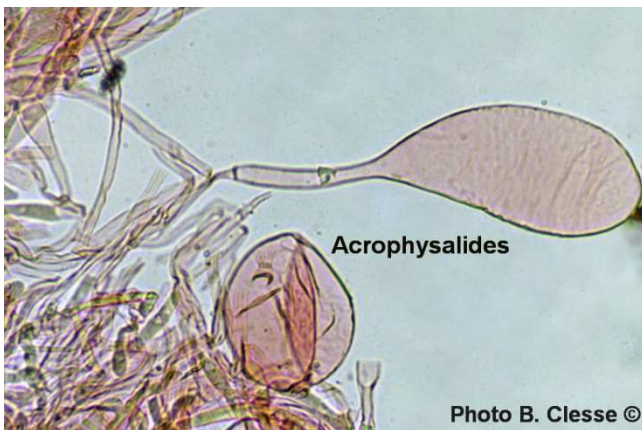
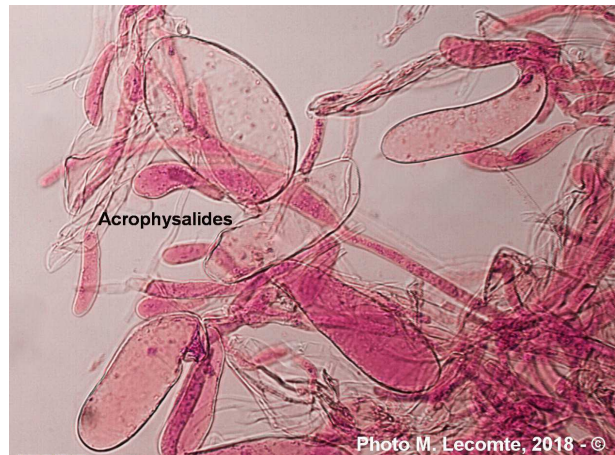
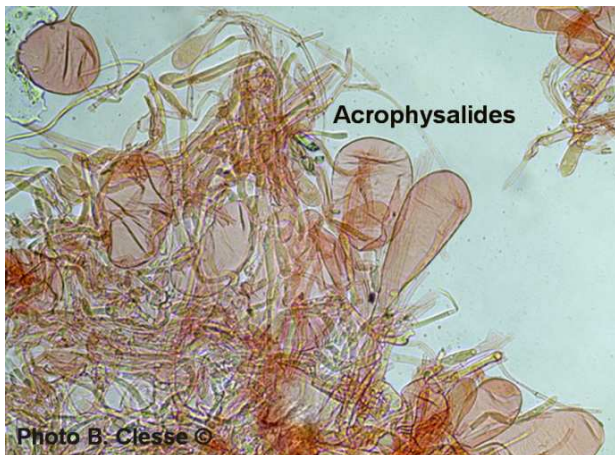


ADDENDA 2019

Les acrophysalides chez les amanites



Acrophysalides chez *Amanita muscaria* ▲▲▲▲

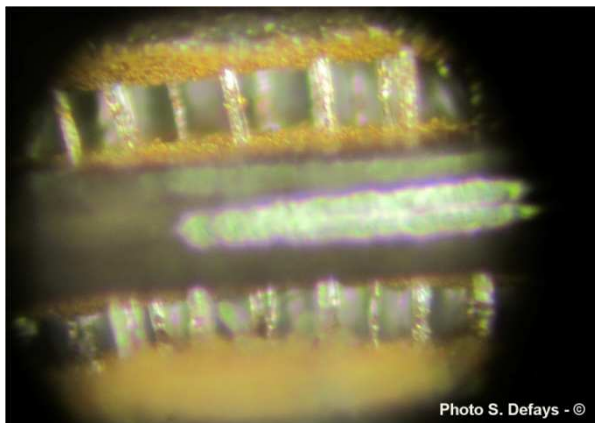
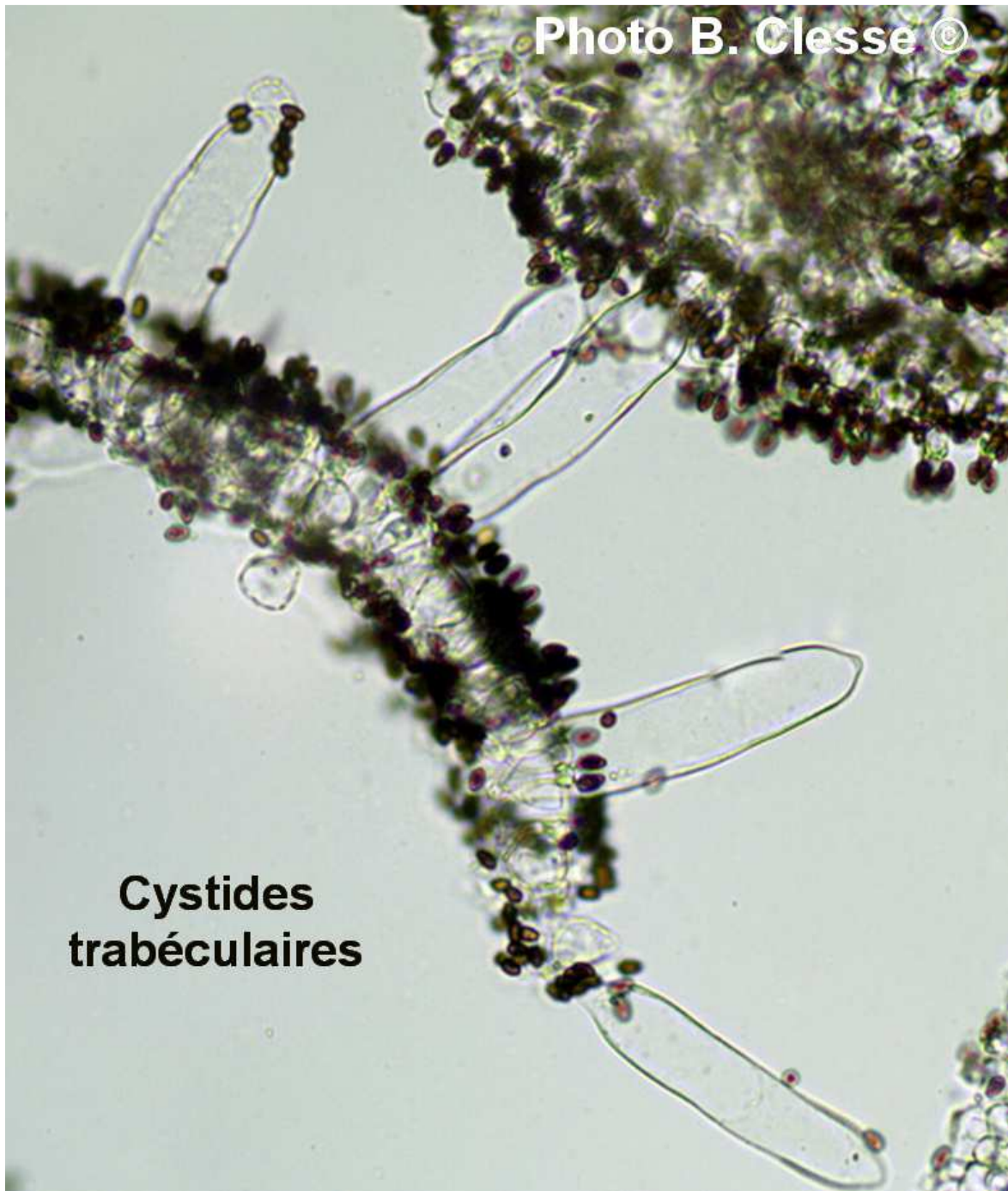
et chez *Amanita citrina* ▼▼



Ce sont les extrémités renflées des hyphes de la chair du pied des *Amanita* et des *Amanitopsis*. Elles présentent des formes très variables, mais ne peuvent être considérées comme des éléments de discrimination spécifique.

Par contre, leur connaissance et leur recherche s'avère importante s'il s'agit de poser un diagnostic dans le cadre d'un empoisonnement fongique, afin de pouvoir confirmer ou infirmer la présence d'amanites dans le bol digestif.

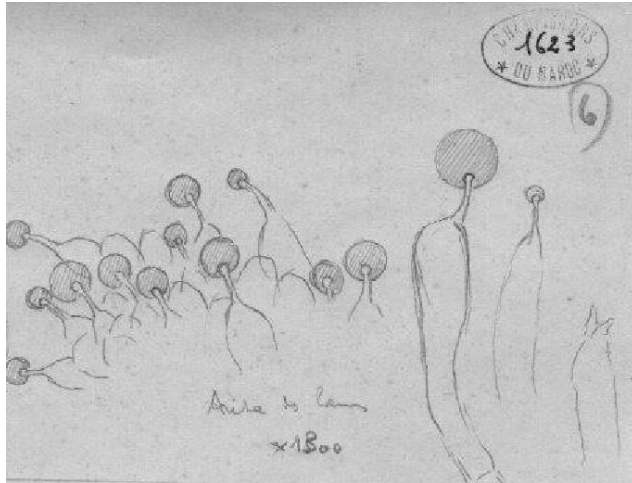
Les cystides trabéculaires (suite de la page 73)



Ces photos illustrent remarquablement la disposition des cystides trabéculaires, qui servent d'éléments séparateurs empêchant les lames de se collapser. On les retrouve chez nombre de représentants du genre *Coprinus* (ici, *C. atramentarius*). Elles peuvent afficher des tailles variant entre 150 et 225 μm de long.

◀ Photo 20x (loupe) des cystides trabéculaires en place, entre les lames.

