

Noir de chlorazol E ou Azo Black

1. NATURE DU REACTIF :

Conditionné sous forme de poudre noire.

Il fait partie des colorants polyazoïques, parce qu'il possède deux chromophores (région de la molécule qui est principalement responsable de la teinte) de type azoïque, c'est-à-dire formés chacun de deux atomes d'azote doublement liés, et diversement substitués. On trouve dans le même groupe les Soudan III & IV, le Rouge liposoluble orangé, le noir Soudan B, le Ponceau bleuâtre, l'Orseiline bleutée, le bleu Chicago, le bleu Evans, le brun Bismarck Y, le rouge Congo, le Rouge Trypan, la Benzopurpurine, le Pourpre brillant R, le Rouge vital, le bleu Azo, le bleu Trypan et le rouge Sirius. On l'appelle aussi Azo Black ou Renol Black G, ou encore Noir Erié ou Noir formique.

2. PREPARATION :

En solution aqueuse

Azo Black :	1 g
eau bidistillée :	→ 100 cc

En solution alcoolique

Azo black	0,5 g
Ethanol à 95°	60 cc
Eau bidistillée	40 cc

Utiliser l'agitateur magnétique et filtrer !

On peut judicieusement ajouter à la solution aqueuse un agent tensioactif, comme le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), à raison de 0,5 g/100 cc.

3. UTILISATION :

C'est un colorant général du noyau et du cytoplasme, en histologie animale et végétale. Il est de nature acide, c'est-à-dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques.

Il est utilisé depuis 1937 en histologie végétale (Cannon, H.G, Nature, 139, 549) et utilisé pour la coloration spécifique des éosinophiles, pour l'observation au microscope. (Ce réactif et son mode d'utilisation ont été décrits par M. Piette, Ann. Biol. Clin. 1961, 19, 729-734 et K.Lawrence, Am. J. Clin. Pathol. 1981, 76, 810-812.).

Il est aussi utilisé pour le comptage et la discrimination de sous-populations leucocytaires, lors de l'analyse de formules sanguines. Il faut alors utiliser de préférence une concentration de Noir chlorazol inférieure à 100 mg/l. Dans ces conditions, les éosinophiles sont nettement colorés et, en outre, les autres granulocytes sont fixés et clairement discriminés. Une légère coloration de toutes les populations leucocytaires apparaît mais elle s'efface si on prolonge la durée de réaction.

Une nouvelle technique de coloration utilisant le noir de chlorazol E a été mise au point afin de révéler, à partir de racines éclaircies, les entités fongiques appartenant aux endomycorhizes à vésicules et arbuscules. Lors d'une étude comparée, le noir de chlorazol E confronté aux autres colorants

d'usages (fuchsine acide, bleu de trypan, bleu d'aniline) s'est franchement distingué en montrant plus clairement les détails structuraux des arbuscules et des hyphes internes. Cette procédure d'éclaircir et de colorer les racines, jumelée avec la microscopie à contraste interférentiel (Nomarski) a permis de révéler avec plus de précision la morphologie des arbuscules par rapport aux techniques employées auparavant. Les échantillons provenant du champ et traités suivant la présente technique de coloration ont aussi donné de bons résultats. De plus, ce nouveau procédé devrait également faciliter les observations des racines hôtes au cours du processus de colonisation par les champignons endomycorrhiziens. (A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae, M. C. Brundrett, Y. Piché, and R. L. Peterson)

Je l'utilise pour la mise en évidence des filaments mycéliens dans les squames cutanées des prélèvements que nous analysons au Laboratoire de Mycologie médicale. (Echange de mail avec le Dr. C Schneider, Site de Lépine Mycologie-parasitologie, à Montpellier)

Après dissociation des squames et fragments d'ongles dans la potasse aqueuse à 30 p. 100 (10 % pour des fragments de peau) ou dans une solution de noir chlorazol, entre lame et lamelle, l'examen direct permet de visualiser les filaments septés, réguliers d'un dermatophyte, les filaments septés plus grossiers et irréguliers d'une moisissure, formant des vésicules, ou les pseudofilaments et les blastospores d'un *Candida* (Examen mycologique en dermatologie, Ann Dermatol Venereol 2005;132:8S89-104)

