

Microscopie, méthodes d'examen, colorations

par Jean LACHAPELLE (†)

Nous avons constaté que ce que nous connaissons pour l'avoir appris de divers ouvrages et de collègues mycologues se trouve magistralement exposé et résumé dans le "Manuel de microscopie" de LOCQUIN & LANGERON¹, c'est pourquoi nous avons estimé que le plus utile, dans un but d'initiation, consistait à résumer cet ouvrage, en suivant son ordre de présentation. A ce condensé, nous avons ajouté des renseignements recueillis dans d'autres ouvrages, notamment dans des monographies, et auprès d'un préparateur de réactifs, colorants et produits chimiques divers, comme MARCEL LECOMTE² ; enfin, nous y avons incorporé quelques commentaires inspirés par notre expérience personnelle - laquelle est axée sur les champignons agaricoïdes. Ce travail a un caractère compilatoire ; nous l'avons voulu pratique avant tout, et à vocation initiatique.

PREMIERE PARTIE

MICROSCOPIE, TECHNIQUES ET TRAITEMENTS DIVERS, COLORANTS ET AUTRES PRODUITS CHIMIQUES A DES FINS D'ANALYSE

I.- METHODES D'EXAMEN

A.- Traitements préparatoires

Régénération du matériel desséché

Pour regonfler les exsiccata, on peut utiliser notamment des alcalis (ammoniaque, potasse, soude) ou le lactophénol, le chloral-lactophénol, le

¹ Ouvrage édité en 1978 chez Masson. La matière intéressante pour le mycologue est assez disséminée dans cet ouvrage par ailleurs magistral.

² A l'occasion de nos échanges épistolaires ou de nos rencontres. Certains renseignements sont sans doute attribuables en partie à Didier Baar (†).

lactochloral, l'acide lactique, l'hydrate de chloral, le mélange à parts égales d'eau, d'alcool et de glycérine (imprégner d'abord à l'alcool), l'eau acétique à 50%.

Le chloral-lactophénol ou le lactochloral sont des produits supérieurs au lactophénol et à l'acide lactique. L'ammoniaque et l'hydrate de chloral respectent mieux le matériel à observer que les autres produits. Chauffer accentue évidemment l'action du milieu¹.

Depuis que Cléménçon a découvert le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), qui est un excellent regonflant, la majorité des champignons peuvent être examinés directement dans le rouge Congo SDS, sans usage préliminaire d'une solution alcaline. Cela vaut aussi pour les exsiccata. Néanmoins, si l'on préfère examiner une préparation d'abord dans une solution alcaline et y regonfler et ramollir du matériel sec, Cléménçon recommande alors d'utiliser la solution GSD même : 5 g Glycérine, 0,2 g hydroxyde de Sodium, 5 g Diméthyl-sulfoxyde, 10 g eau distillée. La glycérine évite le dessèchement et améliore l'indice de réfraction optique, le diméthyl-sulfoxyde active l'imprégnation et favorise le regonflement du matériel sec. L'utilisation du GSD permet de colorer ultérieurement la préparation dans le rouge Congo SDS (voir infra).

Déshydratation du matériel frais

Déposer le matériel sur une lame et le plonger dans du chloral-lactophénol ou lactochloral : les tissus aqueux qui demanderaient à être déshydratés le sont en quelques minutes, sans contraction.

B.- Fixation

Fixer, c'est immobiliser les structures organiques dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. La fixation provoque l'insolubilisation des constituants intracellulaires et l'augmentation de l'indice de réfraction.

La fixation d'une coupe dans un tissu de champignon permet de mieux le colorer en favorisant la pénétration du colorant. En outre, elle facilite l'observation des pigments. Selon JOSSERAND, sur le sec, il faut plonger les coupes dans un fixateur pour insolubiliser les pigments et observer dans une solution très concentrée de chloral hydraté après ébullition ; cette méthode est aussi recommandable sur le vivant, surtout si le pigment est très peu abondant.

Il existe des fixateurs simples et des mélanges fixateurs.

¹ Ne pas chauffer le lactophénol.

L'alcool est très hygroscopique¹ : il contracte les cellules de la moitié de leur volume et rigidifie les tissus. Il n'a pas d'influence sur la plupart des colorants et n'empêche généralement pas leur diffusion. Son pH = 6 alors que celui de l'eau = 7.

L'acide picrique² (solution saturée) est à la fois un fixateur et un colorant ; il est très acide. Peu pénétrant, il contracte moyennement les tissus et les durcit peu. C'est un bon fixateur pour la topographie histologique, moins bon pour les détails intracellulaires.

L'acide acétique (à 5% en solution aqueuse) est un acide moyen. Il peut être mélangé à l'alcool. Il a une vitesse moyenne de pénétration et gonfle les tissus : les tissus fixés sont extrêmement mous.

Le formol est un autre fixateur. Le formol commercial est assez impur (il contient de l'acide formique et du méthanol) et très acide (il doit être neutralisé avant emploi avec du carbonate de calcium par exemple). Il nous paraît plus indiqué d'utiliser du formol de laboratoire, nettement plus pur. Le formaldéhyde durcit fortement les tissus. Il agit plus vivement s'il est additionné de sel ou de sucre. C'est un fixateur d'un emploi simple et d'un domaine d'application assez étendu quoique souvent médiocre.

La solution était tentante évidemment de combiner trois de ces produits dans une sorte de fixateur "universel" : l'AFA (Alcool Formolé Acétique) ; ce mélange s'avère très intéressant et vaut la peine d'être exploité.

Il existe de nombreux autres mélanges fixateurs qui ont le mérite d'utiliser d'une manière appropriée les attributs des divers composants. En histologie, on utilise notamment : le microformol de Bouin, le microformol cuprique de Hollande, le microformol mercurique, le fixateur de Bouin-Hollande, etc. Chaque mélange a son domaine d'application : tout fixateur, simple ou en mélange, doit être utilisé avec à propos !

C.- Eclaircissement et ramollissement

Déminéralisation

Lorsque l'oxalate de chaux obscurcit une préparation, faire agir notamment de l'acide chlorhydrique (5 à 10 %), nitrique (à 6%) ou picrique (solution aqueuse saturée).

¹ Remarquer que le méthanol, produit à usage ménager bon marché, est beaucoup moins hygroscopique que l'éthanol.

² L'acide picrique cristallisé est très sensible aux chocs et au feu. Ne jamais le mélanger à de la glycérine car il donne un produit hautement explosif : la trinitroglycérine (dynamite) !!

Coupes obscurcies

Lorsque les espaces interhyphiques sont remplis d'air, les coupes peuvent être presque illisibles : on les fera bouillir entre lame et lamelle dans l'ammoniaque pour en chasser l'air. On peut aussi laver la préparation à l'alcool.

Ramollissement

L'ammoniaque concentrée a le pouvoir non seulement de regonfler les exsiccata mais aussi de ramollir les hyphes de champignons frais. La potasse et la soude ont une action plus forte que celle de l'ammoniaque. Pour rappel, l'acide acétique rend les tissus extrêmement mous (cf. ci-dessus).

Lorsqu'on n'utilise pas le SDS ou le GSD, on peut recommander, pour ramollir les exsiccata, l'emploi du ramollisseur de Clémenton : ammoniaque concentrée 20 ml, glycérine 1 g, éthanol 96 % 80 ml. Sur la partie prélevée laisser tomber quelques gouttes du liquide à ramollir et laisser agir quelques minutes (voire quelques heures) jusqu'à évaporation. Le champignon ayant acquis une consistance comparable à celle de la cire, on peut alors pratiquer les coupes. Bien rincer pour éliminer l'excédent de glycérine.

Dépigmentation

Pour certains traitements spécialisés, il est indiqué de dépigmenter, autrement dit de blanchir : on utilise notamment de l'eau oxygénée, du permanganate de potassium, de l'hypochlorite de soude (dont l'eau de Javel qui est un dérivé impur peu conseillé en microscopie).

Attention cependant : l'hypochlorite de soude a la propriété de dissoudre complètement le contenu des cellules (en pratique, on l'utilise surtout en histologie végétale lorsqu'on souhaite ne garder que les parois des tissus.)

D.- L'observation

Il est toujours courant aujourd'hui d'observer les prélèvements directement entre lame et lamelle, dans une goutte d'eau, avec éventuellement une dilacération, une dissociation ou une micro-compression pour mieux en séparer les éléments. Les techniques mises en œuvre à cette occasion continuent à faire avancer la mycologie. L'examen en question n'est pas une méthode facile et n'est praticable que sur des cellules faciles à isoler, des tissus aisés à dissocier, des cellules assez petites pour être montées entre lame et lamelle. Si l'examen est court, un montage dans l'eau entre lame et lamelle est suffisant ; pour pouvoir le prolonger, il faut éviter l'évaporation : on se tournera alors vers le lactophénol ou le chloral-lactophénol par exemple....

Les colorations

Une coloration est une expérience de physiologie cellulaire : l'opérateur travaille dans l'infinie complexité de la matière vivante et doit particulièrement surveiller ses conditions opératoires pour pouvoir tirer de bons enseignements de ses résultats. Les colorations sont utilisées pour mettre en évidence des structures morphologiques intra-cellulaires, mais aussi pour étudier la perméabilité de certaines interfaces, la réaction cellulaire à l'introduction d'un colorant, etc.

Notons cependant que les colorants que nous utilisons, opèrent tous, à concentration normale, une action létale sur les éléments étudiés, même sans fixation préalable ; les colorants vitaux (qui laissent les cellules en vie) sont rares ; le moins nocif est le rouge neutre, utilisé à 1/1.000 ; citons également le bleu de méthylène, le bleu de crésyl, le vert Janus, employés à des dilutions de l'ordre de 1/10.000 à 1/30.000, voire 1/100.000.

Plasmolyse¹

Lors de l'examen de cellules contenant des vacuoles pigmentées, le pigment est souvent dilué et peu visible. Pour en intensifier la visibilité, les cellules sont placées dans une solution sucrée concentrée : la différence de pression osmotique provoque un départ de l'eau de la cellule, les vacuoles se contractent et se concentrent rendant alors les pigments plus visibles. Ceci ne s'applique pas aux nécropigments ni aux pigments ayant une autre localisation. Beaucoup d'auteurs proposent indifféremment le sel ou le sucre comme agent de plasmolyse ; l'eau glycinée provoque également une plasmolyse.

