

Quelques réactifs en mycologie

Partie 1 : Introduction et généralités

Didier Baar²³ & Marcel Lecomte

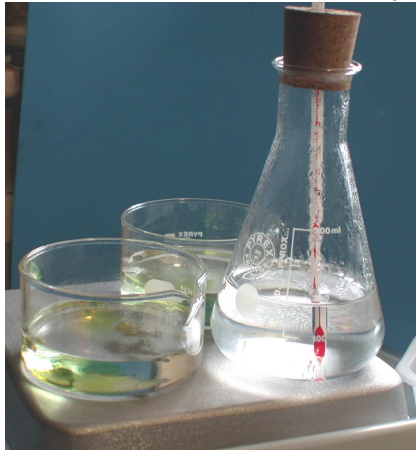
Note du rédacteur en chef : cet article est un condensé d'un travail original du regretté Didier Baar, dont vous retrouverez l'intégralité, y compris les photos originales, sur notre site : voir <http://www.amfb.eu/>, dans la rubrique « Publications ».

Nous avons sciemment supprimé ici les développements de formules chimiques, et les démonstrations de réactions ; les photos en N/B ont été remplacées par des photos semblables mais plus actuelles ; des addenda d'actualisation ont été ajoutés et figurent en notes de bas de page.

Vous trouverez également de larges compléments d'information sur les fiches techniques des colorants et réactifs présents ou non repris dans cet article, sur le site <http://www.champignons-passion.be>

L'éventail des méthodes mises en œuvre lors de l'étude des champignons est chaque jour plus étendu. Continuellement, de nouvelles techniques, découvertes généralement dans d'autres disciplines, sont adaptées à la mycologie. C'est le cas, notamment, de la génétique (séquençage des gènes, par exemple), de l'immunologie (étude des maladies cryptogamiques), de la paléontologie (établissement de l'arbre phylogénétique des mycètes²⁴) [de nos jours, la classification phylogénétique se base surtout sur les résultats des études moléculaires (analyse de l'ADN), traités par les méthodes de la cladistique] et de la biochimie (analyse des protéines et autres métabolites des champignons).

L'identification des champignons, dans le cadre de la taxonomie, a de tous temps été délicate.



Deux causes sont à la source de cette complexité : la variabilité typique des champignons, et la subjectivité à laquelle sont livrées la définition et la limitation des taxons. Ces deux causes rendent la taxonomie quelque peu empirique. C'est pourquoi, ici aussi, on multiplie le nombre de techniques d'étude. En effet, celles-ci permettent d'accéder à des caractères nouveaux, toujours plus objectifs, en vue de rendre davantage cartésienne cette partie essentielle de la mycologie.

C'est dans cette optique que la microchimie et la microscopie ont pris place dans l'éventail des techniques mycologiques. Ces deux grandes méthodes ont maintenant fait leurs preuves dans une large mesure. Toutes deux ont recours – pour ne pas dire qu'elles sont basées dessus - à une large panoplie de réactifs chimiques.

Nous nous proposons, après un rappel sommaire des notions élémentaires (mais combien indispensables) de la chimie, d'étudier les plus importants d'entre eux.

Notions élémentaires de chimie (voir ce chapitre technique sur notre site)

Généralités

On utilise en mycologie une multitude de produits différents. Nous en avons sélectionné une vingtaine parmi les plus communs. La première distinction qui puisse être faite entre ces réactifs est relative à l'usage auquel ils sont destinés : macrochimie ou microscopie. Il n'est pas rare toutefois que des produits servent à des applications aussi bien macrochimiques que microscopiques : nous les qualifierons alors de mixtes.

Une autre manière de classer les innombrables produits utilisés est d'isoler les réactifs véritables du reste. On parlera de réactif lorsqu'un produit conduit à une réaction *a priori* inattendue. Tel est le cas du sulfate de fer, qui est vert mais donne souvent des réactions orange ou rose. Le rouge Congo ammoniacal, quant à lui, n'est pas un réactif parce qu'il colore en rouge les éléments qu'on y plonge. Quoi de plus



²³ Didier Baar, décédé accidentellement le 14 octobre 2001, à l'âge de 23 ans.

²⁴ Voir l'article de J.-M. PIRLOT sur les champignons fossiles (*Mycos*, fascicule 2, 1999, pages 35-38).

normal ? Il y a cependant ici aussi des cas discutables, en ce sens que certains produits, qui ne sont en général pas des réactifs, peuvent à l'occasion se comporter comme tels. C'est justement le cas du rouge Congo ammoniacal, car on peut dire de certaines structures qu'elles sont congophiles si elles fixent le rouge Congo de manière spectaculaire²⁵. C'est la raison qui nous a poussés à utiliser indifféremment les termes « réactif » et « produit » dans la suite de cet exposé.

