

## INTRODUCTION DE COLORANTS ALIMENTAIRES ET D'EXTRAITS DE PLANTES DANS LES TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Une expérience à l'Unité d'Anatomie Pathologique de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou.

MT AKPO-AKELE<sup>(1)</sup>, F GANGBO<sup>(2)</sup>, R DOSSOU<sup>(3)</sup>, R HOUNPKE<sup>(3)</sup>, R DARBOUX<sup>(4)</sup>.

### RESUME

Dans le souci d'adapter les conditions de travail aux ressources matérielles et financières faibles de notre pays, nous avons testé des colorants alimentaires naturels et les extraits de plantes sur du tissu fraîchement disséqué et des blocs anciens de tissus. L'objectif était de déterminer les concentrations et le temps nécessaires pour que ces produits locaux colorent des structures tissulaires, de préciser le potentiel hydrogène (pH) auquel ceux-ci sont efficaces et d'identifier leur longueur d'onde du pic caractéristique. Les colorants alimentaires naturels et les extraits de plantes testés ont coloré le cytoplasme des cellules et les fibres collagènes; ils présentent un intérêt dans le diagnostic des lésions si on les associe aux colorants nucléaires comme l'hématoxyline de Harris.

Cette expérience mérite d'être poursuivie et approfondie.

**Mots clés :** Colorants, colorants alimentaires, extraits de plantes, coloration histologique.

**Introduction of natural stains and plant extracts in histological techniques: experience of the Anatomic Pathology Unit of the Faculty of Health Sciences of Cotonou.**

### SUMMARY

In order to adapt the working conditions to the low material and financial resources of our country, we have tested natural stains and plant extracts on newly dissected tissues and old paraffin embedded tissue specimens. Our objective was to determine the concentrations and time necessary for local products to colour the structures of tissues, to establish the precise hydrogen potential (pH) at which they are efficient, and to identify the Pius of their wavelength. The stains and the tested plant extracts have coloured the cytoplasm of cells and collagen fibers. They are of diagnostic interest only if they are associated with nuclear stains as Harris hematoxylin.

We think that it's important and necessary to continue and deeper this experience.

**Key words:** stains, natural stains, plant extracts,

### INTRODUCTION

Plusieurs facteurs peuvent influencer la coloration des tissus. Il s'agit du potentiel hydrogène (pH), de la concentration du colorant dans la solution colorante, de la force ionique des solutions colorantes et de la fixation des tissus (1,2).

Après avoir effectué en 1997 un essai de colorant textile sur le tissu humain, recherche qui a abouti à une possibilité de substituer le safran par le "jaunesicofix" (3), nous nous sommes proposé de tenter la même expérience avec les colorants alimentaires. Le but recherché à travers ces différentes expériences étant la réduction du coût des colorants

histologiques par l'utilisation de produits locaux ou de grande consommation.

Le présent travail a pour objectifs de :

- déterminer les concentrations et le temps nécessaires pour que des colorants alimentaires naturels ou des extraits de plantes colorent de façon nette les structures tissulaires.

- préciser le potentiel hydrogène (pH) auquel les colorants alimentaires ou extraits de plantes testés sont efficaces.

- identifier la longueur d'onde du pic caractéristique de quelques colorants alimentaires ou extraits de plantes.

### 1- MATERIEL ET METHODES

#### 1-1 MATERIEL

##### 1-1-1 Les tissus utilisés

Les tissus utilisés dans l'expérience étaient des organes humains normaux comme la trompe utérine, l'appendice et des organes de cobaye sain comme le cœur, le poumon, le foie, l'intestin grêle, l'estomac, l'œsophage, le côlon, le rein et la surrénale.