On l'utilise aussi pour la coloration vitale des colonies de staphylocoques, même s'il ne permet de différencier que quelques sérotypes (Coloration vitale des colonies de staphylocoques : étude de quelques colorants et de quelques sucres, par Bonifas, Demierre et Ribero, Path. Microbiol. 38 : 35 (1972)

Chez certains Ascomycètes Pyrénomycètes ou Discomycètes, il permet de colorer les composés chitinoïdes, au même titre que le rouge Congo (en solution aqueuse) ou l'encre Waterman (noire ou bleu-noir) (Remarques sur les parois, l'appareil apical et les réserves nutritives des asques, par Marius Chadefaud, Osterr.Bot. Z., 116, 181-202 (1969)

Utilisé par les entomologistes lépidoptéristes, notamment pour les préparations des genitalia ; ce produit est bien meilleur pour cela que toute les fuschines.

MÉTHODE DE PRÉPARATION DES GÉNITALIA DE PAPILLONS (technique décrite par Bernard Landry)

Matériel nécessaire :

- Deux paires de pinces pointues, ultra-fines
- Un pinceau fin ou une plume de bécassine montée sur un manche pour enlever les écailles des abdomens et des pièces génitales disséquées
- Un pinceau qui sera affecté à l'immersion dans le propanol et l'essence d'euparal uniquement
- Fines épingles entomologiques (minuties) collées à l'extrémité de cure-dents, ou de manches plus longs, et courbées à leur extrémité
- Pastilles d'hydroxide de potassium ou de sodium (attention au dangereux effet caustique de ces composés chimiques)
- Seringue 5 cc et aiguilles de dimensions variables coupées et élimées à l'extrémité pour les rendre non-coupantes
- Ethanol 30%, 70% et 95%
- Teintures : noir de chlorazol et orange G (ou mercurochrome)
- Petits contenants de verre à bords minces pour la dissection
- Propanol pur
- Euparal
- Lames, lamelles et étiquettes de lames
- Plateau de carton sur lequel est dessiné le contour d'une lame, avec un X au milieu, pour indiquer l'endroit où sera mise la résine de fixation (euparal)

Utile mais non-essentiel :

- Paire de pinces courbées
- Couteau ou ciseaux extra-fins (de dissection ou de chirurgien)
- Essence d'euparal

-Acide lactique ou glycérine

Méthode de dissection

Pour commencer il faut séparer l'abdomen du papillon du reste du corps en le soulevant délicatement par en-dessous avec une paire de pinces, courbées de préférence. Ce faisant, si on s'aperçoit que le spécimen va se briser entre le méso- et le métathorax, il convient alors d'insérer les pinces fermées entre la base de l'abdomen et la base des pattes postérieures et d'ouvrir les pinces afin de séparer l'abdomen. Si malgré tout des bris surviennent, les pattes brisées peuvent être placées dans une capsule de gélatine piquée sur l'épingle du spécimen, ou si le métathorax s'est décollé, on peut le recoller avec de la colle blanche.

Recommandation No. 1 : *Si des individus provenant d'un élevage doivent être disséqués, il est essentiel de les laisser vivre au moins 24 heures avant de les tuer, afin que leur chitine soit complètement durcie et que leurs graisses soient complètement métabolisées.*

