Zeitschrift: Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Herausgeber: Société Vaudoise des Sciences Naturelles

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

Heft: 2

**Artikel:** Étude critique des colorations en histologie végétale

Autor: Kraft, Marie-Madeleine

**Kapitel:** VIII: Les colorants : discussion des tableaux I, II et III

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-287465

## Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

## **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

## Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

**Download PDF:** 26.11.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

## Bibliographie:

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

MAD. MEYER, Die sübmikroskopische 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 cellulosiques:

Les colorants usuels présentent des différences sensibles dans leur action, et suivant le genre de tissus cellulosiques (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.  $2\sqrt[6]{_{00}}$ ) est suivi d'un rapide lavage à l'eau distillée, puis du bain de ferrocyanure de K  $5\sqrt[6]{_{00}}$ .

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 cellules 1.

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. 5% 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 cellulosiques 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 classique <sup>2</sup>; elle donne une coloration rapide, mais peu durable. La solution

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Plus les colorants et mordants sont dilués, plus les colorations obtenues sont précises.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> 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 collenchymes 1 (tiges de Labiées et de Solanées par exemple) et contraste avantageusement avec la plupart des colorants verts et bleus 2.

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 mordançage préalable du tissu, qui empâte les contours cellulaires. Dans la coloration simple cependant, le mordançage 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.

- <sup>1</sup> 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.
- <sup>2</sup> 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) <sup>1</sup>. 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 mordançage. 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 photographie 2.

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 (SnCl<sub>4</sub>. NH<sub>4</sub>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.

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

\* 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 diluée <sup>1</sup>, 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  $1^{\,0}/_{00}$  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 bleue <sup>2</sup>. 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,

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Sol. 1% aq. ou ds alc. 30%.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> 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 % aq. ou 1 % and alc. 3 % and 3 % are 3 % and 3 % are 3 % and 3 % and 3 % and 3 % are 3 % and 3 % are 3 % and 3 % are 3 % and 3 % are 3 % and 3 % are 3 % and 3 % are 3 % and 3

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) <sup>1</sup>.

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 cutine 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 violets 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 lipoïdes 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

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> 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 chlor-hydrique 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

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Sol.  $1^{\circ}/_{0}$  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 <sup>1</sup>.

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.

TABLEAU I Colorant	T. (min.)	Mordant	Membranes pecto- cellulosiques	Membranes lignifiées	M. cutinisées et subérifiées	Différenciateur	Milieu de conservation	Sensi- bilité <sup>1</sup>
Alkanna	10	1	I		rose brun	eau dist.	baume	ż
Benzoazurine	10	1	bleu pâle	pleu	bleu jaunâtre	*	8	ż
Bleu d'aniline	က		bleu teinté	vert bleu	jaunâtre	^	*	ż
Bleu coton **	5		bleu pâle	pleu	bleu vert	*	*	Ŀ.
Bleu de méthylène	ಣ			bleu vert	vert jaune	alcool	» ou glyc.	В.
Bleu de molybdène *	2		bleu violet	verdâtre	jaunâtre	eau courante	*	ż
Bleu naphtylène *	10	8	violet pâle	violet noir	violet	alcool	*	ъ.
Bleu de Prusse, K <sub>4</sub> FeCy <sub>6</sub>	3+3	Fe $Cl_3$	verdâtre	plen	bleu vert	eau courante	*	ż
Brun Bismarck *	10	1 -	brun orangé	jaune brun	jaune brun	alcool	» ou glyc.	B.
Carmin	က	(ds col.)	rose rouge	rose jaune	rose jaune	alcool	* *	B.
Chromate de plomb, K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	3+3	acétate de Pb	jaune	jaune	jaune	eau cte lgts	*	ż
Chrysoïdine	က		1	orangé	orangé	alcool	*	B.
Coralline **	10	and the same of th	1	rose jaune	rose jaune	eau dist.	*	ż
Cyanine **	5			pleu	bleu vert	«	» ou glyc.	ż
Deltapurpurine	10		rosé	rouge	orangé	«	*	T.
Encre (bleue noire) *	10		plen	bleu vert	verdâtre	*	*	Ŀ.
Eosine	10	1	teinté	orangé	jaunâtre	*	» ou glyc.	ż
Erythrosine	10	1	teinté	rose orangé	rose orangé	*	glycérine	ż
Fuchsine ammoniacale **	3+3	ac. acétique	I	rose violet	violet brun	*	baume	ż
Fuchsine cristalliséc			×					
ou phéniquée	က	I	rose violet	rouge violet	rouge violet	alcool	*	B.
Fuchsine S	ເວ		rose	rougeâtre	orangé	eau dist.	*	ĮT,
					,			