Recommandation de JOSSERAND : placer la pièce à observer dans une solution sucrée à 8% et attendre car l'osmose n'est pas instantanée. Si, au bout de 10 ou 15 minutes, on ne découvre aucune hyphe dont la vacuole se soit contractée, au moins assez pour permettre le diagnostic, on fera une deuxième préparation en utilisant cette fois une solution à 12 %. On attendra de nouveau. Si l'on n'obtient aucun résultat, il sera inutile d'employer une solution plus concentrée.

Dissociation chimique

Certains champignons, tels les polypores, ont une structure très ferme à dure ; d'autres, tels les pleurotes ont une structure gélatineuse. L'observation de leurs éléments, comme dans les cas fréquents de champignons à structure simplement ferme ou compacte, demande un traitement ramollissant préalable : celui-ci évite ou

¹ LANGERON préfère le terme "osmodialyse".

réduit la dissociation "mécanique" par pression ou par chocs (dilacération, squash) qui souvent abîme ou disperse les éléments. Pour cela, on utilise, selon le cas, de l'alcool, de l'acide acétique (0,2 à 2%) et, le plus souvent, des bases (ammoniaque, potasse, soude). La macération chimique est suivie d'une faible dissociation mécanique. Nous conseillons d'ailleurs d'effectuer la dissociation de structures compactes entre deux lames porte-objet, car une lame couvre-objet ne résiste pas à la pression qui doit être exercée pour réaliser la dissociation !

Intensificateurs de contraste

Ce sont, en fait, des intensificateurs d'indice de réfraction par fixation d'atomes lourds sur les structures à observer. On peut trouver ces métaux dans des fixateurs et des colorants. A ce sujet, il est utile de se rappeler que la glycérine présente dans plusieurs solutions accroît l'indice de réfraction et que le réactif de Melzer (chloral iodo-ioduré), grâce à la présence de l'iode, améliore le contraste de la préparation.

II.- TEINTURES ET IMPREGNATIONS

Conseils généraux

Pour que les colorants pénètrent dans les membranes (souvent imperméables), il faut en général passer ces dernières dans l'alcool dilué et rincer aussitôt.

Une solution colorante aqueuse ne doit pas être mise en contact avec un objet imprégné d'alcool : celui-ci sera impérativement rincé à l'eau au préalable afin d'éviter la formation d'un précipité.

Les objets colorés qui doivent être lavés le sont dans le solvant du colorant (eau, alcool, etc.).

Pendant la coloration, l'objet ne doit pas se dessécher. Il existe à cet effet de petites cuves à coloration très pratiques. Les colorants agissent progressivement : soit on surveille la coloration pour l'arrêter au stade voulu (on parlera de coloration progressive), ou on surcolore pour décolorer ensuite dans un milieu approprié (solvant du colorant) appelé différenciateur (on parlera ici de coloration régressive).

On peut colorer un même objet par différents colorants : ceci facilite les observations.

On distingue trois groupes de colorants :

- colorants neutres (Giemsa),
- colorants basiques ou nucléaires (bleu de méthylène),
- colorants acides ou plasmatiques (éosine).

Basophilie et cyanophilie sont synonymes ; de même acidophilie et éosinophilie. Les affinités basophiles sont nettement renforcées par la fixation, notamment par le formol. On parle aussi d'iodophilie (voir infra).

Selon DONADINI, la vitesse d'une réaction quelconque est fonction de trois facteurs : la concentration des constituants entrant en réaction, la température à laquelle on opère et le solvant dans lequel on effectue la réaction.

Observation, réfraction, contraste

Les éléments naturellement colorés s'observent bien sous le microscope : il n'en est pas de même des éléments hyalins c'est-à-dire à la fois clairs et transparents. Il est donc recommandé de colorer puis d'observer dans un milieu clair approprié : l'eau, l'ammoniaque, le lactophénol, l'hydrate de chloral, etc.

Pour une observation approfondie, il est préférable d'observer d'abord dans un liquide non coloré. Ensuite on peut être amené à colorer. A ce sujet, il faut savoir que chaque champignon, chaque organe de champignon et chaque partie de cet organe peut demander une coloration spécifique en fonction de la nature de sa constitution et de ses propriétés chimiques.

On a intérêt, particulièrement lors de la photomicrographie ou pour des préparations à destination définitive, à laver dans l'ammoniaque diluée 2 fois les préparations montées dans le rouge Congo ammoniacal, dans le lactophénol pour les préparations montées dans le bleu lactique, etc. Par cette opération, le fond se décolore et le contraste se trouve encore augmenté. L'ammoniaque diluée 2 fois a ici l'avantage sur l'ammoniaque concentrée de ne dissoudre que le colorant non fixé sur les structures fongiques. L'ammoniaque concentrée, au contraire, dissout assez facilement le rouge Congo, même fixé, et fait donc pâlir les éléments observés. L'eau convient moins bien parce que le colorant n'y est que peu soluble, et qu'elle a tendance à provoquer sa cristallisation. Cette recommandation peut s'appliquer, mutatis mutandis, à d'autres colorants.

Méthodes de coloration

Les phénomènes de teinture des cellules résultent d'un ensemble très complexe de phénomènes physico-chimiques. Certaines réactions colorantes sont réversibles, d'autres non, certains colorants fixés sont extractibles par un solvant approprié, certains colorent en une autre teinte que leur coloration propre, d'autres ne se fixent qu'en présence d'un sel métallique ; certains sont très sensibles au pH.

Il n'est pas de recette de coloration valable pour tous les objets. Le bon opérateur est celui qu'une longue expérience a dressé pour lui permettre de varier les

temps ou les concentrations, voire de substituer un colorant à un autre pour obtenir le meilleur résultat. Ces variations sont nécessaires pour tenir compte : du fixateur utilisé, de la nature de la pièce, de l'épaisseur des coupes, de la structure à mettre en évidence, du colorant utilisé, etc.

LANGERON distingue diverses méthodes de coloration, parmi lesquelles on peut relever :

- Colorations topographiques : ce sont celles qui différencient le mieux les différents tissus constituant d'un ensemble et permettent la visibilité en général jusqu'aux noyaux, d'un organe.
- Colorations histologiques : ce sont celles qui différencient finement tous les éléments d'un tissu y compris ses structures fines et ses excréta ou secréta. Une telle coloration devient histochimique si elle est spécifique de tel ou tel composé défini.
- Colorations cytologiques : ce sont celles qui permettent d'analyser les détails internes des cellules. De telles colorations peuvent être cytochimiques si elles mettent en évidence des fonctions chimiques déterminées.
- Colorations lysochromes : elles se fixent directement sur les huiles, graisses et cires.
- Colorations progressives : elles nécessitent d'arrêter la montée de la coloration au point voulu en observant celle-ci au microscope.
- Colorations régressives : après surcoloration, on différencie par un réactif qui enlève progressivement l'excès de colorant, en surveillant au microscope pour arrêter l'effet au moment voulu.
- Colorations directes : elles se fixent directement sur l'objet.
- Colorations indirectes avec mordantage : la fixation du colorant a lieu par l'intermédiaire d'un sel métallique "mordant".

Coloration indirecte par mordantage : mordant

Le mordantage est l'utilisation d'un mordant, c'est-à-dire d'une substance qui renforce les colorations et dans certains cas, les rend possibles. On n'emploie que des mordants neutres ou acides. On peut dire qu'un mordant est une substance qui sert d'intermédiaire entre le colorant et la pièce à colorer : il provoque une combinaison chimique entre deux corps qui n'ont aucune affinité chimique au départ ; il sensibilise le corps à colorer en formant avec lui une combinaison stable. Il se forme donc entre le tissu, le mordant et le colorant, une triple combinaison

colorée suffisamment stable pour résister aux décolorants (acides, alcool...). On utilise fréquemment le Lugol à cet effet (solution forte de Nicolle).

Coloration directe : mouillant

Un agent mouillant est un agent qui diminue la tension superficielle ; les détergents en font partie. Ils facilitent la pénétration des colorants dans les cellules ou dans les structures de la cellule en détruisant la couche grasse ou huileuse qui les protège : on peut donc parler ici de coloration directe. Précisons que le mouillant ne réduit pas la tension superficielle de la solution colorante mais la tension superficielle du coloré (coupe ou préparation).

L'Invadin suggéré par CLEMENÇON et MOSER peut être avantageusement remplacé par un simple détergent de ménage (utilisé pour la vaisselle). Le SDS plus récemment recommandé par CLEMENÇON a l'avantage de la pureté et de la stabilité comme composant de base. Il faut éviter de dépasser la dose recommandée dans les formules de colorant afin de ne pas provoquer l'apparition de mousse dans la préparation.

Certains auteurs recommandent de placer le prélèvement à observer dans l'alcool pendant un temps non rigoureusement déterminé (5 à 15 minutes) pour assurer la "mouillabilité" des tissus. Il y a ici un usage inapproprié du terme mouillabilité : en effet, l'alcool est le meilleur des déshydratants et un fixateur de premier ordre. Avec le risque cependant de trop déshydrater les tissus et de leur faire perdre leur taille initiale.

Matières colorantes

Ce sont des substances qui se fixent de façon appropriée sur les objets qui sont mis en contact avec elles par l'intermédiaire d'une solution.

Les principales modalités des teintures ou colorations sont : réactions chimiques entre colorant et objet, imbibition différentielle de l'objet, précipitation du colorant sur l'objet, adsorption du colorant sur l'objet, liaison à l'objet par un "mordant", interdiction de liaison à l'objet.

Certains colorants, acides par nature, se fixent différemment sur certaines structures et conduisent ainsi à des colorations signalétiques, sinon spécifiques, par imbibition à des vitesses différentes ; de plus, le premier colorant ayant occupé un "espace" affine, en interdit l'accès aux autres en compétition avec lui.

Coloration des différents types de tissus

Tissus contenant des lipides

a) Coloration par les lysochromes

Parmi les colorants lysochromes on trouve le bleu de crésyl ammoniacal. La coloration par le bleu de crésyl se fait ainsi : on fait agir une solution aqueuse à 1 ou 2%, on lave à l'eau puis par de l'ammoniaque diluée à 50% ; les lipides apparaissent jaune d'or, les parois des tissus fongiques étant incolores ou vineux pâle. On peut mettre ainsi en évidence les chrysocystides des strophaires et des hypholomes.

b) Coloration par les bleus métachromatiques

La coloration métachromatique consiste en un virage du colorant dans une teinte autre que la sienne propre lorsqu'il est fixé par l'objet.