La deuxième étape consiste à faire macérer l'abdomen dans une solution aqueuse de potasse à 10-20% d'hydroxyde de potassium (ou de sodium). L'abdomen peut être laissé dans cette solution toute une nuit ou peut être placé dans un bain-marie pour une période variant de 1 à 15 minutes, dépendant de la concentration de la solution, de sa chaleur et de la grosseur de l'abdomen (un abdomen de *Catocala* prenant plus de temps à macérer qu'un abdomen de *Coleophora*). Une fois la macération complétée, le contenu de l'abdomen doit être repoussé à l'extérieur, par l'extrémité antérieure, à l'aide du pinceau, et les écailles sur l'abdomen doivent être enlevées. Ces opérations s'effectuent généralement dans l'éthanol à 30%. Une fois l'abdomen partiellement nettoyé, les génitalia doivent être séparés de l'abdomen en déchirant ou en coupant la membrane qui relie les deux, généralement à l'extrémité du huitième segment abdominal chez les mâles et du sixième ou septième chez les femelles. Il est alors temps de déplacer les parties macérées dans un nouveau bain d'éthanol à 30%, si nécessaire, afin d'y voir clair et de compléter le nettoyage de l'abdomen et des génitalia. Il faut s'assurer que toute écaille, bout de tuyau, poussière, ou bulle de graisse soit enlevé de l'intérieur de l'abdomen afin de faciliter l'examen des pièces et leur illustration, si nécessaire. On peut effectuer le nettoyage de l'intérieur de l'abdomen avec une seringue remplie d'éthanol à 30% et finir avec les pinces et les minuties à l'extrémité courbée.

Recommandation No. 2 : *Il faut toujours travailler avec des contenants, des instruments et des liquides exempts de saletés ou de poussières et s'assurer d'un bon entreposage des instruments et contenants à dissection, à l'abri des poussières, entre chaque utilisation.*

La norme internationale consiste à monter entre lame et lamelle toute dissection de papillon. Il est toutefois possible de conserver des dissections durant de courtes périodes dans une capsule de plastique contenant acide lactique ou glycérine, qu'on prendra soin d'enfiler sur l'aiguille du spécimen disséqué. Pour effectuer un montage final de ces dissections préservées dans l'acide lactique ou la glycérine, il faut les laver de toutes traces de ces substances dans un (pour l'acide lactique) ou plusieurs (pour la glycérine) bains d'éthanol à 30%. Il faut noter que l'acide lactique réagit fortement avec le bouchon de caoutchouc de certaines capsules de plastique, ce qui peut compromettre l'intégrité des pièces génitales.

Le nettoyage complété, il faut chez les mâles séparer l'édéage du reste des génitalia (sauf si celui est complètement ankylosé) et vider la bourse des femelles de leur contenu, en coupant une entaille au couteau où celle-ci est la plus grosse.

Recommandation No. 3 : *Il peut être préférable, si nécessaire, d'effectuer plusieurs dissections avant de procéder aux étapes suivantes. Si on a plusieurs spécimens à étudier, cela prend moins de temps de les disséquer tous et de les monter ensemble après.*

Il est d'ailleurs utile de décrire les pièces génitales avant de les monter, car le montage restreint les perspectives qu'on peut obtenir des objets montés. Chaque dissection doit alors être soigneusement numérotée, et une étiquette avec le même numéro doit être placée sur l'épingle du spécimen. Les dissections peuvent être entreposées temporairement dans un bain d'acide lactique ou dans la glycérine.

L'acide lactique semble offrir plusieurs avantages par rapport à la glycérine : elle permet entre autres de stopper l'action du KOH, de poursuivre la dissolution des graisses, qui pourraient ne pas avoir été dissoutes par la soude caustique, et les pièces traitées à l'acide lactique ont tendance à se teindre plus facilement et plus efficacement avec certaines teintures.

Lorsque les pièces disséquées sont bien nettoyées, il convient de les teindre légèrement de façon à ce qu'on puisse mieux distinguer les structures sclérifiées et les membranes. On peut alors les faire tremper le temps requis (très variable selon les colorants et leurs concentrations) dans une solution d'éthanol 30% à laquelle on aura rajouté une faible quantité d'une solution de noir de chlorazol, de safranine, de teinture d'iode, de mercurochrome ou d'orange G. Personnellement, j'aime utiliser le noir de chlorazol pour teindre les membranes et l'orange G, qui teint merveilleusement bien les structures sclérifiées. Je mélange l'orange G avec l'acide lactique et j'y laisse tremper les génitalia au moins 24 heures pour que la teinture prenne bien. La teinture au noir de chlorazol s'effectue tout de suite après avoir enlevé les pièces du bain d'acide lactique. Le chlorazol prend alors très peu de temps à teindre, parfois moins d'une minute, et il faut les surveiller constamment. Des préparations trop teintées de noir peuvent être éclaircies à l'aide d'hypochlorure de sodium (Javel) à très faible concentration ; mieux vaut cependant être prudent lors du processus de teinte que d'être

obliger d'éclaircir une préparation trop teintée. Les pièces teintées à l'orange G perdent leur couleur orangée si on les place dans l'éthanol à faible concentration trop longtemps.

