: l'acide phellonique manque, mais on y trouve davantage de cérine. Le reste est identique.

Coloration. — Comme la subérine, la cutine se colore par les colorants basiques, et par les colorants des matières grasses.

C'est ici l'occasion de noter que la cutine et la subérine, voisines par leur constitution chimique, mais cependant pas identiques, présentent avec les colorants spécifiques *Alkanna*, *Ecarlate R* et *Soudan III*, des réactions colorées pareilles.

«In Uebereinstimmung hiermit ist die Ansicht von ZIMMERMANN, der besonders das Verhalten der Korklamelle und der Kutikula Farbstoffen gegenüber studierte. Er sagt dass, zwischen beiden zurzeit überhaupt kein durchgreifender Unterschied nachweisbar ist» (C. v. WISSELINGH, *loc. cit.*, p. 153).

Mais si nous considérons les réactions des colorants basiques usuels (par exemple *vert d'iode* ou *violet cristal*) sur le liège et sur la cuticule, nous pouvons cependant constater certaines différences d'intensité, la cuticule prenant moins bien le colorant que le suber¹.

L'endoderme, dans les colorations doubles, prend toujours une couleur plus ou moins voisine de celle du liège. Faut-il en conclure qu'il est subérifié? C. VAN WISSELINGH répond ainsi à cette question:

«Der Casparysche Flecken wird durch eine lokale Verholzung und Verkorkung und Wellung der Wand verursacht. Die Verholzung und Verkorkung beschränken sich auf einen Streifen der radialen Längswände und Querwände. In späteren Entwicklungszuständen ist bei vielen Pflanzen die ganze Wand an der Innenseite mit einer dünnen Korklamelle bedeckt... » (C. VAN WISSELINGH, *loc. cit.*, p. 155).

En effet, l'emploi du *vert d'iode*, par exemple, permet de confirmer cette hypothèse, en donnant à l'endoderme une coloration très voisine de celle du liège (racine de *Smilax*.)

Puisque nous venons de parler des colorants des matières grasses à propos de la subérine et de la cutine, notons en passant que certains tissus imprégnés de lipoïdes se colorent facilement par l'*Alkanna*, l'*Ecarlate R* et le *Soudan III*; mais doivent subir un traitement préalable à l'éther ou à l'alcool chaud pour pouvoir être colorés par les colorants usuels. (Voir cas particulier, chap. V.) Nous reparlerons de ce traitement dans les chapitres spéciaux, à propos du pollen et des mousses.

¹ Cela tient probablement à la plus forte teneur en graisse de la cutine.

Bibliographie:

F. FRITZ, Untersuchungen über die Kutinisierung der Zellmembranen... *Planta* 26, 1937, p. 693.

MAD. MEYER, Die submikroskopische Struktur der kutinisierten Zellmembranen, Leipzig, 1938.

C. VAN WISSELINGH, Die Zellmembran, p. 133-164.

CHAPITRE VIII : **Les colorants.**

(Discussion des tableaux I, II et III.)

a) *Colorants des tissus celluloseux:*

Les colorants usuels présentent des différences sensibles dans leur action, et suivant le genre de tissus celluloseux (parenchymes, collenchymes, etc.).

Les colorations par précipitation, comme celles au *bleu de Prusse* et au *chromate de plomb*, sont obtenues par l'action successive de deux réactifs.

Pour le *bleu de Prusse*, le premier bain (chlorure ferrique aq. 2⁰/₀₀) est suivi d'un rapide lavage à l'eau distillée, puis du bain de ferrocyanure de K 5⁰/₀₀.

Pour le *chromate de plomb*, on lave rapidement entre les deux bains (sol. aq. sat.) de bichromate de K et d'acétate de plomb. Dans les deux cas, un lavage soigné à l'eau courante s'impose après coloration. Malgré ces précautions, les colorants par précipitation ont une fâcheuse tendance à empâter les tissus, ils exagèrent l'épaisseur des membranes, masquent les détails et provoquent même parfois des précipités dans les cellules¹.

La *benzoazurine* et le *bleu coton* (en sol. aq. sat.) donnent une coloration un peu pâle, rendant difficile le dessin de certains contours cellulaires, par exemple les collenchymes des tiges de *Salvia* et de *Nicandra*. Ces colorants prennent très bien sur le matériel d'herbier (voir note en fin de chapitre).

Le *brun Bismarck* (en sol. 5⁰/₀₀ aq. ou alc. 30°) est un bon colorant dans la plupart des cas. Il est spécialement recommandable pour les colorations d'épidermes. Bien que ce soit un colorant basique, il colore tous les tissus; les tissus lignifiés prennent une teinte brune assez légère, tandis que les tissus celluloseux deviennent brun orangé.

La *deltapurpurine* et le *rouge Congo* offrent des résultats très variables suivant leur formule de préparation. Comme pour la *benzoazurine*, la solution ammoniacale paraît être la solution classique²; elle donne une coloration rapide, mais peu durable. La solution

¹ Plus les colorants et mordants sont dilués, plus les colorations obtenues sont précises.

² 1 gr. colorant dans 20 cc d'ammoniaque, ajouter 180 cc d'eau dist.

aqueuse saturée de ces colorants agit plus lentement, mais résiste bien mieux à l'action du temps (voir au § insuccès, action des acides et des bases sur les colorants).

Certaines *encres commerciales* (*encre Antoine*) permettent d'obtenir de bonnes colorations durables. Celle de la maison Antoine est difficile à se procurer actuellement, aussi n'avons-nous pu faire nos essais qu'avec la « bleue noire », en diluant 3 fois la sol. commerciale avec de l'eau dist.

L'*orangé d'aniline* et l'*orangé G* ont une action colorante semblable à celle du *brun Bismarck*; bien que ce soient des colorants acides, ils colorent tous les tissus, mais d'une teinte pâle. Un peu faible sur les tissus frais, la coloration est très bonne sur le matériel d'herbier (voir note en fin de chapitre). On utilisera des sol. aq. sat. ou à 1 % dans l'alcool à 70°.

Le *carmin* et l'*hémalun* restent les colorants de choix pour les membranes pecto-cellulosiques.

Parmi les nombreuses formules de préparation, le *carmin aluné de Grenacher* donne des colorations remarquables par leur netteté. Il fait ressortir facilement de très petits amas de liber, comme on en trouve par exemple dans les faisceaux libéro-ligneux des tiges de Monocotylédones. (*Scirpus*, *Juncus*, *Zea*). Il précise les détails des collenchymes¹ (tiges de Labiées et de Solanées par exemple) et contraste avantageusement avec la plupart des colorants verts et bleus².

Les *hématoxylines*, leur préparation et leur emploi ont déjà fait couler beaucoup d'encre. Ce sont des colorants à mordant.

Les *mordants* sont des substances qui servent d'intermédiaire entre le tissu à colorer et le colorant, permettant ainsi la coloration de tissus n'ayant aucune affinité naturelle pour le colorant. Tissu, mordant et colorant forment une laque insoluble, une triple laque. Les mordants sont utilisés soit par action directe sur le tissu, soit par mélange au colorant.

On obtient en général un résultat meilleur avec une solution colorante contenant le mordant, qu'en effectuant le mordantage préalable du tissu, qui empâte les contours cellulaires. Dans la coloration simple cependant, le mordantage préalable est souvent utilisé avec succès. En coloration combinée, il devra, autant que possible être évité, l'action du mordant sur le deuxième colorant étant en effet imprévisible. La coloration double *hématoxyline/vert de méthyle* a cependant été très employée par des spécialistes; dans ce cas, le mordant ne paraît pas nuire à la coloration combinée.

¹ L'intensité de la coloration et la netteté des membranes sont encore renforcées par les alcools de déshydratation (montage au baume), qui atténuent par contre la coloration du bois par les verts, les bleus et les violets.

² Le *carmin* doit être employé avant les colorants verts ou bleus; si on le fait agir après, il modifie sensiblement la teinte verte du bois qui devient violacée, ce qui nuit à la netteté du contraste.

De nombreux essais nous permettent de recommander, en histologie végétale, les *hématoxylines* suivantes, et leur mode d'emploi :

L'hémalun de Mayer colore bien toutes les membranes en violet bleu. Comme son nom l'indique, il évite l'emploi du mordant, celui-ci étant déjà contenu dans la solution (alun ordinaire)¹. Après *l'hémalun*, un lavage à l'eau courante avive la coloration, par action des sels alcalino-terreux de l'eau sur le colorant. La coloration à *l'hémalun* est stable, et donne des contrastes parfaits, spécialement avec le *vert malachite* ou la *chrysoïdine*.

L'hématoxyline acide d'Ehrlich, qui est aussi alunée, donne une coloration plus bleuâtre que *l'hémalun*. Elle colore aussi toutes les membranes.

Par contre, malgré un long lavage à l'eau courante, il est très difficile d'éliminer totalement l'acide acétique contenu dans le colorant; cet acide nuit à la conservation de la préparation, et dans le cas de coloration combinée, risque d'agir de façon défavorable sur l'autre colorant.

L'hématoxyline ferrique de Heidenhain.

L'action du colorant doit être précédée d'un mordantage. Le mordant est ici l'alun ferrique ammoniacal en solution aqueuse 3 %. Les membranes cellulaires deviennent noirâtres; mais bien que les contours soient assez nets, on a l'impression d'un empâtement des tissus. Un rapide lavage à l'eau distillée entre le mordant et le colorant diminue cet inconvénient. Comme *l'hématoxyline ferrique* donne une des colorations les plus foncées qu'on puisse obtenir, elle est fréquemment employée pour des coupes destinées au dessin ou à la photographie².

Hématoxylines avec autres mordants :

Au lieu de l'alun ordinaire (*hémalun*) ou de l'alun ferrique (*hématoxyline de Heidenhain*), nous avons essayé d'autres mordants utilisés en teinturerie. Les résultats sont bons, meilleurs même souvent que ceux obtenus à l'alun de fer, lorsqu'il s'agit de différencier les éléments d'une coupe.

Avec le sulfate de cuivre en solution aqueuse 2 %, toutes les membranes sont colorées en bleu vert par *l'hématoxyline*.

L'alun de chrome, en solution aqueuse 2 %, donne avec *l'hématoxyline* une belle coloration violette des tissus.

Le chlorure stannique ammoniacal ($\text{SnCl}_4 \cdot \text{NH}_4\text{Cl}$) aq. 3 % suivi de *l'hématoxyline*, colore les membranes en violet rose, un peu pâle.

Enfin un mélange de mordants cuivre/fer, et spécialement cuivre/chrome, tel qu'il est pratiqué industriellement, donne de bonnes colorations.

¹ La préparation du colorant est difficile à réussir. L'hémalun comme le *carmin aluné*, existe dans le commerce, prêt à l'emploi.

² NB. Cette coloration ne tient pas longtemps à la lumière, et atteint le maximum de netteté pour de fortes dilutions du colorant et du mordant (sol. usuelles diluées de 1 à 100 ou de 1 à 1000).

b) *Colorants des tissus lignifiés, cutinisés et subérifiés.*
(Coloration combinée.)

En principe, on peut dire que les colorations bleues, vertes et violettes sont plus nettes que les jaunes et les rouges, dans les tissus lignifiés.

Il faut cependant signaler la *chrysoïdine* (sol. 3 % ds alc. 90°) (jaune) qui permet certains contrastes intéressants; par exemple avec les *encres* colorant la cellulose en bleu, vert ou violet, la lignine devient d'un bel orangé, plus brun dans les tissus âgés.

