

Un colorant trop peu utilisé : le bleu de crésyl

Marcel Lecomte

UN PEU DE CHIMIE

Ce colorant provient des hydrocarbures extraits du goudron de houille et dérive du benzène. Il fait partie du groupe des quinone-imides, (qui contiennent des indophénols et des indamides), et du sous-groupe des oxazines. Les oxazines sont des colorants dans lesquels 2 noyaux benzéniques sont unis par un anneau fermé comprenant un atome d'oxygène, un atome d'azote et 4 atomes de carbone (thionium). Ils dérivent de la thiodiphénylamine.

Le bleu de crésyl est moins toxique que son voisin, le bleu du Nil ou bleu de Nile. Les sels de ces deux colorants très semblables sont bleus, tandis que leur base est rouge. La solution alcoolique est donc d'un bleu pur tandis que la solution aqueuse est violacée ; en effet, par suite de la dissociation, la teinte bleue du sel et la couleur rouge de la base se superposent.

PREPARATION

Nous rappelons que la manipulation de produits chimiques purs demande des précautions importantes, notamment au niveau respiratoire : utilisation impérative d'une hotte aspirante ; la bonne cohésion d'un colorant justifie aussi l'utilisation d'un agitateur magnétique.

La solution aqueuse :

Eau bidistillée :	100 cc
Bleu de crésyl :	1 g
agent mouillant : Sodium Dodécyl Sulfate	0,5 g

Nous ne la conseillons pas, car elle est peu stable, se dégrade de manière aléatoire et est donc peu fiable.

La solution alcoolique :

alcool éthylique à 90° :	100 cc
Bleu de crésyl :	2 g
agent mouillant : Sodium Dodécyl Sulfate	0,5 g
eau bidistillée :	100 cc

La formule de Cléménçon (1972) :

éthanol à 96° :	27 cc
Bleu de crésyl :	0,5 g
eau bidistillée :	55,5 cc
agent mouillant : Sodium Dodécyl Sulfate	0,5 g
glycérine pure :	17 cc

Mélanger longuement (agitateur magnétique durant 6 heures) et filtrer.

UTILISATION

Au départ, c'est un colorant orthochromatique (le bleu colore en bleu), mais lors d'applications particulières, et sous l'action de la chaleur, il devient **métachromatique**, c'est-à-dire qu'il colore différents éléments de la cellule en nuances différentes (le préfixe méta- implique une idée de changement).

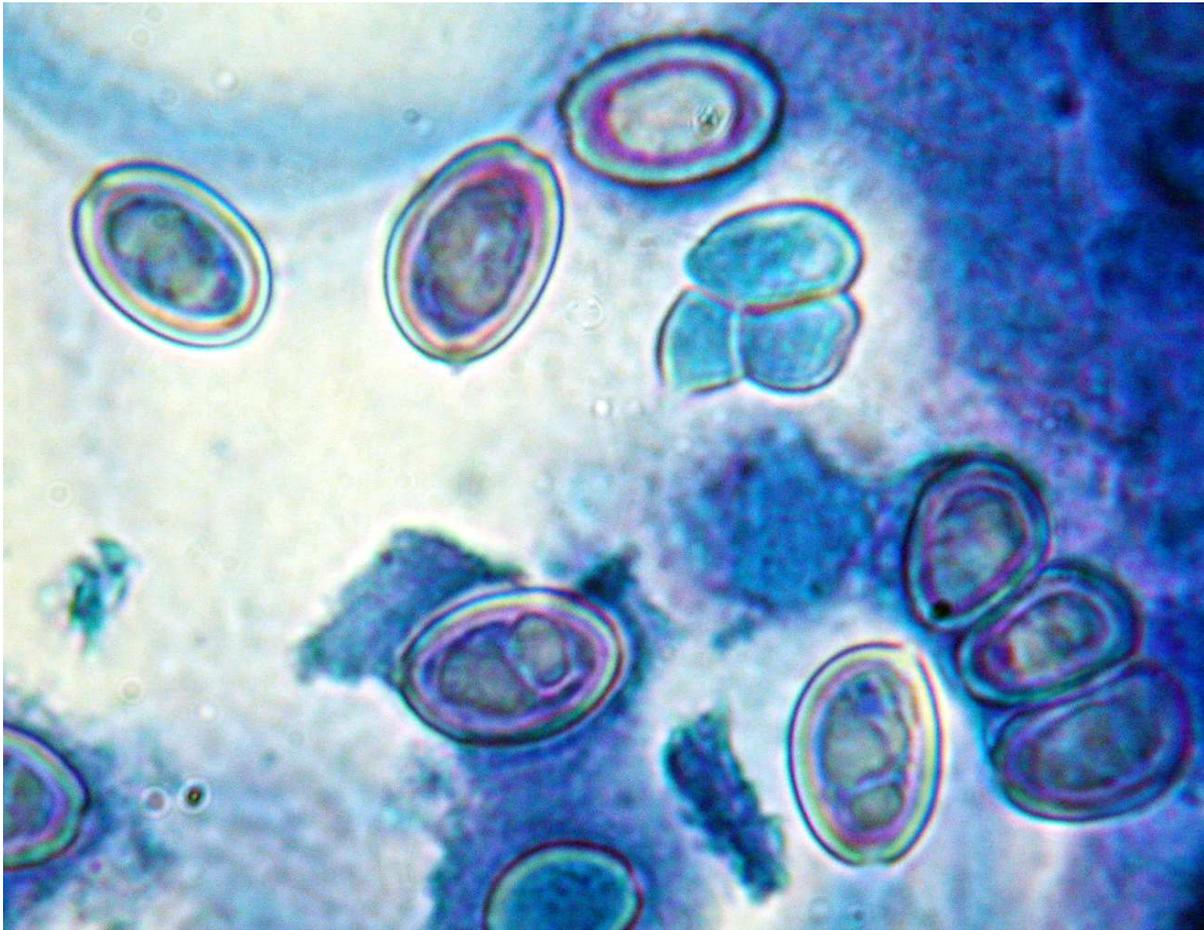
Au départ, le bleu de crésyl est un **colorant vital**, c'est-à-dire qu'il colore les tissus et les éléments cellulaires d'un être vivant (animal, plante, champignon), sans exercer d'action nocive ou létale immédiate. Dans ce cas, la dilution est très grande : de l'ordre de 1/10.000. Une coloration vitale n'est pas une teinture, mais une accumulation de colorant dans des parties bien spéciales de la cellule ; c'est un colorant basique des vacuoles, qui affichent une coloration uniforme ou montrent une inclusion plus ou moins importante de granulations fortement teintées.