Des champignons « carnivores » : toxocystes et gliosphex



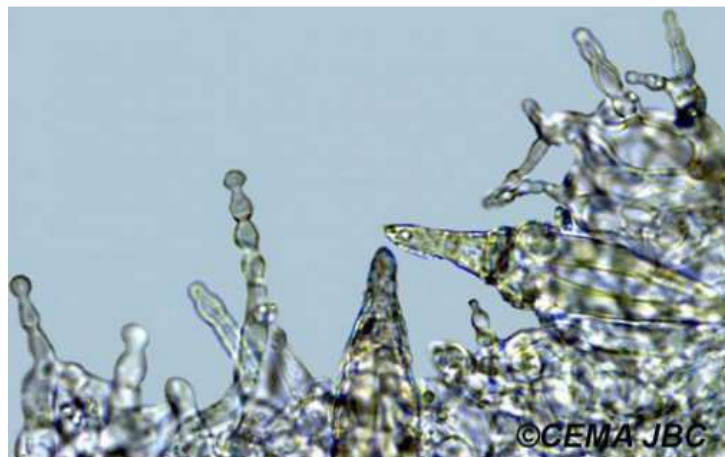
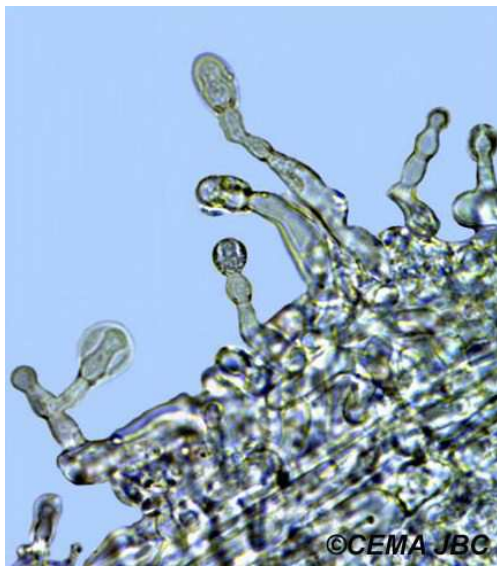
Voici le document qui nous a amené à nous pencher sur ce phénomène intéressant et passionnant, publié par P.A. Moreau, et mis à notre disposition par MPU, Service des collections, Université de Montpellier.

Ce titre peut paraître singulier en parlant de champignons, car il ne s'agit en aucune manière d'endo- ou d'ectoparasitisme, situation assez fréquente dans le monde des Fungi. Certaines espèces se sont spécialisées dans la capture des nématodes¹, et développent au niveau du mycélium des pièges d'une remarquable efficacité.

Ils sont de deux sortes : des anneaux constricteurs isolés (ACI) ou en réseau (ACR), ou des boules gluantes (BG), récemment appelées toxocystes ou gliosphex. Nous avons choisi d'adopter la première appellation, pour tout ce qui se situe sur les lames.

M. Voronine fut le premier botaniste à les observer (+/- 1870) ; Zopf en a clarifié l'étude en 1888.

J. Comandon et P. de Fontbrune (1938) puis CH. Drechsler (1939) ont clairement expliqué ce phénomène, qui est finalement peu mentionné dans les livres de mycologie, même si certains sites en font mention, sans trop d'explications. Plus de 150 espèces munies de ces appendices ont été décrites à ce jour.



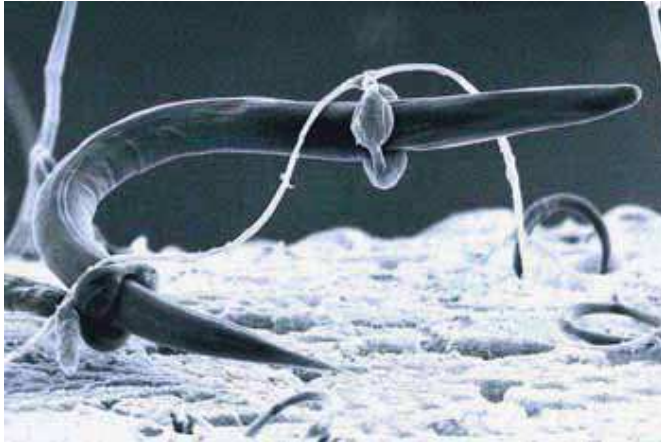
◀ ▲ Toxocystes en chaînettes, chez *Hohenbuehelia geogenia*, avec en plus sur la photo de droite, deux lamprocystides à parois épaisses (Photos J.B. Ceccaldi)

Dans la littérature, ces moyens de capture portent différents noms :

- ++ boucles ou anses de capture, boucles constrictives, garrots (LANGERON, 1945),
- ++ adhesive knobs, adhesive lateral branches, adhesive nets (J. WEBSTER, 1970),
- ++ oleocystidia in the sense of Petersen (1985),
- ++ toxocystes (P.A. MOREAU & ALL, 2000),

¹ Les Nématodes sont des vers ronds, non segmentés, recouverts d'une épaisse cuticule, souvent translucide et (ou) de couleur claire. Ils sont dotés d'un tube digestif complet (avec bouche et anus), mais ne possèdent pas d'appareil circulatoire ou respiratoire. Ils vivent dans tous les milieux : sol, eau, sédiments, fumier, terreau, bois mort, détritux de toutes sortes, et même dans le vinaigre (anguillules). Certains sont de redoutables parasites de l'homme (tube digestif ou muscles) : filaires, ascaris, oxyures, trichines. D'autres s'attaquent aux végétaux (tiges, racines, bulbes, feuilles, pommes de terre).

++ gloeosphexes, gloeosphex cells, gloeosphex cystidia, gliosphex (H. CLÉMENÇON, 2004) ; pour lui, les gliosphex se trouvent sur l'hyménium et les toxocystes sur le mycélium,
 ++ cheilocystides à gliosphex ou cheilocystides nématophages (J.B. CECCALDI, 2016).
 ++ Il semble que le caractère particulier de ces toxocystes ait échappé à R. KÜHNER dans sa description des *Hohenbuehelia* (1980), car il les considère simplement comme des cystidioles à paroi mucilagineuse.



◀ *Arthrobotrys anconia*, capturant un nématode.
 (Virtual Museum of Canada - Photo George Barron)



Un nématode comme on en rencontre des quantités dans les lames des champignons vieillissants ▲

Fonctionnement

Les anneaux de capture sont situés le long des filaments du mycélium ; en plus des cellules d'attache sur le support mycélien, ils sont constitués de 3 cellules spéciales qui se gonflent instantanément (dilatation très rapide des vacuoles) au moindre contact sur leur surface interne, et ferment complètement la lumière de l'anneau. La pression est tellement forte qu'il faut briser le filament mycélien pour dégager la proie. Immédiatement, les 3 cellules développent des bourgeons perforants qui traversent la cuticule de l'animalcule, forment une ampoule interne (appelée poire d'angoisse de Drechsler – une référence à un instrument de torture) générant des suçoirs qui se ramifient, puis vont dégrader et liquéfier le contenu du ver (tissus et organes).

Chez les espèces à toxocystes, la boule collante développe un bourgeon perforant qui perce la cuticule du ver, et développe également une ampoule interne (ou vésicule haustoriale), qui produit des filaments suçoirs.

Espèces présentant ces types de pièges (liste non exhaustive)

ASCOMYCETES (*Orbiliaceae* surtout) :

Arthrobotrys oligospora ; *Arthrobotrys superba*, *A. anconia*, *A. robusta*, *A. cladodes*, *A. conoides*, *A. musciformis*, *Dactylella gephyropaga*, *Dactylaria thaumasia*, *D. polycephala*, *Dactylella asthenopaga* & *D. ellipsozona*, *Stylopaga hadra*, *Arthrobotrys dactyloides*, *Dactylella bembicodes*, *D. lysipaga*, *D. leptospora*, *Dactylaria brochopaga*, *D. candida*, *Trichothecium polybrochum*, *Monacrosporium eudermatum*, *M. doedycoides*

BASIDIOMYCETES

Hohenbuehelia geogenia, *H. petaloides*, *H. grisea*, *H. cyphelliformis* (sur tige sèche de renouée du Japon), *H. longipes* (seulement 7 récoltes en Europe, jusque 2016), *H. tremula*... *Pleurotus cornucopiae*, *P. dryinus*, *P. eryngii* et, en principe, toutes les espèces de ces deux genres, où les toxocystes se trouvent sur les lames de l'hyménium.

« Sur l'arête, nous avons observé des poils à apex recouvert d'une guttule, qui sont des toxocystes, typique des *Pleurotus*. Elles semblent jusqu'à présent caractéristiques de ce genre, et seraient des "ancêtres" des gliosphex des *Hohenbuehelia* (ces derniers étant les cousins les plus proches des *Pleurotus* dans la phylogénie). Chez les pleurotes, les toxocystes sont fréquents sur les mycéliums, mais très rarement observés sur les carpophores, Les dessins de Malençon** représentant ceux des lames de *Pleurotus ostreatus* sont une observation particulièrement remarquable. » (Pierre-Arthur Moreau)

** L'auteur cité dans les lignes précédentes parle de *Pleurotus dryinus* (Pen. ex Fr.) Kummer var. *luteosaturatus* Malençon var. nov. (1975), observé sous cèdre, au Maroc.

Culture

Les ascomycètes prédateurs sont assez faciles à étudier.

++ Utiliser des boîtes de Pétri contenant un mélange de farine de maïs et d'agar-agar.