Les pièces ainsi bien propres et colorées doivent être déshydratées, afin d'éviter toute réaction avec la résine de fixation. À cette fin on doit faire tremper les pièces à l'étude dans deux ou trois bains successifs, d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées (ex. 70%, pendant quelques minutes, et 95%, pendant 30 minutes à une heure), pour finir avec un bain de propanol ou d'éthanol pur pendant une heure. Les génitalia et l'abdomen deviennent de plus en plus cassants à mesure que le processus avance. Pour éviter des bris lors du montage, il faut étaler les pièces génitales et l'abdomen dans la position désirée sur la lame dès le bain d'éthanol 70%, et parfois avant. Les pièces peuvent être maintenues en position étalée à l'aide de petits morceaux de verre, provenant par exemple d'une lame de microscope qu'on aura préalablement brisée. Le transfert des pièces d'un bain à l'autre doit s'effectuer très délicatement, avec le pinceau si nécessaire, et je sèche les petits blocs de verre sur un papier à lentille avant chaque transfert.

Généralement, l'étude des génitalia mâles requiert aussi que la vésica soit dévaginée, comme lors de l'accouplement, pour qu'on puisse en examiner la forme et la structure ainsi que la forme, le nombre et la position des épines (ou cornuti), s'il-y-a lieu. Pour ce faire, la base de l'édéage est sectionnée et à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille suffisamment petite qu'on introduit dans l'édéage par ce trou, on expulse avec un courant d'éthanol 30% la vésica vers l'extérieur. On peut alors procéder à la teinture. Lorsque la vésica est complètement sortie, bien gonflée et teinte, on substitue la seringue d'éthanol à 30% par une autre d'éthanol pur ou de propanol, ce qui a pour effet de faire durcir la vésica dans la position désirée. Il faut enfin transférer l'édéage et sa vésica, en maintenant la pression du liquide avec la seringue, dans un bain d'éthanol pur ou de propanol.

Montage

Les pièces sèches peuvent alors être montées entre lame et lamelle en utilisant l'euparal (*) comme résine de fixation. Un court bain d'essence d'euparal avant le montage proprement-dit facilite cette dernière étape. Lame et lamelle doivent être nettoyées avant le montage; j'utilise à cet effet un papier à lentilles et la buée de ma respiration. Pour éviter d'écraser des pièces génitales épaisses, il faut ajouter des supports de plastique ou de verre sur la lame, avant d'ajouter la lamelle. Ces supports doivent être nettoyés soigneusement dans le propanol et placés dans l'essence d'euparal avant d'être transférés sur la lame. Les pièces doivent être placées au centre de la lame, de la même façon à chaque dissection. Pour appliquer l'euparal toujours au centre de la lame j'utilise un petit plateau de carton sur lequel est dessiné le contour d'une lame avec un X en plein centre. Après avoir placé la quantité requise d'euparal au centre de la lame, on y place les pièces génitales et les supports à lamelle.