,c. F. F.	F.	Ŀ.	B.	ż	ż	ż	F.	ż			B.			표.	ż	B.	B.	Ŀ	Ŧ.	В.	
baume ou glyc.	*	* *	* *	* *	*	*	*	*	» ou glyc.	, ) «	*	» ou glyc.	` `	*	*	*	glycérine	baume	*	*	» ou glyc.
eau cte » » lgts	c	*	*	*	can dist.	* *	«	*	alcool	alcool+HCI	*	alcool	*	eau dist.	alcool	*	ean dist.	alcool	alcool	alcool	*
violet rose bleu violet	violet	violet	noirâtre	rose violet	bleu vert	noir brun	jaune pâle	diffus	orangé	rouge brun	rose orangé	rouge orangé	vert jaune	,		vert	vert påle	teinté	violacé	violet	violet
violet bleu violet	violet	violet brun	violet noir	rose pâle	bleu vert	noir brun	jaune pâle	diffus	jaunâtre	rouge	rose vif	teinté	vert	vert	ŀ	vert bleu	vert	bleu violet	teinté	violet	bleu violet
violet bleu violet	violet påle	violet rose	violet noir	rose pâle	bleu påle	bleu noir	jaune orangé	rose diffus	rouge	rose	rose teinté	1	1	5	vert vif	1	1			violet	violet
(ds col.) id.	alun de Cr	$CuSO_4$	alun ferrique	chlorure Sn <sup>4</sup>	I	I	I	1	I	l	I		I			1	1		HCI 5 %		I
	2 + 5	2 + 5	2+5	2 + 5	10	10	10	10	ಬ	က	က	10	က	10	10	က	က	က	က	က	က
Hémalun de Mayer Hématoxyline d'Ehrlich	<b>Hémato</b> xyline ferrique	*	*	~	Indigotine	Nigrosine	Orangé d'aniline et orangé G	Ponceau 2 R	Rouge Congo	Rouge neutre	Safranine	Soudan III	Vert d'iode	Vert Lumière	*	Vert malachite **	Vert de méthyle	Violet cristal	<b>Violet de</b> gentiane (ammon.)	Id. aniliné ou phéniqué	Violet de méthyle

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

TABLEAU II Colorant A	E	Colorant B	T	Contrastes (et remarques)	M. pecto- cellulos.	Membranes lignifiées	M. cutin. et subérifiées	Milieu de conservat.
			1	The second secon				
Benzoazurine	10	Chrysoïdine	က	suffisant (col. un peu pâle)	bleu pâle	orangé	orangé	baume
*		Rouge neutre	က	peu marqué		rouge violacé	jaunâtre	*
*	_	Safranine	အ	très marqué	*	rose vif	rose violet	~
*		Vert Lumière aq.	က	suffisant	~	vert vif	verdâtre	*
*		Vert malachite*	က	suffisant	*	vert vif	vert jaune	*
Bleu coton	5-10		က	suffisant (col. un peu pâle)	*	orangé	orangé	*
*		Rouge neutre	5	peu marqué	~	rouge violet	rouge jaune	~
*	_	Safranine	က	très marqué	*	rose vif	violet rose	*
Bleu de Prusse	3+3	3+3 Chrysoïdine	က	suffisant (coupes empâtées)	plen	orangé	orangé	~
	-	Safranine	က	peu marqué (id.)	bleu violet	violet	violet	6
Brun Bismarck*	10	Bleu de méthylène	1-3	très marqué	jaune orangé	vert $\pm$ bleu	verdâtre	on glyc.
A		Fuchsine ammon.	3 + 3	suffisant	*	violet	violacé	*
*		Safranine	္က	peu marqué	~ .	jaune rouge	rosé	~
8	_	Vert d'iode	က	très marqué	«	vert	verdâtre	~
		Vert malachite *	က	suffisant	«	verdâtre	jaunâtre	*
Á		Vert de méthyle	က	très marqué	«	vert	vert jaune	glyc.
*		Violet cristal	က	très marqué	*	violet bleu	violacé	baume
A	17	Violets Dahlia,						
		de gentiane,	က	très marqué	brun orangé	violet	violet rose	*
8		de méthyle.				2		
Carmin aluné	rc	Bleu de méthylène	1-3	suffisant — très marqué	rose rouge	vert bleu violet	vert bleu vif	» ou glyc.
*	*	Cyanine **	ಬ	suffisant, peu durable	rose rouge	pleu	bleu violet	* *
_						_	_	_