1- Assistant en Anatomie pathologique, Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou

2- Assistant en Biologie humaine, Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou

3- Techniciens supérieurs, Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou

4- Professeur de Biologie humaine, Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou

**1-1-2 Les colorants utilisés**

La séquence bleu célesté B-hémalun a été utilisée. Nous avons testé:

- des colorants alimentaires généralement consommés dans des pâtisseries et hôtels à savoir :
  - Bleu de crésyl brillant
  - Bleu du marché : utilisé pour colorer les sucettes glacées.
  - Carmin d'indigo
  - Rouge cochenille A : utilisé pour colorer au laboratoire et les pâtisseries
  - Rouge (1) du marché : utilisé pour colorer les sucettes glacées, les bonbons
  - Rouge (2) du marché : utilisé pour colorer les sucettes glacées, les bonbons
  - Vert pistache : utilisé pour colorer les pâtisseries
  - Jaune citron : utilisé pour colorer les pâtisseries
  - Jaune du marché : utilisé pour colorer les sucettes glacées

• les extraits de plantes suivants :

- Tectoma grandis* (Verbénacées) ou teck utilisé pour l'emballage de certains aliments locaux et comme ingrédient pour tisanes.
- Hibiscus sabdariffa* (Malvacées) ou oscille de Guinée, roselle ou "bissap" utilisée pour préparer une boisson rafraîchissante.
- Lawsonia inermis* (Lythracées) connu sous le nom de henné utilisé pour colorer les plantes de pieds, les ongles, les cheveux et comme ingrédient pour tisanes.
- Sorghum caudatum* (Graminées) ou sorgho utilisé pour colorer les fromages locaux et pour préparer des tisanes.
- Mangifera indica* (Anacardiacees) ou manguié utilisé pour teindre les tissus.

**1-2. METHODES****1-2-1 Préparation des colorants et extraits de plantes**

Les gaines de sorgho et les feuilles de bissap ont été découpées à l'aide d'une paire de ciseaux. Les feuilles fraîches de henné et les jeunes pousses de teck ont été pilées dans un mortier en porcelaine, de même que les amandes de mangues. Soixante grammes (60 g) de chacun des produits ont été introduits dans différents flacons de sérum de 500 ml dans lesquels on a ajouté 150 ml de solvant. La concentration massique était donc d'environ 40 % soit 400g/l. Les solvants utilisés étaient : l'eau, l'éthanol, une solution d'acide trichloroacétique à 10%, une solution de soude 1M.

Les flacons ont été ensuite mis au bain-marie à 37° C jusqu'au lendemain.

Après extraction, le mélange a été filtré sur du

papier Wathman n°1 pour recueillir le colorant.

Les colorants et extraits de plantes ont été testés sur les tissus précités, à des concentrations et durées de temps variables, soit seuls, soit en association avec un ou deux autres colorants.

**1-2-2 Les colorants utilisés seuls**

-Les colorants alimentaires liquides ont été directement appliqués, tels quels, sur les tissus tandis que les colorants en poudre ont été au préalable dissous dans un solvant. La durée de coloration minimale était de trois minutes dans la plupart des cas (tableau I).

**1-2-3 Colorants utilisés en association double**

Les colorants alimentaires utilisés en association avec l'hématoxyline de Harris ou l'hématéine de Weigert ont été appliqués sur les tissus à une concentration comprise entre 12,5 g/l et 50 g/l. Au départ la durée de coloration était selon les cas de 3 minutes à 10 minutes (tableau II).

**1-2-4 Les colorants utilisés en association multiple**

Les extraits de plantes ont été testés à la concentration de 40g/l tandis que les autres colorants ont été utilisés à des concentrations variant entre 12,5 et 50 g/l. Le temps d'application a varié en général de 3 à 10 minutes (tableau III).