Parmi les bleus les plus utilisés on trouve le bleu de toluidine et le bleu de crésyl. Cette coloration met en évidence non seulement les lipides acides mais aussi tous les autres constituants métachromatiques.

c) Réactions des caroténoïdes

On rattache habituellement les caroténoïdes aux lipides en raison de leurs caractères de solubilité. Ils se colorent directement en violet, bleu ou vert dans les acides forts et en violet dans les liquides iodés (Iugol, Melzer).

d) Réaction des chromolipoides

Ce sont en général des pigments jaunes à bruns, basophiles et acido-résistants. On les rencontre notamment chez les russules et rhodophylles. ROMAGNESI a tiré un grand parti systématique de leur présence. Leur acido-résistance est mise en évidence par la technique de Ziehl-Nielsen (fuchsine de Ziehl).

Tissus contenant des polyosides

Ces polyosides sont des sucres \pm polymérisés.

a) coloration métachromatique : voir ci-dessus.

b) coloration au rouge de ruthénium : en solution aqueuse à 0,1%.

Colorants des oxydases

En injectant dans un tissu un mélange de solutions d'alpha-naphtol et de diméthylparaphénylène-diamine, on provoque une réaction (dite "*Nadiréaction*") permettant de localiser les oxydases. La réaction donne, par oxydation, un produit de

condensation coloré en bleu. Aucune fixation préalable n'est possible, le colorant formé diffuse facilement et est un lysochrome.

Si on se contente d'une mise en évidence topologique comparée, on peut faire appel à la présence *in situ*, spécialement en ce qui concerne les composés des tissus fongiques, d'un des deux composants fondamentaux de la Nadiréaction. C'est ce qu'on fait en colorant certains tissus de russules ou de bolets à l'aide d'un phénol. On fait encore appel à la même réaction lorsqu'on utilise la paraphénylène-diamine ou la teinture de Gaïac.

Iodophilie - coloration à l'iode

Suivant le mode opératoire et la coloration obtenue, l'iode permet de déceler : le glycogène, la cellulose, l'amidon, la chitine non sclérifiée ni fossilisée, et certains autres polyosides dextrinoïdes.

Voici les principaux réactifs utilisables :

- le lugol, fort ou faible suivant sa concentration : iode 1 g + iodure de potassium 2 g + eau 100 à 400 ml suivant la "force" désirée.
- le Melzer ou chloral iodo-ioduré : iode 1,5 g + iodure de potassium 5 g + hydrate de chloral 100 g + eau 100 ml.

La couleur et l'intensité doivent être soigneusement notées. On peut avoir suivant les cas : une coloration noir pur, violet foncé, bleu foncé, bleu ciel, brun acajou, vineux, jaune brunâtre, jaune d'or, jaune clair. On n'attache en général pas de signification à ces trois derniers termes.

- Si les objets prennent une teinte brun acajou à brun vineux on les dit "dextrinoïdes" ou pseudo-amyloïdes. Ils peuvent contenir soit du glycogène, soit des dextrines.
- L'amidon et l'amyloïde se colorent directement en bleu dans le lugol ou le Melzer ; la réaction est dite amyloïde.

La coloration à l'iode est une véritable coloration métachromatique par opposition aux couleurs jaunes orthochromatiques que prennent la plupart des substances plongées dans l'iode.

La réaction de l'iode s'observe bien sur les éléments pâles. Il n'en est pas de même des éléments fortement pigmentés : ici, l'action de l'iode peut être beaucoup moins apparente et d'une interprétation délicate.

Sensibilité au fer - sidérophilie - carminophilie

JOSSERAND rappelle que KÜHNER est le premier à avoir constaté la présence, dans les basides de la tribu des *Lyophylleae*, de granulations dites carminophiles. Ces grains se présentent sous la forme de très nombreuses sphérules entassées les unes contre les autres. La carminophilie ou sidérophilie exprime l'affinité pour le carmin acétique en présence de fer.

Extrait de la fiche technique de LECOMTE :

« Le carmin acétique commercialisé est une combinaison d'acide carminique avec de l'alumine, de la chaux et des albuminoïdes. Par sa double action de fixateur et de colorant, le carmin acétique est utilisé pour l'observation des noyaux qui sont fortement mais finement colorés. L'acétate de fer rend la coloration rouge intense noirâtre. »

Il faut savoir que les verrues, granulations, parois et ornements amyloïdes ne se colorent pas par le carmin.

Manière de procéder :

- placer une grosse goutte de réactif sur une lame de verre et y placer les coupes ;
- chauffer durant quelques secondes quasi jusqu'à ébullition ;
- agiter le carmin acétique avec une aiguille en acier (ce qui provoque la formation d'acétate de fer) ;
- alternative : y déposer quelques grains de sulfate de fer ou une solution de chlorure de fer III ;
- dès que le carmin acétique vire au rouge bleuâtre, voire noirâtre, et perd sa transparence, refroidir avant la formation d'une pellicule de surface ;
- placer les pièces colorées dans une nouvelle goutte de carmin acétique, dissocier et observer.

Dans une préparation réussie, le protoplasme est faiblement et uniformément coloré, tandis que les noyaux sont vivement teintés de rouge ou de pourpre noirâtre.

CLEMENÇON procède comme suit pour mettre en évidence la carminophilie des basides :

- prélever un fragment de lame (s'il s'agit d'un exsiccatum, hydrater d'abord à l'ammoniaque et tamponner au papier buvard) ;

- mordancer dans une solution de sulfate de fer à 10% durant 5 à 10 minutes ;
- tamponner le fragment puis le plonger dans le carmin acétique et faire bouillir durant 1 à 2 minutes ; des précipités noirs se forment dans la solution rouge ;
- observer ensuite dans une goutte de chloral hydraté.

III.- COLORATIONS TOPOLOGIQUES

Les pigments

On peut les envisager du point de vue :

- 1/ de leur localisation dans les tissus et cellules,
- 2/ de leur constitution chimique,
- 3/ de leur métabolisation,
- 4/ enfin de leur liaison avec les autres constituants cellulaires.

Méthodes spéciales en histologie mycologique

a) Spores

Les spores présentent une certaine différenciation des membranes et une assez grande imperméabilité de celles-ci. Pour que les colorants pénètrent à travers elles, il faut en général les placer dans l'alcool dilué ou dans l'eau sulfurique à 0,01% et rincer aussitôt.

b) Techniques végétales applicables à la mycologie

La cellule végétale a un squelette rigide et réfringent formé de parois cellulaires ± soudées les unes aux autres en forme de tissu ou de faux tissu.

La destruction du cytoplasme, en ne laissant subsister que le squelette cellulosique, permet de mieux observer les parois ainsi que l'anatomie des éléments soumis à l'examen. A cet effet, on baigne la préparation de quelques secondes à 5-10 minutes, dans une solution à 50% d'hypochlorite de soude (l'eau de Javel est à rejeter, à cause de ses impuretés). Laver ensuite à l'eau acidulée par l'acide acétique.

L'hydrolyse basique se fait à la potasse. Il s'agit d'une technique spéciale utilisée par KÜHNER dans l'étude des spores (cf. son ouvrage *Hyménomycètes agaricoïdes*). KÜHNER parle fréquemment de ce traitement qu'il appelle le "traitement potassique" ; il l'utilise notamment pour éliminer la couche externe (myxosporium) des spores.

Si l'on éprouve des difficultés à reconnaître la présence des boucles au pied des basides des entolomes, KÜHNER recommande de colorer au rouge Congo après un traitement potassique suffisant pour lyser le contenu cellulaire.

Les protides ne donnent pas de réaction absolument caractéristique, aussi faut-il essayer plusieurs réactifs pour les reconnaître sûrement. Il est bon de fixer d'abord le tissu à l'alcool qui le durcit et dissout un certain nombre de substances qui pourraient troubler les réactions. L'éosine en solution aqueuse très faible est un de ces réactifs ; elle donne une coloration rouge non élective.

Les réactions de la cellulose sont quelques fois difficiles à obtenir : elles ne se manifestent qu'après transformation notamment par des alcalis caustiques. La cellulose des champignons est généralement mélangée à une grande quantité de chitine.

La callose se colore par les bleus d'aniline solubles à l'eau (bleu de méthyle employé en solution à 1% acidulée par 3% d'acide acétique).

Les membranes cutinisées¹ : sont acido-résistantes et se colorent électivement par la méthode de Ziehl-Nielsen.

Les composés pectiques se comportent comme des acides et prennent les colorants basiques (de préférence en solution acidulée à 0,05% d'acide acétique) mais non les colorants acides, comme la cellulose. Le meilleur réactif de ces composés est le rouge de ruthénium ; en revanche, ils ne prennent pas le rouge Congo ammoniacal.

Les mucilages. Les mucilages cellulosiques (rares) réagissent comme la cellulose. Les mucilages pectiques (fréquents) se gonflent, se colorent par les colorants basiques et par le rouge de ruthénium. Les mucilages callosiques (qui se dissolvent sans se gonfler) se colorent par le bleu d'aniline en solution acétifiée mais non par les colorants basiques. Ces mucilages se mélangent entre eux et avec les gommes : il n'est donc pas facile de les identifier.

Les lipides. Le réactif le plus commode est le Soudan III en solution alcoolique qui les colore en rouge vif. Ce colorant colore aussi les cires, résines, cutine, subérine et latex mais ne colore pas la cellulose, la lignine, les mucilages.

¹ La paroi cellulaire des plantes comprend des substances lipophiles d'incrustation, telles que cutine, cires, subérine. La cutine est un composé lipidique hydrophobe, alors que la pectine est une substance hydrophile.

c) Techniques mycologiques

Milieu alcalin ou acide

Si un milieu alcalin dissout ou déforme les cellules, pigments, etc., il faut essayer alors l'eau éventuellement colorée au rouge Congo, à l'éosine ou l'acide lactique concentré éventuellement coloré par le bleu coton.

Le rouge de ruthénium

Colorant remarquable ; il est coûteux. Il est soluble dans l'eau mais non dans l'alcool et la glycérine : on le prépare extemporanément (traces de poudre dans un peu d'eau pour obtenir un rouge foncé). Ce colorant colore uniquement les éléments basophiles, c'est par excellence le réactif des composés pectiques.

Bleu de méthyle au lactophénol ou bleu coton

Le bleu de méthyle est un bleu d'aniline habituellement appelé bleu coton. Il est un colorant spécifique de la callose. Il colore les membranes callosiques ainsi que le contenu cytoplasmique des hyphes.

Réactif iodé de Melzer

Ce réactif a été créé pour distinguer les parois amyloïdes, les parois non amyloïdes et les parois dextrinoïdes. Ce réactif possède en outre un grand pouvoir éclaircissant, ce qui le rend pratique pour l'examen des plectenchymes.