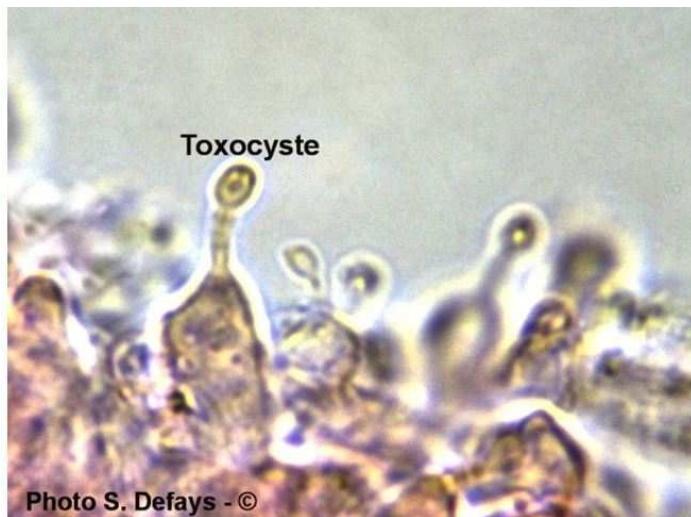
++ Déposer une petite pincée de terre.

++ Laisser incuber durant une à deux semaines à température ambiante → les nématodes présents dans la terre vont ramper à la surface du milieu de culture, afin de se nourrir des bactéries présentes. S'il y a des champignons nématophages dans la terre, ils vont développer des structures de capture. Il est facile d'observer les vers capturés et en cours de digestion, à grossissement moyen.

++ Les gliosphex sont naturellement hyalins et rarement brun pâle, mais ils se colorent bien avec le bleu coton, le rouge Congo, la phloxine B et le rose Bengale.

Expérimentations et observations personnelles

Lors d'un sondage réalisé lors du dernier séminaire de microscopie que nous avons animé à Massembré en novembre 2017, nous avons pu constater que cette notion était inconnue des participants présents. Ce fut également l'occasion rêvée de convaincre 35 personnes à rechercher quelque chose de nouveau, rare sans doute, voire aléatoire. Les recherches furent couronnées de succès, malgré le fait que nous travaillions sur des pleurotes issus de la culture intensive (voir photos de N. Bastien et S. Defays, ci-dessous). Lors d'un séminaire à Vierves-sur-Viroin en 2018 (21 participants), organisé par B. Clesse, nous avons reconduit l'expérience sur *C. cornucopiae*, avec le même succès.



▲ Ces toxocystes ont été trouvées sur des spécimens de *P. ostreatus* issus de la culture intensive industrielle ▲

L'étude de pleurotes "naturelles", trouvées sur tronc de hêtre a donné la photo ci-dessous, parmi de nombreuses autres.



Toxocyste rencontrée sur *P. ostreatus* trouvé dans la nature. Remarquez la similitude avec les dessins de Malençon (page 171).

Cette cystide particulière, arrondie au sommet, est prolongée par un pédicelle portant une sphère réfringente, mesurée à 8-11 µm de Ø (colorée ici au rose Bengale), marquée par un point d'attache circulaire nettement plus sombre. L'examen fouillé et systématique des lames (cela nécessite parfois 5 ou 6 préparations) montre des toxocystes à différents niveaux de formation. On pourrait se demander s'il ne s'agirait pas d'éventuelles cystides monosporiques.

Mais la comparaison des deux types d'éléments ne laisse aucun doute.



← Toxocystes – baside →

L'idée faisant son chemin, lors du séminaire 2017, P. Baumgart fouille dans ses dossiers de photos et attire notre attention à propos



d'une image qu'il a réalisée dernièrement sur une lame de *Leucoagaricus bresadolae*, où figure quelque chose qui ressemble furieusement aux gliosphex des *Hohenbuehelia*. A la mi-janvier 2018, il attire notre attention sur une photo publiée par J.P. COLLIN, dans le bulletin de la F.M.B.D.S., traitant de *Leucoagaricus americanus*, où on remarque le même type de cystide, qui ne ressemble d'ailleurs pas du tout aux autres cheilocystides figurées.



Photo P. Baumgart ©

▲ *Leucoagaricus bresadolae*

Hohenbuehelia geogenia (photo J. Beck-Ceccaldi) ►

Vous conviendrez qu'il s'avère tentant d'établir une relation entre ces photos et de considérer que chez les deux *Leucoagaricus*, il s'agit également de toxocystes. Et le voile du mystère est loin d'être levé !

Nos REMERCIEMENTS les plus vifs vont à

++ Jacques Beck-Ceccaldi, pour ses photos d'étude de *Hohenbuehelia geogenia*.

++ Véronique Bourgade, du Service des Collections de l'Université de Montpellier, pour la mise à notre disposition des archives de G. Malençon.

++ Pierre-Arthur Moreau, pour sa disponibilité et ses conseils.

++ 35 participants, au séminaire de microscopie de Massembré (Belgique, 12 au 19/11/2017) qui ont collaboré à la recherche des toxocystes sur des cultivars de *Pleurotus ostreatus* & 21 participants, au stage de Vierves-sur-Viroin (fin octobre 2018) qui ont travaillé sur *Pleurotus cornucopiae*.

BIBLIOGRAPHIE

BECK-CECCALDI J., 2013 – Voir ses travaux sur *Hohenbuehelia geogenia* à l'adresse suivante :

<http://cemachampi.blogs.sudouest.fr/tag/hohenbuehelia+geogenia>

COLLIN J.P., 2017 – *Leucoagaricus americanus*, un champignon toxique, dans une culture biologique, FMBDS, n° 227, p. 29.

CLEMENCON H., 2004 – *Citology and Plectology of the Hymenomycetes*, Ed. J. Cramer, p. 74.

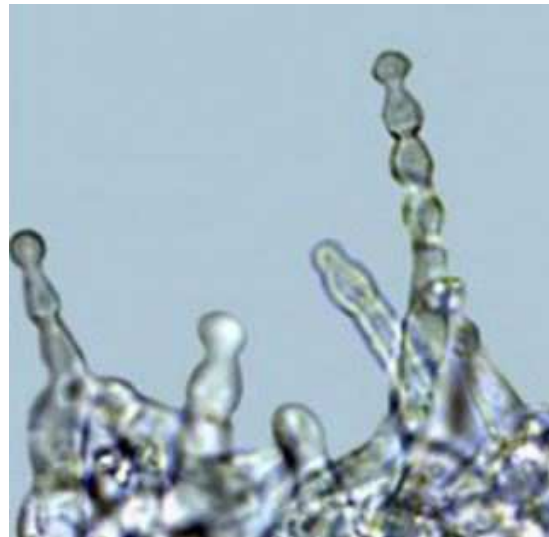
CLEMENCON H., 2012 – *Citology and Plectology of the Hymenomycetes*, Ed. J. Cramer, 2nd revised edition, pp. 84-84.

KUHNER R., 1980 – *Les Hyménomycètes agaricoïdes*, Ed. Société Linnéenne de Lyon, p. 792.

LANGERON M., 1945 – *Précis de Mycologie*, Ed. Masson, pp. 112-116.

MAIRE J.C., MOREAU P.A. & ROBICH G., 2000 - *Complément à la Flore des champignons Supérieurs du Maroc*, Ed. CEMM, pp. 563-564.

WEBSTER J., 1980 – *Introduction to Fungi*, Cambridge University Press, pp. 542-551.



Etude consacrée à *Hohenbuehelia atrocoerulea*

Après réception d'un exemplaire frais de cette espèce (leg. P. Clowez), nous avons entrepris la recherche systématique de toxocystes au niveau des lames. Ce fut très concluant, et en outre, c'était également l'occasion de mettre en évidence les remarquables cystides métuloïdes, propres à ce genre ; observations réalisées dans l'eau glycinée, après coloration au rouge Congo SDS.



Nous avons rencontré diverses formes de toxocystes, relativement nombreux dans les diverses préparations. Une comparaison avec une baside permet d'éliminer toute forme de confusion.



Baside à gauche, et toxocystes (à droite) ; observation en DIC 40x



Il s'avère important de remarquer la diversité de formes trouvées au sein des lames d'une même espèce ; nous envisageons l'idée qu'elles se trouvent à différents stades de développement, le stade ultime étant très ressemblant ▲ avec ce que nous avons rencontré chez *Pleurotus ostreatus* (voir photo, bas de page 8). Suite à diverses remarques émises par des participants à nos derniers séminaires, nous pensons que ces toxocystes sont très peu connus de nombre de mycologues et qu'on pourrait en retrouver chez d'autres genres que *Pleurotus* ou *Hohenbuehelia* (affaire à suivre).

Les halocystes

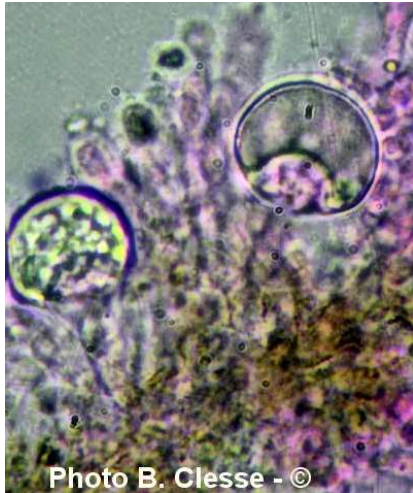


Photo B. Clesse - ©

Suite à un échange verbal au sujet des toxocystes, B. Clesse me confie avoir rencontré des formations très semblables chez un Corticié, appelé *Resinicium bicolor*. L'examen des photos nous impressionne, et nous nous laisserions volontiers aller à croire que ce que l'auteur qualifie d'halocystes, sont en réalité des toxocystes... Nous avons pris comme référence le livre sur les *Corticaceae* de BERNICCHIA. Les halocystides sont illustrées par quelque chose de très semblable, et il n'existe pas de définition dans le glossaire de l'ouvrage.

