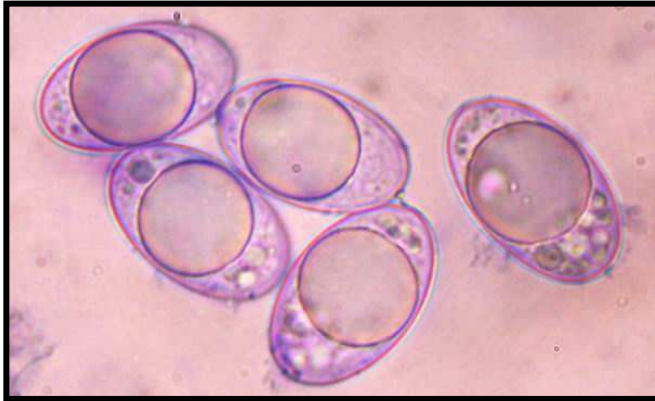


Guttules, vacuoles et noyaux

Marcel Lecomte

Lors de préparations microscopiques, nous sommes confrontés souvent à des nécessités d'interprétation des éléments observés : ces grandes formes géométriques que nous observons (ici, à l'intérieur des ascospores), que sont-elles ? Guttules, vacuoles ou noyaux ?



Geopora arenicola – photo M. Lecomte

Des définitions d'abord :

Le noyau : en biologie, c'est un organe, présent dans la majorité des cellules, et contenant la plupart du matériel génétique de la cellule. Il a deux fonctions principales : contrôler les réactions chimiques du cytoplasme et stocker les informations nécessaires à la division cellulaire. Il a un diamètre moyen de 5 à 7 μm .

La vacuole est un organe présent dans les cellules végétales et fongiques. Elle est délimitée par une membrane ; remplie d'eau, elle contient diverses molécules dont des enzymes. Elle n'a pas de forme ou de taille particulière, sa structure variant en fonction des besoins de la cellule.

Ses fonctions générales sont :

- L'isolement de composants potentiellement nocifs pour la cellule.
- La gestion des déchets à l'aide d'enzymes de digestion, ou l'endocytose d'éléments vieillissants du cytoplasme.
- Le maintien de l'équilibre en eau.
- Le stockage permanent ou transitoire de l'eau et de molécules telles que certains pigments, des glucides, protéines et lipides.

Une guttule est une inclusion ovoïde à sphérique, de nature lipidique (grasseuse), se trouvant dans le cytoplasme de certaines cellules fongiques, et plus particulièrement dans les spores, les paraphyses, parfois dans les hyphes, basides et les cystides. On en trouve aussi dans les levures.

Dans une situation d'observation normale d'éléments fongiques placés dans de l'eau, avec un microscope à lumière incidente ou réfléchi, il est généralement impossible d'observer les noyaux des cellules (sauf chez certains Ascomycètes). Leur mise en évidence nécessite des techniques de coloration particulières et assez lourdes.

Les GUTTULES

Afin de les différencier avec certitude, nous allons utiliser le **rouge Soudan au bleu coton lactique ou lactophénoïl, ou le rouge huile O** : ce sont des colorants qui mettent en évidence la présence de résidus ou d'éléments lipidiques. R. Kühner utilise le **bleu de crésyl** pour colorer en jaune doré caractéristique les lipides libres (enclaves ou exsudats).

Elles s'avèrent très importantes pour la différenciation de certains Ascomycètes.

Les VACUOLES

A nos yeux, le moyen le plus simple pour les identifier avec certitude est de **provoquer leur contraction** ; pour cela, placer les éléments à observer dans une goutte d'une solution aqueuse à 10 ou 15 % de chlorure de Na (sel de cuisine), de saccharose (sucre blanc) ou de glycérine.

Le bleu de crésyl s'utilise en solution aqueuse largement diluée ; il permet alors une coloration uniforme des vacuoles, ou la mise en évidence de granulations fortement teintées.

Les NOYAUX

Leur étude (caryologie) et la mise en évidence de leur nombre peut s'avérer très intéressante. Josserand affirme que « *leur mise en évidence est particulièrement facile dans les spores* ». Nous modérerons quelque peu cette affirmation, car la technique à mettre en œuvre est relativement longue et exigeante financièrement, si on ne dispose pas d'un laboratoire équipé, et si on compare aux observations traditionnelles qui se font directement et en vitesse dans une simple goutte de rouge Congo. En outre, il faut reconnaître que nombre de mycologues éprouvent beaucoup de difficultés à sortir des chemins battus. Retenons que les noyaux sont sensibles surtout aux colorants basiques.