Tableau I: Les colorants utilisés seuls: concentration et durée de coloration

COLORANTS	CONCENTRATION	DUREE DE COLORATION
Bleu de crésyl brillant	50 g/l	5 mn
Bleu du marché	25 g/l	3 mn
Carmin d'indigo	utilisé tel quel	3 mn
Jaune citron	50 g/l	10 mn
Jaune du marché	50 g/l	10 mn
Rouge cochenille A	50 g/l	10 mn
Rouge (1) du marché	50 g/l	15 mn
Rouge (2) du marché	12,5 g/l	3 mn
Vert pistache	25 g/l	10 mn
Extrait de bissap à l'alcool + acide phosphotungstique	40 g/l	5 mn
Extrait de bissap à l'eau + acide phosphotungstique	40 g/l	5 mn
Extrait des amandes de mangues à l'alcool	40 g/l	15 mn
Extrait de Henné à l'eau + acide citrique	40 g/l	10 mn
Extrait de henné à l'alcool	40 g/l	15 mn
Extrait de gaine de sorgho à l'	40 g/l	3 mn
Extrait de teck à l'acide trichloroacétique	40 g/l	10 mn
Extrait de teck à l'alcool	40 g/l	10 mn
Extrait de teck à l'eau	40 g/l	24 heures
Extrait de teck au mélange eau, alcool, acide	40 g/l	10 mn

Tableau II: Colorants associés : concentration et durée de coloration

COLORANT	Concentration des colorants et DUREE DE COLORATION extraits de plantes
Harris + bleu du marché	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 25 g/l pour le 2 <sup>e</sup>
Harris + carmin d'indigo	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et concentration 10g/l non précisée par le fabricant
Harris + bleu de crésyl brillant	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 50 g/l pour le 10 min + 5 min
Harris + jaune citron	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 50 g/l pour le 10 min + 10 min
Harris + rouge cochenille A	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 50 g/l pour le 10 min + 10 min
Harris + rouge (2) du marché	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 12,5 g/l pour le 10 min + 3 min
Harris + vert Pistache	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 25 g/l pour le 10 min + 10 min
Bleu de crésyl brillant + carmin d'indigo	50 g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 5 min + 3 min concentration non précisée par le fabricant
Bleu de crésyl brillant + éosine	50 g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 10g/l pour le 5 min + 3 min
Harris + extrait de bissap à l'alcool	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 400 g/l pour le 10 min + 5 min
Harris + extrait de bissap à l'eau	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 400 g/l pour le 10 min + 5 min
Harris + extrait de gaine de sorgho à l'alcool	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 400 g/l pour le 10 min + 3 min 2 <sup>nd</sup>
Hématéine de WEIGERT + Extrait de bissap à l'alcool	concentration non précisée par le fabricant pour le 1 <sup>er</sup> et 400 g/l pour le 2 <sup>nd</sup> 10 min + 5 min
Harris + extrait de teck à l'acide	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> et 400 g/l pour le 10 min + 10 min

Tableau III: Colorants utilisés en association multiple: concentration et durée de coloration

COLORANT	CONCENTRATION	DUREE DE COLORATION
Harris <sup>(a)</sup> + éosine <sup>(b)</sup> + jaune du marché	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> , 10g/l pour le 2 <sup>ème</sup> et 50 g/l pour le 3 <sup>ème</sup>	10 min; 3min et 10 min
Harris <sup>(a)</sup> + rouge (2) + jaune du marché	5g/l pour le 1 <sup>er</sup> ; 12,5 g/l pour le 2 <sup>nd</sup> et 50 g/l pour le 3 <sup>ème</sup>	10 min; 3min et 10 min
(Bleu céleste B <sup>(c)</sup> + hémalum) + Eosine + extrait de henné à l'eau	concentration non précisée par le fabricant pour le 1 <sup>er</sup> , 10g/l pour le 2 <sup>ème</sup> et 400 g/l pour le 3 <sup>ème</sup>	10 min; 10 min; 3min et 10 min
(Bleu céleste B + hémalum) + extrait de bissap à l'eau	concentration non précisée par le fabricant et 400 g/l pour le 3 <sup>ème</sup>	10 min; 10 min et 5 min
(Bleu céleste B + hémalum) + extrait de henné à l'eau	concentration non précisée par le fabricant et 400 g/l pour le 3 <sup>ème</sup>	10 min; 10 min et 10 min

**1-2-5 Le pH des colorants et extraits de plantes et leur spectre d'absorption**

Le plupart des colorants et extraits de plantes ont été utilisés à un pH acide.