Sur MycoDB, on définit ce terme comme "cystide ornée d'une guttule apicale".

On peut imaginer que ce nouveau nom a été inventé pour nommer quelque chose dont les observateurs ne comprenaient pas bien la destination, et qu'ils n'étaient pas avertis de l'observation de Ma-

lençon. Lionel Ferry utilise également ce terme sur son site web :

<http://lionel-ferry-mycologie.piwigo.com/picture/?/109/categories>

Nous envisageons clairement l'hypothèse qu'il serait raisonnable de revoir ce terme de "halocyste" et de lancer l'idée que ce serait en réalité des toxocystes. Il n'y a pas de raison que ces pièges à nématodes soient limités aux *Pleurotus* ou *Hohenbuehelia*...

Nous avons réalisé nous même un examen attentif de l'hyménium de ce champignon et nous y avons retrouvé ces éléments en nombre important.



Photo M. Lecomte, 2018 - ©



Photo M. Lecomte, 2018 - ©



Photo M. Lecomte, 2018 - ©

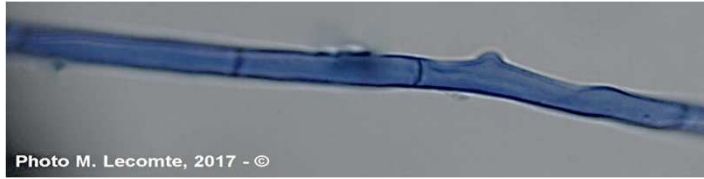


Photo M. Lecomte, 2018 - ©

La question reste posée et ouverte ; halocyste et toxocyste sont-ils synonymes ?

Retour vers les hyphes

En pp. 87 à 91, nous avons développé un imposant chapitre traitant de toutes les sortes d'hyphes qui se différencient au sein des champignons, selon leurs qualités et leurs fonctions, mais nous avons omis d'aborder des éléments structurels qui nous paraissent très importants, et surtout beaucoup plus clairs dans notre esprit, à l'heure actuelle.



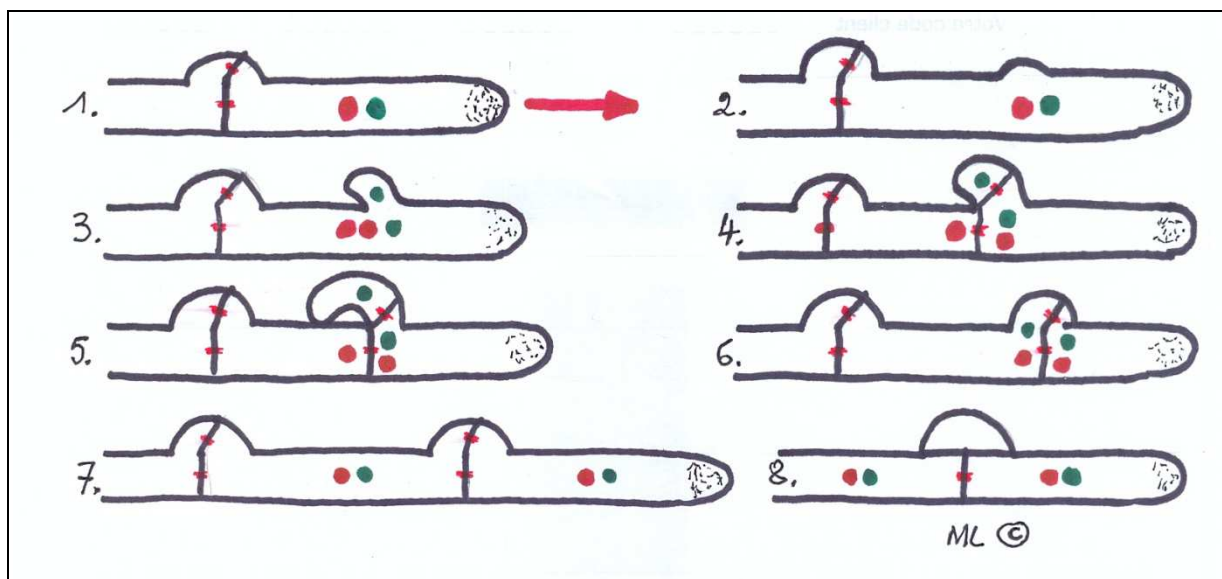
Voici une hyphe toute simple ; il s'agit d'une sorte de « tuyau » de quelques μm de \varnothing , qui présente une croissance apicale (elle s'allonge par un bout, tout simplement). Elle est délimitée par deux parois et contient du cytoplasme. Régulièrement, on voit apparaître des cloisons (ou septa, possédant un pore central)*** qui la divisent en cellules hyphales, contenant chacune 2 noyaux, durant la phase de croissance. Ils sont invisibles avec les colorants que nous utilisons régulièrement. Pour les mettre en évidence, il faut utiliser des produits tels que le cristal-violet, l'hématoxyline ferrique, le carmin acéto-ferrique ; mais ces derniers peuvent révéler d'autres éléments trompeurs dans certains genres, comme les granulations sidérophiles ; dans d'autres cas, les noyaux se montrent tout simplement récalcitrants et ne se colorent pas. C'est pourquoi notre préférence va au colorant de Giemsa lent, selon la méthode préconisée en 1949, par R. Kühner. Elle peut paraître fastidieuse, mais donne des résultats souvent spectaculaires.

lièrement, on voit apparaître des cloisons (ou septa, possédant un pore central)*** qui la divisent en cellules hyphales, contenant chacune 2 noyaux, durant la phase de croissance. Ils sont invisibles avec les colorants que nous utilisons régulièrement. Pour les mettre en évidence, il faut utiliser des produits tels que le cristal-violet, l'hématoxyline ferrique, le carmin acéto-ferrique ; mais ces derniers peuvent révéler d'autres éléments trompeurs dans certains genres, comme les granulations sidérophiles ; dans d'autres cas, les noyaux se montrent tout simplement récalcitrants et ne se colorent pas. C'est pourquoi notre préférence va au colorant de Giemsa lent, selon la méthode préconisée en 1949, par R. Kühner. Elle peut paraître fastidieuse, mais donne des résultats souvent spectaculaires.

1. Fixation du fragment d'hyménium ou de mycélium dans de l'alcool très pur (95 à 97°), voire absolu.
2. Hydrolyser durant +/- 10 minutes, à 60°C., dans un tube à essai contenant HCl pur.
3. Rincer plusieurs fois de suite à l'eau froide, par une suite de bains de 2 minutes.
4. Remplacer dans 2 ou 3 bains d'alcool très pur pour chasser un maximum d'eau.
5. Vider l'alcool ; placer la pièce dans un verre de montre et appliquer 5 ou 6 gouttes de Giemsa lent ; laisser agir durant 15-30 minutes (on peut la laisser plusieurs heures sans inconvénient notable).
6. A l'aide d'une seringue, ajouter 5 cc d'eau bidistillée (mais pas directement sur le colorant) ; homogénéiser délicatement par balancement du verre, afin de ne pas provoquer trop de précipités. Laisser en contact durant 20 à 60'.
7. Poser la pièce sur une LPO et la bloquer avec une aiguille, afin de pouvoir l'arroser avec une pissette à eau ; cela permet d'éliminer les inévitables précipités.
8. Poser une goutte d'eau glycinée, une LCO, puis dissocier : les noyaux seront enfin visibles. Mais attention, la coloration disparaît après quelques minutes.

La question évidente qui va se poser est celle-ci :

« **Comment s'effectue la croissance des hyphes ?** ».



Voici un schéma, qui tente d'expliquer la chose.

1. Les hyphes ont une croissance apicale ; celle qui est figurée pousse vers la droite, et la pointe est le siège d'une intense activité biochimique. Chaque cellule hyphale contient 2 noyaux de polarité contraire (ils sont invisibles si on observe l'hyphe avec des colorants classiques). Notez que les septa possèdent tous un dolipore (figuré par la brisure rouge).
2. A un certain moment, une boursouffure se forme dans la paroi hyphale, au niveau des 2 noyaux. Cela signifie qu'une division nucléaire se prépare.
3. La boursouffure devient un bourgeonnement qui croît dans le sens opposé de la croissance de l'hyphe. La division nucléaire a lieu et un des noyaux va se loger dans la boucle naissante.
4. De nouvelles cloisons se forment, répartissant les noyaux de la manière suivante : la cellule hyphale terminale est dicaryotique ; la boucle naissance et l'avant-dernière cellule sont monocaryotiques.
5. La boucle bourgeonnante se courbe jusqu'à toucher la paroi hyphale de l'avant-dernier article de l'hyphe.
6. Dès qu'il y a contact, les parois communes se désagrègent et on se retrouve avec un article qui est à nouveau dicaryotique.
7. Nous voici revenus à notre point de départ, et l'hyphe peut continuer à s'allonger en répétant le même processus.
8. Un cas particulier : de temps en temps, il se forme de fausses boucles, qui sont reconnaissables au fait qu'il n'y a pas de dolipores dans les parois communes.

Une seconde question va logiquement apparaître pour un esprit avisé :

« Et pour les hyphes non bouclées, comment cela se passe-t-il ? ».

Pour fournir une réponse précise, il va falloir introduire des éléments nouveaux pour beaucoup d'entre nous : le dolipore, les parenthésomes et les corps de Woronin (ou de Voronine).

