

Les colorants : discussion des tableaux I, II et III

Objekttyp: **Chapter**

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

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

Heft 2

PDF erstellt am: **18.09.2024**

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.

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 cellulosesques:*

Les colorants usuels présentent des différences sensibles dans leur action, et suivant le genre de tissus cellulosesques (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 cellulosesques 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 % 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 lentilles 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>	5	(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>Bleu de méthylène</i> <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</i>	3+3	<i>Vert de méthyle</i>	3	suffisant	violet noir	vert	vert violacé	glyc.
<i>Orangé d'aniline</i>	10	<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	»	»	»	»	
»	3	»	5	<i>Alkanna</i>	10	suffisant	violet rose	vert	brunâtre	»	
<i>Hématun</i>	3	»	5	<i>Soudan III</i>	10	très marqué	»	»	orangé	»	
»	3	»	10	»	10	très marqué	»	»	»	»	
»	3	<i>Vert Lumière</i>	5	»	10	très marqué	»	»	»	»	
»	5	<i>Vert malachite *</i>	10	<i>Violet gent.</i>	5	suffisant, peu durable	rouge	vert bleu	brun violet	»	
<i>Rouge Congo aq.</i>	5	<i>Vert Lumière</i>	10	<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	—		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	»
»	et	10	—	suffisant	»	orangé	orangé	» ou glyc.
»	et	10	<i>Violet g. am.</i>	suffisant, peu durable	»	vert	rougeâtre	»
»	et	10	—	suffisant	»	»	violet brun	»
<i>Safranine</i>	et	10	—	peu marqué, inconstant	rose violet	bleu vert	vert	»
—	et	10	<i>Soudan III</i>	suffisant ¹	—	bleu violet	violacé	»
		et				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*).