Tableau IV: Le pH auquel les colorants alimentaires et extraits de plantes ont été utilisés.

Colorants ou extraits de plante	pH acide	pH basique
Carmin d'indigo	1.9	-
Bleu de crézyl brillant	3.1	-
Extrait de bissap aqueux	4	-
Rouge (2) du marché	4.5	-
Extrait de teck alcoolique	4.9	-
Extrait de henné aqueux	5.5	-
Extrait de gaine de sorgho alcoolique	6.5	-
Vert pistache	-	7.1
Jaune citron	-	7.4
Bleu de marché	-	8.4
Rouge cochenille	-	9.3

**2-RESULTATS**

**2-1- Coloration avec les colorants utilisés seuls**

- les fibres collagènes ont été colorées en vert par le carmin d'indigo (Photo1).
- le cytoplasme cellulaire a été coloré en couleur orangée par l'extrait de teck (Photo 2), en bleu violacé par le bleu céleste, en rouge par le rouge du marché et en violet par le bissap en milieu aqueux
- le cytoplasme des cellules musculaires lisses a été coloré par le Rouge (2) du marché.

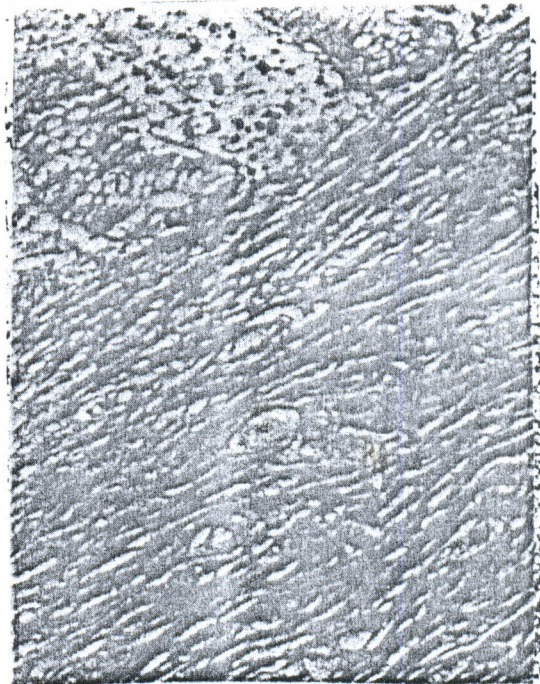


Photo : Coupe d'appendice humain; Coloration au carmin d'indigo (x 40).  
Human appendix section: Indigo carmine staining (x40).

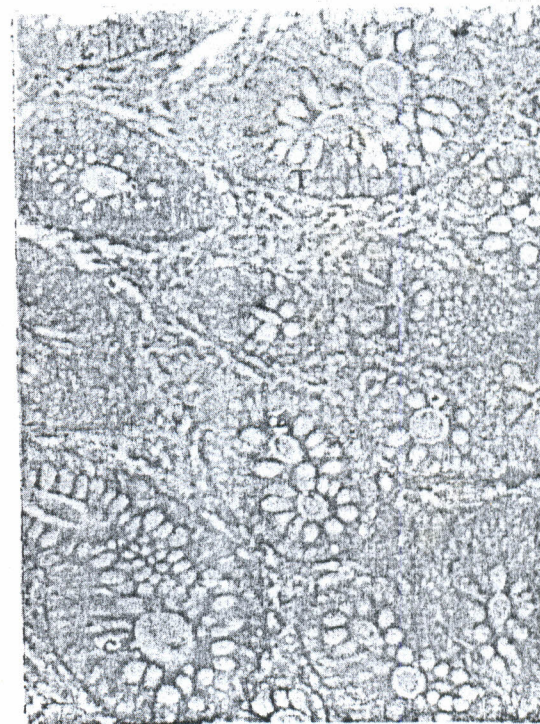


Photo 2: Coupe d'appendice humain, Coloration à l'extrait de teck en milieu alcoolique (x40).  
Human appendix section: teak extract in alcoholic medium (x40).