La grande difficulté que présentent les colorations au *rouge neutre* et à la *safranine* tient à la régression, car ces colorants, même en solution diluée¹, surcolorent la coupe. Une différenciation s'impose, et l'alcool seul n'est pas assez énergique; il faut avoir recours à l'alcool chlorhydrique qui exige une surveillance continue (sous le microscope). Cette différenciation peut donner de beaux résultats, mais qui ne sont cependant pas durables (voir au § insuccès, action des acides et des bases sur les colorants).

Le *bleu de méthylène*, aluné ou non, est un colorant agréable à manipuler; il faut éviter les solutions trop concentrées indiquées par certains traités. La solution à 1 %₀₀ est bien suffisante pour la technique histologique. Il donne de beaux contrastes avec les rouges, et même avec l'*hémalun*, car, dans la plupart des cas, la coloration qu'il donne est plus verte que bleue². Il permet aussi d'obtenir, dans certains cas, des nuances dans les tissus ligneux, dues probablement à une lignification plus ou moins complète, ou à des variétés différentes de lignine (voir chap. VII). Dans les tiges de *Salvia*, et dans celles de *Zea Mays* par exemple, il colore les fibres en vert tirant au bleu, tandis que les faisceaux ligneux sont franchement verts. Dans la racine de *Smilax*, la cutine et le liège sont vert-olive, le bois est vert, et l'endoderme présente une coloration très voisine de celle du liège (voir chap. VII).

La *cyanine* représente pour nous le colorant aux surprises désagréables. En flacon ordinaire, elle commence à précipiter quelques heures après sa préparation. Conservée en flacon brun, elle reste stable un à deux mois au maximum. D'autre part la durée du bain colorant varie dans chaque cas. — En coloration combinée avec le *rouge Congo* ou le *carmin aluné*, le montage à la glycérine gélatinée donne d'abord un résultat satisfaisant, mais après trois semaines, le bois s'est complètement décoloré, et le bleu a diffusé dans le milieu. Après six semaines, il n'y a plus de bleu du tout. Les essais de montage au baume n'ont pas été plus heureux: des tiges de *Cucurbita*, à gros vaisseaux fortement lignifiés, étaient presque complètement décolorées, malgré une déshydratation la plus rapide possible. Nous avons multiplié les essais sur le même matériel,

¹ Sol. 1 %₀ aq. ou ds alc. 30°.

² En coloration combinée, le *bleu de méthylène* peut prendre des teintes très variables suivant le deuxième colorant qui l'accompagne.

et quelques résultats paraissaient assez bons: le bois était nettement violet, mais au bout de deux mois, la décoloration se manifestait, laissant les tissus lignifiés à peine jaunâtres. (Essais: sol. 1 % et 5 % dans alc. 50°.)

Les colorants verts sont, pour la plupart, excellents, et ne surcolorent pas les coupes. Ils tiennent longtemps, et donnent de très beaux contrastes en coloration combinée.

Le *vert d'iode*, s'il tend à diffuser dans la glycérine gélatinée, reste très stable dans le baume du Canada. Il différencie le bois, qui devient vert bleu, de la cutine et de la subérine, qui prennent une teinte vert jaune: cette différence est très visible dans les lenticelles de *Sambucus nigra*, et dans les tiges de certaines *Clematis*, ayant un liège interne et une moelle lignifiée. (Sol.: 1 gr. colorant dans 20 cc. alcool à 60° et 1000 cc. eau dist.)

Le *vert de méthyle* donne, par montage à la glycérine gélatinée, ce que le vert d'iode donne au baume. Cependant le contraste entre les vaisseaux et les fibres est beaucoup moins net. Dans le baume du Canada, le *vert de méthyle* ne se conserve pas. (Voir note chap. IX, montage à la glycérine gélatinée.) (Sol. 1 gr. dans 100 cc. eau dist. et 2 cc. acide acétique glacial.)

Le *vert Lumière* présente une particularité intéressante; comme colorant acide, il devrait colorer de préférence la cellulose. C'est ce qui se passe si, après la coloration, on fait agir directement de l'alcool sur la coupe; cependant cette coloration reste pâle, et ne présente que peu d'intérêt. Au contraire, si on différencie à l'eau après la coloration, on voit la cellulose se décolorer, et la lignine seule rester d'un beau vert, tandis que suber et cutine sont à peine teintés. (Sol. sat. dans alc. 95°.)

Le *vert malachite* donne une bonne coloration très stable; le liège est vert, et le bois vert bleu. (Sol. 1 % aq. ou dans alc. à 30°.)

Les *verts d'iode*, *Lumière*, et *malachite* permettent les meilleures colorations triples. Les contrastes obtenus sont surtout intéressants avec l'*hémalun* et le *Soudan III*, dans des coupes de *Vitis vinifera*, présentant une large bande de liège interne, ou dans des tiges d'*Hedera Helix*. — Ces verts sont très sensibles à la lignine, et décèlent les premières traces de lignification des très jeunes vaisseaux. (Jeunes tiges de *Ranunculus* et de *Tradescantia*, par exemple.)

Le *violet cristal*, ou *cristallisé*, donne, malgré son nom, une coloration d'un beau bleu après déshydratation, un bleu se rapprochant de celui de la *cyanine*, mais bien plus durable. (Sol. 1 % ds alc. 70°.)

Les autres violets: *violet Dahlia*, de *gentiane* et de *méthyle* sont très voisins du point de vue chimique, et peuvent se remplacer l'un l'autre. Il faut veiller à ce que leurs solutions soient convenablement diluées, sinon la surcoloration est telle que toute régression devient impossible. La coloration du bois obtenue par ces réactifs est nettement violette, tandis que le liège et la cutine prennent une teinte violet rose, quelquefois même brunâtre (endoderme de *Smilax*). (Sol. 1 % aq. ou 1 %₀₀ dans alc. 70°.)

Certains auteurs préconisent les solutions ammoniacales de colorants comme la *fuchsine* et le *violet de gentiane*, avec différenciation à l'alcool chlorhydrique. Ici encore une action secondaire tardive de l'acide est à craindre (voir insuccès)¹.

Cependant la *fuchsine ammoniacale* a un grand intérêt quand on l'emploie seule: elle dessine admirablement les vaisseaux du bois dans une coupe, *Cucurbita* par exemple, sans agir sur les tissus voisins qui paraissent même moins visibles, sauf le suber et la culine qui sont comme le bois colorés en rose brun. — Fait curieux à noter, sur des tiges de Monocotylédones, comme *Zea Mays* ou *Scirpus*, ce même résultat n'a pu être obtenu, la *fuchsine* colorant dans ce cas toutes les membranes, qu'elles soient cellulosiques ou lignifiées.

A noter enfin que les *violet*s *Dahlia*, *de gentiane*, *de méthyle*, comme la *fuchsine* en solution ordinaire, colorent toujours toutes les membranes, ce qui nécessite une assez longue différenciation à l'alcool pour les colorations combinées.

c) *Colorants spéciaux de la cutine et de la subérine.*

La cutine et la subérine sont colorées par les colorants basiques en coloration double. Ces substances se colorent donc par les mêmes colorants que la lignine, mais prendront souvent une teinte légèrement différente. La lignine, par exemple, se colore par le *vert d'iode* en vert bleuâtre, tandis que la subérine prend une coloration vert olive. La *safranine* colore la lignine en rouge, tandis que la subérine est orangée.

Le *bleu de méthylène* colore le bois en bleu vert et la subérine en vert jaune. — La cutine se colore souvent de façon identique à la subérine, c'est pour cela que nous les avons réunies sous une même rubrique dans nos tableaux. Il arrive cependant, dans certains cas, que la cutine se colore à peine, ou reste simplement jaunâtre; ces différences de coloration dépendent probablement de la teneur variable de la cutine en matières grasses, car les colorants des lipoides colorent toujours la cutine de façon identique, et semblable à la subérine.

De ce fait, les colorants spéciaux de la cutine et de la subérine seront les colorants des matières grasses. Celui qui a donné les résultats les plus nets est le *Soudan III*, de préférence à la teinture *d'Alkanna* ou à l'*écarlate R*. (Voir colorations combinées triples, tableau 2.)

La coloration des coupes histologiques présente-t-elle des différences notables suivant l'état frais ou sec du matériel employé ?

Nous pouvons répondre non à cette question pour autant

¹ On peut aussi différencier à l'eau ordinaire, à action plus lente, mais, par cette méthode, la coloration est plus durable.

qu'il s'agit de tissus morts, comme les tissus lignifiés et subérifiés.

Quant aux *tissus cellulosiques*, il est intéressant de constater que les *colorants prennent mieux sur les coupes de tissus secs* et ramollis, que sur des tissus frais et fixés. — Certains colorants considérés comme trop pâles pour donner des détails nets (*benzoazurine, orangé G, vert Lumière* avec différenciation à l'alcool) donnent, sur le matériel sec ramolli, des résultats très beaux. Le *carmin, l'hémalun* et le *rouge Congo*, eux aussi, paraissent renforcés. Tout se passe comme si le pouvoir de diffusion du colorant augmentait dans les membranes desséchées.

Insuccès :

Quelques-uns ont été relevés en cours d'exposé. Ils peuvent provenir de causes variées. Nous signalerons ici ceux auxquels on est le plus facilement exposé.

Dans les colorations simples progressives :

La *préparation des colorants* peut être *défectueuse*. Cela se produit facilement dans les colorants associés au mordant. Nous avons ainsi rencontré des difficultés avec l'*hémalun* et le *carmin aluné*, qui, si l'alun n'est pas suffisamment trituré avec le colorant, laissent après un temps plus ou moins long, déposer au fond du flacon des cristaux du mordant. Celui-ci n'agissant plus, la solution colorante ne « prend » plus sur les tissus.

D'autres *colorants*, comme la *cyanine* (voir aussi sous b) sont *peu stables* en solution, surtout si celle-ci est exposée à la lumière. Lors de la coloration, des particules de précipité se fixent dans les cellules et sur les membranes, et il est très difficile de les éliminer par des lavages. Il faut donc préparer une très petite quantité de ces colorants, les conserver en flacons bruns, et les filtrer avant l'emploi.

Les *solutions colorantes* citées par les manuels sont souvent *trop concentrées*, les colorants basiques : *bleu de méthylène, violets Dahlia, de gentiane, de méthyle* tout spécialement. On évitera une surcoloration de la coupe en diluant jusqu'à 10 ou même 20 fois le colorant usuel avec de l'eau distillée. Cette méthode permet aussi de définir les colorants qui ont le plus d'affinité pour un tissu donné : pour cela on met les coupes dans des solutions du même colorant en dilutions croissantes, et on les y laisse le temps voulu jusqu'à coloration. On pourrait ainsi établir les courbes de sensibilité des colorants. (Voir tableau 1, dernière colonne.)

Les *solutions colorantes* dans la préparation desquelles entre un *acide* (*vert de méthyle acétique*) ou une *base* (solutions ammoniacales de *rouge Congo, de benzoazurine*) colorent bien les tissus au premier abord ; mais présentent, après un temps plus ou moins long,

une décoloration partielle ou même totale, c'est pourquoi nous leur avons préféré, dans la plupart des cas, des solutions aqueuses saturées ou des solutions alcooliques, d'action plus lente, mais plus durable. Après un grand nombre d'essais, il semble que nous pouvons attribuer ces phénomènes de décoloration à des traces d'acide ou d'alcali, provenant du colorant ou du différenciateur, qui n'ont pu être éliminées par le lavage.

Les *colorants à mordant*, comme l'*hématoxyline ferrique de Heidenhain* à concentration usuelle et *ceux par précipitation*, comme le *bleu de Prusse* et le *chromate de plomb*, ont donné des contours cellulaires empâtés, peu satisfaisants pour une étude histologique. Un rapide lavage entre le mordant et le colorant, ou entre les deux réactifs, diminue cet inconvénient; pourtant, dans la plupart des cas, nous avons préféré les solutions contenant déjà le mordant, et les autres méthodes à celles par précipitation.