La concentration de la solution de colorant a beaucoup d'importance ! Une règle à retenir : des solutions diluées agissent lentement mais de manière beaucoup plus élective !

Les types de colorants conseillés

Le mélange de Giemsa (bleu Azur-éosine-bleu de méthylène) permet une coloration des noyaux, sans autres colorations parasites. C'est de loin le meilleur colorant pour ce travail. Il existe du Giemsa « rapide » et du « lent ».

Méthode de Josserand

Pour ces manipulations à bains divers et multiples, l'utilisation de tubes de Borel est recommandée (tubes en verre avec couvercle en verre).

- prélever des spores d'une sporée
- déposer sur une lame mouillable (bien dégraissée à l'alcool) dans une goutte d'eau bidistillée
- bien mélanger puis réaliser un frottis
- après évaporation de l'eau, les spores restent collées sur la lame
- préparer des tubes de Borel identifiés ou numérotés, avec les produits indiqués ci-dessous
- observer dans l'eau ou dans une goutte d'ammoniaque
- les noyaux apparaissent dans les spores sous forme de petites masses colorées en pourpre noirâtre

HCl pur (1) chauffé à 60° 10 minutes	Eau de rinçage 5 à 10 minutes Très important pour enlever l'acidité	Ethanol à 95° ou absolu 10 minutes	Ether (2) 1h1/2 à 2 h	Ethanol (3) à 95° ou absolu 2 minutes	Eau de rinçage 1 à 2 minutes	Solution aqueuse de Giemsa 1 goutte par cm ³ d'eau 4 à 8 heures
Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7

(1) : on parle d'acide chlorhydrique pur lorsqu'il contient 36,5 g d'HCl par litre

(2) & (3) : ces étapes sont indispensables pour les spores de Russulales, mais elles seront inutiles dans de nombreux cas

Méthode de Robert Kühner

Il s'agit d'une technique sophistiquée et assez longue, mais sans grande difficulté. Elle met remarquablement les noyaux en évidence. L'auteur travaille au départ d'un morceau du sporophore.

- la fixation à l'alcool absolu ou à 95° n'est pas obligatoire

- immerger le fragment dans de l'acide chlorhydrique à 8 % (8,25 ml d'HCl fumant avec 100 ml d'eau bidistillée), chauffer à 55-60° C durant 8-10 minutes en moyenne (de 5 à 15 minutes selon la taille du fragment).
- éliminer la solution acide et remplacer par de l'eau froide qu'on change de 3 à 5 fois en 15 minutes
- vider l'eau et la remplacer deux fois par de l'éthanol (ou du méthanol) absolus
- vider l'alcool et déposer sur le morceau de sporophore 4 à 6 gouttes de Giemsa lent
- laisser agir le colorant durant au moins une heure
- ensuite, verser 5 ml d'eau bidistillée dans le tube et rendre homogène en inclinant et redressant doucement le tube (ne pas mélanger)
- laisser agir encore une heure
- placer le fragment coloré sur une lame de verre et le rincer à l'eau avec le jet d'une seringue (bloquer le fragment avec une aiguille montée) durant 2 à 3 secondes
- effectuer une coupe s'il s'agit d'un gros fragment
- placer sous lamelle avec de l'eau bidistillée, ou mieux encore de l'ammoniaque diluée 2x
- dissocier éventuellement par percussion, si c'est nécessaire

Le carmin acétique : (mieux encore : carmin acétique ferrique) ; La coloration des noyaux par ce moyen est une caractéristique des genres *Geopora* et *Mycena*. Cette coloration est également possible sur des exsiccata.

Méthode de Josserand et de Kühner

Pour le matériel et la préparation d'une lame, voir les recommandations ci-dessus (mélange de Giemsa).

