

# Fixation

Objekttyp: **Chapter**

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

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

Heft 2

PDF erstellt am: **22.07.2024**

## **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.

*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*<sup>1</sup>:

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

<sup>1</sup> 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 glycéro-alcoolique durant quelques mois. Un lavage d'une demi-heure à l'eau courante<sup>1</sup> du matériel conservé dans ce

<sup>1</sup> 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 ( $\text{HgCl}_2$ ) 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 normal<sup>1</sup>. 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).

<sup>1</sup> Si certains tissus sont restés écrasés, on pourra mettre les coupes dans un bain d'ammoniaque (1 partie NH<sub>3</sub> 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*<sup>1</sup>.

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

<sup>1</sup> Les coupes ainsi obtenues auront de 20 à 30  $\mu$ , ce qui est suffisant pour l'observation histologique.