Le liquide de lugol

Ce réactif est excellent pour les champignons filamenteux. Peu réfringent, il éclaircit peu mais donne des images à contours extrêmement nets. Il colore électivement le glycogène en brun acajou qui tranche sur la teinte jaune brun que prennent les membranes et parties non glycogéniques du cytoplasme.

Le Soudan III au lactophénol

Est utilisé pour la recherche et la coloration des lipides.

le Giemsa et le carmin acétique

Ils sont recommandés par KÜHNER pour la coloration des noyaux. Voir aussi les travaux de DONADINI et de BERTHET, sur les Discomycètes.

Les réactifs sulfoaldéhydiques

Ils colorent les substances phénoliques (coloration des polypeptides) contenues dans certaines cystides et hyphes. Inventés par MAIRE et largement utilisés par ROMAGNESI, ils trouvent leur application dans les russules. En définitive, c'est la sulfovanilline qui est préférée, dans un premier temps, bien que moins sensible que d'autres aldéhydes : elle a en effet un grand pouvoir de pénétration et permet toutes les observations structurales que l'on souhaite. La préparation est extemporanée. Le sulfobenzaldéhyde s'avère également très intéressant, car il dépasse les limites de la sulfovanilline !

L'acido-résistance

MELZER a appliqué la méthode de la coloration de Ziehl aux incrustations périhyphiques des russules ; ce procédé a été largement utilisé par ROMAGNESI.

Le bleu de crésyl ammoniaco-acétique

Imaginé par LOCQUIN, il met en évidence la métachromasie, les lipides et le gonflement de certaines strates membranaires.

DEUXIEME PARTIE

LES PRODUITS CHIMIQUES ET LEURS USAGES

(cette partie a été rédigée avec le concours de Marcel LECOMTE et des fiches techniques qu'il a publiées sur son site Internet)

L'objet de ce chapitre est de présenter, dans l'ordre alphabétique, des notices sur les produits chimiques (colorants, réactifs, milieux d'observation, etc.) de toute nature utilisés en microscopie des champignons, même les produits les plus simples. Nous nous limitons ici aux produits courants en exposant surtout leurs aspects utilitaires. Ces notices comportent des renseignements recueillis de divers côtés : elles ne sont pas établies selon un schéma préconçu ; elles peuvent faire en partie double emploi avec les renseignements déjà donnés ci-dessus. Pour en savoir plus sur les divers produits, il est conseillé de prendre connaissance des fiches techniques très complètes disponibles sur le site Internet de LECOMTE.

LECOMTE considère qu'en chimie, il n'y a pas de place pour l'approximation dans le dosage des produits. C'est peut-être le seul paramètre qu'il est possible de maîtriser parfaitement car tous les autres sont sujets à caution : le champignon peut être jeune ou vieux, sec ou imbu et réagir avec \pm d'inconstance, alors il faut lui

appliquer des produits et réactifs préparés de manière rigoureuse et constante. Si l'auteur d'une formule annonce des doses précises, on peut supposer qu'il a expérimenté et qu'il considère que c'est la meilleure solution.

Ka (constante d'acidité) de divers milieux

Afin d'avoir une bonne perception du caractère acide ou basique d'un produit ou d'un milieu, il est utile de connaître le facteur Ka de quelques produits classiques.

acides faibles : phosphorique : 2 ; lactique : 3,86 ; acétique : 4,75

acides forts : chlorhydrique : - 7 ; acide sulfurique : - 3

base faible : ammoniacque : 9,2

bases fortes : potasse et soude : 15,7

En termes de pH, 1 indique un acide fort et 14 une base forte, l'eau étant neutre à 7.

Acide acétique

L'acide acétique (à 5% en solution aqueuse) est un fixateur non coagulant. C'est un acide faible au pH de 2,4. Il peut être mélangé à l'alcool. Il a une vitesse moyenne de pénétration et gonfle les tissus qui, fixés, sont extrêmement mous. Le cytoplasme imprégné d'acide acétique est rendu très acidophile mais peut prendre aussi les colorants basiques. Le pH optimum pour une bonne fixation est de 4. Les autres acides, notamment lactiques, lui sont très comparables en tant que fixateurs.

En 1976, KÜHNER a énoncé une règle essentielle, qu'il considère comme valable pour tous les Hyménomycètes à lames : "Les spores dont au moins une couche de la paroi gonfle fortement par le procédé ammoniac-acétique (traiter les spores à l'ammoniacque, milieu basique, et ensuite par l'acide acétique, milieu acide), sont toujours fortement dextrinoïdes jusqu'à maturité et puissamment cyanophiles."

Acide chlorhydrique (HCl)

L'acide chlorhydrique à 5% est surtout utilisé en microscopie pour la recherche des incrustations acido-résistantes chez les russules, par la méthode différentielle de MELZER. Les incrustations apparaissent comme des petites masses bleu mauve réparties rarement autour des dermatocystides du pileipellis et essentiellement sur les hyphes primordiales. Dans une préparation bien faite, les incrustations sont les seuls éléments non décolorés par l'acide. Ne pas confondre les incrustations acido-résistantes qui se trouvent à l'extérieur des cystides, avec des

granulations internes des cystides qui sont parfois aussi vivement colorées (il s'agit alors souvent de contenus vacuolaires) !

Acide lactique

L'acide lactique est un acide faible. Concentré, il est un regonflant très énergique des exsiccata. Son indice de réfraction assez élevé ($n = 1,439$) en fait un bon milieu d'observation. Si sa viscosité présente l'inconvénient de rendre la dissociation difficile, elle offre l'avantage de permettre la réalisation de préparations semi-permanentes. Seul, il est relativement peu utilisé, mais il entre dans la composition de plusieurs milieux d'observation de très grande valeur, tels le lactophénol et mieux, le chloral-lactophénol. C'est d'autre part le solvant du bleu de méthyle (ou bleu coton) dans le colorant dit "bleu lactique".

Acide nitrique (HNO₃)

Voir la rubrique aniline.

Acide sulfurique (H₂SO₄)

L'acide sulfurique est notamment utilisé en combinaison avec la vanilline, pour donner un réactif aussi bien macrochimique que microscopique. La sulfovanilline fait partie des réactifs sulfoaldéhydiques, au même titre que notamment le sulfobenzaldéhyde ; elle est le plus utilisé de ceux-ci. On la prépare de la manière suivante : dissoudre extemporanément quelques cristaux de vanilline dans une grosse goutte d'acide sulfurique à 50% en mélangeant avec une baguette en verre. La solution obtenue est jaune clair et s'altère rapidement.

La sulfovanilline colore en gris ardoise le contenu des laticifères et des cystides (on parle alors de gléocystides) de nombreuses russules, ce qui permet de les déceler et de les étudier. Ce réactif est très précieux, notamment pour la recherche des dermatocystides, qui passent facilement inaperçues dans les autres liquides d'observation.

On n'utilise pas l'acide sulfurique seul comme milieu de montage parce qu'il détruit les hyphes et donne de très mauvaises préparations. L'acide sulfurique est un réactif extrêmement dangereux car, étant très corrosif, très oxydant et fortement déshydratant, il détruit la plupart des matières organiques. Il existe une règle d'or qu'il faut observer lors de la dilution de l'acide sulfurique : **verser l'acide dans l'eau** (et par petites quantités, en agitant) et non pas l'inverse ; on risquerait de voir l'eau bouillir et l'acide jaillir de tous côtés. Enfin, il faut éviter de mélanger l'acide sulfurique avec des bases (ammoniaque, soude, potasse), car la réaction pourrait être assez violente.

Alcool

L'alcool est très hygroscopique¹. Miscible à l'eau en toutes proportions, il contracte les cellules de la moitié de leur volume. Son association à l'acide acétique en tant que fixateur est connue depuis longtemps. Il ne fixe pas les lipides mais les dissout généralement. Il rigidifie les tissus. Il ne fixe pas les hydrates de carbone, sauf le glycogène. Il pénètre assez rapidement les tissus. En coagulant, l'alcool détruit les organites intracellulaires et déforme les noyaux et nucléoles. Il n'a pas d'influence notable sur la plupart des colorants et n'empêche généralement pas leur diffusion.

Les auteurs recommandent généralement l'emploi d'éthanol. LACHAPELLE emploie avec succès le méthanol à usage domestique qui est bien meilleur marché.

Ammoniaque

L'ammoniaque est une solution aqueuse concentrée de gaz ammoniac (NH₃), qui est un gaz à l'odeur extrêmement irritante. Les solutions commerciales contiennent généralement entre 20 et 30% de ce gaz. On peut, pour son utilisation en macrochimie, déposer une petite goutte d'ammoniaque sur la partie du champignon à tester, ou bien exposer celle-ci aux vapeurs qui se dégagent du flacon.

L'ammoniaque concentrée a le pouvoir de ramollir les hyphes de champignons frais et de regonfler les exsiccata. C'est, de plus, le solvant de colorants tels que le rouge Congo. Certains auteurs préfèrent diluer deux fois l'ammoniaque, car son action sur les hyphes est alors moins drastique : elle peut dès lors être appliquée au montage d'objets plus délicats.

L'ammoniaque est très volatile, aussi faut-il en ajouter souvent lors de l'observation d'une préparation microscopique. C'est en général un très bon milieu de montage, mais il faut savoir qu'il dissout certains éléments comme les incrustations acido-résistantes de la cuticule des russules et qu'il altère quelquefois la couleur des pigments.

On l'utilise notamment pour l'étude

1/ des chrysocystides (cystides dont le contenu vire au jaune sous l'action des bases dans des genres comme *Hypholoma* ou *Stropharia*, notamment) ;

2/ des cystides de certains *Inocybe* qui jaunissent dans l'ammoniaque à des degrés divers, ce qui est intéressant pour leur identification ;

¹ Remarquer que le méthanol est beaucoup moins hygroscopique que l'éthanol.

3/ des ornements sporiques.

Par ailleurs, l'ammoniaque est utile pour éliminer l'air dans les espaces interhyphiques : pour cela chauffer la préparation.

Dans le cas des spores d'ochrosporés (*Pholiota*, *Cortinarius*, *Alnicola*, etc.), l'ammoniaque est un milieu d'observation doublement indiqué : outre son mérite de regonflant, elle possède encore celui de foncer l'ensemble de la spore mais plus vivement les ornements que le reste de la paroi. Le contraste est donc accusé et la différenciation renforcée.

Il est bon de savoir que l'ammoniaque, au contact de l'iode, et dans des conditions très précises, peut provoquer des réactions à caractère explosif. Mais il n'y a pas lieu de s'affoler !

