

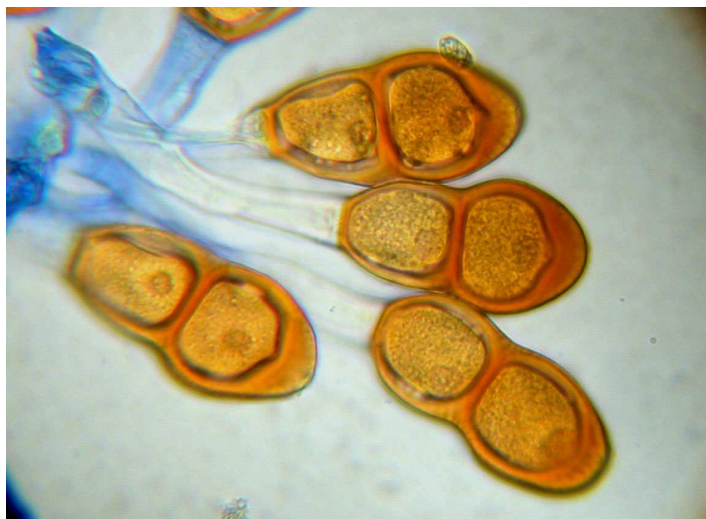
Bleu coton au lactophénol

1. NATURE DU REACTIF :

Le vrai nom du bleu coton est le bleu de méthyle (à ne pas confondre avec le bleu de méthylène – {chlorhydrate de tétraméthylthionine}, dont la base est une base ammonium, qu'on obtient par l'action de l'oxyde d'argent ; et qui est un colorant basique progressif).

Le numéro du *Color Index* (C.I., c'est la référence internationale en matière de colorants) pour le bleu de méthyle est le 42780. On devrait plutôt dire bleus de méthyle, car sous ce nom, sont repris toute une famille de colorants bleus acides qu'il faut impérativement distinguer des bleus basiques. Tous ces bleus acides font partie des triphénylméthanés et dérivent de la triphénylrosaniline (bleu d'aniline) : ce sont des sels de sodium d'acides sulfonés (rosanilines sulfonées).

Son chromophore (région de la molécule qui est principalement responsable de la teinte) est formé d'un atome de carbone qui porte trois cycles benzéniques différemment substitués (c'est-à-dire que certains de leurs atomes d'hydrogène ont été remplacés par divers groupements chimiques). Deux de ces cycles sont liés au carbone central par une liaison simple, le troisième par une liaison double. Il est parfois appelé également C4B.



Téleosporos d'une rouille sur *Artemisia vulgaris* (photo Marcel Lecomte)

Le bleu de méthyle est un colorant acide ; il résulte de cet état de choses qu'il a une affinité particulière pour les structures à caractère basique. C'est le colorant le plus adapté à la mycologie générale parce qu'il est spécifique de la callose, qui est un des principaux constituants de la paroi des hyphes de champignons.

Il est aussi appelé bleu lactique de Amann, ou encore bleu de Guegen par les orchidophiles.

Citons aussi dans le même groupe la **fuchsine acide** (rubine acide, Magenta S), le

vert lumière (Lichtgrün ou vert acide S – c'est un sel de sodium de l'acide trisulfodiméthylidibenzylidiamidotriphénylcarbinol...ouf !), le **bleu à l'eau**, les **bleus 1 et 2 de Saint-Denis**, le **bleu de diphénylamine**, le **bleu de Chine**, le **bleu naphtyle**, le **bleu d'isamine**...

2. PREPARATION :

Bleu coton au lactophénol :

Phénol en cristaux :	20 g
Acide lactique (commercial concentré) :	20 g
Glycérine :	40 g
Eau bidistillée :	20 g
Bleu de méthyle :	0,5 g

Les produits doivent être dissous dans l'ordre indiqué et en agitant modérément à l'aide d'une baguette de verre. La dissolution du bleu de méthyle peut prendre un certain temps (laisser reposer 24 h puis agiter à nouveau). Il est impossible de filtrer le mélange, qui est trop épais.