1. Réactifs macrochimiques

Toutes les substances à usage macrochimique sont des réactifs à proprement parler. Ils sont le plus souvent stockés dans des flacons présentant une petite tige (fichée dans le capuchon) terminée par une palette, normalement destinée à l'application de produits pharmaceutiques (sur les cors, les verrues et autres joyeusetés)²⁶.

Sur le terrain, on a intérêt à n'emporter que le minimum de flacons, afin de limiter l'encombrement. Pour l'utilisation, il suffit de déposer, grâce à la tige, une petite goutte du réactif sur la partie du champignon à tester. Le sulfate de fer, lui, sera appliqué en frottant la surface du champignon avec le cristal. L'ammoniaque, enfin, est le seul réactif qu'on peut utiliser sans provoquer de contact direct entre la substance et le champignon : les vapeurs peuvent être suffisantes.



Réaction du sulfate de fer sur une russule de la section des *Viridentes* - photo M. Lecomte

Pour réaliser des réactions macrochimiques dans des conditions idéales, il faut choisir des spécimens adultes mais pas trop vieux, et bien frais mais non gorgés d'eau. De même, les réactifs utilisés doivent être en bon état pour fournir des résultats reproductibles. La plupart se conservent longtemps, mais pas tous. Une réaction positive se traduit par un changement de couleur de la zone testée.

Plusieurs facteurs doivent être pris en compte pour une utilisation rationnelle et optimale des réactifs macrochimiques (OTJACQUES, 1995) : la partie du champignon sur laquelle le réactif a été appliqué, l'intensité de la réaction, le temps nécessaire à la réaction, et enfin la subjectivité de l'opérateur. En effet, les réactions seront souvent différentes selon que le réactif a été déposé sur la cuticule du chapeau ou sur la chair du stipe, par exemple. Au niveau de l'intensité de la réaction, on distingue souvent par - ou 0 une réaction négative, par + une réaction positive mais faible, par ++ une réaction plus nette, et par +++ une réaction forte. On se contente de ces quatre niveaux parce qu'il est difficile de quantifier précisément l'intensité de la réaction.

De même, on distingue des réactions instantanées, des réactions rapides (quelques secondes), des réactions normales (autour d'une minute), des réactions lentes (entre deux minutes et un quart d'heure) et des réactions tardives (de l'ordre de la demi-heure ou plus). Enfin, la subjectivité du manipulateur entre aussi en ligne de compte, car chacun voit les couleurs avec une teinte et une intensité propres. Ainsi, un ocre sera plutôt jaune pour certains, et plutôt brun pour d'autres...

2. Réactifs pour la microscopie

En microscopie, on utilise aussi bien des réactifs véritables, comme le réactif de Melzer, que des milieux d'observation inertes (ou qui peuvent être considérés comme tels).

Le choix d'un milieu d'observation dépend essentiellement de trois facteurs : le groupe auquel appartient le champignon à observer, le type de cellules à mettre en évidence et la destination de la préparation.

²⁵ Il en est de même pour le bleu de méthyle (les structures sont alors dites cyanophiles), et le bleu de crésyl qui, chez les Macrolépiotes, est utilisé pour une coloration métachromatique (la paroi des spores devient rouge alors que le colorant est bleu).

²⁶ On parlera de flacons coricides

Le groupe auquel appartient le champignon est essentiel : il est inutile, par exemple, d'observer des spores de *Clitocybe* dans le réactif de Melzer, car elles sont iodo-négatives chez toutes les espèces du genre. De même, il est plus intéressant d'observer des spores d'ascomycètes dans le bleu coton au lactophénol que dans le rouge Congo ammoniacal, parce que le bleu coton se fixe très bien sur l'ornementation des spores de nombreux ascomycètes, ce qui n'est pas nécessairement le cas du rouge Congo.

Le type de cellules à mettre en évidence n'est pas non plus sans importance. Par exemple, on a en général avantage à observer les asques dans le réactif de Melzer, tandis que les paraphyses y sont fort peu visibles. Enfin, la destination de la préparation doit être prise en compte. Une préparation extemporanée sera idéalement réalisée dans un milieu très fluide (ammoniacal, rouge Congo ammoniacal, potasse, etc.) qui facilite la dissociation. Au contraire, si on désire conserver la préparation quelque temps, on aura intérêt à la monter dans un liquide visqueux, stable et peu volatil (bleu coton au lactophénol, acide lactique concentré, lactophénol, chloral lactophénol, etc.). De la même manière, les préparations vouées à la photographie seront avantageusement montées dans des milieux visqueux, qui limitent le déplacement des objets au cours de l'exposition (qui dure parfois plusieurs secondes).