Aniline

Julius SCHÄFFER a conçu en 1933 une réaction dite "réaction croisée" de l'aniline avec l'acide nitrique pour séparer deux groupes d'*Agaricus*. Cette réaction est obtenue en traçant sur le revêtement du chapeau un premier trait avec une baguette de verre trempée dans l'huile d'aniline, puis un deuxième trait, croisant le premier, avec une autre baguette de verre trempée dans l'acide nitrique. Les constatations au point de rencontre sont les suivantes :

- teinte rouge orangé = réaction positive (ex. *A. arvensis*).
- pas de teinte rouge orangé = réaction négative (ex. *A. xanthoderma*).

H.M. FRANK a publié un article dans la revue ZfM (ZfM 51 : 103-108, 1988) où il propose de remplacer la réaction de Schäffer par le dépôt d'une goutte d'un mélange à parts égales d'aniline et d'acide acétique à n'importe quel endroit du champignon. D'un emploi très facile, ce réactif se conserve malheureusement durant très peu de temps : il polymérise très vite !

Bleu coton : voir bleu de méthyle.

Bleu de crésyl

La solution alcoolique est d'un bleu pur tandis que la solution aqueuse est violacée. On peut le faire agir sur des exsiccata ou sur du matériel frais.

Le bleu de crésyl est d'abord un colorant général des parois. C'est aussi un colorant basique des vacuoles, qui affichent une coloration uniforme ou montrent une inclusion ± importante de granulations fortement teintées. En solution aqueuse concentrée, il colore le protoplasme des cellules en bleu foncé.

Sur le plan de la systématique, il faut accorder beaucoup d'importance à la coloration prise par la paroi cellulaire qui peut réagir de différentes manières :

- soit elle ne se colore pas ;
- soit elle se colore en bleu ou violet : on parle alors de coloration orthochromatique ;
- soit elle se colore en pourpre ou rouge (couleurs différentes du bleu de crésyl) : on parle alors de métachromasie.

Le bleu de crésyl permet notamment de mettre remarquablement en évidence l'endospore de la paroi sporique des lépiotes, qui se colore de manière élective en rouge pourpre.

Selon KÜHNER, le bleu de crésyl colore également de manière caractéristique les enclaves ou exsudats lipidiques :

- colorer la préparation dans une 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.

Toujours selon KÜHNER, les hyphes laticifères et oléifères sont à observer dans le bleu de crésyl, la sulfovanilline, le bleu coton ou le bleu de toluidine.

Les gléocystides souvent se colorent sélectivement dans le bleu coton ou la SV (aussi le sulfoformol, le sulfobenzaldéhyde) mais le bleu de crésyl en colore l'intérieur en bleu profond.

En solution alcoolique, il est devenu pour BUYCK un réactif de routine, permettant souvent une observation de qualité supérieure à celle réalisée dans le rouge Congo ou d'autres réactifs pour pas mal de russules. Le bleu de crésyl est un milieu d'observation révélant les caractères des dermatocystides et des laticifères : le contenu des cystides prend une coloration bleu verdâtre et les hyphes oléifères ainsi que les hyphes axiales des cordons de sphérocytes, une coloration bleu foncé dense qui tranchent l'une et l'autre sur le reste de la préparation. Enfin et surtout il révèle de manière précieuse les incrustations des hyphes primordiales et d'autres cellules.

Selon EYSSARTIER, le bleu de crésyl fait apparaître une gangue métachromatique chez certains plutées.

Les effets de ce colorant sont amplement analysés par SINGER. Selon lui, la métachromasie concerne les parois des spores, des hyphes, le contenu des

gléocystides, les parois des cystides, des basides et la trame des lames ; elle concerne aussi l'ornementation des spores dans certains genres. Il précise que l'action sur les hyphes du stipe doit s'observer sur les hyphes intérieures et non les hyphes corticales. Toujours selon cet auteur, plusieurs colorants provoquent des réactions métachromatiques : bleu diamine, bleu de méthylène alcalin, différents violets ou carmins. Il fait remarquer que le bleu de toluidine¹ convient souvent mieux que le bleu de crésyl pour mettre en évidence la métachromasie.

HEINEMANN suggère d'utiliser le bleu de crésyl pour l'examen des cystides, celles-ci étant pour la plupart métachromatiques.

L'observation dans le bleu de crésyl demande des coupes extrêmement fines. Ce bleu peut se préparer selon la formule de CLEMENÇON : elle est une alternative commode à la solution extemporanée qui, elle, se prépare comme suit : sur la lame porte-objet déposer une goutte d'eau et, dans celle-ci, une infime quantité de poudre sur la pointe d'une aiguille lancéolée, dilacérer à fond la coupe (de préférence sur *exsiccata* car sur le frais le contenu gêne parfois l'observation), laisser se colorer (quelques minutes), déposer la lame couvre-objet, laver à l'eau (déposer une goutte d'eau sur le côté du couvre-objet, aspirer le colorant de l'autre côté à l'aide d'un buvard) de manière à réduire l'intensité de la coloration et observer.

Que ce soit pour la métachromasie, l'amyloïdie ou la cyanophilie, selon JOSSERAND, il convient d'observer les hyphes par leur section, donc selon le cas, de procéder à une coupe parallèle à l'arête, perpendiculaire au rayon du chapeau ou à la longueur de stipe de manière à voir des hyphes tronçonnées transversalement et présentant à l'œil leur orifice sectionné : de cette façon, on n'est pas gêné par le contenu de l'hyphe. Après un séjour dans le colorant, la coupe est transportée dans le solvant.

Le bleu de crésyl donne des résultats spectaculaires dans la mise en évidence des pigments qu'ils soient vacuolaires ou qu'ils se présentent sous forme d'incrustations pariétales. Ce colorant est particulièrement précieux car l'observation des pigments, s'avérant un exercice difficile, est souvent négligée.

La solution alcoolique recommandée par CLEMENÇON donne d'excellents résultats et se conserve bien : eau distillée 55,5 ml, éthanol 27 ml (= 21,6 g), glycérine 17 ml (= 21,4 g), Invadin 0,5 ml (mouillant que l'on peut remplacer par un détergent ménager), bleu de crésyl 0,2-0,5 g.

¹ C'est aussi l'avis et la recommandation de LANGERON.

Bleu de méthyle

Le bleu de méthyle fait partie d'une famille de colorants bleus acides. Il s'utilise :

- en solution aqueuse : eau bidistillée 100 ml + bleu de méthyle 1 g + agent mouillant 1 cc.
- en solution aqueuse acidifiée à l'acide acétique : eau bidistillée 100 ml + bleu de méthyle 1 g + acide acétique glacial 2 cc + agent mouillant 1 cc.
- en solution alcoolique : alcool éthylique à 90° 100 ml + bleu méthyle 2 g + agent mouillant 1 ml + eau bidistillée 100 ml.

Bleu de méthyle au lactophénol ou bleu coton - cyanophilie

Le bleu de méthyle, aujourd'hui composant courant du bleu coton, peut se mélanger à l'eau, à l'acide lactique, au lactophénol, au phénol, etc. Selon plusieurs auteurs, la meilleure solution consiste à le dissoudre dans le lactophénol à raison de 0,5%¹. Le lactophénol convient mieux que l'acide lactique, ce dernier étant considéré comme trop regonflant et donc ne respectant pas les dimensions des éléments.

Le bleu de méthyle est un colorant plasmatique et spécifique du collagène : il colore soit la membrane si elle est callosique, soit le contenu cytoplasmique des hyphes. Comme le rouge Congo, le bleu coton colore donc de façon spécifique les parois des hyphes, les cloisons, les boucles, etc. Il colore spécialement bien les ornements non amyloïdes des spores et les inclusions réfringentes des chrysocystides (après un passage dans l'ammoniaque).

Il permet surtout d'observer la cyanophilie et présente, à cet égard, une valeur importante dans la spécification de certains genres, créant une différenciation résultant du fait qu'il est absorbé ou non selon le genre par les spores, les hyphes, les chrysocystides, certains poils du revêtement.

La solution ne doit pas être opaque. Selon SINGER, le bon procédé consiste à plonger la coupe dans l'ammoniaque ou la potasse, à rincer pour éliminer ces milieux, à colorer ensuite dans la solution de bleu coton. Pour observer la cyanophilie : chauffer et attendre quelques instants (voire quelques heures).

La cyanophilie se traduisant par l'aptitude des parois à se colorer en bleu, ce qui crée un contraste avec l'intérieur de la cellule, JOSSERAND recommande

¹ Affirmation contestée par certains auteurs qui préfèrent l'acide lactique sans phénol.

d'observer les hyphes par leur section. Selon le cas, procéder à une coupe parallèle à l'arête, perpendiculaire au rayon du chapeau ou à la longueur du stipe de manière à voir des hyphes tronçonnées transversalement et présentant à l'œil leur orifice sectionné : de cette façon, on n'est pas gêné par le contenu de l'hyphe. Après un séjour dans le colorant, la coupe est transportée dans le solvant.

JOSSERAND fait encore remarquer que quels que soient les mérites de ce colorant, il est généralement d'une sélectivité très faible, parfois même nulle (avis que nous partageons) : tous les éléments se colorent en bleu et si les cystides paraissent d'un bleu incontestablement plus sombre que le tissu alentour, c'est surtout parce que, plus volumineuses que les autres cellules (hyméniales ou tramaires), elles fixent le colorant sur une masse plus considérable.

Selon SINGER, l'ornementation des spores s'observe bien dans le bleu coton chez les Discomycètes mais également dans plusieurs genres de Basidiomycètes (*Crepidotus*, *Lepista*, *Porpoloma*, etc.). LACHAPELLE recommande d'essayer d'observer dans le rouge Congo SDS qui donne d'excellents résultats (il ne l'a toutefois pas encore essayé dans de nombreux cas).

DONADINI signale que la paroi sporique est constituée de 4 couches : l'endospore, l'exospore, la périspore et l'ectospore ; cette structure n'est pas lisible au microscope photonique. C'est la périspore surtout, et dans une moindre proportion l'exospore, qui sont colorées par le bleu lactique¹. La périspore est en effet constituée de polyosides du type callose et de composés pectiques. Cet auteur rappelle qu'une bonne observation des ornements de spores doit être "mobile" pour que l'impression rétinienne soit "volumique", sinon on ne voit qu'un plan. En jouant ainsi sur la profondeur de champ, on observe de plus l'ornementation aux antipodes de la spore, donc à l'envers, ce qui donne souvent de précieuses indications.