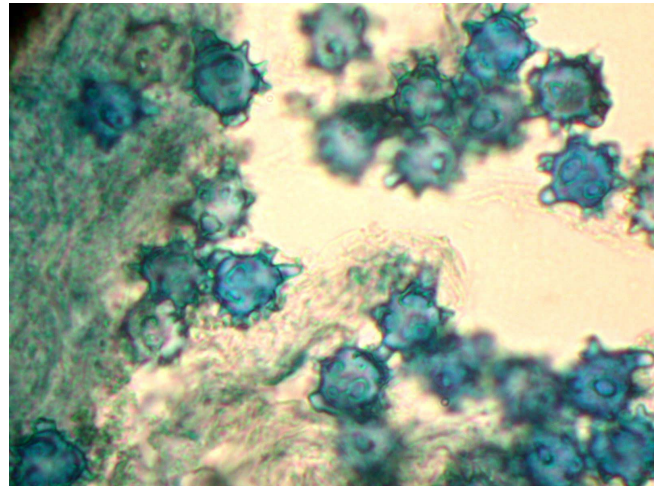
Si vous voulez filtrer, il faut effectuer cette opération avant d'introduire la glycérine dans la solution. Placer sur l'agitateur magnétique durant 2 à 6 heures.

Bleu coton lactique :

Eau bidistillée :	30 g
Acide lactique (commercial concentré) :	20 g
Glycérine :	50 g
Bleu de méthyle :	0,5 g

Chlamydozoïdes (forme conidienne) chez *Nyctalis asterophora*
(photo Marcel Lecomte)

Même technique de préparation que pour le précédent, avec cet avantage de ne plus être incommodé par l'odeur forte et dérangeante du phénol. Celui-ci joue un rôle antiseptique, intéressant pour les préparations définitives, mais pour des observations à court terme, nous trouvons beaucoup d'avantages au Bleu Coton lactique seul. Le phénol était appelé autrefois acide phénique car il est légèrement acide, il renforce donc l'acidité de l'acide lactique. Le phénol est caustique et peut dissoudre certains tissus, c'est probablement pour cela qu'il a été rajouté (rôle de "mordant" et d'"éclaircissant") avec en plus un rôle tampon.



Une solution tampon est une solution faiblement acide ou alcaline, contenant soit un acide faible associé à un de ses sels de base forte, soit une base faible associée à un de ses sels d'acide fort. Elle a la propriété de pouvoir être diluée sans subir une grande variation de son pH.

Citons les liquides biologiques, le liquide physiologique (solution de chlorure de sodium), ou le bicarbonate de soude (qui assure la stabilité de l'équilibre acide-base du sang) ; plus complexes de composition sont la solution de Ringer, la solution de Locke ou la solution de Tyrode ; les milieux de culture sont des solutions tampon.

Pour des recherches très délicates, les scientifiques sont amenés à utiliser des solutions tampon naturelles, comme le sérum sanguin, le liquide amniotique ou l'humeur aqueuse des yeux.

Bleu coton aqueux :

Eau bidistillée :	100 ml
Bleu de méthyle :	1 g
agent mouillant (Sodium Dodécyl Sulfate, dit SDS) :	0,5 g

Bleu coton aqueux acidifié à l'acide acétique :

Eau bidistillée :	100 ml
Bleu de méthyle :	1 g
acide acétique glacial :	2 cm ³
agent mouillant (Sodium Dodécyl Sulfate, dit SDS) :	0,5 g

Bleu coton en solution alcoolique :

alcool éthylique à 90° :	100 ml
--------------------------	--------

Bleu méthyle :	2 g
agent mouillant (Sodium Dodécyl Sulfate, dit SDS) :	0,5 g
eau bidistillée :	100 ml

Pour ces 3 dernières solutions, mélanger longuement (ou laisser 2 heures sur l'agitateur magnétique) et filtrer.

Bleu coton Soudan III au lactophénol :

Phénol en cristaux :	20 g
Acide lactique (commercial concentré) :	20 g
Eau bidistillée :	20 g

Préparer le lactophénol à l'agitateur magnétique, jusqu'à obtention d'une solution homogène et transparente (1 à 2 heures).

