Colorants histologiques divers

Huile pour immersion

HUILE POUR IMMERSION : ce produit destiné uniquement à la microscopie est une préparation contenant des composés organiques, dont le benzoate de benzyle.

Cette huile est nocive en cas d'ingestion. Elle peut être irritante au niveau de la peau et des yeux. Il y a très peu de risques au vu de la petite quantité utilisée. Ne pas évacuer dans les eaux naturelles, les eaux d'égouttage ou le sol.

Quoi qu'il en soit, comme lors de toute séance de mycologie chimique, il convient de se laver correctement les mains en terminant et d'éviter de se frotter les yeux en cours d'étude. Conserver le flacon bien fermé.

On peut aussi utiliser des produits plus « biologiques », comme l'huile de ricin, l'huile de cèdre... de qualité extra pure évidemment !

TOUS LES PRODUITS COLORANTS repris ci-dessous sont au départ des colorants histologiques appliqués à des cellules animales, mortes ou vivantes. Il nous paraît intéressant de connaître leur processus d'action pour envisager de les appliquer d'une manière ou d'une autre dans le domaine de la mycologie.

Quasi tout est encore à expérimenter, mais nous croyons fortement à l'intérêt de la microchimie et de l'usage des substances colorantes pour la mise en évidence de caractères ou de critères de détermination précis.

BLEU DE TOLUIDINE : c'est une coloration de base qui donne aux constituants acides différentes nuances de bleu. Il est métachromatique (bleu à rouge) sur certains constituants cellulaires. A explorer !

CARMIN D'ORTH (AU CARBONATE DE LITHIUM) : c'est un colorant nucléaire rouge, et rapide (temps de coloration : 2 à 5 minutes)

Eau bidistillée :	100 ml
carbonate de lithium à saturation : 13 g/litre à 20° C	2 g
carmin :	5 g

Faire bouillir à petit feu durant 10 à 15 minutes ; refroidir et filtrer ; ajouter 1 g de thymol (ou de phénol) pour la conservation.

CRESYL VIOLET : (ou violet de crésyl) est un colorant du groupe des Oxazines ; il s'avère très intéressant à cause de ses remarquables qualités métachromatiques.

En cytologie animale, il colore le cytoplasme en bleu, la chromatine des noyaux en rouge violet, le collagène en rouge clair, le cartilage en rouge, l'hémoglobine en jaune. Nous pensons qu'il a un avenir prometteur en mycologie pour les tissus végétaux. On peut le laisser agir de 15 minutes à 12 heures, sans crainte de surcoloration.

Ne pas traiter les coupes colorées à l'alcool, puisque c'est un solvant très efficace de ce colorant, qui réduirait vos efforts à néant en quelques secondes.

Il constitue également un excellent colorant vital.

Eau bidistillée :	100 ml
crésyl violet :	1 g

Laisser durant 3 à 4 heures sur l'agitateur magnétique, car l'eau n'est pas le meilleur solvant ; la dilution en beaucoup plus facile dans le méthanol.

JAUNES D'ALIZARINE dont le jaune d'Alizarine et le jaune d'A. rougeâtre (pH de 10,2 à 12,1), dérivent des nitrodiazobenzènes par copulation avec l'acide salicylique. Ce sont des colorants monoazoïques caractérisés par le chromophore azoïque –N=N- dans le cas présent, ce chromophore ne figure qu'une fois dans la molécule). Ce sont des dérivés acides (oxyazoïques) qui sont d'excellents colorants cytoplasmiques, au même titre que l'Orange I & II, l'Orange G, le Ponceau R (ponceau de xylydine), le Jaune de métanile, le Rouge solide (rocelline), le Rouge d'orseille A, l'Azorubine, l'Azophloxine 2G...Ils sont très solubles dans l'eau. Le jaune d'A. est l'acide nitrobenzène-azo-salicylique, de formule $C_{13}H_8N^3NaO_5$.

Ils se préparent en solution à 5 ou 1 % dans l'eau bidistillée.

Eau bidistillée :	100 ml
jaune d'alizarine :	1 g

ORANGE DE METHYLE est encore appelé Orangé III, tropéoline D, hélianthine, ou orangé de diméthylaniline. Acide complexe, de formule brute $C_{14}H_{14}N^3NaO^3S$, il vire du rouge au jaune entre pH 3,1 et pH 4,4. C'est un colorant monoazoïque caractérisé par le chromophore azoïque –N=N-. Dans le cas présent, ce chromophore ne figure qu'une fois dans la molécule. C'est un dérivé basique (amidoazoïque), au même titre que l'Orange IV (tropéoline OO), le Rouge de méthyle, la Chrysoïdine, la Vésuvine (brun de Bismarck)...Ils sont très solubles dans l'eau.

Il se prépare en solution à 1 % dans l'eau bidistillée et sert à l'étude de la réaction du cytoplasme chez les végétaux..

Eau bidistillée :	100 ml
orange de méthyle :	1 g

ROUGE D'ALIZARINE S est une alizarine sulfoconjuguée (dioxyanthraquinose). C'est une oxyquinose. Le groupe quinonine est un chromophore acide très énergétique : c'est donc un colorant acide (pH du rouge d'Alizarine : de 4,6 à 6,3). l'alizarine est le principal colorant de la garance ; c'est une anthraquinone qui se prépare facilement de manière synthétique.