KÜHNER a énoncé une règle essentielle, qu'il considère comme valable pour tous les Hyménomycètes à lames : "Les spores dont au moins une couche de la paroi gonfle fortement par le procédé ammoniac-acétique sont toujours ... puissamment cyanophiles".

Bleu de méthylène

A ne pas confondre avec le bleu de méthyle ! Colorant basique, très soluble dans l'eau et l'alcool à raison de 1%.

MOSER recommande, lui, la composition suivante : 0,5 g de bleu de méthylène dissous dans 23 ml d'alcool ; y ajouter 77 ml d'eau et 0,8 g de potasse.

¹ Que l'auteur préfère au bleu au lactophénol.

Ce bleu est une solution alternative pour colorer les parois peu visibles de spores incolores.

Bleu de toluidine - métachromasie - structures gélifiées

SINGER précise que plusieurs colorants provoquent des réactions métachromatiques : bleu diamine, bleu de méthylène alcalin, différents violets ou carmins mais, fait-il remarquer, le bleu de toluidine¹ convient souvent mieux que le bleu de crésyl pour mettre en évidence la métachromasie.

Les affinités basophiles du bleu de toluidine, comme du bleu de crésyl, sont nettement renforcées par la fixation, notamment par le formol.

Pour l'observation des hyphes gélifiées, JOSSERAND recommande de les observer comme il l'expose pour les phénomènes d'amyloïdie, de métachromasie et de cyanophilie, ensuite de voir si l'action de la potasse ne favorise pas l'observation et si le bleu de toluidine ne provoque pas une coloration contrastante utile.

A propos des hyphes laticifères et oléifères, KÜHNER² écrit qu'elles sont à observer dans le bleu de crésyl, la SV (ou SVB, SF), le bleu coton ou le bleu de toluidine.

LACHAPELLE s'inspirant de la formule de CLEMENÇON pour la préparation du bleu de crésyl en solution alcoolique, a composé une solution de bleu de toluidine comme suit³ : 25 cc de glycérine + 50 cc d'alcool + 100 cc d'eau + 0,5 g de bleu de toluidine⁴. Cette solution, qui s'avère stable, lui a donné de très bons résultats pour l'observation, dans les parties gélifiées de champignons⁵, des hyphes cuticulaires, des cloisons, des boucles, des pigments (vacuolaires, intracellulaires, intercellulaires) et, bien entendu, de la métachromasie. LACHAPELLE considère le bleu de toluidine comme un colorant de base aussi important en microscopie que le rouge Congo, le bleu de crésyl, le bleu coton, etc.

¹ C'est aussi l'avis et la recommandation de Langeron.

² *Hyménomycètes agaricoïdes*, p. 903.

³ A noter que l'adjonction de SDS provoque une floculation du colorant qui, ainsi dénaturé, devient inutilisable.

⁴ La combinaison à parts égales de glycérine, d'eau et d'alcool constitue un bon fixateur. Ceci devait conduire normalement à bien révéler les pigments et c'est ce que nous avons effectivement pu observer.

⁵ Exemple le plus significatif : le pileipellis en trichoderme clavulé et noduleux de *Oudemansiella mucida*.

Bleu trypan

CLÉMENÇON, qui recommande le bleu trypan, fait remarquer qu'il donne une coloration très claire des parois, qu'il ne masque pas les pigments et qu'il laisse le cytoplasme incolore.

Le bleu trypan est un colorant acide de la même famille chimique que le rouge Congo ; il se fixe sur l'amyloïde.

LACHAPELLE a préparé une solution L4¹ comme suit : eau 80%, KOH 0,8%, NaCl 0,8%, mouillant (1 goutte de Dreft²), 0,1% de phénol, 0,5% de bleu trypan (une petite pointe de cutter !), 20% de glycérine. Mélanger dans cet ordre et laisser reposer 2 heures. On peut aussi préparer un bleu trypan aqueux à 1% de la même manière que le rouge Congo SDS.

Quoique LACHAPELLE n'ait pas une très longue pratique de ce bleu, il confirme l'intérêt de ce colorant, au moins comme alternative au rouge Congo lorsque celui-ci ne donne pas satisfaction. Il recommande d'observer à la fois dans le rouge Congo et le bleu trypan dans le cas où on se livre à une étude approfondie ou de découverte d'un champignon. La coloration est d'un joli bleu pâle alors même que la solution est d'un bleu intense ; quoique le contraste ne soit pas très fort la lisibilité est excellente, grâce notamment à une très bonne réfringence. Le cytoplasme n'est quasiment pas coloré tandis que les parois des hyphes, les cloisons et les boucles sont bien apparentes ; les pigments sont remarquablement mis en évidence. L'agencement des articles au niveau des cloisons, notamment les boucles sont d'une remarquable lisibilité. Même les granulations sidérophiles de *Lyophyllum georgii*, par exemple, ressortent bien. En revanche, lorsque les cellules plus particulièrement de l'hyménium (basides, cystides) ont un contenu granuleux, le bleu trypan tend à se fixer en trop grande quantité et les opacifie.

Chloral : voir hydrate de chloral

Chloral-lactophénol

Formule : hydrate de chloral 20 g + phénol 10 g + acide lactique 10 g.
Miscible à l'eau. Voir aussi à hydrate de chloral.

¹ Il faut veiller à un dosage précis du KOH et du NaCl selon Cléménçon !

² Mais pas de SDS en raison de la présence du KOH.

Eau - eau glycinée - "L4"

L'eau est un milieu neutre qui respecte (assez) bien (à peu près) toutes les parties des champignons, en particulier les pigments et la couleur des spores. Toutefois, elle :

1/ ne ramollit pas les coupes,

2/ est volatile,

3/ a un faible indice de réfraction (1,333),

4/ migre progressivement dans les articles provoquant un gonflement qui fausse leur taille.

Selon DONADINI, l'eau est un solvant polaire¹ qui dissout les composés ioniques tels KOH (potasse) et NaOH (soude) ou des composés polaires tels NH₃ ou encore le glucose ou les acides acétique et lactique. Elle dissout peu des corps non polaires tels l'iode ou le bleu coton et la plupart des composés organiques. L'eau n'est pas le solvant idéal, car elle n'est pas isotonique² au liquide intracellulaire ; si l'on veut faire des observations in vivo, il faut ajouter à l'eau du glucose, à raison de 2 à 5 %.

On peut employer de l'eau distillée ou bidistillée ; LACHAPELLE utilise l'eau de Spa qui est très peu minéralisée.

Pour remplacer l'eau qui n'est pas un milieu idéal, CLEMENÇON recommande une formule dite L4 à l'appui d'arguments chimiques sérieux. LACHAPELLE trouve la formule excellente en tant que solution pour la préparation de colorants. Il l'a préparée d'une manière approximative et en remplaçant le mouillant Invadin par du SDS³ ou, selon le cas, par un détergent courant (Dreft, par exemple).

L'eau glycinée que recommande IZARRA est proche de la formule du L4 de CLEMENÇON, la seule différence étant l'adjonction de phénol : eau distillée 80 g + KOH 0,8 g + NaCl 0,8 g + phénol 0,5 g + Invadin (mouillant) 0,5 g + glycérine 20 g. Le phénol empêche la formation d'organismes susceptibles de polluer une

¹ Une substance est dite *polaire* si sa molécule est caractérisée par un champ magnétique induit par sa structure propre.

² Si deux substances séparées par une paroi semi-perméable sont *isotoniques*, il ne se produit pas de phénomène osmotique ni dans un sens ni dans l'autre. Si par exemple un liquide est isotonique au contenu cellulaire d'une spore, celle-ci ne se collapse pas ni ne grossit par échanges transmembranaires.

³ Rappel : le SDS n'est pas compatible avec le KOH qu'il faut remplacer par le NaOH.

préparation. LACHAPELLE emploie la formule de IZARRA à la place de l'eau lorsqu'il souhaite un milieu non coloré et non volatil : cette eau glycinée donne pleinement satisfaction.

Eosine

L'éosine est un colorant acide qui se dilue dans l'eau et dans l'alcool et peut se mélanger à l'ammoniaque et à KOH. Elle colore les plasmas et quelquefois les membranes, elle rend les contours très nets. La solution aqueuse s'altère facilement et doit être renouvelée.

LECOMTE pense que la meilleure manière d'utiliser l'éosine consiste à pratiquer la coloration régressive, c'est-à-dire surcolorer (dans une solution à 1% dans H₂O) et puis décolorer à l'eau d'abord puis à l'alcool à 70°.

Dans la recherche de la formule des trames de polypores (mono-, bi- ou trimitiques), l'éosine met particulièrement en évidence les hyphes génératrices. Le rouge Congo quant à lui révèle les hyphes squelettiques : c'est pour cette raison que les polyporologues ont imaginé une solution mélangeant éosine et rouge Congo.

Fuchsine phénique de Ziehl - Acido-résistance

La fuchsine est un colorant acide, donc plasmatisque. Elle a la particularité d'être très sensible aux alcalis, même faibles.

L'épicutis de certaines russules présente des hyphes dites "primordiales" qui se distinguent des hyphes cuticulaires notamment par la présence de cristaux sur leurs parois. Traitées dans la fuchsine phénolée, les incrustations de l'hyphes primordiales prennent une coloration rouge ; en revanche, ces incrustations se dissolvent dans plusieurs réactifs dont NH₄OH et le Melzer.

MELZER a appliqué la méthode de coloration de Ziehl aux incrustations périhyphiques des russules. ROMAGNESI a largement exploité cette particularité.

Procédé :

- colorer 10 minutes dans la fuchsine phéniquée (ou phénolée),
- plonger 1 minute dans l'acide chlorhydrique aqueux à 2%. Les structures qui résistent à l'action de l'acide sont dites acido-résistantes : elles sont mises en évidence par leur coloration en un beau rouge pourpre.

Gaïac (résine de gaïac)

La teinture de gaïac a le mérite de révéler la présence dans la chair de certains champignons de phénoloxydases : mise en contact avec la chair, elle provoque une

réaction enzymatique qui fait éventuellement apparaître une tache bleue. Cette réaction est très utilisée pour l'identification des russules (sur le haut du pied).

Soit on utilise une solution alcoolique qu'il faut renouveler une fois l'an, soit on procède extemporanément. LACHAPELLE a toujours procédé comme suit (même si la méthode peut paraître très approximative) : faire une petite salissure sur la chair avec un grain de gaïac (pointe d'aiguille lancéolée), déposer dessus une goutte d'alcool : observer la vitesse et l'intensité de la coloration.