Soudan III :	1 g
--------------	-----

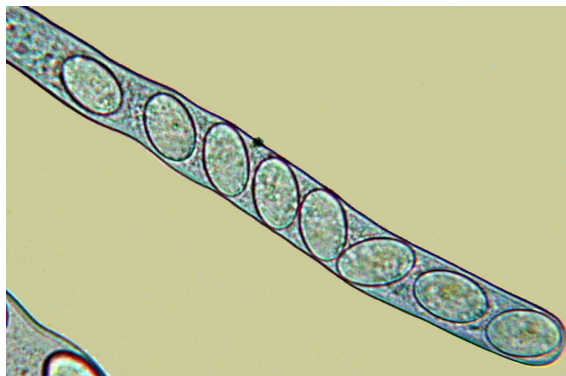
- Ajouter le Soudan III à saturation
- Couvrir d'un verre de montre
- Passer à l'agitateur magnétique durant une heure
- Porter à ébullition douce quelques minutes
- Laisser refroidir et filtrer.

Glycérine :	40 g
-------------	------

- Ajouter la glycérine en dernier lieu

3. UTILISATION :

Le bleu de méthyle au lactophénol est un bon milieu d'observation pour les champignons. Il ne se fixe pas électivement sur certaines cellules ; tout en colorant surtout le contenu cellulaire, il a la particularité de teinter la paroi de la plupart des hyphes, ce qui en fait un colorant d'usage général. Néanmoins, il met particulièrement bien en évidence les ornements des spores chez les Ascomycètes (chez *Scutellinia*, *Nectria*, *Epichloe*, *Sphaerosporella* par exemple). Il colore très bien les Ustilaginées. Romagnesi a montré qu'il colore bien les cystides des *Nematoloma*.



Asque avec ascospores chez *Verpa conica* (photo Françoise Draye)

Nous préconisons la démarche suivante pour le traitement des coupes :

mordantage à l'eau de Javel durant quelques minutes

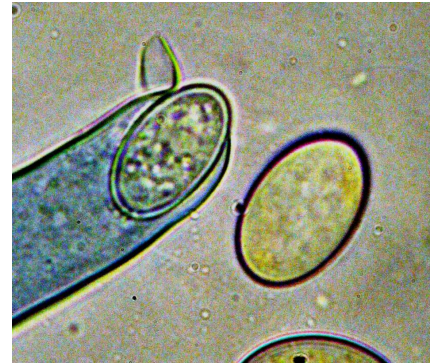
lavage à l'eau bidistillée

coloration dans le bleu coton lactophénol (quelques minutes) et examen

D'autre part, c'est aussi un réactif microchimique à proprement parler, en ce sens qu'on peut dire de certaines structures qu'elles sont **cyanophiles** si elles prennent le bleu de méthyle avec une intensité spectaculaire, ce qui est relativement courant. C'est le cas pour les verrues des spores de *Lepista* par exemple, qui se détachent nettement en bleu foncé sur un fond quasi incolore.

Asque operculé avec ascospores, chez *Verpa conica* (photo Françoise Draye)

Chez *Rhodocybe* par contre, seul le feuillet superficiel de la spore fixe le bleu coton et celle-ci apparaît complètement colorée en bleu, sans différenciation marquée pour les verrues sporiques. En milieu acide, les spores de *Lepiota* sl. fixent également très bien les diverses préparations de bleu de méthyle ; cette coloration peut être spectaculaire jusqu'à l'opacité chez certaines espèces, mais il est toujours possible de la réduire en exposant la préparation aux vapeurs d'ammoniaque.



Pour avoir les meilleures préparations possibles, on a intérêt à colorer les éléments à observer dans ce réactif, mais à les laver et à les monter dans le lactophénol pur. Le contraste s'en trouve augmenté, ce qui est très utile pour la photomicrographie. Le lactophénol a deux avantages : son indice de réfraction élevé ($n = 1,44$) rend les préparations très transparentes, ce qui facilite leur interprétation (toutefois, le chloral-lactophénol lui est encore supérieur à ce point de vue). D'autre part, sa viscosité importante permet de conserver les préparations quelques jours, voire quelques semaines sans altération : il permet la réalisation de préparations semi-permanentes. Mais cette viscosité est également un désavantage, car la dissociation est très difficile dans ce réactif (le bleu de méthyle acétique lui est supérieur à ce point de vue).