L'*éosine*¹, souvent préconisée par les traités, et si précieuse en histologie animale, nous a toujours donné des colorations faibles, et facilement diffuses. De même l'*érythrosine*, l'*acide picrique*, le *ponceau R*, l'*indigo* et la *nigrosine* ne nous ont jamais donné des résultats utilisables pour une bonne étude histologique. Cela tient probablement au fait que ceux qui les ont préconisés avaient eu recours à d'autres méthodes de fixation que les nôtres.

Le *milieu* peut aussi, immédiatement ou avec le temps, conduire à des insuccès, même si les coupes sont parfaitement colorées.

Dans la *glycérine gélatinée*, la moindre surcoloration de la coupe occasionne une diffusion du colorant, qui peut se produire immédiatement lors du montage, ou apparaître avec le temps. Certains colorants, comme le *violet cristal*, présentent cette diffusion même sans qu'il y ait surcoloration de la coupe. Presque toutes les préparations à la glycérine gélatinée d'ailleurs, se décolorent après un temps plus ou moins long. (Le *vert d'iode* ne résiste que très peu de temps, le *vert de méthyle* et le *bleu de méthylène* un peu plus.)

Dans le *baume du Canada*, la plupart des colorants donnent de très beaux résultats; il faut cependant noter que le *vert de méthyle*, même s'il a résisté à la déshydratation, se décolore rapidement. Une déshydratation insuffisante, avec précipité dans le xylol; ou, au contraire, une déshydratation trop prolongée, avec décoloration partielle ou totale de la coupe, ne sont pas des échecs, mais de simples fautes de technique.

Dans les colorations simples régressives :

En plus des cas étudiés dans le paragraphe précédent, nous pouvons avoir ici des échecs dus à l'*action du différenciateur*. Le cas s'est présenté pour nous lors de la différenciation à l'alcool chlorhydrique de coupes colorées à la *safranine*, au *rouge neutre* ou au *violet Dahlia*. Le même phénomène a pu être observé en différenciant à l'acide acétique des coupes colorées par des solutions

¹ Sol. 1 % aq. ou ds alc. 70°.

ammoniacales de *fuchsine* et de *violet de gentiane* : malgré un lavage soigné, et la déshydratation par les alcools, des traces d'acide avaient probablement subsisté dans les tissus qui, après un temps variable, se décoloraient ¹.

Dans les colorations combinées successives :

Il est exagéré de parler d'échecs. Les mauvais résultats obtenus sont dus, pour la plupart, à des *contrastes insuffisants* entre les colorations des différents tissus. Cela peut être attribué à une différence vraiment faible entre les colorants employés, qui se trouvent trop rapprochés dans le spectre et donnent une série d'intermédiaires si voisins que l'oeil a peine à les distinguer. Si l'on intervertit l'ordre de succession des bains colorants, certains contrastes sont atténués de fâcheuse manière : c'est le cas par exemple lorsqu'on emploie les colorants verts avant le *carmin* ; ce dernier rend les bois violacés, alors que la succession inverse (*carmin/verts*) donne des contrastes parfaits.

Tous les résultats acceptables sont notés dans le tableau II, qui signale les cas où le contraste est peu net.

Les colorations combinées *deltapurpurine/bleu de méthylène* et *vésuvine/encre de fer*, donnent des préparations noirâtres inutilisables.

Rappelons que les colorants à mordant seront, autant que possible, évités pour la coloration combinée.

Dans les colorations combinées simultanées :

Comme nous l'avons dit déjà, les *mélanges de colorants donnent des résultats moins bons que les colorations successives*, et sont à éviter dans la mesure du possible.

Le *colorant genevois* (*rouge Congo/chrysoïdine*), s'il ne donne pas des contrastes très nets, est le seul mélange de colorants que nous connaissions qui se maintienne stable pendant très longtemps.

¹ Nous avons toujours, dans la mesure du possible, employé des solutions colorantes neutres, soit aqueuses, soit alcooliques. Nous n'ignorons pas que bien des traités préconisent des solutions acides ou basiques : ces solutions peuvent aviver la coloration, ou faciliter la solubilisation du colorant, ce qui est nécessaire dans certains cas. Nous avons évité l'emploi des solutions acides ou alcalines dans tous les cas où la solution neutre pouvait les remplacer. car d'après nos expériences, il nous semble que toute trace d'acide ou d'alcali persistant dans une préparation, diminue la durée de conservation de celle-ci.

<i>Hémalun de Mayer</i>		(ds col.)	violet	violet	violet rose	eau cte	baume ou glyc.	F.
<i>Hématoxyline d'Ehrlich</i>	5	id.	bleu violet	bleu violet	bleu violet	» » lgts	» » »	F.
<i>Hématoxyline ferrique</i>	2+5	alun de Cr	violet pâle	violet	violet	» » »	» » »	F.
»	2+5	CuSO ₄	violet rose	violet brun	violet	» » »	» » »	F.
»	2+5	alun ferrique	violet noir	violet noir	noirâtre	» » »	» » »	B.
»	2+5	chlorure Sn ⁴	rose pâle	rose pâle	rose violet	» » »	» » »	N.
<i>Indigotine</i>	10	—	bleu pâle	bleu vert	bleu vert	eau dist.	» » »	N.
<i>Nigrosine</i>	10	—	bleu noir	noir brun	noir brun	» » »	» » »	N.
<i>Orangé d'aniline et orangé G</i>	10	—	jaune orangé	jaune pâle	jaune pâle	» » »	» » »	F.
<i>Ponceau 2 R</i>	10	—	rose diffus	diffus	diffus	» » »	» » »	N.
<i>Rouge Congo</i>	5	—	rouge	jaunâtre	orangé	alcool	» ou glyc.	B.
<i>Rouge neutre</i>	5	—	rose	rouge	rouge brun	alcool+HCl	» » »	B.
<i>Safranine</i>	3	—	rose teinté	rose vif	rose orangé	» » »	» » »	B.
<i>Soudan III</i>	10	—	—	teinté	rouge orangé	alcool	» ou glyc.	N.
<i>Vert d'iode</i>	3	—	—	vert	vert jaune	» » »	» » »	B.
<i>Vert Lumière</i>	10	—	—	vert	—	eau dist.	» » »	F.
»	10	—	vert vif	—	—	alcool	» » »	N.
<i>Vert malachite *</i>	3	—	—	vert bleu	vert	» » »	» » »	B.
<i>Vert de méthyle</i>	3	—	—	vert	vert pâle	eau dist.	glycérine	B.
<i>Violet cristal</i>	3	—	—	bleu violet	teinté	alcool	baume	F.
<i>Violet de gentiane (ammon.)</i>	3	HCl 5 %	—	teinté	violacé	alcool	» » »	F.
<i>Id. aniliné ou phéniqué</i>	3	—	violet	violet	violet	alcool	» » »	B.
<i>Violet de méthyle</i>	3	—	violet	bleu violet	violet	» » »	» ou glyc.	B.

¹ Le colorant est utilisé en sol. très diluée (6 gtttes sol. col. ord. pr 20 cc eau dist.).
On apprécie la coloration obtenue après 24 heures (sensibilité B = bonne, F = faible, N = nulle).

TABLEAU II Colorant A	T	Colorant B	T	Contrastes (et remarques)	M. pecto- cellulos.	Membranes lignifiées	M. cutin. et subérifiées	Milieu de conservat.
<i>Benzoazurine</i>	10	<i>Chrysoïdine</i> <i>Rouge neutre</i> <i>Safranine</i> <i>Vert Lumière aq.</i> <i>Vert malachite *</i>	3 3 3 3 3	suffisant (col. un peu pâle) peu marqué très marqué suffisant suffisant	bleu pâle » » » »	orangé rouge violacé rose vif vert vif vert vif	orangé jaunâtre rose violet verdâtre vert jaune	baume » » » »
<i>Bleu coton</i>	5-10	<i>Chrysoïdine</i> <i>Rouge neutre</i> <i>Safranine</i>	3 5 3	suffisant (col. un peu pâle) peu marqué très marqué	» » »	orangé rouge violet rose vif	orangé rouge jaune violet rose	» » »
<i>Bleu de Prusse</i>	3+3	<i>Chrysoïdine</i> <i>Safranine</i>	3 3	suffisant (coupes empâtées) peu marqué (id.)	bleu bleu violet	orangé violet	orangé violet	» »
<i>Brun Bismarck *</i>	10	<i>Bleu de méthylène</i> <i>Fuchsine ammon.</i> <i>Safranine</i> <i>Vert d'iode</i> <i>Vert malachite *</i> <i>Vert de méthyle</i> <i>Violet cristal</i> <i>Violet Dahlia,</i> <i>de gentiane,</i> <i>de méthyle.</i>	1-3 3+3 3 3 3 3 3 3	très marqué suffisant peu marqué très marqué suffisant très marqué très marqué	jaune orangé » » » » » » »	jaune rouge vert verdâtre	rosé verdâtre jaunâtre vert jaune violacé	» » » glyc. baume »
<i>Carmin aluné</i>	5	<i>Cyanine **</i>	1-3 5	suffisant — très marqué suffisant, peu durable	rose rouge rose rouge	violet violet	violet rose violet rose	» » » ou glyc. » »

<i>Carmin aluné</i>	5	<i>Nigrosine</i>	10	peu marqué	rose	violet	violacé	baume
»		<i>Vert d'iode</i>	3	très marqué	rose rouge	vert bleu	vert olive	»
»		<i>Vert Lumière aq.</i>	10	suffisant	rose violet	vert	rose violacé	»
»		<i>Vert de méthyle</i>	3	très marqué	rose rouge	vert	vert	glyc.
»		<i>Violet cristal</i>	3	suffisant — très marqué	rose rouge	bleu violet	teinté violet	baume
»		<i>Violet Dahlia, etc.</i>	3	peu marqué	rose violet	violet	violacé	»
<i>Chromate de plomb</i>	3+3	<i>Vert Lumière aq.</i>	10	suffisant (coupes empâtées)	jaune	vert	vert jaunâtre	»
<i>Deltapurpurine</i>	10	<i>Bleu de méthylène</i>	1	nul (le bleu précipité)	rouge	noirâtre	noirâtre	»
»		<i>Vert malachite *</i>	3	suffisant	rouge	vert	verdâtre	»
<i>Encre</i>	10	<i>Chrysoïdine</i>	3	très marqué	bleu	verdâtre	orangé	»
»		<i>Rouge neutre</i>	5	peu marqué	bleu	rouge violet	violacé	»
»		<i>Safranine</i>	3	suffisant	bleu	brunâtre	rouge	»
<i>Hémalun</i>	5	<i>Chrysoïdine</i>	3	très marqué	violet	orangé brun	jaune orangé	»
»		<i>Rouge neutre</i>	5	peu marqué	violet	violacé	rouge violet	»
»		<i>Safranine</i>	3	peu marqué	violet	rose violet	violet	»
»		<i>Vert d'iode</i>	3	suffisant	violet	vert bleu	violacé	»
»		<i>Vert Lumière aq. ou malachite *</i>	3	suffisant — très marqué	violet	vert-gris	violacé	»
<i>Hématox. ferrique et Orangé G</i>	3+3	<i>Vert de méthyle</i>	3	suffisant	violet noir	vert	vert violacé	glyc.
»		<i>Bleu de méthylène</i>	3	très marqué	orangé pâle	vert bleu	verdâtre	baume
»		<i>Safranine</i>	3	peu marqué	rose orangé	rose vif	rose jaune	»
»		<i>Vert d'iode, de méthyle</i>	3	très marqué	orangé pâle	vert	vert jaune	baume, glyc.
»		<i>Violet cristal</i>	3	très marqué	orangé pâle	violet bleu	violacé	baume

TABLEAU II (suite) Colorant A	T	Colorant B	T'	Contrastes (et remarques)	M. pecto- cellulos.	Membranes lignifiées	M. cutin. et subérifiées	Milieu de conservat.
Rouge Congo	5	Bleu de méthylène	3	très marqué	rouge	vert bleu	vert jaune	baume
»		Chrysoïdine	3	peu marqué --- suffisant	rouge	orangé	jaune orangé	» ou glyc.
»		Cyanine **	5	suffisant, pas durable	rouge	bleu	bleuâtre	»
»		Nigrosine	10	peu marqué	rouge	noir brun	noir brun	»
»		Vert d'iode	3	très marqué	rouge	vert	vert jaune	»
»		Vert Lumière aq.	10	très marqué	rouge	vert	vert	»
»		Vert malachite *	3	très marqué	rouge	vert bleu	vert	»
»		Vert de méthyle	3	très marqué	rouge	vert	vert	glyc.
»		Violet cristal	3	suffisant	rouge	bleu violet	violacé	baume
»		Violet Dahlia, etc.	3	peu marqué	rouge	violet	violet rouge	»

* = colorants peu stables, à filtrer avant l'emploi.