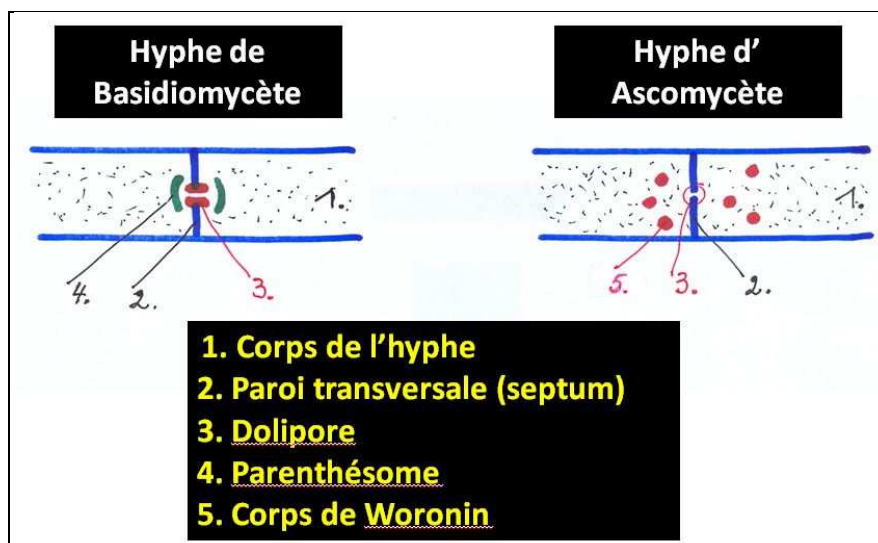
A. Les Basidiomycètes



Au centre de cette cloison, on distingue une étroite ouverture, appelée « dolipore », qui assure la circulation du cytoplasme et des noyaux d'une cellule hyphale à l'autre. On peut le comparer au diaphragme d'ouverture d'un condensateur de microscope, qui s'ouvre ou se ferme selon les besoins.

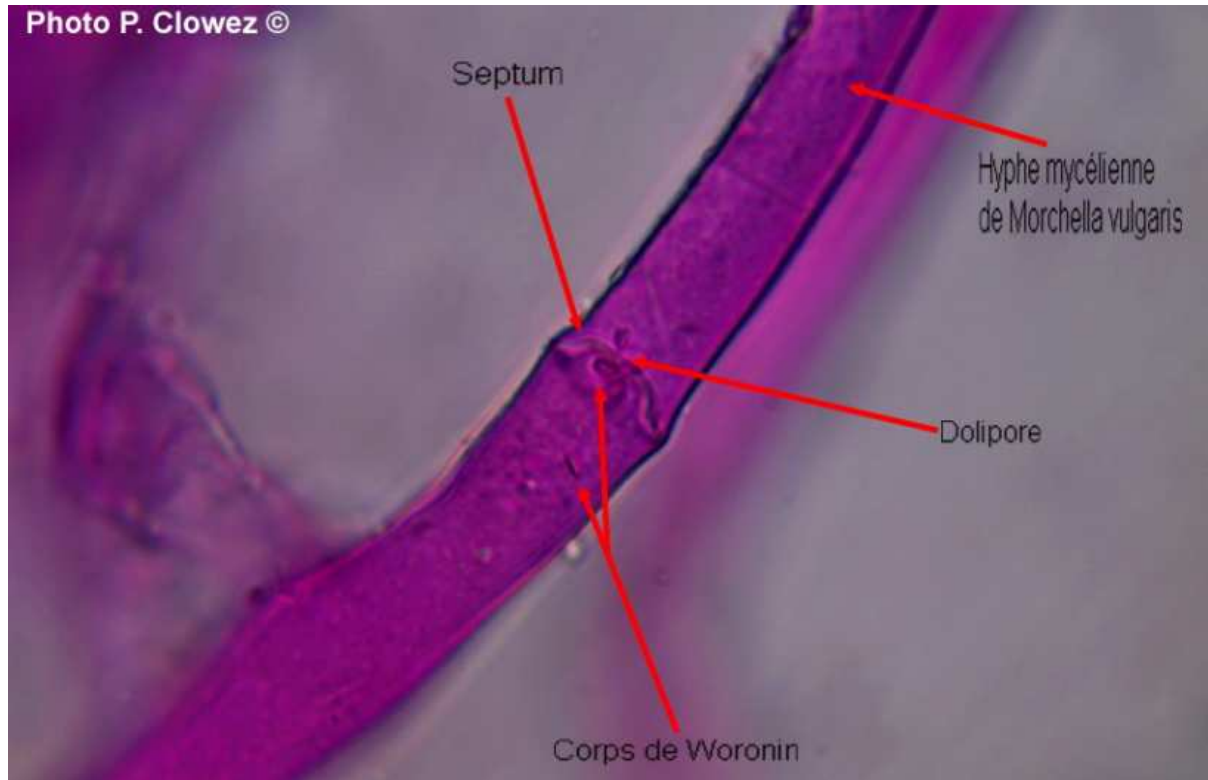
Sur une photo réalisée au microscope électronique, on voit également apparaître 2 éléments porés, en forme de parenthèse, qu'on a appelés « parenthésomes », et qui jouent un rôle de filtre. Ils sont situés de part et d'autre du dolipore, et ne sont pas visibles aux grossissements traditionnels. Voir différentes photos sur Google, en introduisant « parenthésome » comme mot de recherche.

On peut synthétiser cela selon le schéma suivant :



Avec du soin et de la patience, on peut mettre en évidence le dolipore grâce au rouge Congo SDS, (« inventé » par un assistant de G.H. Cléménçon), en travaillant sur du matériel très frais.

B. Les Ascomycètes



Coloration à la phloxine B ▲

On y rencontre également un dolipore septal, mais pas de parenthésomes. Par contre, on note la présence des « corps de Voronine ». Ces derniers vont jouer le rôle de bouchon en cas d'accident au niveau de l'hyphes. Ils sont remarquablement mis en évidence sur cette photo de P. Clowez, spécialiste français des morilles. Voir cette animation :

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/97/The_translocation_of_protoplast_in_Sordaria_fimicola_-_pgen.1000521.s011.ogv qui montre en direct les mouvements du cytoplasme dans l'hyphes, alors que les corps de Voronine restent immobiles.

*** Les septa remplissent des rôles multiples :

1. Consolider les hyphes en empêchant les parois hyphales de se collapser.
2. Assurer un rôle de transit du cytoplasme, et des noyaux (les cellules hyphales ne sont pas hermétiques).
3. Fermer l'hyphes, en cas de brisure, en empêchant la fuite du fluide cytoplasmique.
4. Servir de zone de transition et permettre la spécialisation des hyphes (basides, cystides ...).

BIBLIOGRAPHIE

CLEMENCON G.H., 1998 – *Observing the Dolipore with the Light Microscope*. Inoculum. Suppl. to Mycologia 49, April.

CLEMENCON G.H., 2012 – *Cytology and Plectology of the Hymenomycetes*, (2e éd.). Stuttgart : Ed.J. Cramer.

KÜHNER R., 1949 – *Nouveaux modes d'emploi en mycologie de deux réactifs permettant la coloration en masse des noyaux cellulaires: le carmin acétique et le mélange de giemsa*. Soc. Linéenne de Lyon, pp. 132-136

PATTON A.M. & MARCHANT R., 1978 – *A Mathematical Analysis of Dolipore/Parenthesome Structure in Basidiomycetes*. Journal of General Microbiology, 109, 335-349.

Les types de boucles

Boucles chez *Cantharellus tubaeformis* (observation dans la nigrosine). ►

Il s'agit de **boucles classiques**, présentant différents stades de formation.

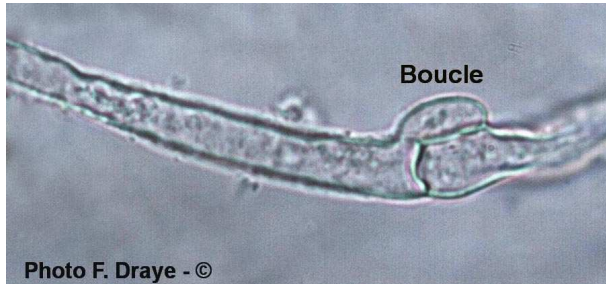


Photo F. Draye - ©



Photo F. Dechany ©

◀ Boucle complètement formée, chez *F. velutipes*.