### 2-2 Coloration avec les colorants utilisés en association double

En plus du cytoplasme, des fibres collagènes et du mucus qui ont été colorés, les noyaux des cellules ont été mis en évidence (Photos 3 et 4).



Photo 3 : Coupe d'estomac de cobaye  
Coloration au bleu céleste B- hémalum + bisapp aqueux acidifié à l'acide phosphotungstique (x40).  
Guinea-pig stomach section: Sky blue B-hemalum+aqueous bisapp acidified with phosphotungsten acid (x40).

### 2-3 Coloration avec les colorants utilisés en association multiple

Le cytoplasme, les noyaux et les fibres ont été également mis en évidence. Les images obtenues paraissent nettes (Photo 5).

Ces associations ont montré que l'hématoxyline de Harris a coloré les noyaux tandis que les autres colorants ou extraits ont mis en évidence les structures cytoplasmiques.

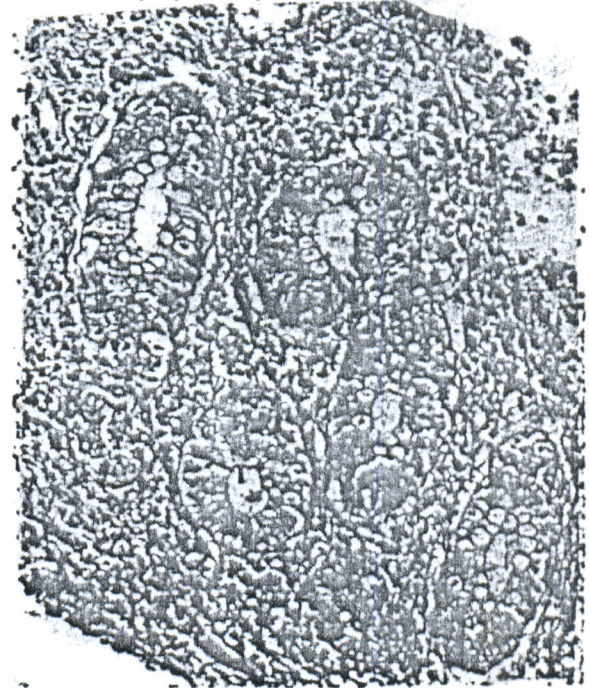


Photo 4 : Coupe d'appendice humain  
Coloration à l'hématoxyline de Harris + carmin d'indigo (x40).

Human appendical section: Hematoxylin of Harris+indigo carmine (x40).

