

Trypan bleu

1. NATURE DU REACTIF :

Le Trypan bleu (ou Trypan blue, ou bleu trypane) est un excellent colorant microscopique. Son C.I. est 23850. Son nom scientifique n'est pas des plus faciles à mémoriser : 2,7-NAPHTALENEDISULFONIC ACID,3,3'-((3,3'-DIMETHYL(1,1'-BIPHENYL)4,4'-DIYL-)BIS(AZO), BIS (5-AMINO 4-HYDROXY-) TETRASODIUM

Formule brute : $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$

Sa solubilité dans l'eau est de 10 g/Litre ; il est insoluble dans l'éthanol.

Son pH, au point de saturation est de 9,8

Le bleu trypan est un grand colorant anionique du groupe des colorants azoïques.

2. PREPARATION :

En solution aqueuse :

Eau bidistillée :	100 ml
Trypan Blue :	0,2 g

- Agitateur magnétique durant ½ heure
- filtrer

3. UTILISATION :

La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes.

Il a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule en question entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et restera bleue. Cependant, cette molécule étant toxique, elle finit par tuer les cellules qui deviennent alors toutes bleues.

Cette méthode est couramment utilisée lors de numération cellulaire.

On peut également utiliser cette coloration pour visualiser les hyphes de champignons et les Straménopiles (organismes eucaryotes présentant au cours de leur cycle des cellules biflagellées, à deux flagelles de structure différente : un lisse et un plumeux).

Il est traditionnellement utilisé comme composant dans les colorations polychromes comme p. ex. pour la mise en évidence de tissu conjonctif collagène. Le bleu trypan est utilisé comme colorant dans les colorations vitales, en travaillant sur des coupes à la paraffine.

IL EST UTILISE EN HISTOLOGIE POUR REALISER UNE COLORATION TRICHROMIQUE :

(TECHNIQUE PRECONISEE PAR MERCK)

Préparation

1. Solution de jaune de naphtol S

Dissoudre 0,3 g de jaune de naphtol dans 100 ml d'eau distillée et filtrer.

2. Solution de fuchsine acide

Dissoudre 0,2 g de fuchsine acide Certistain® dans 100 ml d'eau distillée et filtrer.

3. Solution de bleu trypan

Dissoudre 0,2 g de bleu trypan dans 100 ml d'eau distillée et filtrer.

4. Solution de coloration

Mélanger 80 ml de solution de jaune de naphtol S, 5 ml de solution de fuchsine acide, 4 ml de solution de bleu trypan et 0,8 ml d'acide chlorhydrique et filtrer.

4. Solution d'hématoxyline de fer selon Weigert

Mélanger dans une proportion 1:1 les solutions A et B d'hématoxyline de fer selon Weigert.

Protocole de coloration

Coloration trichromique

Déparaffiner et réhydrater les coupes de manière habituelle.

Laver à l'eau distillée : 1 min

Colorer dans la solution d'hématoxyline de fer selon Weigert : 5 min

Différencier à l'eau courante : 5 min

Colorer dans la solution de coloration : 10 min

Laver à l'eau distillée

Déshydrater et clarifier dans Ethanol 50 %, 70 % et 96 % : chaque fois 1 min

2 x dans l'éthanol 100 % : chaque fois 1 min

clarifier dans le xylène et monter avec néo-Entellan

Résultat

Noyaux cellulaires bleu noir ; cytoplasmes jaunes ; tissu conjonctif collagène : grandes fibres rouges & petites fibres bleues

4. DANGERS :

Le Trypan bleu pur ou en solution très concentrée est toxique en cas d'ingestion, et irritant pour les muqueuses. Il est donc préférable d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux.

En cas d'inhalation, faire respirer de l'air frais.

En cas de contact avec la peau, laver abondamment. à l'eau.

En cas de contact avec les yeux, rincer abondamment. à l'eau, durant 10 minutes, en maintenant les paupières écartées.

En cas d'ingestion, faire boire beaucoup d'eau et provoquer le vomissement !

Dose létale orale pour l'homme : 6,2 g/kilo ; on le soupçonne d'effet cancérigène.... mais non démontré actuellement !

5. CONSERVATION :

En flacon bien fermé et à l'abri de l'humidité, dans un endroit bien ventilé. A l'état pur, sa manipulation est réservée à des spécialistes.

Stocker dans un endroit assez frais, car il se décompose en cas de fort échauffement. Il n'apprécie pas les acides.