** = préparations peu durables.

Note: Les différenciateurs et les mordants sont à voir dans le tableau I.

Les temps, qui pouvaient varier dans les colorations simples, doivent être respectés dans les colorations combinées.

Les contrastes « très marqués » sont excellents,

« suffisants » sont bons pour l'observation histologique,

« peu marqués » sont médiocres.

Les résultats « insuffisants ou nuls » sont à voir au paragraphe : insuccès.

TABLEAU II (col. triples) Colorant A		T	Colorant B	T	Colorant C	T	Contrastes (et remarques)	M. pecto- cellulos.	Membranes lignifiées	M. cutin. et subérifiées	Milieu de conservat.
<i>Benzoazurine aq.</i>	10	<i>Vert Lumière aq.</i>	10	<i>Soudan III</i>	10	suffisant	bleu	vert	orangé	baume	
»	10	<i>Vert malachite *</i>	5	»	10	très marqué	violet	vert	orangé	»	
<i>Carmin</i>	5	<i>Vert Lumière</i>	10	»	10	très marqué	rose rouge	vert	orangé	»	
»	5	<i>Vert malachite *</i>	5	»	10	très marqué	»	»	»	»	
»	5	<i>Vert Lumière</i>	10	<i>Violet gent.</i>	5	suffisant, peu durable	»	»	brun violacé	»	
»	5	»	5	<i>ammon.</i>	5	suffisant, peu durable	»	vert bleu	»	»	
<i>Chromate de Pb</i>	3+3	<i>Vert d'iode</i>	5	<i>Alkanna</i>	10	suffisant, empâté (méth. de Petit)	jaune	vert	rouge brun	»	
»	3+3	»	5	»	10	suffisant, empâté	»	»	jaunâtre	»	
»	3+3	<i>Vert malachite *</i>	5	<i>Soudan III</i>	10	suffisant, empâté	»	»	»	»	
<i>Encre (bleue noire)</i>	5	<i>Vert d'iode</i>	10	»	10	très marqué	bleu violet	vert	orangé	»	
»	5	<i>Vert Lumière</i>	5	»	10	très marqué	»	»	»	»	
»	5	<i>Vert malachite *</i>	5	»	10	très marqué	»	»	»	»	
<i>Hématun</i>	3	<i>Vert d'iode</i>	5	<i>Alkanna</i>	10	suffisant	violet rose	vert	brunâtre	»	
»	3	»	5	<i>Soudan III</i>	10	très marqué	»	»	orangé	»	
»	3	<i>Vert Lumière</i>	10	»	10	très marqué	»	»	»	»	
»	3	<i>Vert malachite *</i>	5	»	10	très marqué	»	»	»	»	
<i>Rouge Congo aq.</i>	5	<i>Vert Lumière</i>	10	<i>Violet gent.</i>	5	suffisant, peu durable	rouge	vert bleu	brun violet	»	
»	5	»	5	<i>ammon.</i>	5	suffisant, peu durable	»	vert violacé	brun violet	»	
»	5	<i>Vert malachite *</i>	5	»	5	suffisant, peu durable	»	bleu violet	brunâtre	»	

TABLEAU III : Colorations simultanées Colorant A		T	Colorant B	T	Colorant C	T	Contrastes (et remarques)	M. pecto- cellulos.	Membranes lignifiées	M. culin. et subérfiées	Milieu de conservat.
<i>Benzoazurine</i>	et	10	<i>Vert Lumière</i>	10	—	10	peu marqué	bleu	vert	verdâtre	baume
»	10	et	<i>Vert Lumière</i>	et	<i>Soudan III</i>	10	suffisant	»	»	orangé	»
<i>Carmin</i>	et	10	<i>Vert d'iode</i>	10	—	10	suffisant	rose rouge	violacé	vert	»
»	et	10	<i>Vert Lumière</i>	10	—	10	suffisant	»	vert pâle	verdâtre	»
»	et	10	<i>Vert malachite</i>	10	—	10	suffisant	»	vert violacé	»	»
»	et	10	<i>Vert Lumière</i>	10	<i>Soudan III</i>	10	suffisant	rose	vert	orangé	»
»	et	10	»	10	<i>Violet g. am.</i>	5	peu marqué, peu durable	»	»	brunâtre	»
<i>Chromate de Pb :</i> (Acétate et vert Lumière, puis bichromate 10+2)											
<i>Chromate de Pb</i>	et		<i>Vert Lumière</i>		—	10	peu marqué, empâté	jaune	vert épais	jaune vert	»
<i>Encre</i>	et	10	<i>Chrysoïdine</i>	10	<i>Soudan III</i>	10	peu marqué	»	»	jaunâtre	»
»	et	10	<i>Fuchsine crist.</i>	10	—	10	suffisant	bleu	verdâtre	orangé	»
»	et	10	<i>Safranine</i>	10	—	10	peu marqué	bleu violet	violacé	violacé	»
»	et	10	<i>Vert d'iode,</i>	10	—	10	suffisant, inconstant	bleu	rouge	brunâtre	»
»	et	10	<i>Lumière, malachite</i>	10	—	10	suffisant	»	vert	verdâtre	»
»	et	10	<i>Vert de méthyle</i>	10	—	10	suffisant	»	»	»	glyc.
»	et	et	<i>Vert Lumière</i>	et	<i>Soudan III</i>	10	suffisant	bleu violet	vert	orangé	baume
<i>Fuchsine crist.</i>	et	10	<i>Bleu de méthylène</i>	10	—	10	suffisant, inconstant	rose	bleu	vert	»
<i>Fuchsine phén.</i>	et	10	»	10	—	10	peu marqué	»	bleu violet	violacé	»
<i>Fuchsine crist.</i>	et	10	<i>Verts d'iode ou</i>	10	—	10	suffisant, inconstant	»	bleu vert	vert	»
			<i>de méthyle.</i>								ou glyc.
<i>Fuchsine S anilin.</i>	et	10	<i>Bleu de méthylène</i>	10	—	10	peu marqué	»	bleu violet	violacé	»

<i>Fuchsine S</i>	et	10	—	peu marqué	rose	vert violet	violacé	glyc.
<i>Hémalun</i>	et	10	—	suffisant	violet	brun rouge	orangé	baume
»	et	10	—	suffisant	violet rose	vert	verdâtre	»
»	et	10	<i>Soudan III</i>	suffisant	»	»	orangé	»
<i>Picrobleu d'aniline</i>	et	5	—	suffisant	bleuté	bleu vert	violacé	»
<i>Picrocarmin de Ranvier</i>		5	—	suffisant	rosé	bleu vif	orangé	»
<i>Picronigrosine</i>		10	—	peu marqué	teinté	jaunâtre	jaune pâle	»
<i>Rouge Congo</i>	et	10	—	suffisant	rouge	gris	orangé	»
»		10	—	suffisant	»	orangé	orangé	» ou glyc.
»	et	10	—	suffisant	»	vert	rougeâtre	»
»	et	10	<i>Violet g. am.</i>	suffisant, peu durable	»	»	violet brun	»
»	et	10	—	suffisant	»	bleu vert	vert	»
<i>Safranine</i>	et	10	—	peu marqué, inconstant	rose violet	bleu violet	violacé	»
—		et	<i>Soudan III</i>	suffisant ¹	—	vert	orangé	»

¹ Buxton préconise l'emploi de ce colorant double simultané *vert Lumière* et *Soudan III* avec n'importe quel colorant cellulosique usuel.

Note : On peut voir par les tableaux que les colorations simultanées donnent des colorations très semblables aux résultats obtenus par les colorations successives.

Il faut cependant noter que, dans tous les cas, les colorations perdent de leur netteté, lors de l'emploi simultané des colorants.

Liste des colorants :

1. *Colorants simples* (colorations successives, tableaux I et II).
Alkanna (teinture d') ou *Orcanette* (LANGERON, p. 1148), à mordant, constitution inconnue.
Benzoazurine G, col. acide, diazoïque (solution ammoniacale id. *R. Congo*, ou sol. aq. saturée).
*Bleu d'aniline à l'alcool*¹- *Bleu gentiane 6 B* (LANGERON, p. 556), col. basique, d. du triphénylméthane.
Bleu coton - B. à l'eau 6 B - B. soluble - B. de Lyon - B. de méthyle, (LANGERON, p. 1127, 605), col. acide, d. du triphénylméthane.
Bleu de méthylène (LANGERON, p. 490, 1148), col. basique, d. de la thiazine.
Bleu de molybdène (LANGERON, p. 1149 avec SnCl₂), col. minéral.
Bleu naphtylène - B. de Meldola (KRALL, p. 158), col. basique, d. de l'oxazine.
Bleu de Prusse, col. minéral, par précipitation.
Brun Bismarck - Vésuvine (KRALL, p. 124), col. basique, diazoïque.
Carmin - acide carminique (LANGERON, p. 469, selon Grenacher), col. à mordant, d. des oxycétones.
Chromate de plomb (LANGERON, p. 1148, selon Petit), col. minéral, p. précipitation.
Chrysoïdine, col. basique, monoazoïque.
Coralline (LANGERON, p. 1155, KRALL, p. 143) col. acide, d. du triphénylméthane.
Cyanine - Bleu de quinoléine (KRALL, p. 166), col. basique, d. de la quinoléine.
Deltapurpurine - Rouge diamine 3 B, col. acide, diazoïque (solution ammon. id. *R. Congo*, ou sol. aq. saturée).
Encres (LANGERON, p. 1150, selon Bugnon), produit commercial.
Eosine (à l'eau, LANGERON, p. 511) (à l'alcool, KRALL, p. 149), col. acide, d. de la phtaléine.
Erythrosine (LANGERON, p. 560), col. acide dérivé de la phtaléine.
Fuchsine - Solférino - Magenta, col. basique, d. du triphénylméthane : (Fuchsine ammoniacale, LANGERON, p. 1157. — Fuchsine crist : sol. 1 % ds alcool 70°. — Fuchsine phéniquée selon Ziehl, LANGERON, p. 505, 501).
Fuchsine acide - Fuchsine S (LANGERON, p. 548, 1020), col. acide, d. du triphénylméthane.
Hématoxyline, col. à mordant (LANGERON, p. 473, hémalun selon Mayer. — ROMÉIS, p. 192, hématoxyline acide selon Ehrlich. — LANGERON, p. 477, hématoxyline ferrique selon Heidenhain).
Indigo disulfonique ou *indigotine*, col. acide, type du groupe.
Nigrosine - Induline (LANGERON, p. 1106), col. acide, mélange de colorants d'azine sulfonés.
Orangé d'aniline - Aurantia, col. nitré acide.
Orangé G (LANGERON, p. 507), col. acide, monoazoïque.
Ponceau 2 R - Ecarlate de Biebrich, col. acide, diazoïque (sol. aq. 2-4 %).
- Rouge Congo*, col. acide, du groupe de la benzidine.
Rouge neutre (LANGERON, p. 300), col. basique, d. de l'azine.