Pour l'utilisation des milieux de montage en microscopie (BAAR, 1996), on dépose une goutte du liquide choisi sur une lame porte-objet, on y transfère le fragment de champignon à observer et on retourne délicatement sur le tout une lamelle couvre-objet sur laquelle une toute petite goutte du milieu de montage aura été déposée, et ce pour éviter l'emprisonnement de bulles d'air. Le fragment à observer peut être une coupe fine, faite en général à la lame de rasoir, ou bien un petit morceau de champignon prélevé à l'aide de pincettes ou d'un scalpel. Dans ce dernier cas, il est nécessaire, pour voir quelque chose, de dissocier le prélèvement dans le liquide d'observation. Pour ce faire, on tapote la surface de la lamelle à l'aide de l'extrémité molle et arrondie d'un stylo Bic, par exemple. Dans tous les cas, l'objet destiné à l'observation doit être de très petites dimensions.

3. Réactifs mixtes



Réaction de la sulfovanilline sur *Russula aurora* - photo M. Lecomte

Dans cette catégorie de réactifs ne sont classés, en fait, que l'acide sulfurique et la vanilline (les deux composants de la sulfovanilline), l'ammoniacal et la potasse à 10% dans l'eau bidistillée.

Il est à remarquer que les réactifs dont l'utilisation la plus courante est de loin macrochimique ont été regroupés avec les réactifs typiquement macrochimiques (c'est le cas du sulfoformol). De même, les réactifs qui, bien que pouvant occasionnellement être utilisés en macrochimie, sont surtout destinés à la microscopie, ont été regroupés avec les réactifs purement microscopiques (le réactif de Melzer en est un bon exemple).

Remarque : dans chaque catégorie, nous avons classé les réactifs par ordre alphabétique, même si, parfois, cela peut paraître illogique.

Partie 2 : Réactifs pour la macrochimie et réactifs mixtes

La description de chaque réactif est structurée selon quatre rubriques. D'abord, les caractéristiques les plus remarquables du produit sont exposées dans l'introduction. Celle-ci est suivie d'un point important, consacré aux utilisations mycologiques qui sont faites du réactif. La troisième rubrique met en exergue les dangers que présentent le réactif ou ses composants, tandis que dans la quatrième, des conseils relatifs à la conservation sont prodigués.

Réactifs pour la macrochimie

1. Formol pur

Ce que l'on appelle communément « formol » est en réalité une solution concentrée d'un gaz : le méthanal, ou aldéhyde formique, ou encore formaldéhyde. Le méthanal est le plus simple aldéhyde pos-

sible, car il ne possède qu'un seul atome de carbone. Il a une odeur peu marquée, mais fortement irritante et a tendance, en solution aqueuse, à polymériser²⁷, ce qui se traduit par l'apparition de fines lamelles blanches au fond des vieilles solutions.

La solution commerciale contient généralement 35-40% de méthanal et est habituellement stabilisée par 10-15% de méthanol. Le méthanal, au fil du temps, a tendance à s'oxyder en acide formique.

• UTILISATION :

Le formol est utilisé dans plusieurs groupes de champignons, et notamment dans la détermination des espèces au sein du genre *Leccinum*. Il provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration rougeâtre sur la chair de *Leccinum scabrum* (d'après BATAILLE, 1969). D'autre part, le formol entre dans la composition de différents réactifs, et, entre autres, du sulfoformol, qui est un réactif sulfoaldéhydique qu'on peut utiliser non seulement en macrochimie, mais aussi en microscopie, quoi que cette dernière application du sulfoformol soit tombée en désuétude depuis un certain nombre d'années.

• DANGERS :

Le méthanal est un gaz fortement irritant, non seulement pour les voies respiratoires, mais également pour les yeux. D'autre part, il est toxique et même corrosif. Il convient donc d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux et, surtout, d'éviter de respirer les vapeurs.