Concrètement, il n'est donc vraiment intéressant que pour l'observation des spores et des hyphes de champignons frais et bien mous. Le bleu de méthyle est aussi utilisé en solution acétique ou lactique, mais, d'une manière générale, et surtout par habitude et tradition, la solution dans le lactophénol leur est préférée. Un chauffage modéré facilite généralement la dissociation, en rendant le milieu plus fluide. Mais chauffer déforme souvent les hyphes et provoque l'éclatement de certaines spores. Le bleu coton lactique à chaud, s'avère très intéressant pour l'étude du genre *Scutellinia* et ses voisins.



Asque avec ascospores ailées, chez *Aleuria bicucullata* (photo Marcel Lecomte)

R. KUHNER : “ Chez certains *Panaeolus*, il permet de mettre en évidence la présence de pleurocystides différentes des poils marginaux : ce sont des chrysocystides qui se repèrent facilement sur des exsiccata regonflés à l'ammoniaque, car elles présentent une grosse inclusion réfringente et se colorent beaucoup plus vivement au bleu coton que les basides ”...

Christian LECHAT : “ Il s'avère très utile pour l'étude des asques. Ce produit colore le cytoplasme et fait ressortir la nasse apicale

chez les *Loculomycetidae*. Il est très efficace également pour les préparations permanentes. ... ”

Guillaume EYSSARTIER : le contenu (deutéoplasme) des chrysocystides est naturellement réfringent, et devient jaune avec l'âge et pas seulement lors d'un montage dans un milieu alcalin. Il possède aussi une forte affinité pour le bleu Coton.

Bernard LAGRELLE : Son utilisation est intéressante pour l'isolation du champignon symbiotique des racines d'orchidées ; on peut faire germer et pousser asymbiotiquement sur milieu sucré

stérile des graines d'orchidées, mais c'est sans issue si ce n'est pas réalisé en présence de leur symbiote.

La méthode la plus « simple » pour trouver le symbiote en question est de prendre une racine d'orchidée, de la fendre au scalpel, d'y verser une goutte de ce fameux bleu pour localiser les zones mycorrhizées, et de mettre en culture un fragment prélevé. Voici un lien expliquant la technique d'isolation du symbiote et son utilisation ultérieure pour le semis d'orchidées :

<http://pagesperso-orange.fr/bernard.lagrelle/AA%20multiplication/introduction.htm>

4. DANGERS :

Le lactophénol est un réactif relativement dangereux par le phénol qu'il contient, qui est toxique et corrosif, ainsi que par l'acide lactique, qui est irritant. Il est donc préférable d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux. En cas de contact, se laver immédiatement. D'autre part, le bleu coton, comme son nom l'indique, se fixe très bien sur le coton (et sur d'autres textiles), où il provoque des taches indélébiles.

Lors de la préparation du réactif, il est impératif de travailler sous hotte, sous peine d'être sujet à de violents maux de tête dus à l'odeur du phénol pur !

5. CONSERVATION :

Le lactophénol contient du phénol, qui est un dérivé du benzène. Sa formule compte trois liaisons doubles ; il est donc sensible aux radiations ultraviolettes. Quant au bleu de méthyle, s'il est bleu, c'est parce qu'il absorbe les autres couleurs de la lumière visible grâce à ses innombrables liaisons doubles entre atomes. Cette absorption de lumière est susceptible, à long terme, de détruire le colorant. Il faut dès lors conserver le bleu coton au lactophénol à l'obscurité, dans un flacon en verre (le plastique pourrait être attaqué) ou en PVC inerte, fermé hermétiquement (risque d'altération par l'oxygène de l'air et de dilution par absorption de vapeur d'eau).