¹ Le signe - indique des synonymes.

Safranine (LANGERON, p. 300, ou sol. alcool. 1 %), col. basique, mélange de dérivés de l'azine.

Soudan III (LANGERON, p. 996), col. des lipoides, diazoïque.

Vert d'iode (ou à l'iode), col. basique, d. du triphénylméthane.

Vert Lumière S. F. - Vert acide (LANGERON, p. 544), col. acide, d. du triphénylméthane.

Vert malachite - Vert solide, col. basique, d. du triphénylméthane.

Vert de méthyle - Vert de Paris, col. basique, d. du triphénylméthane.

Violet cristal - Violet cristallisé - Violet 6 B, col. basique, d. du triphénylméthane.

Violet Dahlia, col. basique, d. du triphénylméthane, avec groupes éthyle.

Violet de gentiane, col. basique, mélange de violet cristal et de violet de méthyle (violet de gentiane ammoniacal, LANGERON, p. 1157. — Violet de g. aniliné selon Ehrlich, LANGERON, p. 501. — Violet de g. phéniqué, LANGERON, p. 501).

Violet de méthyle - Violet de Paris, col. basique, d. du triphénylméthane, semblable au violet Dahlia, mais avec des groupes méthyle.

2. *Colorants combinés* (colorations simultanées, tableau III, classés par auteurs).

P. BUGNON, Sur l'emploi du *vert Lumière* en histologie végétale.

Id., Sur l'emploi des *encres commerciales* en histologie végétale (cf. *loc. cit.* chap. VI).

Cytologia 10, 1939, p. 257-81 : *Vert Lumière/Safranine*

Ibid., *Violet de gentiane/Orangé G.*

A. DAUFRESNE (cf. *loc. cit.* chap. VI) : *Carmino-vert, Picrocarmin de Ranvier.*

Id., *Violet à double coloration* : NB. c'est au sujet de ce colorant mal précisé que nous avons essayé de combiner des solutions de fuchsine cristallisée, phéniquée, acide anilinée, avec des solutions de bleu de méthylène ou de vert de méthyle. Les résultats sont très inconstants, et même si certains sont bons, nous avons préféré les bains successifs de colorants.

M. LANGERON (cf. *loc. cit.*) : *Picrocarmin de Ranvier.*

MCE LENOIR, Préparation du double colorant simultané *carmin aluné/bleu de méthylène* (*Bull. Mens. Soc. Sc. Nancy*, 1936, p. 68).

A. MEYER (cf. *loc. cit.*, chap. VI) : *Bleu de méthylène/Safranine.*

E. SÉGUY (cf. *loc. cit.*) : *Carmin et Vert malachite.*

E. STRASBURGER (cf. *loc. cit.*) : *Picronigrosine, Picrobleu d'aniline, Fuchsine/Vert d'iode.*

J. TEMPÈRE (cf. *loc. cit.*, chap. VI) : *Picronigrosine, Picrobleu d'aniline.*

Autres essais :

Hémalun/Chrysoïdine (30 cc hémalun pour 10 cc chrysoïdine).

Hémalun/Vert malachite (id. pour 10 cc vert malachite).

Réactif genevois (Rouge Congo/Chrysoïdine) (rouge Congo : 3 gr. ds 90 cc ammoniacque à 10 %, chrysoïdine : 3 gr. ds 100 cc d'alcool à 95° ; prendre 10 cc R. C. pr 1 cc chryso., mélanger les deux solutions et filtrer).

Rouge Congo/Vert malachite 20 cc sol. ammoniacale de rouge Congo sont mélangés avec 20 cc de sol. aq. 1 % de vert malachite).

CHAPITRE IX : Milieux conservateurs.

Pour l'observation immédiate d'une coupe, il n'est pas nécessaire de faire un montage. Il suffit de la placer sur une lame, dans une goutte d'eau ou de glycérine, et de recouvrir d'une lamelle.

Si l'on veut conserver les préparations, il faut, par contre, enrober la coupe dans un milieu conservateur, ou *médium*.

On utilise généralement en histologie végétale: *la glycérine gélatinée* (milieu aqueux solidifiable) et *le baume du Canada* (résine solidifiable).

1. Montage à la glycérine gélatinée:

Préparation du médium. (LANGERON, *loc. cit.*, p. 602.)

*Montage*¹.

La coupe est placée dans une goutte d'eau, sur une lame² qu'on maintient à 30-40° sur la plaque chauffante. On enlève avec du papier filtre l'excès d'eau entourant la coupe; on prend délicatement³ une goutte de médium avec un agitateur, et on la dépose soit sur la coupe, soit sur le couvre-objet tiédi, soit sur les deux à la fois. On place délicatement la lamelle sur la coupe, en maintenant la lame bien horizontale sur la plaque chauffante, pour que le médium s'étale jusqu'au bord du couvre-objet⁴.

Les résultats obtenus par ce montage sont souvent très bons au premier abord, mais les coupes se conservent moins bien qu'au baume du Canada. Les colorants, après un certain temps, pâlissent, ou passent dans le milieu, et peuvent même disparaître. — La coupe, n'ayant pas été traitée aux alcools successifs, est souvent surcolorée; on évitera cet inconvénient par un bain de quelques minutes à

¹ Ne jamais laisser les coupes hors d'une goutte de liquide.

² Le nettoyage des lames et des lamelles peut se faire par HNO₃ 1%. Si l'on veut démonter des préparations fraîches au baume, on laissera celles-ci dans un bain d'alcool jusqu'à ramollissement du baume, et on rincera au xylol. Les vieilles préparations au baume ne peuvent être démontées.

Les préparations à la glycérine gélatinée, non lutées, peuvent être récupérées par un bain d'eau tiède; les autres exigent un traitement variable suivant le lut employé.

³ On évitera les bulles d'air dans la préparation en remuant le moins possible la glycérine gélatinée pendant son ramollissement au B. M. Il ne faut pas amener le médium à ébullition, car la glycérine gélatinée se concentre alors et prend une teinte foncée; de plus, le médium trop chaud contracte les tissus délicats (feuilles et stomates, tissus lacuneux des plantes aquatiques).

⁴ Les couvre-objets ronds sont très favorables dans ce montage; ils facilitent le lutage, qui peut alors se faire à la «tournette».

l'alcool à 40° après la coloration, avant le montage, puis on lavera soigneusement à l'eau, sinon la gélatine précipitera.

La glycérine gélatinée étant un milieu dit « liquide », il faut *luter* les préparations. Le lutage doit être hermétique pour une bonne conservation de la coupe et, surtout, de sa coloration. Un simple bordage de la préparation à la paraffine est insuffisant. On a préconisé plusieurs *luts* et *verniss* (LANGERON, *loc. cit.*, p. 610). Les vernis qu'on trouve dans le commerce fournissent un lut prêt à l'emploi.

« L'ancien maskenlack, tout à fait périmé, sera remplacé avantageusement par les vernis ou peintures à séchage rapide (Duco et imitations) » (LANGERON, *loc. cit.*, p. 613).

Le lutage peut se faire à la main (couvre-objets carrés ou rectangulaires) ou à la « tournette » (couvre-objets ronds). Pour les préparations minces, une couche de lut suffit. Pour les préparations plus épaisses (ou si la première couche présente des lacunes) on applique une seconde, et même éventuellement une troisième couche.

Si la glycérine gélatinée n'est pas le médium idéal, elle est cependant utile pour le montage d'objets délicats, qui seraient contractés ou endommagés par la déshydratation (certains organes de plantes aquatiques par exemple). Elle sera particulièrement utile aussi pour des préparations où l'on veut éviter une trop grande réfringence : cribles libériens, stomates, etc.

Précisons que les colorants comme le *vert de méthyle*, qui se réduisent facilement, ne se conservent qu'à la glycérine gélatinée. « Certains colorants se décolorent toujours dans le baume, parce qu'ils sont avides d'oxygène, et ne peuvent supporter les milieux réducteurs. » (LANGERON, *loc. cit.*, p. 634.)

Le montage à la glycérine gélatinée conviendra également aux colorants qui sont modifiés par la déshydratation (le *violet cristal* tend à devenir bleu; le *bleu de méthylène* devient vert). En coloration combinée *rouge Congo* et *chrysoïdine* (*réactif genevois*), il y a, par la déshydratation, diminution du contraste entre les deux teintes.

2. Montage au baume du Canada :

Le baume du Canada se trouve dans le commerce (LANGERON, *loc. cit.*, p. 596). Il doit être de première qualité, exempt d'acide et d'impuretés, sinon les colorations pâlissent et disparaissent rapidement. Pour toutes nos préparations, nous avons utilisé le baume au xylol¹.

¹ On diluera avec du xylol le baume devenu trop épais.

Le baume est une résine très employée à cause de sa forte réfringence et de sa solidification rapide. On l'utilisera dans tous les cas possibles ¹.

Le montage exige des coupes parfaitement déshydratées. Toute trace d'eau produit, au contact du baume, un précipité de gouttelettes résineuses opaques; cet accident se manifeste immédiatement par l'aspect laiteux que prend la préparation. La *déshydratation* se fait par bains successifs de la coupe dans la série des alcools ². Ceux-ci ont l'avantage de débarrasser la coupe de tout excès de colorant. La déshydratation doit être complète, mais il ne faut pas la prolonger inutilement, car certains colorants très solubles dans l'alcool (colorants basiques surtout) risquent de disparaître complètement, *vert d'iode* et *violet cristal* par exemple.

Processus de déshydratation: Après le dernier lavage, les coupes laissées dans un godet-crible sont passées successivement dans les alcools à 40, 60, 80°. On les laisse une minute dans celui à 95° et une minute dans le premier alcool à 100°. A ce moment, il est prudent de sortir les coupes du godet (qui a pu entraîner des traces d'eau ou de matières colorantes) pour les mettre une minute aussi dans le deuxième alcool à 100°.

De ce dernier, on passera les coupes débarrassées de tout excès d'alcool (par un papier filtre par exemple) dans du xylol ou éventuellement du toluène. Un trouble dans le xylol trahit une déshydratation préalable insuffisante ³. Dans ce cas, on régressera systématiquement pour remonter plus lentement la série des alcools.

La coupe, sortie du xylol, est posée sur la lame, et immédiatement (pour éviter l'entrée d'air dans les cellules) couverte d'une goutte

¹ Actuellement, le baume du Canada est difficile à trouver dans le commerce. Certains produits peuvent éventuellement le remplacer: La *térébenthine de Venise*, signalée par LANGERON, permet le passage direct de l'alcool à 95° au montage; les détails et la transparence sont bons, mais les colorants ne s'y conservent pas.

Récemment, deux produits nouveaux ont été lancés, que nous n'avons fait qu'essayer: l'*Euparal* (GRÜBLER) permet le montage direct à partir de l'alcool à 100° (même de celui à 95° ?). Il offre une bonne réfringence, mais sèche assez lentement. Au premier abord, il paraît respecter les couleurs des préparations, cependant après quelque temps les colorants basiques disparaissent.