En solution aqueuse concentrée, il colore le protoplasme des cellules en bleu foncé et les tue.

Pour la détermination d'un genre ou d'une espèce mycologique, il faut accorder beaucoup d'importance à la coloration prise par la paroi cellulaire ; elle peut réagir de manières différentes :

- elle ne se colore pas,
- elle se colore en bleu ou violet (couleurs normales du bleu de crésyl) : on parle alors d'**orthochromasie** ou de **coloration orthochromatique**,

- elle se colore en pourpre ou rouge (couleurs différentes du bleu de crésyl) : on parle alors de **métachromasie** ou de **coloration métachromatique**.



Réaction métachromatique sur les spores d'une *Macrolépiote*

La littérature spécialisée apporte beaucoup de renseignements sur ce sujet :

POUR ROBERT KÜHNER

Cela permet de mettre remarquablement en évidence l'endospore de la paroi sporique des *Macrolepiota* & *Leucocoprinae*, qui se colore de manière élective en rouge pourpre.

- Écraser un fragment de tissu dans une grosse goutte de bleu de crésyl entre deux lames de verre.
- Enlever une des lames et verser sur le fragment dissocié une nouvelle goutte de bleu.
- Laisser agir 10 minutes et observer à la lumière du jour (afin de bien saisir les nuances de violet qui paraissent plus rouges avec une lumière artificielle).
- A la loupe, on peut déjà reconnaître une réaction métachromatique, mais le contrôle microscopique est indispensable, à cause de la superposition des teintes.

Le même auteur a également démontré que le bleu de crésyl colore de manière caractéristique les enclaves ou exsudats lipidiques :

- colorer la préparation dans une solution aqueuse de bleu de crésyl,
- placer ensuite la préparation dans une goutte d'ammoniaque et observer,
- les lipides libres se colorent en jaune doré caractéristique tandis que la préparation se décolore et se salit.

SELON BART BUYCK, le spécialiste des Russules mondiales : « *En solution alcoolique, il est devenu pour moi un réactif de routine, permettant souvent une observation de qualité supérieure à celle dans le rouge Congo ou d'autres réactifs pour pas mal de russules. Toutes mes descriptions publiées depuis 1990 mentionnent systématiquement la coloration du revêtement dans le bleu de crésyl, mais il n'y a plus eu d'article portant uniquement sur l'importance du bleu de crésyl dans les russules. En Europe, le bleu de crésyl est surtout utile pour l'observation des incrustations sur les hyphes (primordiales ou autres) et la reconnaissance du groupe de cyanoxantha (dans les rares cas où on aurait des doutes sur le terrain). L'intense coloration métachromatique dans*

ce dernier groupe ne trouve son équivalent que dans certains Foetentinae, moléculairement les espèces les plus proches de cyanoxantha ».