Pendant le transfert des pièces il faut éviter de transférer trop d'essence d'euparal ; pour ce faire, j'utilise une des deux pointes des pinces droites. Il faut faire attention également à l'accumulation de poussières dans le bain d'essence d'euparal et renouveler ce bain au besoin afin d'éviter le transfert de poussières sur la lame. Avant d'ajouter la lamelle on y appose à l'aide d'un pinceau une petite quantité d'essence d'euparal (ou de propanol) sur la surface de contact pour faciliter un étalement rapide de l'euparal sous la lame. Si les pièces se déplacent dans une position non désirées, on peut les replacer à l'aide d'une vibrisse de chat montée sur un cure-dents qu'on insère entre lame et lamelle en l'ayant préalablement fait tremper dans l'essence d'euparal ou le propanol. Une vibrisse coupée en deux donnera deux outils de tailles différentes et complémentaires. De chaque côté de la lamelle, on colle une étiquette indiquant le numéro de la dissection, numéro qu'on doit aussi retrouver sur une étiquette attachée au spécimen disséqué. On inscrit aussi sur ces étiquettes les principales données de capture du spécimen, le nom de l'espèce, la date de montage de la lame, le nom de celui qui a effectué la dissection et le type de résine de fixation utilisée. Sur l'étiquette du spécimen il faut mettre un numéro de dissection unique ainsi que le sexe du spécimen (ex. BL 979). Il faut ensuite placer cette étiquette de façon à ce que le numéro et l'indication du sexe ne soient pas cachés par les autres étiquettes. Pour cette étiquette il est fortement recommandé d'utiliser un papier de couleur, sauf les jaunes, orangés ou rouges, qui sont utilisés pour les étiquettes de types ou de paratypes; un vert fait très bien l'affaire.

On doit alors faire sécher les lames dans un endroit à l'abri des poussières. Les lames laissées à sécher à la température ambiante prennent plusieurs semaines à sécher. On peut utiliser une plaque chauffante ou un four spécialement conçus à cet effet, de préférence à une température de 50°C environ, durant un mois. Il est souvent nécessaire de rajouter de l'euparal sous la lamelle lors de la période de séchage car celui-ci se contracte à cause de la libération de ses composantes gazeuses. Pour ce faire j'utilise une mince tige de métal dont l'extrémité est courbée à 90° sur une longueur de 1-2 mm; une épingle entomologique ferait sans doute très bien l'affaire. Il suffit d'humecter avec de l'essence d'euparal les bords de la préparation où il manque d'euparal avec un pinceau, d'immerger le bout de la tige de métal dans l'euparal et de porter la goutte ainsi cueillie aux endroits où il manque d'euparal.

() Certains utilisent le baume du Canada, résine du Sapin baumier, pour monter leurs dissections. Toutefois, on doit faire tremper les pièces disséquées dans un bain de xylène avant le montage, pour assurer une bonne compatibilité chimique entre celles-ci et le baume, mais le xylène est une substance cancérigène et le baume du Canada a tendance à devenir plus foncé à la longue. On doit éviter à tout prix l'utilisation de tout autre type de résine de fixation synthétique.*

Dernière mise à jour : 10 décembre 2003

Le noir de chlorazol est un colorant de la chitine... mais le tégument d'une araignée en bon état n'est pas de la chitine pure. Il ne prend le colorant que si on l'a au préalable décolorée et altérée sa surface (potasse, eau oxygénée, eau de Javel, trop forte dose d'ultra-violet, etc). Le tégument devient bleu. Ceci permet également de rendre plus observables des araignées décolorées par les ultra-violet (oubliés près d'une fenêtre p. ex.). (Conseils pour l'étude des Araignées, Jean-Claude Ledoux)

4. DANGERS :

A l'état pur : très toxique : cancérigène ; irrite la peau et les muqueuses ; risque possibles d'effets néfastes pour l'enfant durant la grossesse. Pour le produit de base non dilué : tenir à l'abri de sources d'inflammation ; ne pas fumer ; travailler sous hotte aspirante. Très polluant en quantité minime pour la nappe phréatique.

La solution à 0,5 ou 1 % est bien évidemment beaucoup moins toxique, mais demande à être manipulée avec précaution (toxique per os) ; ne pas déposer sur les muqueuses (yeux, fosses nasales, lèvres, langue).

Voici 2 photos de la spore d'*Anthostomella tomicoides*. La spore est formée de 2 cellules dont l'une est hyaline. Le noir de chlorazol renforce le contour de la cellule hyaline ce qui favorise son observation.



Photos réalisées par J.P. GAVERIAUX, 2005

5. CONSERVATION :

Illimitée si conservation au frais et au sec, dans un emballage hermétique (pour la poudre).

1 à 3 ans pour les solutions, selon la qualité de l'endroit de conservation (pas à la lumière, température moyenne et constante, flacon bien fermé)