TABLEAU II (suite) Cofórant A	T	Colorant B	£-	Contrastes (et remarques)	M. pecto- cellulos.	Membranes lignifiées	M. cutin. et subérifiées	Milicu de conservat.
Rouge Congo	<b>10</b>	Bleu de méthylène Chrysoïdine Cyanine *** Nigrosine Vert d'iode Vert Lumière aq. Vert malachite * Vert de méthyle Violet cristal		très marqué peu marqué — suffisant suffisant, pas durable peu marqué très marqué très marqué très marqué très marqué très marqué suffisant peu marqué	rouge rouge rouge rouge rouge rouge rouge	vert bleu orangé bleu noir brun vert vert vert bleu violet violet	vert jaune jaune orangé bleuâtre noir brun vert jaune vert vert vert vert	baume  " ou glyc.  " " glyc. baume "
							1	_

\* = 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	Τ	Colorant C	Т	Contrastes (et remarques)	M. pecto- cellulos.	Membranes lignifiées	M. cutin. et subérifiées	Milieu de conservat.
Renzogrurine ag		Vert I umière aa	-	Soudan III	10	Stifficant	hlen	yert	orangé	banme
Penzoazai de aq.	0 9	To the Landers of the	2 1	Document III	2 ,	Samsanı			200	
*	10	Vert malachite *	က	*	10	tres marque	violet	vert	orange	~
Carmin	7.0	Vert Lumière	10	*	10	très marqué	rose rouge	vert	orangé	*
*	ຜ	Vert malachite *	70	*	10	très marqué	) *	*	*	*
*	2	Vert Lumière	10	Violet gent.	ស	suffisant, peu durable	*	*	brun violacé	*
				ammon.		•				
A	3	Vert malachite*	rc	*	rc	suffisant, peu durable	*	vert bleu	* *	*
Chromate de Pb	3+3	3+3   Vert d'iode	3	Alkanna	10	suffisant, empâté	jaune	vert	rouge brun	*
						(méth. de Petit)				
*	3+3	3+3 Vert Lumière	10	Soudan III	10	suffisant, empâté	*	2	jaunâtre	a
« «	3+3	Vert malachite *	5	*	10	suffisant, empâté	*	*	*	a
Encre (bleue noire)	ro	Vert d'iode	2	*	10	très marqué	bleu violet	vert	orangé	*
*	3	Vert Lumière	10	*	10	très marqué	*	*	*	*
*	r.	Vert malachite*	5	*	10	très marqué	*	*	*	*
Hémalun	3	Vert d'iode	20	Alkanna	10	suffisant	violet rose	vert	brunâtre	*
*	က	*	2	Soudan III	10	très marqué	*	*	orangé	*
*	က	Vert Lumière	10	*	10	très marqué	*	*	) **	*
*	က	Vert malachite *	3	*	10	très marqué	*	vert bleu	~	*
Rouge Congo aq.	ī.	Vert Lumière	10	Violet gent.	rc	suffisant, peu durable	rouge	vert violacé	brun violet	*
				ammon.				3		
*	ī.	Vert malachite *	ಸ	*	T.	suffisant, peu durable	*	bleu violet	brunâtre	*
		4					2			
•					-					