Il se prépare en solution à 5 % dans l'eau bidistillée.

Eau bidistillée :	100 ml

rouge d'alizarine :	5 g

SAFRANINE O : les safranines sont des Azines du groupe des Quinone-imides ; elles possèdent toutes 3 noyaux benzéniques et 4 atomes d'azote ; leur chromophore azoïque leur donne un caractère fortement basique. Celle-ci est un colorant nucléaire rouge, et assez rapide (temps de coloration : 15 à 30 minutes, selon les colorants associés)

Eau bidistillée :	100 ml
Safranine O :	1 g

Conservation assez longue.

VERT JANUS B : encore appelé vert diazine, est un colorant vital ou post-vital basique, monoazoïque. C'est une quinone-imide du groupe des azines. Dans le même groupe, on trouve le Rouge neutre (le principal colorant du vacuome) et ils sont tous deux peu toxiques.

Le vert Janus est le principal colorant du chondriome.

Il se prépare en solution très faible pour la coloration vitale (de 1/4000 à 1/10.000 dans l'eau bidistillée). En coloration post vitale, on l'emploie en solution de 0,33 à 1 %. La coloration est encore meilleure si on fait précéder par une coloration au rouge neutre.

Il convient également pour l'étude des réductions ; dans ce cas, il se dédouble en 2 composés incolores dont l'un redevient rouge par oxydation. La couleur verte n'est plus régénérée.

Il présente les mêmes possibilités que le bleu coton lactophénol, pour l'étude des asques, avec des résultats différents selon l'espèce étudiée (coloration du cytoplasme et mise en évidence de la nasse apicale chez les Loculomycetidae).

Eau bidistillée :	100 ml
vert Janus :	0,5 g

VERT DE MALACHITE : est le chlorure de diamidotriphénylcarbinol et est basique. C'est un triphénylméthane du groupe des rosanilines ; ces colorants n'existent qu'à l'état de sels, car leurs bases (carbinols) sont incolores. C'est un colorant nucléaire, de par son caractère basique, puissant et régressif. Il est parfois appelé vert d'éthyle.

Eau bidistillée :	100 ml
vert malachite :	0,5 g

Le VERT LUMIERE (ou Fast Green, ou vert Acide S) est un dérivé sulfoné du triphénylméthane.

Le VERT DE PRUSSE est un ferricyanure.

Le VERT ALCIAN, ou phtalocyanine, est un colorant basique.

Le VERT d'IODE est un colorant basique de la série des triphénylméthanes.

Le VERT NAPHTOL B est un colorant acide de la série des nitrosoquinones.

VIOLETS DE METHYLE : Ce sont des triphénylméthanes du groupe des rosanilines ; ces colorants n'existent qu'à l'état de sels, car leurs bases (carbinols) sont incolores. Ce sont des colorants basiques puissants. Nous vous indiquons pour information le violet dahlia (monophénylrosaniline) et le violet Hoffmann (triéthylrosaniline) que nous n'utilisons pas.

Citons :

le **VIOLET CRISTAL**, qui renferme 6 groupes méthyle (hexaméthylé)

Il colore les noyaux cellulaires en violet.

Eau bidistillée :	100 ml
Acide acétique glacial :	2 ml
violet cristal :	0,5 g

le **VIOLET DE GENTIANE**, ou méthylrosaniline, est un mélange de chlorhydrates de violets pentaméthylés (violet de méthyle et violet de Paris) et hexaméthylé (violet cristal). Certains auteurs préconisent de n'utiliser que le cristal violet qui est plus pur et donne des colorations plus précises ... à vérifier !

On l'utilise en solution aqueuse ou hydro-alcoolique, en y ajoutant de l'aniline ou du phénol comme accentuateur de coloration.

a/ Violet aniliné de Sterling :

Alcool à 95° :	10 ml
Violet de gentiane :	5 g
Aniline :	2 ml
Eau bidistillée :	88 ml

- dissoudre le violet de gentiane dans l'alcool
- ajouter ensuite l'aniline, puis l'eau

b/ Violet phéniqué :

Alcool à 90° :	10 ml
Violet de gentiane :	1 g
Phénol cristallisé :	2 g
Eau bidistillée :	100 ml

- dissoudre le violet de gentiane dans l'alcool et ajouter petit à petit le phénol : il est impératif de triturer la préparation au mortier (c'est la seule technique de préparation valable pour les colorants phéniqués, selon Langeron)
- quand le mélange est bien homogène, rincer avec les 100 ml d'eau, par petites doses et transférer au fur et à mesure dans un flacon
- laisser reposer 24 heures puis filtrer
- préparé de cette manière, le colorant a un délai de conservation très long

DANGERS : (règle générale)

Tous les colorants sont toxiques par ingestion (ce n'est pas leur destination !) et de manière moindre par contact (laver abondamment dans ce cas). Ils tachent facilement la peau et les vêtements.

Il convient de se laver abondamment les mains après une séance de laboratoire et de porter des gants de chirurgie lors des préparations de produits.

5. CONSERVATION : (règle générale)

Quelques mois à 2 ou 3 ans maximum ; la solution la plus simple consiste à les tester de temps en temps !