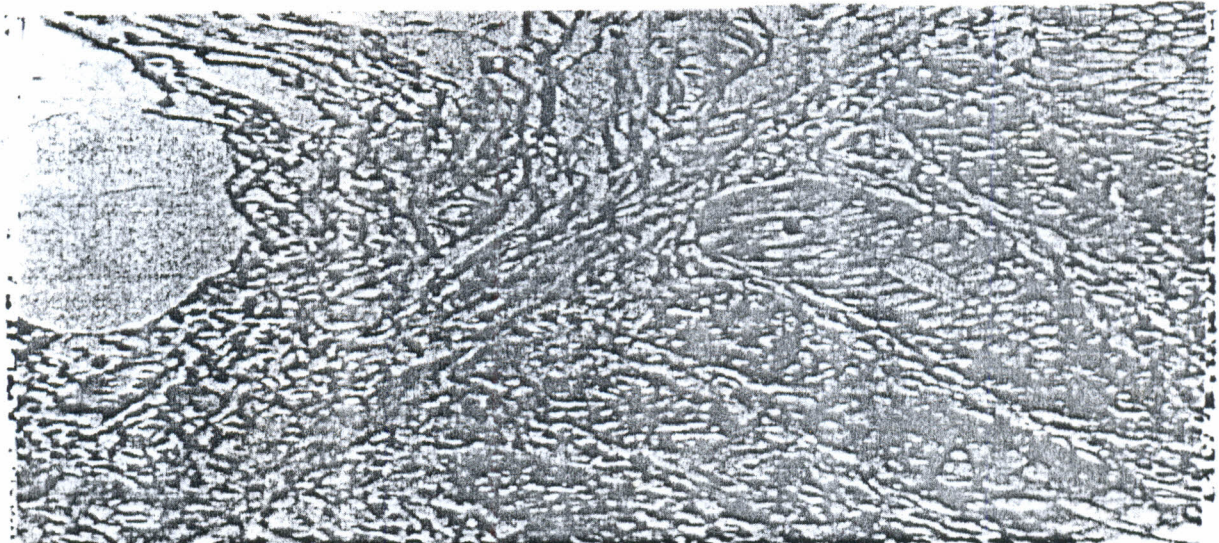


Photo 5 : Le cytoplasme, les noyaux et les fibres sont colorés (x40).  
Cytoplasm, nucleus and fiber are stained (x40).

Ces associations ont montré que l'hématoxyline de Harris a coloré les noyaux tandis que les autres colorants ou extraits ont mis en évidence les structures cytoplasmiques

### 3. COMMENTAIRES

Il est possible d'introduire des colorants alimentaires dans les techniques histologiques (4). Lorsque le colorant est utilisé seul, il ne colore que le cytoplasme des cellules et les fibres collagènes. Il joue alors le rôle de l'éosine et celui du safran dans la technique de routine connue Hémalum-Eosine-Safran (HES).

L'addition d'un colorant nucléaire est indispensable pour visualiser le noyau, l'exemple le plus utilisé dans ce travail est l'hématoxyline de Harris ou la séquence Bleu céleste B-Hémalum selon le cas, qui sont des produits classiquement utilisés en routine en histologie.

Les colorants alimentaires et les extraits de plante présentent un intérêt diagnostique si on les associe aux colorants nucléaires.

La triple association n'apporte pas plus d'information que la double association de colorants. Dans le contexte de ce travail on pourrait recommander la combinaison suivante:

Colorant alimentaire ou extraits de plante + Hématoxyline de Harris ou séquence Bleu céleste B-Hémalum.

Ce travail offre des perspectives de colorants histologiques à moindre coût.

### CONCLUSION

Ce travail de recherche prouve que nous pouvons envisager l'introduction dans les techniques histologiques de colorants alimentaires et extraits de plantes locaux en remplacement des colorants

habituellement utilisés dans les laboratoires.

- Du point de vue de l'accessibilité des produits testés : on peut se procurer facilement les colorants et extraits de plantes testés dans notre environnement.

- Du point de vue financier, ces produits coûtent moins chers.

Ce travail devra être poursuivi afin de :

- purifier les colorants et extraits de plantes testés
- stabiliser les colorations afin que les belles couleurs obtenues au départ sur les tissus ne se décolorent dans le temps.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-Hould R : Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Eds Décarie, Paris 1984; 122 .

2-Labosi : Produits chimiques et réactifs de laboratoires. Eds Janvier, Paris 1994; 59 - 107.

3-Kpeidja A F. Peut-on introduire des colorants textiles dans la coloration de routine des tissus humains pour leur analyse microscopique? Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur des Travaux. Collège polytechnique universitaire. Université Nationale du Bénin; 1997.

4- Dossou R et Hounkpe R. : Introduction de produits locaux dans les techniques histologiques. Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur des Travaux. Collège polytechnique universitaire. Université Nationale du Bénin ; 1999.