Le *Caedax* (HOLLBORN) exige, comme le baume, une parfaite déshydratation, et, après les alcools, un passage au xylol ou au toluol. Il donne une bonne réfringence, paraît conserver les colorants et sèche rapidement.

² Les alcools de déshydratation ne doivent jamais être acides, sinon ils agissent sur les colorants, faisant par exemple virer le *rouge Congo* au bleu, décolorant le *carmin*, etc. D'autre part, si les alcools sont colorés par de précédentes opérations, ils enlèvent la netteté et les nuances des coupes qu'on y plonge. Il faut donc les changer souvent.

³ Après usage, le xylol contient parfois des gouttelettes d'eau gênantes; une rapide filtration parvient souvent à les éliminer; au cas contraire, le xylol devra être changé.

de baume et d'une lamelle¹. La préparation est prête et n'exige aucun lutage. Si elle contient quelques bulles d'air, un léger chauffage les fera émigrer vers le bord de la lamelle, puis sortir de la préparation (mais prendre garde à l'ébullition du baume!!). Comme pour la glycérine gélatinée, recommandons de ne pas remuer le baume, pour éviter d'y introduire d'innombrables petites bulles d'air.

Si, en une préparation, on veut réunir plusieurs coupes, celles-ci risquent de glisser vers le bord de la lamelle, lors du montage, ce qui sera fâcheux aussi bien pour l'observation que pour la conservation de la préparation. On peut y remédier souvent sans démonter la préparation, en ramenant les coupes vers le centre, immédiatement après le montage, à l'aide d'un cheveu ou d'un poil de brosse.

3. — La préparation est *étiquetée*. Nos préparations portent deux étiquettes, à droite et à gauche de la lamelle, donnant l'une la date, le nom de la plante et de l'organe (racine, tige, etc.), le plan de coupe (radiale, transversale, etc.); l'autre le traitement, la coloration et le milieu conservateur.

4. — La *conservation* des préparations a une grande importance.

Après le montage à la glycérine gélatinée, les préparations sont lutées dans les semaines qui suivent. De même que celles montées au baume, elles seront, après leur montage, et pendant quelques semaines, conservées à plat dans des cartons appropriés. (Cf. LANGERON, *loc. cit.*, p. 600). Après ce temps-là, les préparations peuvent être placées verticalement dans des boîtes à cet usage, avec répertoire dans le couvercle. Une méthode de classement en fichier, avec étiquettes cartonnées, est préconisée par RACOWITZA (voir bibliographie).

Bibliographie :

K. JOHN, Protection des préparations au baume, *Zeitschr. Wiss Mikr.* 45, 1928, p. 482.

M. LANGERON, *loc. cit.*, p. 595-614.

E.-G. RACOWITZA, Montage, conservation, classement des préparations microscopiques. *Arch. Zool. exp.* T. 59. Notes et Revue 1920, p. 78.

¹ Il ne faut mettre sur la lame ni trop ni trop peu de baume. Avec un peu d'entraînement, on s'habitue à mettre la quantité strictement nécessaire pour que le baume, rendu assez liquide par du xylol, s'étale immédiatement sous le poids de la lamelle. Si l'on met trop peu de baume, l'air entre à la périphérie, par suite de l'évaporation du xylol. Si le baume est trop épais, on court le risque d'écraser la préparation avec certains objectifs (dans ce cas, nettoyer très prudemment la lentille de l'objectif avec un chiffon fin imbibé de xylol. Les tissus rudes rayent les lentilles, et le xylol à trop forte dose les décolle).

CHAPITRE X : Méthode spéciale de coloration des grains de pollen.

Introduction. — La question du pollen est à l'ordre du jour. Depuis quelques années, on s'intéresse au pollen fossile, qui permet de reconstituer l'histoire postglaciaire des forêts. D'autre part, les apiculteurs étudient aussi la question, la présence ou l'absence du pollen de certaines espèces végétales permettant d'indiquer approximativement la provenance des miels et de déceler la falsification des miels du pays par des miels étrangers.

Une méthode de préparation du pollen, pour établir une collection des formes-types usuelles, présente un intérêt évident. « In erster Linie muss man eine möglichst vollständige Sammlung der heimischen Pollenarten in bequemer und dauerhafter Aufmachung nach einheitlicher Behandlung anlegen, um bei der Durchmusterung der mikroskopischen Honigbilder jederzeit Vergleichspräparate zur Hand zu haben » (ZANDER, *loc. cit.*, p. 17).

Une telle méthode a été décrite par ZANDER (*ibid.*) avec montage à la glycérine gélatinée. La lecture de quelques travaux traitant du sujet fait ressortir la grande difficulté de détermination des pollens due principalement aux états différents des grains examinés (pollen sec, pollen frais, pollen ramolli soit artificiellement, soit par séjour dans les miels).

Dans les miels, les grains de pollen se trouvent à l'état de gonflement, de turgescence maximum, semblable à l'état frais dans certaines conditions; mais différant complètement, à première vue, des grains recueillis sur la plante, séchés, puis examinés. Par exemple, certaines microphotos de pollen « *en grains de café* » nous montrent des formes de pollen sec qu'on ne rencontre jamais dans les miels (exemple: *Acer platanoides*).

Nous avons essayé plusieurs méthodes de ramollissement et de gonflement, pour amener les grains de pollen, séchés totalement ou partiellement, à un état le plus voisin possible de celui où ils se trouvent dans les miels.

De telles collections présentent un réel avantage sur les dessins, même les mieux étudiés, dont l'image est presque toujours une interprétation plus ou moins fidèle, faite de la superposition de différents plans. Ces préparations valent mieux aussi que des photographies, qui ne permettent de voir le grain que dans un seul plan, alors qu'il faut toujours

changer la mise au point du microscope pour se rendre compte non seulement du contour général du grain, mais de son volume.

Notons que les grains traités par ces méthodes, la deuxième surtout, sont très réfringents. En effet, le baume du Canada est plus réfringent que la glycérine gélatinée; il évite le lutage des préparations, et conserve une bonne transparence. Cette réfringence exige une grande attention de la part de l'observateur, et un diaphragme minimum au microscope. Pour éviter ces inconvénients, et permettre une observation plus agréable, nous avons essayé de colorer les grains; les résultats obtenus ont été satisfaisants.

Les préparations ainsi faites permettent un dénombrement facile des grains, et une détermination aisée du contour cellulaire. Le dessin est donc facilité par cette méthode, qui permet aussi d'obtenir de très bonnes microphotographies.

Voici les deux méthodes qui nous ont donné de bons résultats:

Traitement préalable (pour les deux méthodes):

Placer quelques grains de pollen sur une lame; noter au microscope la couleur des grains (souvent caractéristique déterminante), et la forme du grain dans son état actuel (frais ou sec).

Si le pollen n'est pas sec, il se trouve souvent aggloméré; le chauffer quelques minutes à la plaque chauffante pour détacher les grains. (Ne pas essayer de vider à l'hypochlorite; les grains y perdent leur turgescence et leur forme originale, et ne restent qu'à l'état de squelette.) Coller les grains sur lame à l'albumine d'œuf (couche très mince d'albumine étalée avec une baguette de verre sur une lame très propre, et qui doit présenter le phénomène des lames minces: anneaux de Newton). Répartir les grains de pollen avec un pinceau, ou même les étaler en les remuant avec une baguette de verre, pour les placer dans toutes les positions désirables. S'il s'agit de pollen de Conifères, où chaque grain est muni de deux ballonnets, cette deuxième méthode est préférable. Chauffer la lame à la plaque chauffante à 70° environ. L'albumine se coagule à la chaleur, emprisonnant les grains.

Dégraissier¹ alors les grains par trois lavages successifs à l'alcool à 95° sur la lame chaude. Evaporer l'excès d'alcool sur la plaque chauffante.

Méthode 1:

Ramollir sur lame *au liquide glyciné*². Laver à l'eau distillée. Colorer sur lame (1 à 2 gouttes de colorant). Laver 3 fois à l'alcool à 95°, en éloignant l'alcool avec des bandes de papier filtre.

¹ Sans ce traitement, la coloration prend mal, sauf s'il s'agit de colorants spécifiques des lipoides, l'exine étant formée de cutine.

² Le liquide glyciné est un mélange en parties égales d'eau distillée, d'alcool à 95° et de glycérine pure.

Achever l'évaporation à la plaque chauffante. Monter au baume du Canada, en recouvrant d'une lamelle carrée ou rectangulaire.

Méthode 2:

Ramollir sur lame au *chloralphénol d'Amann*¹. Le chloralphénol ramollit, gonfle, fixe et déshydrate le pollen de façon remarquable. Même sans aucune coloration, on obtient des détails très nets de la structure, par montage direct au baume sur le chloralphénol.

L'éclaircissement est meilleur que dans la méthode précédente, mais il se produit quelquefois une cristallisation du phénol en aiguilles roses en présence de certains colorants, ou si le réactif a été mal préparé.

Pour la coloration, ajouter sur lame, après ramollissement, une goutte de chloralphénol et une goutte de colorant. Laver à l'eau courante. Laver trois fois à l'alcool à 95°. Evaporer et monter au baume.

Voici la liste des colorants ayant donné de bons résultats pour le pollen²:

<i>Bleu de méthylène.</i>	<i>Soudan III.</i>
<i>Brun Bismarck.</i>	<i>Vert d'iode.</i>
<i>Chrysoïdine.</i>	<i>Vert malachite.</i>
<i>Fuchsine cristallisée,</i>	<i>Violet de gentiane</i>
<i>aniliné ou phéniquée.</i>	<i>aniliné ou phéniqué.</i>
<i>Rouge neutre.</i>	<i>Violets Dahlia, de méthyle.</i>
<i>Safranine.</i>	

cela sur une quarantaine de colorants essayés.

Cas particulier des Conifères: Chaque grain de pollen est, ici, muni de deux ballonnets qui, souvent au cours du traitement, restent gonflés d'air. Pour éliminer de la préparation ces bulles, gênantes à l'observation microscopique, on ajoutera, après évaporation à sec de l'alcool, une goutte de chloralphénol, et on chauffera légèrement sur la plaque chauffante pendant 3 à 5 minutes, avant de monter au baume.

¹ Le chloralphénol est un mélange de 2 gr. d'hydrate de chloral et de 1 gr. d'acide phénique, liquéfié à douce chaleur (B. M.) et conservé en flacon brun à pipette.

Le chlorallactophénol préconisé par LANGERON (*loc. cit.*, p. 1151) pour le matériel desséché, a donné pour le pollen, des résultats moins bons que le chloralphénol, probablement parce qu'il n'est pas miscible avec le baume du Canada. AMANN dit lui-même, en parlant de l'emploi de ce réactif: «Da das Chlorallactophenol nicht ohne weiteres mit Balsam mischbar ist, müssen die damit behandelten Präparate, die in letzteres Medium eingeschlossen werden sollen, erst mit Chloralphenol entwässert werden» (*cit. Zeitschrift für wiss. Mikr.*, XVI, 1899, p. 40).

² Plus les colorants sont dilués, plus les détails de structure des grains apparaissent avec netteté. Il en est de même si l'on utilise la méthode de coloration régressive. Il faudra, dans ce cas, surveiller l'action du différenciateur, et arrêter à temps la différenciation.

Méthode appliquée au miel:

Il est généralement inutile de faire des préparations permanentes de miel. Elles peuvent cependant présenter un certain intérêt dans des cas spéciaux¹.

Rappelons que, dans le miel, les grains de pollen sont toujours un peu gonflés. Le collage à l'albumine, dans la plupart des cas, n'est plus nécessaire, le sucre se chargeant d'emprisonner les grains.