Glycérine

Ayant un indice de réfraction entre 1,460 et 1,473, elle peut être employée comme huile d'immersion. Etant hygroscopique, elle peut servir à réaliser une plasmolyse de cellules en vue de contracter les vacuoles.

La glycérine entre dans la composition de beaucoup de solutions colorantes ou non (souvent à raison de 20%). Elle améliore en effet l'efficacité de beaucoup de préparations car elle est ramollissante et peu volatile, elle permet d'éliminer facilement les bulles d'air, elle améliore l'indice de réfraction et, en créant un milieu plus visqueux, permet de mieux respecter les éléments d'un éventuel dilacérat.

Huile pour immersion

L'huile pour immersion normalisée est synthétique : elle a des qualités dont on peut difficilement se passer si l'on pratique une microscopie exigeante. Son indice de réfraction est de 1,515.

On peut aussi utiliser des produits plus "biologiques", comme l'huile de ricin, l'huile de cèdre... de qualité extra pure évidemment !

Hydrate de chloral

L'hydrate de chloral, le chloral-lactophénol, l'acide lactique, le lactophénol sont des milieux de montage très proches, stables, visqueux et non volatils et ils conviennent à la réalisation de préparations semi-permanentes. On peut les qualifier de milieux inertes car ils ne participent à aucune réaction chimique : il n'est donc pas question de les utiliser comme milieux de dissolution.

Ils ont cette qualité de présenter un indice de réfraction élevé, ce qui rend les préparations très claires et le contour des objets particulièrement net. Le chloral-lactophénol est de loin le meilleur puisque son indice de réfraction (n) est de 1,49 alors que l'eau distillée présente un $n = 1,33...$

L'hydrate de chloral est un bon regonflant qui convient pour ramollir les exsiccata. Son indice de réfraction est élevé, il éclaircit bien mais en rendant très transparent, il ne crée pas de contraste. A ce sujet, il ne faut pas perdre de vue que plus l'indice de réfraction est élevé, moins le contraste est marqué : cela implique donc d'observer des objets colorés naturellement ou d'utiliser des colorants. A cet égard, ne pas oublier que le chloral iodé (le "Melzer", utilisé pour révéler les structures amyloïdes et que l'on doit toujours avoir sous la main), grâce à la présence d'iode améliore le contraste de la préparation.

Lactochloral

Formule : eau 10 g + glycérine 10 g + acide lactique 20 g + formol 5 g + acide acétique 2 g + hydrate de chloral 5 g.

Lactophénol

Formule : phénol 20 g + acide lactique 20 g + glycérine 40 g + eau 20 ml.

Le lactophénol est un liquide visqueux et incolore. Il est reconnu comme un très bon milieu d'observation. Son indice de réfraction est assez élevé ($n = 1,44$) : il permet donc la réalisation de préparations très lisibles. Si sa viscosité importante facilite la conservation des préparations pendant quelque temps, en revanche elle rend la dissociation difficile, quoiqu'elle ait le mérite d'amortir et de diffuser les chocs lors de la dissociation mécanique. Le chloral-lactophénol est supérieur au lactophénol parce que son indice de réfraction est encore meilleur et que la dissociation y est plus facile grâce à la présence d'hydrate de chloral, qui ramollit les structures. Cependant, ces deux milieux, s'ils rendent les préparations très lisibles, ne leur donnent qu'un assez faible contraste (cf. rubrique Hydrate de chloral).

Le lactophénol est aussi un bon regonflant qui permet à chaud de regonfler les exsiccata.

Le lactophénol est intéressant, notamment, pour laver les préparations réalisées dans le bleu de méthyle au lactophénol (bleu coton). Le fond étant ainsi décoloré, le contraste s'en trouve amélioré. Un fond incolore est toujours intéressant pour la photomicrographie ; en outre, la viscosité du lactophénol limite le mouvement des objets au cours de l'exposition.

Lugol

Formule : eau distillée 100 ml + iodure de potassium 2 g + iode cristallisé 1 g.

Le lugol est la base du Melzer. Il est à la fois un colorant et un liquide de mordantage (voir supra). Il est un excellent réactif pour l'examen extemporané des champignons filamenteux (espèces fibreuses). Etant peu réfringent, il éclaircit peu,

mais donne des images à contours extrêmement nets. En outre, il colore électivement le glycogène en brun acajou (réaction dextrinoïde) qui tranche sur la teinte jaune brun que prennent la membrane et la partie non glycogénique du cytoplasme.

LOCQUIN a démontré que si on soumet des spores de lépiotes présentant un pore germinatif à de l'acide acétique conjugué à du lugol faible après traitement à l'ammoniaque, on distingue alors facilement l'endospore et l'exospore constituant la paroi sporique épaisse chez certaines espèces de ce genre ; la première (couche interne), étant beaucoup plus affine pour l'iode, se colore en brun rosâtre nettement plus tôt que la couche externe.

Melzer ou chloral iodé de Melzer - amyloïdie, dextrinoïdie

Le réactif de Melzer est un des milieux de montage les plus utiles pour la microscopie. Il met en évidence l'amyloïdité des éléments hyalins ou faiblement colorés. C'est un réactif vis-à-vis duquel les éléments observés peuvent avoir trois comportements différents : ou bien ils sont iodo-négatifs (ou achromatiques), ou bien ils sont soit amyloïdes, soit dextrinoïdes. L'iodo-négativité correspond à l'absence apparente de réaction : les cellules se teintent de jaune brunâtre, qui est la couleur du réactif. Des éléments amyloïdes prendront une coloration gris bleu ardoise, voire noire, tandis que les cellules dextrinoïdes (ou pseudoamyloïdes) se teinteront de brun rouge foncé. La coloration par l'iode est une véritable coloration métachromatique, qui s'oppose à la réaction orthochromatique banale, qui est jaune. La réaction amyloïde signale généralement la présence d'amidon, tandis que la réaction dextrinoïde révèle le plus souvent les dextrines.

HEINEMANN considérant le Melzer comme une teinture (les auteurs le considèrent généralement aujourd'hui comme un réactif), qualifie d'"amyloïde" une réaction métachromatique, de "pseudoamyloïde", une réaction orthochromatique et d'"inamyloïde", une réaction achromatique.

KÜHNER a énoncé une règle essentielle, qu'il considère comme valable pour tous les Hyménomycètes à lames : "Les spores dont au moins une couche de la paroi gonfle fortement par le procédé ammoniac-acétique sont toujours fortement dextrinoïdes jusqu'à maturité ...".

Le réactif de Melzer est utilisé dans de nombreux genres, aussi bien chez les Basidiomycètes que chez les Ascomycètes. Il se révèle particulièrement précieux pour l'observation de l'ornementation des spores des genres *Lactarius* et *Russula*.

HEINEMANN et THOEN dans leur étude du genre *Cystoderma* font remarquer qu'il n'est pas aisé de distinguer les spores qui sont amyloïdes de celles qui ne le sont

pas. En effet, l'amyloïdité se voit mal sur matériel frais et même sur matériel sec regonflé à l'ammoniaque, la réaction est parfois très faible. Il y a lieu dans ce cas, après regonflement à l'ammoniaque, d'utiliser un minimum de réactif de Melzer et de faire l'examen dans l'hydrate de chloral. La plus grosse difficulté provient du fait que le siège de la réaction est généralement la périspore et que des spores ayant perdu cette membrane peuvent ne plus être amyloïdes. Dans une préparation, il peut arriver que l'on ne trouve que quelques périspores amyloïdes, parmi de nombreuses spores non amyloïdes. L'amyloïdité, lorsqu'elle existe, n'est cependant pas toujours limitée à la périspore. Certaines espèces semblent présenter une épispore amyloïde, au moins partiellement à hauteur de la plage supra-apiculaire.

Pour observer l'amyloïdie des spores, amener une sporée sur une lame reposant sur du papier blanc, déposer une goutte de Melzer et observer à la lumière du jour : amyloïdes, les spores deviennent presque noires (parfois la réaction amyloïde d'une cellule autre que la spore peut être gris pâle avec une teinte violacée) sinon elles prennent la couleur jaune brun du Melzer ou deviennent rouge vineux.

A propos de l'amyloïdie des hyphes, rappelons encore une fois que selon JOSSERAND : « Que ce soit pour la métachromasie, l'amyloïdie ou la cyanophilie, il faut observer les hyphes par leur section, donc selon le cas, procéder à une coupe parallèle à l'arête, perpendiculaire au rayon du chapeau ou à la longueur du stipe de manière à voir des hyphes tronçonnées transversalement et présentant à l'œil leur orifice sectionné : de cette façon, on n'est pas gêné par le contenu de l'hyphe ».

Selon KÜHNER, l'hyphe amyloïde prend une teinte pourprée ou rougeâtre alors que la paroi sporique amyloïde se colore en gris bleu.

KÜHNER propose de préparer le Melzer et d'observer comme suit. Préparer d'abord la solution suivante : iodure de potassium 1,5 g + iode 0,5 g + eau 20 g. Puis mélanger 1 partie de cette solution (par ex. : 5 cm³) et 1 partie (5 g) de chloral hydraté. Laisser agir quelques minutes (la réaction est à peu près instantanée). Avec la pointe d'une aiguille, transporter la coupe dans une goutte de solution aqueuse concentrée d'hydrate de chloral, déposée sur la même lame. Changer le chloral (en l'absorbant à l'aide d'un papier filtre) jusqu'à ce que des nuages bruns ou jaunes cessent de s'échapper des pièces à étudier. Observer dans une goutte de chloral.

Le Melzer est soluble dans l'eau et se mélange assez bien à NH₄OH : rincer l'élément imprégné de NH₄OH dans une petite quantité de Melzer que l'on écarte ensuite.

Phloxine

La phloxine fait partie de la même famille chimique que l'éosine ; comme cette dernière, la phloxine est un colorant acide, donc plasmatique, c'est-à-dire qui peut être utilisé pour colorer le contenu des cellules.

En colorant l'intérieur des hyphes, la phloxine, comme l'éosine, met l'épaisseur de leur paroi en évidence, par différenciation de coloration. Lorsque la paroi est mince, elle n'est guère visible (ce qui est généralement sans inconvénient) ; en revanche, la forme de l'élément ressort ainsi très bien. Cette faculté peut être mise à profit, notamment dans les cas suivants :

- pour distinguer les terminaisons des poils piléiques de *Lactarius vellereus* et ceux de *L. bertillonii* ;
- pour révéler la forme des hyphes des mycènes à revêtement dit "en brosse" ou la forme des hyphes des marasmes ou collybies à structure dite "ramealis" (hyphes bourgeonnantes ou en puzzle) ;
- pour l'observation de l'épaisseur de la paroi des cystides des inocybes ;
- pour analyser les trames comportant plusieurs types d'hyphes (notamment chez les polypores et dans divers genres). Ici, c'est la prise différenciée de colorant par chaque type d'hyphes qui aide à démêler la formule de la trame. A cet effet, les polyporologues font un usage courant de la phloxine ou de l'éosine seules, ou en mélange avec le rouge Congo.