Photo B. Clesse ©



Photo B. Clesse ©

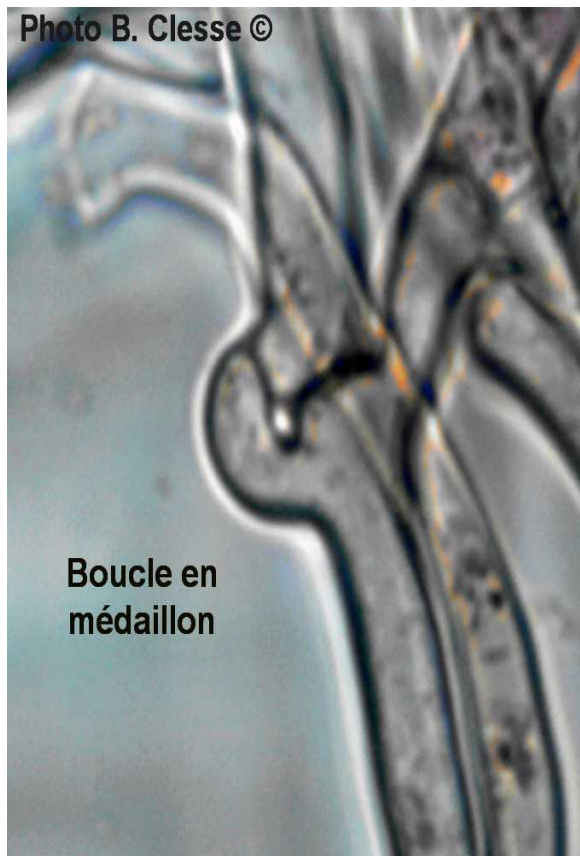


Photo B. Clesse ©

Boucle en médaillon

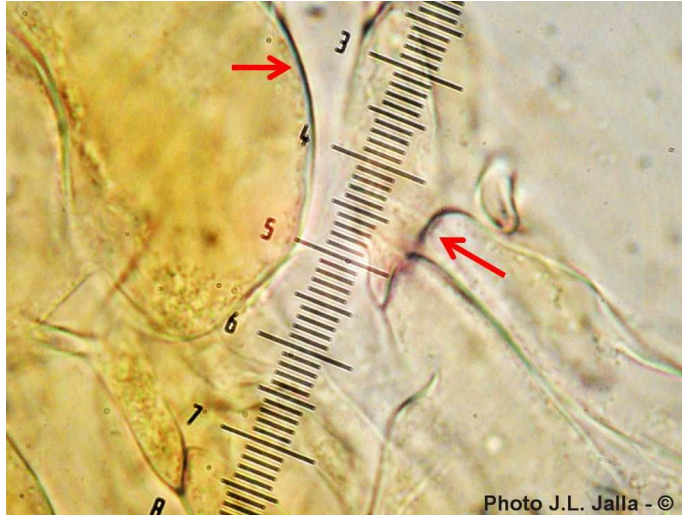
◀ boucle en médaillon chez *Bjerkandera adusta* et chez *Lepiota ochraceosulfurens* ▼



Photo F. Draye ©

La réaction KK chez les amanites

Elle est ainsi dénommée parce qu'elle a été initiée par Kotilová Kubickova, en 1982, dans le sous-genre *Amanitopsis*, et particulièrement chez les *Vaginatinae*. L'auteur a constaté qu'à la jonction entre le pied et le chapeau, on pouvait rencontrer des hyphes particulières, souvent plus volumineuses, dont la cloison affiche une réaction +/- nettement amyloïde (variations de bleu noirâtre) en présence du réactif de Melzer. Pour ce faire, il faut réaliser de fines coupes à ce niveau (merci au microtome de Ranvier), les mettre à baigner durant quelques minutes dans le melzer, puis observer après dissociation à 1.000 x. La réaction sera notée KK+ ou KK-, selon le résultat obtenu.



S. Poumarat & J.L. Jalla (2013) conseillent de se faire la main sur des espèces de la section *Amanita*, comme *muscaria*, *pantherina* ou *junquillea*, où cette réaction est très visible ...même si elle ne sert à rien dans ce groupe.

Un conseil : « Pour observer cette réaction, il faut être exactement à la confluence stipe/chapeau, là où la chair du stipe cède la place à la chair du chapeau. Avec de l'habitude, on peut voir si on est au bon endroit (même si la réaction est négative) à la forme des cellules (*). Quand je dis exactement, c'est exactement. La réaction est visible seulement sur 1 ou 2 mm de la

hauteur du basidiome » (S. Poumarat).

Par contre, chez les *Vaginatinae*, elle va permettre d'effectuer un réel tri parmi des espèces souvent difficiles à déterminer ; « bien qu'elles aient toutes des spores non amyloïdes, la réaction peut y être positive ou négative et le résultat est remarquablement corrélé avec les caractères qui définissent les divers taxons. Elle permet donc d'ajouter une preuve à une identification. Par exemple, *A. vaginata* est KK- ; *A. corylii* est KK+ ; *A. ochraceomaculata* est KK- ; *A. betulae* est KK+ ; *A. pachyvolvata* est KK- ; *A. schaefferi* est KK+ » (Neville et Poumarat, 2009). *A. umbrinolutea* est KK+ ; *A. battarrea* est KK-. (S. Poumarat).

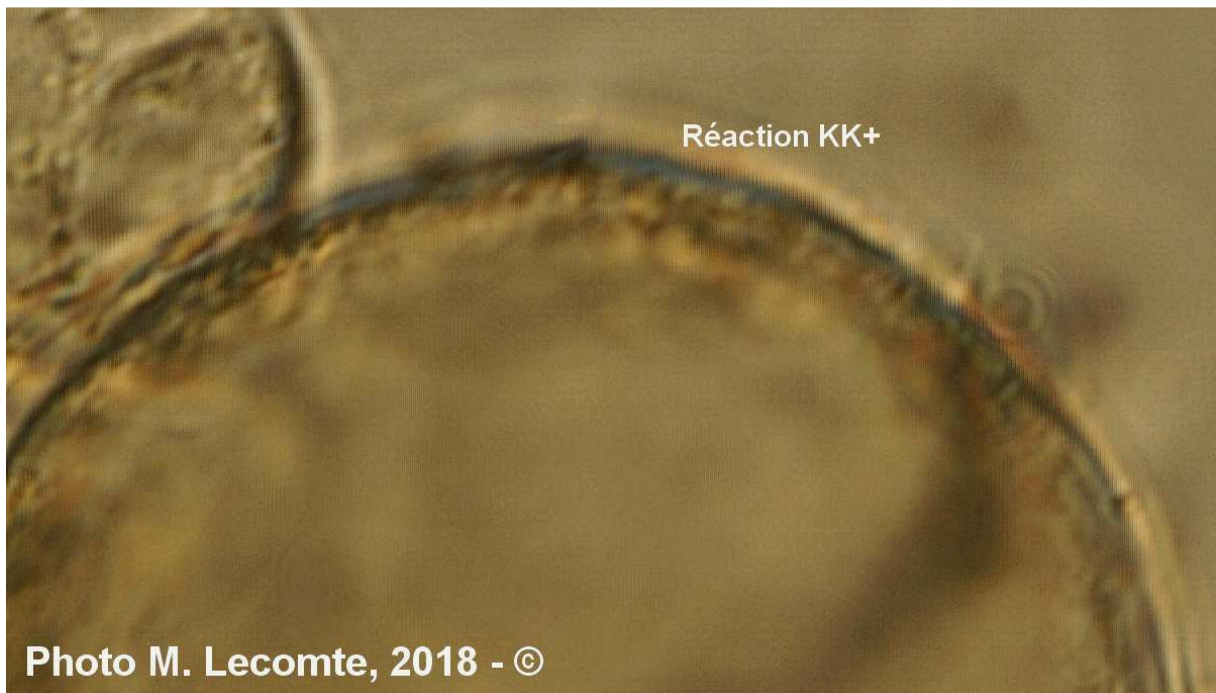


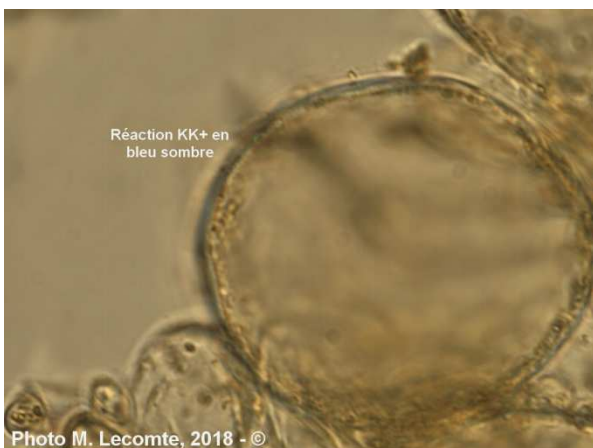
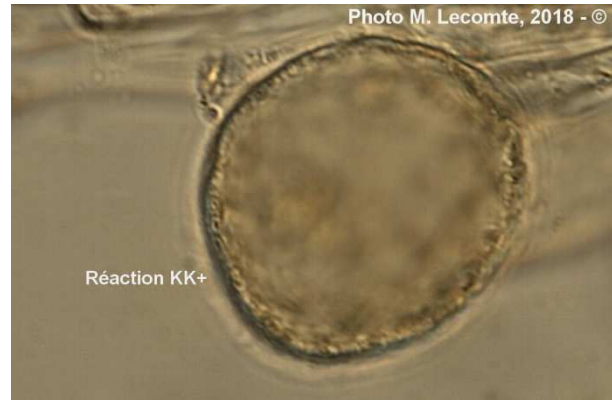
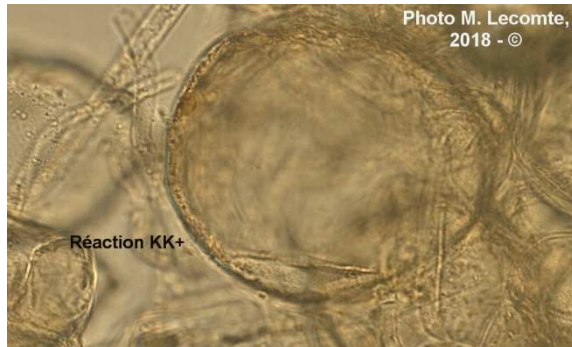
Photo M. Lecomte, 2018 - ©

(*) précision : ces cellules sont semblables à des sphérocytes de grande taille (voir nos photos).

Curieux de réaliser cette expérimentation, nous avons choisi de tester *Amanita muscaria*, où la réaction est nettement positive, même si elle n'est pas indicative, car elle est positive sur tous les représentants de la section *Amanita*.

