

Bleu de crésyl

1. NATURE DU COLORANT :

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. 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.

2. PRÉPARATION :

a/ **en solution aqueuse :**

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

b/ **en solution alcoolique :**

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

c/ **selon Clémençon (1972) :**

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

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

3. UTILISATION :

C'est un **colorant métachromatique**, c'est-à-dire qu'il colore différents éléments de la cellule en nuances différentes (le préfixe méta- implique une idée de changement).

→ la coloration est différente de celle du colorant : paroi colorée en rouge avec le bleu de crésyl.

On peut travailler sur des exsiccata ou sur du matériel frais.

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 ou plante s.lato), 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.

Sur le plan de la systématique, 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**.

Voici une technique d'observation recommandée par Robert KÜHNER :

- 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)
- à la loupe, on peut déjà reconnaître une réaction métachromatique, mais le contrôle microscopique est indispensable, à cause de la superposition des teintes.

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

Robert KÜHNER a également démontré que le bleu de crésyl colore également de manière caractéristique les enclaves ou exsudats lipidiques :

- colorer la préparation dans un 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

Je vous livre maintenant des considérations pratiques émises par Bart BUYCK,

(14/12/2001, Forum de Mycologia Europaea), 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*. ”

Philippe DUFOUR : “ Le genre *Macrolepiota* et les *Leucocoprineae* présentent une endospore (paroi de la spore) 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 d'endospore métachromatique, ni de pore germinatif nettement marqué. ”

Serge POUMARAT : “ Il est possible de déceler réaction métachromatique sur les spores de *Leucoagaricus machrorizus* en combinant avec un traitement préalable à NH₄OH (ammoniaque) portée à l'ébullition (en chauffant la préparation). La réaction métachromatique est bien visible dans ces conditions. ”

DAGRON a mis au point une technique très élaborée de double coloration pour les piléocystides 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

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

Notes de Jean LACHAPELLE, 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 Clémentçon.

- 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 de *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.

REMARQUES DIVERSES :

- le bleu de crésyl fait apparaître une gangue métachromatique chez certains *Pluteus* (Guillaume EYSSARTIER)
- bleu de crésyl selon Clémentçon, 60 sec. → excellents résultats sur *Morchella rotunda*, avec asques en bleu clair et spores 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 ?) (Marcel LECOMTE)
- bleu de crésyl selon Clémentçon, 2 minutes → excellent résultat pour différencier le contenu du cytoplasme des spores chez *Mitridula paludosa* ; résultat médiocre au niveau des asques et hyphes. Il faut noter que ce colorant est très efficace sur le cy-

toplasme 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 même dans l'eau. (Marcel LECOMTE)

- en solution aqueuse, il sert à colorer le corps sporal des *Orbilina*, sinon la cellule est tuée et l'observation du corps sporal est obligatoire pour l'identification.

4. DANGERS :

Sous sa forme pure, il 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.

5. CONSERVATION :

Il se conserve 1 à 2 ans en flacon bien fermé.