Potasse (ou soude)

Les propriétés de la potasse (KOH) et de la soude (NaOH) sont pratiquement identiques. Il en est de même de leurs utilisations macro- et microchimiques. Le facteur Ka (constante d'acidité) de ces bases fortes est d'ailleurs identique à 15,7.

En microscopie, la solution de potasse la plus utilisée est de 5% voire de 2 ou 3% dans l'eau. La solution à 5% convient bien pour la plupart des observations : elle a des effets semblables à l'ammoniaque concentrée mais présente l'avantage d'être sensiblement moins volatile et d'être inodore. On peut donc, au lieu d'ammoniaque concentrée, employer de la potasse à 5% pour toutes les observations courantes.

A 10%, on utilise la potasse pour l'étude des champignons très durs, tels que les polypores et les croûtes qui peuvent résister très longtemps à la dissociation dans la potasse à 5%. Plus concentrée, la solution à 10% (à fortiori à 20 ou 40%) exerce une action beaucoup plus rapide mais elle présente le désavantage d'être très agressive et de dissoudre certains éléments. La solution à 10% peut également être intéressante lors de l'observation des champignons gélatineux (*Auricularia*, *Tremella*) parce qu'elle liquéfie les mucilages, ce qui est d'un grand secours lors de la dissociation. Comme l'ammoniaque, la potasse regonfle les exsiccata.

La potasse convient bien lorsqu'on souhaite observer la disposition des éléments entre eux car elle les met en évidence et évite une dissociation, par pression

ou chocs, qui disperse les éléments. Lorsque l'on veut observer de fines structures, il faut préférer une faible concentration (2-3%) ou l'ammoniaque, base plus douce.

Une préparation contenant du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) induit une précipitation de la potasse qu'il faut remplacer par de la soude.

Une coupe teintée au rouge Congo, à l'éosine ou à la phloxine peut être observée ensuite dans la potasse ou la soude ; en revanche, il ne faut pas préparer ces colorants dans une solution aqueuse de potasse ou de soude car la base détruit à la longue le colorant.

Rouge Congo ammoniacal

Le rouge Congo est un colorant acide, c'est-à-dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques. Il colore particulièrement bien les parois des cellules de champignons ; c'est pour cela qu'il est un des colorants les plus utilisés en mycologie générale.

Le rouge Congo ammoniacal à 1% est un excellent milieu pour toutes les observations courantes, réalisées au départ d'exsiccata, grâce aux remarquables qualités regonflantes et ramollissantes de l'ammoniaque et a l'avantage supplémentaire de colorer la paroi de la plupart des hyphes, ce qui augmente le contraste et facilite ainsi l'observation et l'interprétation.

Le rouge Congo ammoniacal doit être chauffé puis refroidi brusquement pour chasser les bulles de gaz. Il est recommandé d'ajouter de la glycérine dans la solution à raison de 20%, ce qui la rend franchement moins volatile, évite les bulles d'air et permet une dilacération qui respecte mieux les cellules.

Le rouge Congo peut se diluer dans l'eau (très peu efficace), l'ammoniaque ou la potasse : c'est la solution ammoniacale qui était la plus employée jusqu'à ce que CLEMENÇON propose une solution aqueuse au SDS (voir infra).

Mis en présence d'acide lactique (le PVA lactophénolé par exemple, qui est un milieu de montage définitif), il devient noir instantanément ; on restitue la couleur originale avec une goutte d'ammoniaque.

Rouge Congo aqueux SDS : une nouveauté essentielle pour la mycologie !

CLEMENÇON ayant découvert le mouillant SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) en dit énormément de bien. Voici son avis : "Lorsque j'ai essayé ce réactif (solution aqueuse à 1% de rouge Congo avec 1% de SDS) sur des basidiomycètes, j'ai été surpris par la clarté de la coloration. Contrairement aux solutions aqueuse et ammoniacale de rouge Congo, les parois des hyphes, les cloisons et les parois des basides étaient sélectivement et intensément colorées dans le rouge Congo SDS, le

cytoplasme demeurant absolument incolore. Mais la surprise essentielle concerne le dolipore très ténu et cerclé par un épaississement pariétal en forme de bourrelet, le dolipore est souvent obstrué par une masse cytoplasmique. Alors que le bourrelet pariétal a parfois l'aspect d'un petit bouton au centre de la cloison, le dolipore lui-même n'est guère visible sous le microscope optique. Par contre, dans le rouge Congo SDS, non seulement le bourrelet pariétal est très lisible, mais aussi parfois le dolipore lui-même, parce que la masse cytoplasmique obturante n'est pas colorée."

"Le SDS étant un excellent regonflant, la majorité des champignons peuvent être examinés directement dans le rouge Congo SDS, sans usage préliminaire d'une solution alcaline. Mais si l'on préfère examiner une préparation d'abord dans une solution alcaline et y regonfler et ramollir du matériel sec, il faut alors éviter de le faire dans KOH, car le potassium induit des précipités en présence de SDS". Il faut remplacer le KOH par le NaOH.

L'usage du rouge Congo aqueux au SDS s'avère un conseil particulièrement judicieux. Il assure une très belle coloration, la préparation étant souvent remarquablement claire et lisible. Il crée une bonne différenciation entre les types de cellules observées. Il met particulièrement bien en évidence les parois des hyphes, des basides et des cystides ; des éléments souvent difficiles à observer tels que les cloisons, les boucles et les hyphes gélifiées sont bien mis en évidence. Cette solution peut révéler de petits détails qui souvent passent inaperçus. L'observation de l'épicutis des russules, par exemple, donne des résultats d'une interprétation souvent lumineuse ! La faculté de différenciation de ce rouge Congo SDS est telle qu'il peut rendre inutile l'emploi d'autres colorants ou réactifs spéciaux.

SDS : voir rouge Congo SDS

Soude : voir potasse.

Sulfate de fer

Le sulfate ferreux se présente sous forme de petits cristaux verts à l'état hydraté et de poudre blanchâtre à l'état anhydre. Pour l'utilisation, il suffit de frotter le cristal sur la partie du champignon à tester.

Certains auteurs conseillent l'utilisation d'une solution aqueuse à 30% de sulfate de fer ; c'est l'alternative qui s'impose lorsqu'on ne dispose pas de cristaux mais de sulfate en poudre. Les réactions que provoque cette solution sont généralement beaucoup plus rapides et plus vives que celles que provoque le cristal. La solution telle quelle "rouille" en quelques heures : on en prolonge considérablement la vie en ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique. D'une manière générale, le cristal est préféré à la solution, par méconnaissance de celle-ci

et du moyen de la stabiliser. Le sulfate de fer est surtout employé lors de la détermination des russules.

Sulfovanilline (SV)

Le contenu des cystides ainsi que celui des laticifères des russules prennent généralement une remarquable couleur dans divers colorants, tel le bleu de crésyl, ou réactifs, (sulfovanilline, sulfobenzaldéhydrique (SBA), sulfopipéronal (SP)). Si la réaction de la SV est moins forte, elle présente, selon ROMAGNESI, l'avantage de conférer aux coupes ou dilacérats une plus grande lisibilité : on peut y faire toutes les observations structurelles, mesurer les basides et cystides.

L'utilisation du benzaldéhyde est particulièrement intéressante pour mettre en évidence les piléocystides de la cuticule des russules, qui seront annoncées SBA + ou SBA - : ce test est considéré comme un critère de détermination majeur !

Choix du milieu d'observation (orientation pour les observations générales)

| | | |
|----|--|--|
| 1 | structure gélatineuse..... | bleu de toluidine |
| 1' | autres cas | 2 |
| 2 | observation des parois et des éléments du revêtement | rouge Congo, bleu trypan |
| 2' | autres observations..... | 3 |
| 3 | observation des pigments ou des granulations localisés dans les revêtements ou la trame..... | bleu de crésyl, bleu de toluidine |
| 3' | observation du contenu des cellules | 4 |
| 4 | éléments non lipoïdes..... | éosine, phloxine |
| 4' | éléments lipoïdes..... | bleu de crésyl, fuchsine |

Rappelons que l'ouvrage de MOSER M. (1978), *Kleine Kryptogamenflora, Die Röhrlinge und Blätterpilze*, 4^e éd. donne des conseils précis sur les colorants et réactifs à employer dans la plupart des cas.

Matières colorantes : en guise de résumé et d'orientation

| Produit code | | Famille chimique | Utilisations |
|---|---------|-------------------------|--|
| bleu de crésyl 51010 | basique | oxazines | coloration des membranes métachromatiques, des lipoides, du protoplasme |
| bleu de méthyle (bleu coton) ¹ 42780 | acide | triarylméthanés | colore soit la membrane si elle est callosique, soit le contenu cytoplasmique des hyphes - colore les tissus cyanophiles (chrysocystides, ornements non amyloïdes des spores) - coloration du contenu des hyphes génératrices et squelettiques - coloration des gléocystides |
| bleu de toluidine 52040 | basique | thyazines | coloration métachromatique - colorant nucléaire, des corps chromophiles - convient pour les structures gélatineuses |
| bleu trypan | acide | polyazoïques | colore les membranes, pas le cytoplasme, l'amyloïde |
| carmin acétique | | colorant naturel | colorant des noyaux (granules carminophiles des Lyophyllées : sidérophilie) |
| chloral iodé de Melzer | | colorant minéral | coloration iodophile |
| éosine 45380 | acide | xanthènes | colorant du plasma - phloxines, érythrosines et éosines intensifient les contrastes |
| fuchsine | basique | triarylméthanés | si identique à la néo-fuchsine : colorant nucléaire, de certains lipides, du glycogène, de la cytologie végétale - incrustations acido-résistantes (coloration régressive) |
| rouge Congo 22120 | acide | polyazoïques | coloration des parois, de la cellulose, l'amyloïde |

¹ Le bleu de méthyle est le bleu employé aujourd'hui dans la solution du bleu coton. Ses autres noms : Baumwollblau, Anilinblau, Methylblau, Chinablau, Wasserblau, Tintenblau, Color Index 42755 selon Moser et 42780 selon Lecomte.