Mode opératoire utilisé :

- ++ effectuer un prélèvement longitudinal de +/- 2 cm dans la zone de jonction entre pied & chapeau ;
- ++ au microtome de Ranvier, réaliser 3 séries successives de coupes les plus fines possible, et les placer sur 3 LPO ; appliquer le melzer et laisser agir durant 5 minutes ;
- ++ couvrir avec une LCO de 22 x 40, et dissocier, en observant dans le melzer ;
- ++ dans un second temps, nous avons épongé le réactif pour observer dans l'eau glycinée, mais le résultat n'a pas été concluant, avec une impression de disparition rapide de la réaction amyloïde.



BIBLIOGRAPHIE

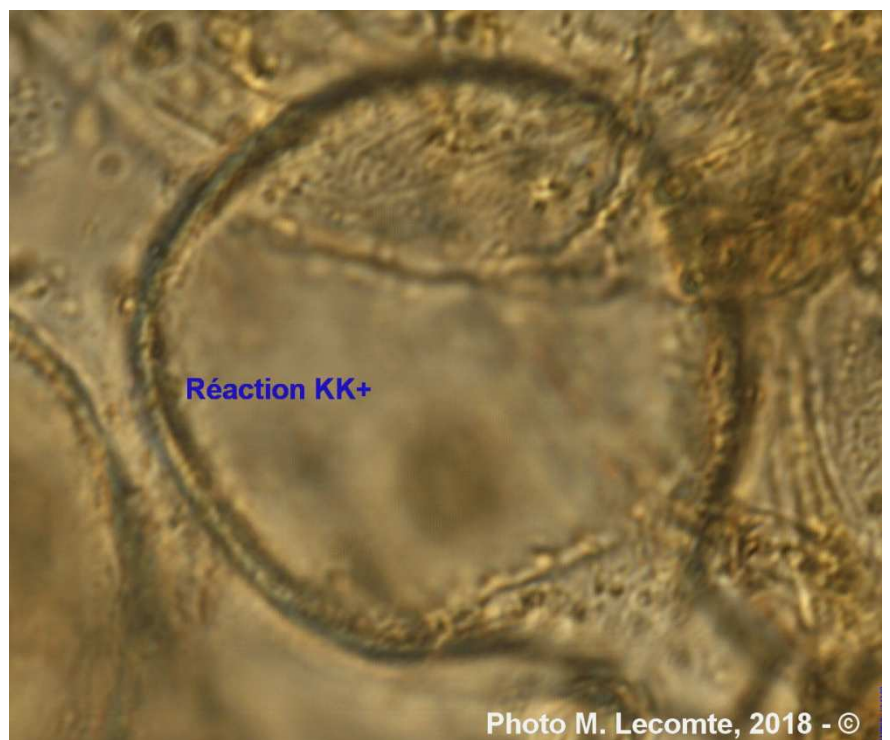
KOTILOVA-KUBICOVA L., 1982 – Occurrence of amyloid substance in the plasma in hyphae of basidiocarp of some *Amanita* species (*Agaricales*). *Ceska Mycol.*, 36 (2) : 114-117.

JALLA J.L. & POUMARAT S., s.dt. – Le genre *Amanita* et la réaction de K.-K., fichier pdf trouvé sur le net

NEVILLE P. & POUMARAT S., 2004 - *Amaniteae. Amanita, Limacella*

& *Torrendia*. Edit. Candusso, Alasio, 1120 p.

NEVILLE P. & POUMARAT S., 2009 - *Quelques espèces nouvelles ou mal délimitées d'Amanita de la sous-section Vaginatinae*. *Fungi non delineati raro vel haud perspete et explorate descripti aut definite picti*, pars 51-52. Ed. Candusso, Alasio. 200 p.



Observation des cléistothèces (suite de p. 134)

Voici une adaptation personnelle d'un protocole d'observation suggéré par D. Pradès, sur un forum de naturalistes. Cette méthode de travail permet le prélèvement des cléistothèces, sans briser les fulcres, qui sont essentiels pour la détermination. Selon le milieu de montage choisi, on pourra envisager des préparations définitives.

- ++ Prélever 2 ou 3 feuilles fortement infectées par l'oïdium à étudier (à maturité, le champignon se présente sous forme de minuscules points bruns à noirâtres).
- ++ Les placer dans un flacon hermétique à large ouverture.
- ++ Ajouter 10 à 20 cc d'eau distillée (nous déconseillons l'eau du robinet, à cause d'éventuels précipités), puis quelques gouttes de phloxine B ou de rose Bengale. Attendre 5-10 minutes.



Photo F. Corhay - ©

▲ Cléistothèce avec ascospores et fulcres de *Microsphaeria alphitoides* ▲

- ++ Agiter fortement durant 30 secondes... cela va « décoller » les champignons de leur support.
- ++ Prélever du liquide et l'étaler sur une LPO.
- ++ Sous la loupe, prélever quelques exemplaires (mis en évidence par le colorant) à l'aide d'une aiguille très fine (minutie d'entomologiste ou aiguille d'acupuncture), et les poser sur une autre LPO, dans un milieu adéquat (goutte d'eau glycinée à 20-50 %, acide lactique, hydrate de chloral à 50 %, Aquatex...). → En cas d'utilisation d'une solution de glycérine, laisser à l'air libre jusqu'à évaporation de l'eau.
- ++ Poser délicatement une LCO (afin de ne pas éclater le cléistothèce) et observer.
- ++ Si on souhaite observer les ascospores de champignon, exercer une pression plus forte sur la LCO afin de briser l'enveloppe du champignon.

Un nouveau type de coloration pour les morilles (suite de la p. 111)

Philippe Clowez, spécialiste français des morilles, a cherché à mettre en évidence l'ornementation sporique des ascospores du genre *Morchella*. Celle-ci était connue grâce à la microscopie électronique, mais invisible avec un microscope classique.

Le bleu coton lactique permet parfois d'obtenir un semblant de résultat.

Mais il s'avère également très important de différencier les cloisons des paraphyses ou encore les poils des côtes longitudinales qui ornent la paroi sporale (acroparaphyses).

Après de multiples essais, il a fixé son choix sur 3 modus operandi :

1. Utilisation seule du noir de chlorazol aqueux SDS (appelé aussi Azo black).

Il colore nettement les cloisons, et par son pouvoir de contraste, met bien en évidence les contours des différentes pièces. Il s'avère plus efficace si on le chauffe légèrement. Selon l'effet recherché, on va rincer ou non la préparation (directement ou par capillarité).

Asques de *Morchella elata* (Azo black seul) ►



2. Double coloration phloxine B alcoolique et Azo black.

Commencer par la phloxine ; rincer abondamment puis observer dans le noir.

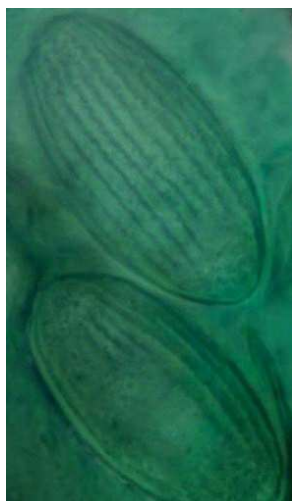


◀ Basides et cystides chez *Russula* sp. (phloxine B + Azo black)

3. L'utilisation combinée de la glycérine et d'une encre verte à tampon (marque Noris).

Technique : « Prélever un petit fragment d'hyménium de morille fraîche ou d'exsiccatum dans une goutte d'eau pendant quelques minutes. Placer une petite goutte de glycérine sur lame de verre et y plonger le fragment égoutté. Mettre ensuite une goutte d'encre à tampon verte

(marque Noris), mélanger. Placer la lamelle, observer en optimisant le contraste quitte à perdre en luminosité. » (P. Clowez)



◀ Stries sur les ascospores de *Morchella anatolica* (photo P. Clowez ; glycérine+ vert Noris)

BIBLIOGRAPHIE

CLOWEZ P. & MOREAU P.-A., 2018 – Quelques nouvelles colorations microscopiques appliquées à l'étude des morilles. Doc. mycol. XXXVII, p. 15–22.

Clowez P. & Moreau P.-A., 2018 – Les spores de morilles en microscopie optique. Doc. mycol. XXXVII, p. 23–38.

Les chlamydospores

Ce sont des éléments fertiles permettant une multiplication végétative rapide, semblables aux conidies des Ascomycètes. C'est une forme de clonage, car il n'y a pas échange du patrimoine génétique. Elles développent une paroi épaisse qui leur permet de subsister durant l'hiver sur le sol ou dans les débris de végétaux, en attendant des conditions propices à leur germination.



On va les rencontrer chez certains basidiomycètes, en parasites d'autres espèces, surtout des russules et des lactaires vieillissants.

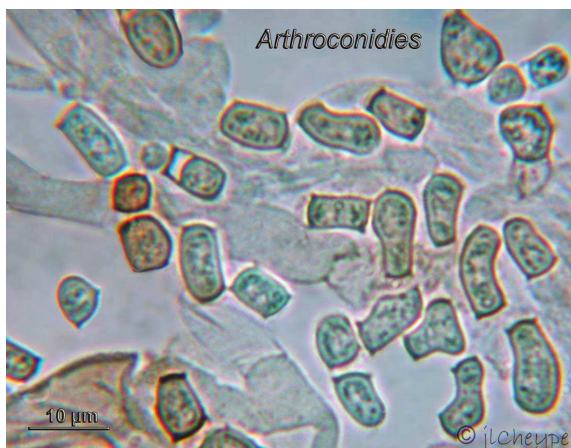
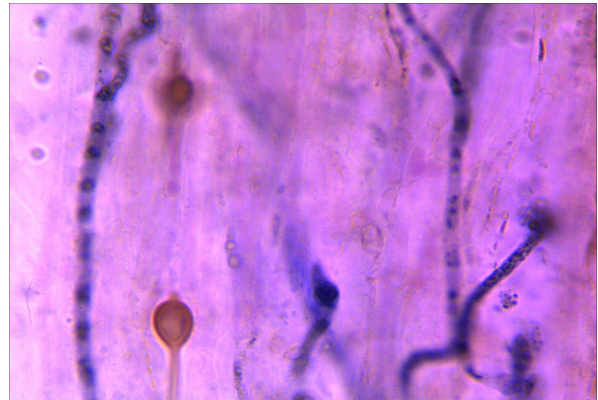
◀ *Asterophora parasitica*, qu'on rencontre surtout sur les espèces du groupe de *Russula delica* (sous-section des *Delicineae*) - photo M. Lecomte, coloration à la phloxine B.



