

Bleu de méthylène

1. NATURE DU COLORANT :

Le **bleu de méthylène**, ou chlorhydrate de tétraméthylthionine, dont la base est une base ammonium, est obtenu par l'action de l'oxyde d'argent ; cette base a été appelée bleu Borrel par LAVERAN. C'est un colorant basique progressif.

Il fait partie du groupe des Quinones-imides, section des Thiazines, qui sont des colorants sulfurés dans lequel deux noyaux benzéniques sont unis par un anneau fermé constitué d'un atome d'azote, d'un atome de soufre et de 4 atomes de carbone.

Dans ce groupe, on va trouver : la **thionone** (ou violet de Lauth), le bleu de **toluidine**, le **bleu de méthylène nouveau** (qui est dérivé de l'éthyltoluidine, et non de la diméthylaniline comme son homonyme ; ils sont très voisins dans leur action !), le **violet de méthylène**, l'**azur de méthylène** et le **vert de méthylène** (bleu de méthylène nitré).

ATTENTION à ne pas confondre avec les bleus de méthyle (la fuchsine acide (rubine acide, Magenta S), le vert lumière (Lichtgrün ou vert acide S), le bleu à l'eau, les bleus 1 et 2 de Saint-Denis, le bleu de diphenylamine, le bleu coton, le bleu de Chine, le bleu naphthyle, le bleu d'isamine... qui constituent toute une famille de colorants bleus acides.

2. PRÉPARATION :

a/ en solution aqueuse (il est très soluble dans l'eau) :

Eau bidistillée :	100 ml
Bleu de méthylène :	1 g
Sodium Dodécyl Sulfate	1 g

Mélanger longuement (ou laisser 2 heures sur l'agitateur magnétique) et filtrer.

b/ comme colorant vital (sans SDS)

mélanger 1 cc de la solution de base avec 5 cc d'eau distillée → solution à 1/500ème
mélanger 1 cc de la solution de base avec 10 cc d'eau distillée → solution à 1/1.000ème
mélanger 1 cc de la solution de base avec 100 cc d'eau distillée → solution à 1/10.000ème

c/ en solution aqueuse alunée :

Eau bidistillée :	100 ml
Bleu de méthylène :	1 g
Alun de potasse	10 g

L'alun de potasse est un sulfate double de potassium et d'aluminium.

Mélanger longuement (ou laisser 2 heures sur l'agitateur magnétique) et filtrer.

3. UTILISATION :

C'est le plus important des **colorants basiques**.

Un inconvénient : c'est un colorant très coûteux !

Le bleu de méthylène chimiquement pur est peu utilisé en microscopie, sinon pour les colorations vitales où il fournit d'excellents résultats sur des tissus nerveux, sur des cellules vivantes isolées ou sur des organismes entiers (Protozoaires par exemples).

On utilise beaucoup plus souvent le sel double associé au chlorure de zinc. Le bleu de méthylène est en effet "pollué" par l'Azur de méthylène, qui se forme spontanément dans les solutions.

En solution à 1 %, il est possible de l'utiliser pour une coloration nucléaire, mais nous lui préférons le bleu de toluidine, et la thionine, qui sont plus électifs, et fournissent des colorations plus nettes.

Le bleu de méthylène n'est pas métachromatique.

Toutes les colorations de noyaux qui lui ont été attribuées dans la littérature sont dues en fait à la présence de ses deux dérivés : le violet et l'azur de méthylène. Une solution classique et bien connue, comme le bleu de Kühne, n'est efficace que grâce à leur présence. C'est un système de relations complexes puisque le violet et l'azur de méthylène n'exercent leur pleine action qu'en présence de bleu de méthylène.

Le bleu de méthylène aluné associé au rouge de ruthénium, constituent une paire extraordinaire, à utiliser en histologie et cytologie végétales.

Cette double coloration donne des couleurs variées dans les éléments lignifiés (liège en vert – bois en bleu – parenchyme en rose – sclérenchyme en violet).

La solution idéale consiste évidemment à travailler sur des coupes qui ont été réalisées au microtome après inclusion à la paraffine ou au PEG, puis collées sur lame avec l'albumine de Meyer. Il serait triste de ne pas tenter de conserver les résultats obtenus, qui sont spectaculaires.

Modus operandi :

- colorer 5 à 10 minutes dans le bleu de méthylène aluné
- laver à l'eau
- colorer 5 à 10 minutes dans le rouge de ruthénium
- rincer à l'eau
- monter à la glycérine gélatinée ou au Conservateur de Hoyer
- pour monter au baume du Canada, il est nécessaire de déshydrater complètement (voir la fiche technique adéquate)

Pour les diverses techniques et les produits évoqués, voir les fiches techniques spécifiques !

[UTILISATION de l'association bleu de méthylène + fuchsine basique pour la coloration de COUPES DE TISSU ANIMAL enrobées dans la résine ou le plastique.](#)

Solutions de base :

- 0,5 g de bleu de méthylène + 400 cc d'eau distillée (1)
- 0,5 g de fuchsine acide + 400 cc d'eau distillée (2)
- Solution tampon : avec un pH de 6,8 à 7,2 ; un pH plus élevé donne des résultats plus bleus ; un pH plus élevé donne des résultats plus de tonalité plus rose

Solution de travail :

- 12 cc de la solution de base (1)
- 12 cc de la solution de base (2)
- 21 cc de la solution tampon
- 15 cc d'alcool éthylique à 95°
- filtrer

Technique de coloration :

- plonger les coupes dans la solution de travail durant 5 à 15 secondes, voire plus longtemps
- rincer dans l'eau distillée
- pratiquer une coloration régressive en plongeant une à 2 x dans de l'alcool éthylique à 95°
- laisser sécher les coupes
- monter

Résultats :

- noyaux colorés en bleu
- cytoplasme, mitochondries, cils, certaines granules cellulaires colorées en rouge ou rose
- cartilage et d'autres granules cellulaires colorées en bleu pourpre

Il est important de respecter scrupuleusement les dosages prévus dans le protocole, sous peine d'obtenir des colorations incertaines.

Si vous colorez des coupes en série, à l'aide de cuves de coloration, il est préférable de les coller sur les lames ; les exposer à la chaleur durant 5 minutes, à l'étuve (60 à 100° C), avant la coloration.

4. DANGERS :

Le bleu de méthylène en solution aqueuse est peu ou pas toxique, mais ne doit être en aucun cas utilisé comme colorant alimentaire. Il tache facilement la peau et les vêtements.

5. CONSERVATION :

Il se conserve au moins un an en flacon bien fermé.