CHRISTIAN DAGRON (†) A MIS AU POINT UNE TECHNIQUE très élaborée de double coloration pour les pileocystides des scalps de russules : c'est long mais cela donne des résultats extraordinaires. Voici la marche à suivre, en tenant compte qu'entre chaque étape, il est impératif de laver à l'eau :

- + placer le scalp durant 15 minutes dans l'ammoniaque
- + le passer ensuite dans l'eau de Javel commerciale durant 15 minutes
- + 4 heures minimum dans le rouge Congo concentré, pour assurer la saturation des cloisons des cystides
- + 2 à 15 minutes dans le bleu de crésyl, selon le niveau de coloration souhaité

ECHANGE DE CORRESPONDANCE AVEC JEAN LACHAPPELLE (†), qui a réalisé des expériences de mise en évidence des pigments et des incrustations pariétales qu'ils occasionnent : les résultats sont spectaculaires en utilisant la solution alcoolique recommandée par Cléménçon.

Le bleu de crésyl révèle les caractères des dermatocystides et des laticifères des russules ; dans ce dernier genre, il révèle aussi les incrustations des hyphes primordiales et d'autres cellules.

Les pigments pariétaux des hyphes du pileipellis de *Tricholoma acerbum* apparaissent - pour reprendre l'expression d'A. Marchand - comme des épines sur une tige de ronce !

Les incrustations des hyphes cuticulaires d'*Alnicola scolecina* sont remarquablement visibles.

Les pigments vacuolaires des hyphes du pileipellis de *Lepiota boudieri* apparaissent comme des billes franchement colorées dans un sac tubulaire.

Les premières observations sont prometteuses. Il faudrait inciter l'un ou l'autre mycologue intéressé à faire de telles expériences de son côté.

COMMENTAIRES ET REMARQUES DIVERS

« Le genre *Macrolepiota* et les *Leucocoprineae* présentent une endospore métachromatique (rouge-violacé dans le bleu de crésyl) et un pore germinatif proéminent. Cependant, les *Lepioteae* (dont fait partie le genre *Lepiota*) ne possèdent ni endospore métachromatique, ni pore germinatif nettement marqué » (Philippe Dufour).

« Il est possible de déceler une réaction métachromatique sur les spores de *Leucoagaricus macrorrhizus* en combinant avec un traitement préalable à NH_4OH (ammoniaque) portée à l'ébullition, en chauffant la préparation. La réaction métachromatique est bien visible dans ces conditions » (Serge Poumarat).

« Le bleu de crésyl fait apparaître une gangue métachromatique chez certains *Pluteus* » (Guillaume Eyssartier).

OBSERVATIONS PERSONNELLES

Un bain de 60 sec. dans le bleu de crésyl selon Cléménçon donne d'excellents résultats sur *Morchella rotunda*, avec les asques colorés en bleu clair et les ascospores bien visibles, certaines fixant vivement le bleu ; on distingue nettement sur certaines spores de fines gouttelettes externes, agglutinées aux 2 pôles. Pas de métachromasie au niveau de la paroi (mais cela existe-t-il chez les Ascomycètes ?)

Le bleu de crésyl selon Cléménçon, appliqué durant 2 minutes, s'avère excellent pour différencier le contenu du cytoplasme des spores chez *Mitrula paludosa* ; mais le résultat est médiocre au niveau des asques et des paraphyses. Il faut noter que ce colorant est très efficace sur le cytoplasme des algues filamenteuses, dont j'ai trouvé des débris dans ma préparation, ce qui n'est pas surprenant puisque ce champignon vit dans des lieux très humides et souvent même dans l'eau.

En faible solution aqueuse (1/200 à 1/500), il sert à colorer le corps sporal des *Orbillia*, dont l'observation est obligatoire pour l'identification (à plus forte concentration, ou dans une solution alcoolique, la cellule est tuée).

Avec les cystides des Lactaires de la section *Vollemi*, on a une réaction orthochromatique.

DANGERS

Sous sa forme pure, cristalline, le bleu de crésyl est toxique (irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau). En solution, il est peu toxique per os (par voie orale) et sans grand danger par contact (mais il provoque des taches persistantes sur les tissus, les vêtements et sur les mains). En cas de contact avec les yeux, laver abondamment et à grande eau. Il se conserve 2 à 5 ans en flacon bien fermé.