TABLEAU III : Colorations simultanées Colorant A	Т	Colorant B	L L	Colorant C	Н	Contrastes (et remarques)	M. pecto-cellulos.	Membranes lignifiées	M. cutin. el subérifiées	Milieu de conservat.
Benzoazurine	et	Vert Lumière	10	-		peu marqué	pleu	vert	verdâtre	baume
*	10	Vert Lumière	et	Soudan III	10	suffisant	*	*	orangé	*
Carmin	et	Vert d'iode	10	1		suffisant	rose rouge	violacé	vert	*
*	et	Vert Lumière	10	1		suffisant	*	vert pâle	verdâtre	*
*	et	Vert malachite	10			suffisant	*	vert violacé	«	*
*	et	Vert Lumière	10	Soudan III	10	suffisant	rose	vert	orangé	*
*	et	*	10	Violet g. am.	ī	peu marqué, peu durable	*	*	brunâtre	*
Chromate de Pb :	1/									
(Acetate et vert Luniere, puis bichromate 10+2)				-		peu marqué, empâté	janne	vert épais	jaune vert	*
Chromate de Pb	et	Vert Lumière	300	Soudan III	10	peu marqué	*	* *	jaunâtre	*
Encre	et	$Chryso\"{i}dine$	10			suffisant	pleu	verdâtre	orangé	*
*	et	Fuchsine crist.	10			peu marqué	bleu violet	violacé	violacé	* .
*	et	Safranine	10	a japonesis a		suffisant, inconstant	pleu	rouge	brunâtre	
*	et	Vert d'iode, Lumière, malachite	10	Section 1		suffisant	*	vert	verdâtre	*
*	et	Vert de méthyle	10	and common		suffisant	*	*	*	glyc.
*	et	Vert Lumière	et	Soudan III	10	suffisant	bleu violet	vert	orangé	baume
Fuchsine crist.	et	Bleu de méthylène	10	4 companies		suffisant, inconstant	rose	pleu	vert	*
Fuchsine phén.	et	*	10			peu marqué	*	bleu violet	violacé	*
Fuchsine crist.	et	Verts d'iode ou	10	The second secon		suffisant, inconstant	*	blen vert	vert	» ou glyc.
Fuchsine S anilin.	et	de méthyle. Bleu de méthylène	10			peu marqué	×	bleu violet	violacé	*

	1e							on glyc.							
glyc.	baume	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	
violacé	orangé	verdâtre	orangé	violacé	orangé	jaune pâle	orangé	orangé		rougeâtre	violet brun	vert	violacé	orangé	
vert violet	brun rouge	vert	*	bleu vert	bleu vif	jaunâtre	gris	orangé		vert	*	bleu vert	bleu violet	vert	
rose	violet	violet rose	*	*	bleuté	rosé	teinté	rouge	a II	*	*	*	rose violet	1	
peu marqué	suffisant	suffisant	suffisant	suffisant	suffisant	peu marqué	peu marqué	suffisant	2.	suffisant	suffisant, peu durable	suffisant	peu marqué, inconstant	suffisant 1	
			10												
			1								າວ			10	
-	1		Soudan III 1			manus ma	2			-	Violet g. am.	***************************************	**************************************	Soudan III 16	2
10	10	10	*	57	25	10	10	10		10	Violet g. am.		10		
Vert de méthyle — —	Chrysoïdine — 10 —	Vert Lumière 10 —	*	Vert malachite 5 —	ıc	10	10	Chrysoïdine — — — —	(Réactif genevois)	Vert Lumière 10 —	Violet g. am.		Bleu de méthylène 10 —	Soudan III	
	et Chrysoïdine — 10 —	et Vert Lumière 10	10 Soudan III	et Vert malachite 5 —	10	_ 10	10		(Réactif genevois)		Violet g. am.	10	et Bleu de méthylène 10 —	et Soudan III	

1 Busnon 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 SnCl<sub>2</sub>), 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 3B, col. acide, diazoïque (solution animon. 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, monoazoique.
- 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.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> 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 lipoïdes, 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 ammoniaque 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).