◀ ▲ *Asterophora lycoperdoides*, qu'on rencontre souvent sur les vieilles russules du groupe de *Russula nigricans* (section des *Compactae*) et sur de gros lactaires en décomposition, comme *Lactarius vellereus*.

Chez *Lentinellus cochleatus*, on en rencontre également dans la chair du pied et dans le revêtement cuticulaire, qui est composé d'hyphes entremêlées à +/- parallèles, dans lequel on trouve ces éléments vésiculeux pédicellés. Ici, il n'est pas question de parasitisme, car ce champignon pousse sur des souches pourrissantes de feuillus ou de conifères.

Lentinellus cochleatus - photo N. Bastien ▶

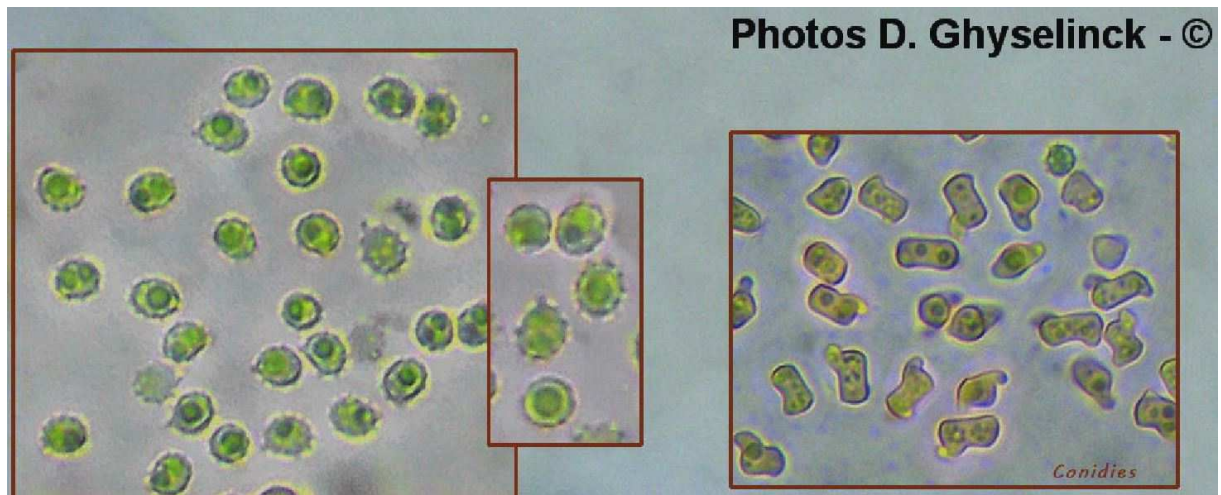


On va également en rencontrer chez *Cystoderma jasonis*, au niveau de la cuticule, sous forme d'éléments anguleux à +/- arrondis, de 7-10 x 4-5 µm. Breitenbach les a qualifiés « d'arthrospores », mais à nos yeux, il s'agit également de chlamydospores.

La littérature foisonne de noms relatifs à la reproduction végétative.

Langeron (1945) a utilisé pour la 1^{ère} fois, « arthrospore » en parlant de *Geotrichum candidum* (très utile pour les fromages) ; on parlera de « blastospores » chez les levures, de « dictyospores » chez les

Alternaria. Les chlamydospores se rencontrent aussi chez *Candida albicans*.



A droite, les conidies rencontrées chez *Trechispora stevensonii*.

A gauche, les basidiospores de ce corticié.

Chez cette espèce, l'anamorphe et le téléomorphe cohabitent sur le même substrat.

Personnellement, nous déplorons la multiplicité de termes créés par différents auteurs et utilisés pour qualifier les conidies ; il serait plus simple d'appeler « conidie » tout élément générant une reproduction asexuée.

Addendum à la page 45

NOUVEAU DISPOSITIF DE COUPE POUR LE RANVIER



Il est composé de deux pièces mobiles qui permettent, par un système de serrage, de placer en bonne position des lames très tranchantes, interchangeables, de 10 cm de long, qui permettent de réaliser les coupes en un seul passage, sans mouvement de va-et-vient. En outre, l'ensemble est d'une très grande rigidité (cela évite d'obtenir des coupes qui ondulent, et d'épaisseur variable), avec une grande surface de contact plane.

Pour nous, c'est l'outil idéal en la matière.

Addendum à la page 66 SPORE ET PAROI SPORALE

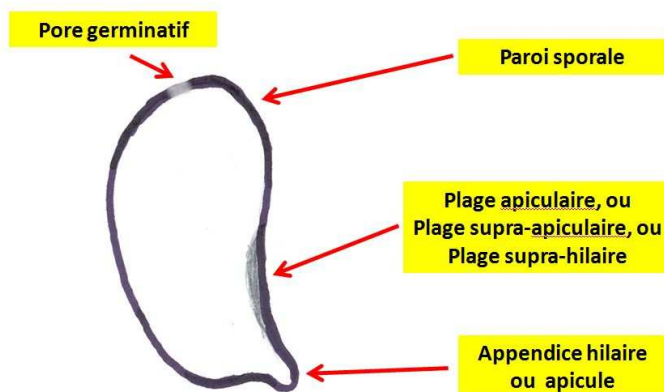


Schéma général d'une spore

La spore, élément fertile du champignon, présente nombre de formes diverses chez les Basidiomycètes. Sur ce schéma simplifié, nous avons noté les éléments qui demandent à être observés avec soin.

La **paroi sporale** sera lisse ou diversément ornementée, et pourra être colorée.

L'**apicule** est l'endroit où la spore s'attache au stérigmate.

La **plage supra-apiculaire** est une zone +/-

étendue, bien délimitée, lisse, qui ne portera pas d'ornementation (dans le cas des spores ornementées).

Le **pore germinatif** est un point de faiblesse de la paroi sporale (paroi de résistance), qui permettra la naissance d'un mycélium primaire, au moment approprié. L'intérieur de la spore contient du **cytoplasme** dans lequel baignent divers éléments {noyau(x), vacuole(s)}

La paroi sporale

Nous avons eu l'occasion de consulter un récent article de G. Fortin², précisant le détail d'une paroi sporale, qui s'avère très complexe et dévoile ses dessous maintenant que nous disposons d'outils d'investigation très puissants.

Nous avons choisi de le suivre dans son interprétation qui nous paraît très cohérente :

« Le suffixe « -sporium » est utilisé pour nommer les couches de la paroi sporale alors que le suffixe « -spore » est utilisé pour parler de la spore en général, comme dans basidiospore ou ascospore. » (G. Fortin)

2-3-4 sont les éléments constitutifs de la paroi sporale externe, qu'il appelle **myxosporium** ; 5-6 constituent la paroi interne, dénommée **eusporium**.

Le **myxosporium** est la zone où se situent tous les éléments qui nous intéressent pour la coloration ou les réactions ; pigments, éléments amyloïdes ou dextrinoïdes, cyanophiles, congophiles ... il est composé de 3 couches :

++ L'**ectosporium** (2) : couche très mince, de nature gélatineuse, qui permet à la spore d'adhérer au support qui va la recevoir (il est invisible avec nos moyens d'investigation classiques).

++ Le **périsporium** (3) : plus épais, également de nature gélatineuse.

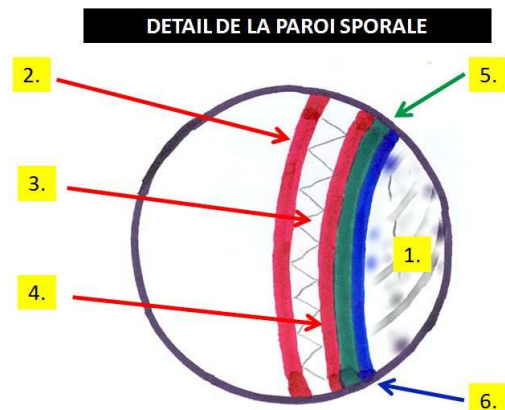
++ L'**exosporium** (4) : il contient les diverses ornementsations (si elles existent) ; de nature gélatineuse, il peut devenir cartilagineux.

Seules, ces 2 dernières couches sont visibles au microscope optique ; elles sont toutes deux solubles dans le KOH.

L'**eusporium** est incolore et insoluble dans le KOH ; c'est la vraie paroi de la spore, seule restante après disparition éventuelle du myxosporium ; il est composé de 2 couches :

++ L'**endosporium** (5) : il est en contact avec (4) et d'une épaisseur variable.

++ L'**épisorium** (6) : c'est la paroi fondamentale de la spore ; il est directement en contact avec le cytoplasme. Si la spore possède un pore germinatif, c'est dans cette paroi que le pertuis se forme.



² Guy Fortin, mycologue québécois, qui publie des articles de microscopie d'un grand intérêt, et très bien documentés. Voir <http://blog.mycoquebec.org>