

Phloxine B

1. NATURE DU COLORANT :

La phloxine B fait partie du groupe des phloxines, partie des érythrosines.

Celles-ci sont des colorants artificiels ou synthétiques provenant des hydrocarbures extraits du goudron de houille, dérivant tous du benzène. Elles appartiennent aux phénylméthanés (tri-phénylméthanés du groupe des phtaléines).

Les phtaléines résultent de l'action des phénols sur l'anhydride phtalique : les plus importantes sont les éosines et les érythrosines. Ces colorants ont une affinité particulière pour les substances acidophiles et les colorent de manière élective ; ils conviennent très bien pour colorer le plasma.

Les érythrosines. sont des éosines iodées.

Citons dans ce groupe :

- la **safrosine** (éosine écarlate), qui est un dérivé mononitré de la fluorescéine
- la **phloxine**, qui est un sel de sodium de la fluorescéine chlorée
- le **rose bengale**, qui est un sel de sodium de la fluorescéine iodée

Tous ces colorants sont solubles dans l'alcool et dans l'eau !

2. PRÉPARATION :

En solution aqueuse :

Eau bidistillée :	100 ml
Phloxine B :	1 ou 2 g
Sodium Dodécyl Sulfate (agent mouillant) :	1 g

Le SDS est un agent tensioactif anionique qui facilite la pénétration de la phloxine dans le cytoplasme. Il ne doit toutefois pas être utilisé en présence de KOH (formation de précipités).

En solution alcoolique, selon Singer :

alcool éthylique à 80 ° :	100 ml
Phloxine B :	1 ou 2 g
Sodium Dodécyl Sulfate (agent mouillant) :	1 g

En solution ammoniacale, selon Moser :

alcool éthylique à 80 ° :	100 ml
Phloxine B :	1 ou 2 g
Sodium Dodécyl Sulfate (agent mouillant) :	1 g

Laisser durant une demi-heure sur l'agitateur magnétique et filtrer.

sur base d'une expérience limitée, l'éosine aqueuse à 2%, que l'on peut se procurer chez le pharmacien, doit probablement donner des résultats assez comparables

3. UTILISATION :

Jean LACHAPELLE, du Cercle de Bruxelles, m'a très aimablement fourni les renseignements : Il faut savoir qu'il excelle dans les travaux de microscopie !

- En mélange avec une solution aqueuse de KOH à 5 %, elle est recommandée pour l'observation des cystides, et même pour le ramollissement des coupes.
- Il doit s'agir d'une préparation extemporanée, car la phloxine B en présence de la potasse devient bientôt noirâtre et inutilisable. Donc procéder à une coloration dans la phloxine et ensuite à une observation dans KOH à 5%.
- L'observation des cystides est également facilitée par l'observation dans le bleu de cré-syl, qui a l'avantage d'avoir d'autres usages.
- La phloxine B est très utilisée en particulier pour colorer le contenu des cellules ; les polyporologues en font un usage courant seul ou en mélange avec le rouge Congo. Singer signale que son usage est répandu aux Etats-Unis : il propose une solution alcoolique à 2 %. Celle-ci, d'après lui, serait stable dans l'ammoniaque et dans la potasse...(voir toutefois la remarque ci-dessus !)
- Intéressant également pour l'examen des cuticules de mycènes car elle met bien en évidence le volume et donc la forme des ornements des hyphes superficielles des revêtements.
- Colorant le contenu et non les parois, elle peut s'avérer utile comme alternative au cas où le bleu coton ou le rouge Congo ne donnent pas un bon résultat.
- L'éosine (point à approfondir) : il s'agit d'un colorant proche de la phloxine. C'est un colorant acide; il se dilue dans l'eau et sans doute aussi dans l'alcool (voir phloxine); il se mélange à l'ammoniaque et au KOH. Il colore les plasmas et quelquefois les membranes ; il rend les contours très nets.
- Source : Moser (coloration des ornements peu visibles des sp. hyalines (e.g. Laccaria) : recourir à la phloxine B (procédé, cf. amyloïdité) ou au bleu coton.

Il existe plusieurs sortes de Phloxine. A. de Haan, président du Cercle d'Anvers et excellent microscopiste, utilise la Phloxine jaune dans un cas d'application (je ne sais plus exactement lequel...) en rapport avec les Cortinariacées.



Macrocystide couronnée de cristaux (acide oxalique), chez *Inocybe margaritispora* (photo Marcel Lecomte)

Jean-Marie PIRLOT précise que pour l'étude des Polypores, il faut placer la coupe dans du KOH à 5 % pour regonfler, puis ensuite introduire une goutte de phloxine par le côté de la lame ; elle colore le cytoplasme et permet parfois de voir les noyaux.

Pour un procédé de double coloration, pratiquer ainsi :

- déposer une goutte de rouge Congo ammoniacal puis une goutte de phloxine
- mélanger, y faire glisser la coupe, couvrir d'une lamelle et dissocier par tapotement si nécessaire
- introduire ensuite du KOH 5 % par le côté de la lamelle afin d'éclaircir la préparation

- → les parois sont teintées par le Congo et le contenu des hyphes, basides et cystides, par la phloxine

Jean-Pierre Gaveriaux ajoute :

En solution aqueuse à 2%, la phloxine B colore en rouge le cytoplasme des cellules mortes, sans colorer les parois des hyphes et les cloisons.

La phloxine B peut être utilisée en mélange avec d'autres colorants. En association avec le rouge Congo elle permet la double coloration. Déposer sur une lame une petite goutte de Congo puis à proximité une petite goutte de phloxine ; mélanger avec une épingle et y placer la coupe à colorer. Mettre une lamelle et dissocier par tapotements successifs. Il y a ainsi coloration des parois des hyphes par le Congo et du contenu des cellules par la phloxine. L'introduction de potasse à 5% permet, si nécessaire, d'éclaircir la préparation pour faciliter les observations (il n'est toutefois pas possible de prolonger l'observation très longtemps car la phloxine devient rapidement noirâtre en présence de KOH).

4. DANGERS :

Une règle générale : en solution, les colorants sont toxiques per os (par voie orale) et de manière beaucoup moindre par contact (laver abondamment dans ce cas). Ils tachent facilement la peau et les vêtements.

5. CONSERVATION :

Ils se conservent au moins un an en flacon bien fermé (la solution la plus simple est de le tester de temps en temps).