La meilleure méthode de préparation nous paraît être la suivante:

1 à 2 cc. de miel sont agités dans une éprouvette avec 10 à 15 cc. d'eau distillée. Le sirop ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 minutes environ. On décante et, au moyen d'une pipette, on recueille le culot dont une goutte est déposée sur une lame chauffée à la plaque chauffante pour évaporer l'excès de liquide².

On traite sur lame 3 fois à l'alcool à 95° pour dégraisser les grains. On évapore à sec, et on colore sur lame par une ou deux gouttes de colorant. On lave à l'eau distillée, puis encore 3 fois à l'alcool. Après évaporation à sec, on monte au baume.

N. B. — Les méthodes 1 et 2 ont aussi été appliquées avec succès aux spores des Cryptogames vasculaires et des Mousses (Equisetales, Filicales, Sphagnales, etc.).

Bibliographie:

L. AMBRUSTER et G. OENIKE, Die Pollenformen, Bücherei f. Bienenkunde, Band X, Neumünster, 1929.

Biological Abstracts 1937, n° 7775, Coloration du pollen.

A. DAUFRESNES, *loc. cit.*, p. 566.

V. JENTYS SZAFER, Structure des membranes du pollen, *Bull. Acad. Polonaise*, Cracovie, 1928.

LANGERON, *loc. cit.*, p. 606 et 1151 (chloralphénol).

L. MANGIN, Observations sur le développement du pollen, et Observations sur le grain de pollen mûr, XXXVI. *Bull. Soc. Bot. France*, 1889.

ZANDER, Beiträge zur Herkunftsbestimmung bei Honig, 1 et 2, Berlin, 1935, et Leipzig, 1937.

CHAPITRE XI : Méthode spéciale de coloration des mousses.

A propos de la lignine (p. 128), nous avons déjà parlé de la question des mousses. Il existe de très nombreuses opinions à ce sujet. F. CHODAT et R. CORTESI, dans leur travail « Sur la coloration des membranes des mousses », disent ceci:

¹ Pour l'apiculteur, par exemple, collection comparative des récoltes des abeilles d'une même ruche suivant les années.

² Si le nombre de grains a une importance, on ne devra évidemment comparer que des préparations ayant un même nombre de gouttes!!

« Les histologistes n'ont pas tardé à constater que la mise en évidence de la cellulose présente de fréquentes irrégularités... D'autre part, aucun histologiste n'a réussi à mettre en évidence la lignine chez les mousses... Or, si les histologistes ont si souvent échoué dans la mise en évidence de la cellulose des membranes des mousses, l'existence de ce corps a pourtant été prouvée par plusieurs analyses chimiques. Ainsi WAKSMAN¹ y a dosé non seulement la cellulose, mais même la lignine » (*loc. cit.*, p. 58 et 60).

Dans le traité de C. BONNIER et LECLERC DU SABLON, nous trouvons fréquemment le terme de « cellules lignifiées ».

De même A. PASCHER parle de « Holzkörper » (*loc. cit.*, p. 5).

W. LORCH, dans son « Anatomie der Laubmoose », emploie les expressions: « Holzfasern, Holzkörper, Holzstoff et Holz-zellen ». De ce même ouvrage, nous tirons encore le passage suivant: « Im Gegensatz hierzu steht eine Angabe SCHELLENBERGS, der bei *Polytrichum* das Vorhandensein von Lignin festgestellt haben will. LINSBAUER hat die Befunde SCHELLENBERGS einer erneuten Prüfung unterzogen, und ist zu dem Resultate gelangt, dass von einer Verholzung der Mooszellmembranen keine Rede sein kann. »

La présence ou l'absence de lignine chez les mousses est donc controversée. On pourra lire encore différentes opinions à ce sujet, citées par C. VAN WISSELINGH (*loc. cit.*, p. 132-134) au chapitre intitulé « Vorkommen der Verholzung ».

La question ainsi posée présentait donc un certain intérêt du point de vue histologique, en relation avec notre étude des colorants.

Nous avons choisi comme matériel d'expérience: des thalles de *Marchantia polymorpha* (Hepaticae); des feuilles et tiges feuillées de *Mnium sp.* (Bryales); des feuilles, tiges feuillées et soies de sporogones de *Polytrichum commune* (Bryales); des feuilles et tiges feuillées de *Sphagnum squarrosum* (Sphagnales).

Résultats du réactif-test:

— thalle de *Marchantia*:

L'épiderme inférieur et les rhizoïdes sont brunâtres (?).

Les cellules du sclérenchyme (selon BONNIER) sont jaunâtres, peu caractéristiques.

¹ WAKSMAN trouve 7% de lignine dans les parties supérieures et 19% dans les parties inférieures de la tige feuillée de *Sphagnum*. Cette méthode de dosage comprend sous le nom de lignine toutes les substances non hydrolysables ou facilement oxydées.

Un dosage des groupes méthoxyles donne des résultats bien inférieurs, justifiant dans une certaine mesure l'incertitude au sujet de la présence ou de l'absence de lignine des mousses. G. KLEIN signale pour 17% de lignine dans le *Sphagnum* 0,6% seulement de groupes méthoxyles.

Les cellules à huile, assez nombreuses dans le parenchyme, présentent une coloration nette rouge orangé.

L'épiderme supérieur et le parenchyme sous-jacent sont brunâtres, mais cependant plus pâles que l'épiderme inférieur.

— *plante de Mnium* :

Les feuilles, constituées d'une seule assise cellulaire, prennent une coloration orangée, caractéristique des matières grasses, qui semblent exister ici en très forte quantité. La pseudo-nervure médiane, formée d'un amas de cellules conductrices, présente la même coloration.

Dans la tige feuillée, l'assise superficielle, munie de rhizoïdes, est brunâtre (?); le tissu de soutien, formé de cellules à parois épaissies, à cavités intérieures petites, est brun jaune. Le parenchyme à grandes cellules est brunâtre, et contient quelques grains d'amidon (bleu violet). Quant au massif central, formé de cellules allongées, étroites, à parois minces, représentant le tissu conducteur de l'eau, il est également brun.

— *Polytrichum commune* :

Pour la tige feuillée, nous trouvons des résultats analogues: tissu de soutien extérieur brun, parenchyme cortical brunâtre, pseudopéricycle et tissu conducteur central jaune brun.

La feuille présente plusieurs assises de cellules au milieu. La nervure médiane est ainsi assez marquée, et présente à la face inférieure une masse jaune brun de cellules à parois épaissies semblables à des fibres. Le pédicelle (soie du sporogone) montre une écorce de plusieurs rangées de cellules fortement renforcées (tissu de soutien); le réactif-test colore ces cellules en brun jaune vif. Quant au parenchyme médullaire, à parois minces, s'il n'a pas complètement disparu par vieillissement, il est à peine teinté (blanc crème).

— *Sphagnum squarrosum* :

Dans ce cas, aucune coloration brunâtre n'apparaît.

L'assise superficielle de la tige feuillée est blanchâtre, et le tissu scléreux apparaît comme un anneau jaune d'or très net. Le parenchyme est blanc crème, comme les tissus celluloseux des plantes supérieures. Les feuilles de *Sphagnum* présentent une coloration orangée (matières grasses) et ne paraissent pas contenir de tissu de soutien.

De ces expériences préliminaires, on ne peut tirer aucune conclusion certaine quant à la présence de lignine chez ces mousses. On peut cependant prévoir sa présence dans plusieurs cas (sclérenchyme de *Polytrichum* et de *Sphagnum*) vérifiés par des essais positifs à la *phloroglucine chlorhydrique*.

Les cellules lignifiées, s'il s'en trouve, semblent faire partie du tissu de soutien proprement dit plutôt que du tissu conducteur.

La coloration brunâtre obtenue dans trois des cas cités, ne correspond exactement à aucune réaction connue du réactif-test. Elle n'a jamais été observée chez les Phanérogames, ni chez les Cryptogames vasculaires. Elle est due probablement à une imprégnation des membranes par une ou des substances spécifiques des mousses, par exemple l'acide dicranotannique signalé par CZAPEK.

Un nouvel essai du réactif-test, après le traitement à l'éther/hypochlorite, donne encore la coloration brune de ces tissus. Le traitement des coupes par HCl (voir traitement préalable des coupes, cas spéciaux) atténue la coloration. Malgré des essais de prolongation du traitement, nous ne sommes pas parvenue à la faire disparaître totalement.

Cette réaction colorée, si elle ne correspond absolument à aucune de celles obtenues chez les Phanérogames, se rapproche cependant de celle des tanins en présence du réactif-test. Elle semble due à l'action du Fe Cl_3 de ce réactif. Pour nous en assurer, nous avons essayé l'action des réactifs des tanins cités par LANGERON, (*loc. cit.*, p. 1158): Fe Cl_3 seul donne une coloration brun noir, et $\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7$ brune; KOH produit une coloration rouge très nette, tandis que le *bleu de méthylène* donne une réaction verdâtre; le réactif de Broemer donne un précipité jaunâtre pas très net, et la caféine un précipité blanchâtre.

On peut donc conclure à la présence de tanoïdes dans les mousses étudiées, sauf chez *Sphagnum*.

Coloration:

Nous avons essayé sur ces mousses différentes méthodes de coloration, en procédant de la manière suivante: les mousses ont été fixées¹, et les coupes faites au microtome à main. Pour cela, les tiges feuillées et les pédicelles furent introduits dans une moelle de sureau sèche du format du microtome et trouée au moyen d'une aiguille. Les feuilles étaient prises entières. Le matériel fut ensuite soumis au traitement mixte à l'éther/hypochlorite préconisé par CHODAT et CORTESI. Les coupes de tiges feuillées, de pédicelles et les feuilles furent plongées dans un bain d'éther ordinaire pendant 2 à 5 heures, puis dans un bain de NaClO pendant une demi-heure environ. Les membranes sont ainsi dégraissées, et le contenu cellulaire éliminé. La durée du traitement doit être prolongée (le bain d'éther surtout) pour les mousses vieilles, les membranes cellulaires s'imprégnant de lipoides au cours de la vie de la plante. Après ce traitement, et un rapide passage à l'acide acétique pour neutraliser toute

¹ Voir chap. I, Matériel étudié.

trace d'alcali, les coupes, lavées à l'eau distillée, sont prêtes à la coloration par la méthode ordinaire. Il faut cependant noter que seules les colorations les plus sensibles à la lignine ont été essayées, vu la très petite quantité de cette substance supposée dans nos minuscules coupes. Les colorants furent donc choisis parmi ceux qui avaient donné de bons résultats en solution très diluée, et ceux utilisés avec succès pour le pollen, par exemple :

le *bleu de méthylène*, la *chrysoïdine*, les *verts d'iode*, ou *malachite*, les *violetts cristal*, de *gentiane*, de *méthyle*, tous colorants basiques, utilisés pour les quatre cas dans les colorations doubles suivantes :

Bleu de méthylène/Carmin,
Chrysoïdine/Hémalun ou Rouge Congo,
Vert d'iode ou *Lumière*/Carmin ou Rouge Congo,
Vert malachite/Carmin, Hémalun ou Rouge Congo,
Violet cristal/Rouge Congo.

En coloration simple, nous avons essayé l'*hématoxyline ferrique* ou *cuivrique*.

— *thalle de Marchantia* :

Dans tous les cas de coloration, les cellules épidermiques et les rhizoïdes restent brunâtres. Aucune lignification n'apparaît nettement dans les colorations doubles.

L'essai au *bleu de méthylène* donne une coloration verdâtre à certaines parois cellulaires, mais cette réaction n'est pas concluante puisque les tanins, qui donnent aussi cette réaction, n'ont pu être complètement éliminés par le traitement.

Le parenchyme donne une coloration cellulosique nette aussi bien au *carmin* qu'au *rouge Congo*.