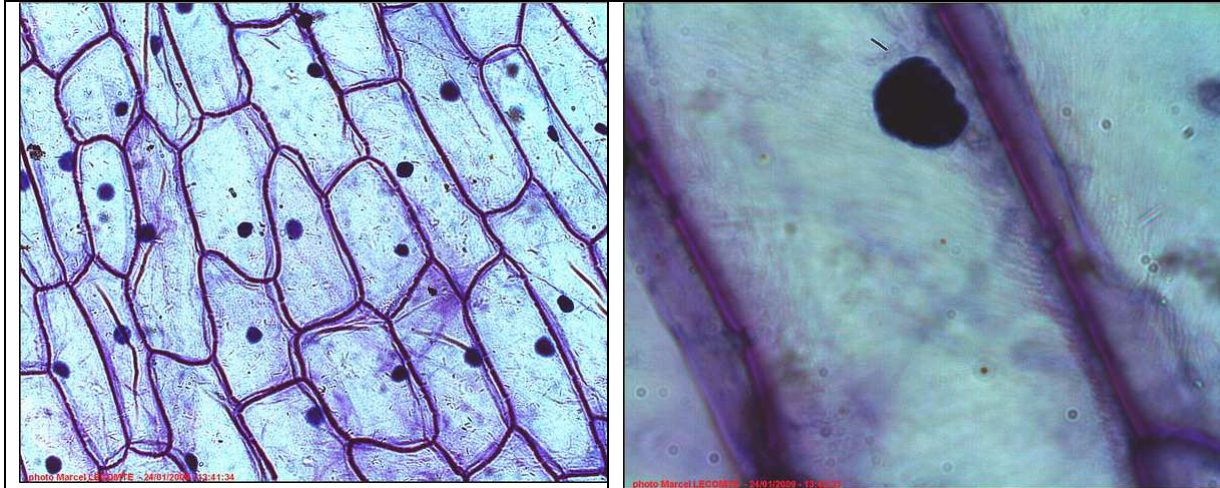
- après évaporation de l'eau, les spores restent collées sur la lame
- préparer des tubes de Borel identifiés ou numérotés, avec les produits indiqués ci-dessous
- l'opération réalisée dans le tube 1 s'appelle le mordantage ou la fixation
- observer dans l'eau ou dans une goutte d'ammoniaque à 50 %

Préférer du matériel frais	10 cc Alun de fer ammoniacal à 5 % (1) +	Eau de rinçage	Carmin acétique de Sémichon	sortir la lame du bain de colorant et y déposer à nouveau une grosse goutte de carmin acétique	10 g d'hydrate de chloral + 10 cc d'eau
Ethanol à 95° 24 heures	10 gouttes acide acétique glacial 15 à 30 minutes	passer dans l'eau une seule fois	15 à 30 minutes ou de 1 à 2 heures (R.K.)		2 minutes
Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Porter à ébullition durant quelques secondes	Tube 5

(1) On peut également utiliser le picroformol de Hollande (à base d'acétate de cuivre) comme fixateur.

On peut utiliser également avec succès l'**hématoxyline** (avec alun de fer ammoniacal), le **rouge Neutre** (laisser agir durant 24 heures), le **bleu de méthylène**, le **bleu de toluidine**, le **vert de méthyle**, l'**orcéine acétique**.

L'**orange d'acridine** est utilisé pour des colorations vitales, mais nécessite un microscope en fluorescence.



Cellules d'épiderme d'oignon, avec noyau bien visible - coloration bleu de méthylène, 40x et 100x, photo Marcel Lecomte

Bibliographie :

- AUDERSET G.**, 1987 – *Biologie végétale*, Florimontanes, 268 p., 52
- BASSO M.T.**, 2005 – *Manuale di Microscopia dei Funghi*, 303 p., 200
- CLÉMENÇON H.**, 2004 – *Cytology and Plectology of the Hymenomycetes*, Cramer, 488 p., 17-20
- JOSSERAND M.**, 1983 – *La description des champignons supérieurs*, Lechevalier, 156-158.
- KÜHNER R.**, 1980 – *Les Hyménomycètes agaricoïdes*, n° spécial du Bul. Soc. Linnéenne de Lyon, 1025 p., 822, 1022-1025.
- LANGERON M.**, 1942 – *Précis de microscopie*, Masson, 1340 p.
- LOCQUIN M.**, 1984 – *Mycologie générale et structurale*, Masson, 551 p.
- LOCQUIN M. & LANGERON M.**, 1978 – *Manuel de microscopie*, Masson, 352 p., 224-225, 251-252, 299
- MARTOJA R. & MARTOJA M.**, 1967 – *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Masson, 345 p., 86-91