— *plante de Mnium* :

Les feuilles, débarrassées des matières grasses par le traitement préalable, donnent une bonne coloration simple à l'*hématoxyline* sur mordant de fer ou de cuivre. Aucun colorant basique n'a donné les réactions du bois; en coloration double, le colorant cellulosique seul agit, même dans la région de la nervure.

La tige feuillée donne aussi des réactions cellulosiques nettement marquées au *carmin*, à l'*hémalun* et au *rouge Congo*. Malgré un traitement prolongé à l'éther/hypochlorite, puis à l'acide chlorhydrique, l'écorce et les rhizoïdes sont brunâtres.

Dans ce cas encore, aucune coloration caractéristique de la lignine n'a pu être obtenue.

— *Polytrichum commune* :

C'est sur cette espèce que nous avons tenté le plus grand nombre de colorations; nous avons essayé tous les colorants cités, et en plus quelques autres, comme le *violet Dahlia* ou de *méthyle* avec le *rouge Congo*, par exemple; nous voulions nous assurer que

les colorations des membranes lignifiées aperçues n'étaient pas fortuites, mais se confirmaient.

Les feuilles de *Polytrichum* présentent une structure plus compliquée que celles de *Mnium* par exemple. Vers la nervure médiane, nous trouvons: la face supérieure couverte de lamelles; à la face supérieure et inférieure de la feuille, deux bandes d'hydroïdes sont suivies, en allant vers l'intérieur, de deux lignées de cellules à parois épaissies (stéréome), séparées par un parenchyme. A la coloration, il est difficile de distinguer les hydroïdes du stéréome; dans la coupe transversale de feuille, on voit donc deux bandes, l'une supérieure, l'autre inférieure, fortement colorées par les colorants du bois, séparées par une ou deux lignées de cellules à parois cellululosiques.

Au *bleu de méthylène*, la coupe est complètement verdâtre, probablement parce que les tanoïdes n'ont pas été complètement éliminés. D'autre part, le *réactif genevois* donne une mauvaise différenciation. Les détails les mieux visibles se trouvent dans les colorations au *carmin* en contraste avec les verts.

La tige feuillée de *Polytrichum* montre aussi une structure assez complexe: le centre est formé d'éléments conducteurs, *hydroïdes à parois épaisses* au milieu, qu'entoure un anneau d'*hydroïdes à parois minces*. A ce système conducteur central fait suite un *pseudopéricycle* plus ou moins distinct, qui peut contenir de l'amidon ou de l'huile, et semble avoir un rôle protecteur. Suivant les auteurs, ce tissu porte différents noms: Endodermis, rudimentäres Perizykel, Stärkescheide, Schutzscheide, Leptomring, Hydromscheide (voir nomenclature W. LORCH, *loc. cit.*, p. 62 et 72, et C. SCHULZ, *loc. cit.*, p. 29). Autour de cette espèce de cylindre central (Zentralstrang) se trouve une écorce (Rinde) formée elle aussi de deux zones: un *parenchyme cortical* présentant des traces foliaires (Blattspuren) plus ou moins nombreuses et distinctes selon l'âge de la plante et le niveau de la coupe; et un *sclérenchyme cortical* (Epidermoïdalschicht) à membranes cellulaires épaissies.

Les hydroïdes à parois épaisses prennent plus ou moins distinctement les colorants du bois. Les hydroïdes à parois minces prennent très nettement les colorants de la cellulose, et montrent, à première vue, un aspect semblable à celui d'un liber annulaire. Le pseudopéricycle, qui se présente sous une forme irrégulière, plus ou moins bien définie suivant les coupes, variable avec l'âge de la plante et le niveau de la coupe, est constitué de petites cellules à parois minces qui prennent soit les colorants cellululosiques, soit, légèrement, les colorants du bois. Cette différence est probablement due à des tissus plus ou moins âgés. Le parenchyme cortical fixe nettement les colorants de la cellulose; les traces foliaires y forment des amas plus ou moins distincts, légèrement colorés par les colorants de la lignine. Le sclérenchyme cortical, formé de cellules à parois fortement épaissies, prend les colorants

de la lignine. Cette coloration n'est cependant pas très franche, car elle est faite de la superposition du colorant à la coloration brune initiale de ces membranes.

Le *bleu de méthylène* donne de nouveau ici une coloration peu sûre, qui est due probablement aux tanoïdes.

La *chrysoïdine/hémalun* colore le centre en brun orangé, comme le bois; l'anneau d'hydroïdes à parois minces en violet rose, comme le liber; le pseudopéricycle devient jaunâtre et peu différencié, le parenchyme violet et le sclérenchyme brun rouge.

Avec le *vert d'iode* (ou *vert Lumière*)/*carmin*, le centre est vert, le premier anneau rose; le pseudopéricycle apparaît légèrement verdâtre; le parenchyme est brun rose, et le sclérenchyme va du vert brun au vert olive.

Avec le *vert d'iode/rouge Congo*, l'anneau d'hydroïdes à parois minces atteint son maximum de netteté, et ressort en rose vif dans la coupe.

Avec le *vert malachite/hémalun*, les hydroïdes du centre sont vert jaune, tandis que les cellules du tissu de soutien extérieur sont vert bleu. Cette différence fait penser à d'autres cas analogues, observés chez des Phanérogames, où les vaisseaux du bois et les fibres présentaient des nuances de coloration (cf. colorants des tissus lignifiés, chap. VIII).

La coloration *violet cristal/rouge Congo* nous donna un résultat intéressant: dans une série de coupes d'une même tige, le centre devint bleu, le premier anneau rose vif, et le pseudopéricycle, très irrégulier, présenta une teinte brunâtre. Le parenchyme se colora en rose brun, et le tissu de soutien extérieur en bleu, avec reflets brun très foncé. Il semble que nous avons affaire ici à une tige âgée, dont les tissus seraient plus fortement imprégnés de tanoïdes, exception faite des hydroïdes à parois minces.

L'âge de la coupe paraît devoir constituer un facteur important, qui permet au massif central de présenter nettement, ou, au contraire, très faiblement, les réactions de la lignine. Le pseudopéricycle, par contre, donnera quelquefois les colorations de la cellulose, et plus souvent celles de la lignine. — Le parenchyme, malgré un traitement préalable prolongé, reste souvent brunâtre (tanoïdes?) et cette teinte fondamentale influence l'aspect de la coloration. — Le tissu de soutien extérieur peut, lui aussi, varier; s'il est très fortement épaissi, il forme une bande de couleur foncée, que les colorants de la lignine accentuent encore, au point qu'on ne peut presque plus distinguer les cellules. Cependant, dans les tiges jeunes, les contours cellulaires restent bien visibles, et sont colorés par les verts et les violets (colorants des tissus lignifiés).

Des essais de coloration analogues ont été tentés sur des coupes de pédicelles (soies de sporogones). Ces pédicelles présentent, sous l'action de tous les colorants du bois, une large bande extérieure

fortement lignifiée (tissu de soutien). Il semble que, là au moins, la présence de lignine soit incontestable. Quant à la partie centrale du pédicelle, elle est, dans la plupart des cas, totalement disparue. Si elle a subsisté, elle montre des réactions cellulosiques nettement caractérisées. La coloration au *réactif genevois* donne, en quelque sorte, le degré de lignification du tissu de soutien: dans les pédicelles jeunes, le tissu est jaune orangé; dans les plus âgés, il est brun. De nouveau on obtient les meilleurs contrastes de colorants avec les *verts/carmin*, ou le *violet cristal/rouge Congo*.

— *Sphagnum squarrosum*:

Les feuilles ne présentent aucune des réactions colorées de la lignine. Après traitement, elles donnent toutes les réactions des membranes cellulosiques.

La constitution de la tige est la suivante: une coupe transversale nous montre un hyaloderme extérieur formé de deux à trois couches de grosses cellules (rappelant le velamen des racines épiphytes), un stéréome, tissu formé de cellules à parois épaissies (*fälschlich Holzkörper*) et un tissu de cellules banales (*Grundgewebe, fälschlich Mark*) (nomenclature selon W. LORCH, *loc. cit.*, p. 50).

Ces différents tissus ont des réactions variables suivant l'âge de la tige étudiée¹. Dans les tiges jeunes, les réactions des colorants de la cellulose peuvent seules être obtenues, bien que le stéréome annulaire présente déjà un épaississement très net des membranes. Dans les tiges plus âgées, cet anneau donne nettement les réactions de la lignine (*verts/carmin* et *violet cristal/rouge Congo*).

Dans la partie inférieure de la tige de *Sphagnum* (partie la plus vieille), l'anneau n'existe plus; il a été rompu, et forme quatre ou cinq paquets de fibres, séparés les uns des autres. Ces amas fibreux présentent les réactions de la lignine encore plus nettement que l'anneau des tiges plus jeunes. Avec les *verts/carmin*, ces paquets fibreux ressortent nettement en vert bleu sur le fond rose violet de la cellulose. La *chrysoïdine* ou le *violet cristal* les fait ressortir en brun orangé ou en bleu vif sur le fond corail obtenu avec le *rouge Congo*.

Des coupes longitudinales de tiges feuillées montrent aussi nettement ces mêmes colorations.

¹ Voir note au début du chapitre.

Conclusions.

De ces différents essais de coloration des mousses, on peut donc tirer les conclusions suivantes:

a) Il existe des *différences considérables de lignification entre les espèces de mousses*, et, pour l'instant, aucune règle générale ne peut être énoncée.

b) *L'âge de la plante étudiée* a une grande importance, et les résultats obtenus sur du matériel divers ne peuvent en rien être comparables.

c) *L'imprégnation des membranes* des mousses présente encore un vaste champ d'investigations pour la microchimie. Des substances mal précisées ou inconnues doivent certainement avoir une influence, et embarrassent l'histologiste travaillant avec les seuls colorants.

Malgré ces nombreuses causes d'erreur, il semble, d'après nos expériences renouvelées, que la lignification de certains tissus de soutien chez les mousses ne fait pas de doute. Quant à la cellulose, elle a été prouvée par de nombreux auteurs avant nous, et nos essais ne sont que la confirmation des leurs.

Bibliographie:

G. BONNIER et LECLERC DU SABLON, *Cryptogames* (traité).

F. CHODAT et R. CORTÉSI, *Sur la coloration des membranes des mousses*, *C. R. Soc. Phys. et Hist. Nat.*, Genève, 1939.

G. KLEIN, *Handbuch der Pflanzenanalyse*, III^{er} Band/I, II, Wien, 1932.

W. LORCH, *Anatomie der Laubmoose*, *Handbuch der Pflanzen-anatomie*, K. Linsbauer, 1931.

A. PASCHER, *Die Süßwasserflora*, Heft 14, Iéna, 1914.

C. SCHULZ, *Beiträge zur Anatomie und Biologie der Polytrichaceen* (thèse), Hambourg, 1937.

C. VAN WISSELINGH, *Die Zellmembran*, 1925.

WAKSMAN et STEVENS, *Soil Science*, 26, 133.

Table des matières.

	Pages
INTRODUCTION	91
CHAP. I : Matériel étudié	93
CHAP. II : Fixation	97
CHAP. III : Coupes	105
CHAP. IV : Réactif-test	106
CHAP. V : Traitement préalable des coupes	109
CHAP. VI : Coloration	111
CHAP. VII : Les constituants de la membrane cellulaire et leurs affinités chimiques	116
CHAP. VIII : Les colorants	131
Tableaux	140
Liste des colorants	148
CHAP. IX : Milieux conservateurs	150
CHAP. X : Méthode spéciale de coloration des grains de pollen	154
CHAP. XI : Méthode spéciale de coloration des mousses	157