• CONSERVATION :

La polymérisation du méthanal est accélérée par le froid et, dès lors, il faut conserver le formol à température ordinaire, et non pas au réfrigérateur, comme il serait préférable de le faire pour de nombreux autres produits²⁸. Pour éviter au méthanal, qui est un gaz, de s'échapper de la solution (dont la concentration diminuerait si cela arrivait), il est important de garder le formol dans un flacon hermétiquement fermé. Cette précaution permet, de plus, de limiter l'oxydation du méthanal en acide formique par l'oxygène atmosphérique.

2. Phénol à 3% dans l'eau bidistillée

Réaction du phénol sur *Russula olivacea* - photo M. Lecomte

Le phénol est un des premiers termes de la grande famille des composés aromatiques, qui sont des molécules organiques (c'est-à-dire contenant du carbone), cycliques, et dont l'odeur est souvent assez remarquable, d'où leur nom. Sa structure de base est en effet un cycle à six atomes de carbone liés entre eux alternativement par une liaison simple et par une liaison double : le phénol dérive du benzène. Chacun des atomes de carbone supporte, de plus, un atome d'hydrogène.

Le phénol se présente sous forme de petits cristaux blancs, ou légèrement roses s'il est quelque peu impur (même très peu) ; son odeur est forte, caractéristique. Il est assez soluble dans l'eau (à peu près 6%), et est hygroscopique, c'est-à-dire qu'il a tendance à absorber la vapeur d'eau de l'atmosphère.

Anciennement, on désignait le phénol sous le nom d'acide phénique, parce que, mis en présence d'une base forte, il a un comportement semblable à celui des acides (les phénols ont un caractère acide plus marqué que les alcools).



²⁷ La polymérisation est une classe de réactions chimiques qui, d'une manière générale, conduisent à la formation de molécules immenses (les polymères) à partir d'un grand nombre (souvent des milliers) de petites molécules (les monomères), le plus souvent toutes semblables, ou alors de deux types différents. Il existe toutefois de petits polymères, que l'on appelle des oligomères s'ils résultent de l'association de moins d'une dizaine de monomères. Le trioxyméthylène, qui provient de trois molécules de méthanal seulement, est un oligomère.

²⁸ Il est préférable, dans pratiquement tous les cas, de conserver les produits chimiques dans des flacons en verre brun, qui les protègent des rayons ultraviolets. Ces derniers ont en effet la propriété de détruire les molécules organiques, et particulièrement celles qui comptent beaucoup de liaisons doubles (comme les colorants, par exemple). Le verre est l'un des matériaux les plus résistants qui soient au point de vue chimique. Les flacons seront, à quelques exceptions près, conservés à l'abri de la lumière, et dans un endroit frais.

• UTILISATION :

En solution aqueuse simple, le phénol n'est utilisé qu'en macrochimie. Il provoque en général, sur la chair des champignons, des réactions brunâtres et lentes. L'absence de réaction est, avec le phénol, au moins aussi intéressante que la réaction elle-même, qui est trop banale. Le phénol provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration rouge vineux sur le pied d'*Amanita crocea*. Par ailleurs, le phénol entre dans la composition de plusieurs autres réactifs macrochimiques, tels que la phénolaniline. En microscopie, on utilise le phénol en association avec d'autres produits (acide lactique, hydrate de chloral, glycérine, etc.), et parfois avec des colorants, comme ingrédient dans de nombreux milieux de montage de grande qualité (lactophénol, chloral-lactophénol, chloral-phénol, bleu coton au lactophénol, etc.).

• DANGERS :

Le phénol est corrosif et toxique. Pur, c'est un produit dangereux dont il faut se méfier. En solution à 3%, les dangers sont plus réduits, mais il est cependant préférable d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux, et d'éviter de respirer les vapeurs.

• CONSERVATION :

La conservation du phénol, en solution ou non, exige certaines précautions. En effet, la présence de trois liaisons doubles dans la molécule de phénol la rend sensible aux radiations ultraviolettes²⁹. Il convient donc de conserver le phénol à l'abri de la lumière. D'autre part, l'exposition à l'air doit être évitée pour deux raisons : d'abord le phénol est hygroscopique (mais cela n'est vrai que pour les cristaux), et ensuite l'oxygène de l'air le détruit. Aussi, veiller à ce que le flacon soit bien fermé.

3. Résine de gaïac à 10% dans l'alcool à 80°

La base de ce réactif est une résine extraite d'arbres d'origine américaine : *Guaiacum officinale* et *Guaiacum sanctum*. Ces deux espèces font partie de la famille des *Zygophyllaceae*. La résine est un mélange complexe contenant principalement (à raison d'environ 70%) les acides α - et β -gaïaconique, mais aussi de l'acide gaïacinique, de la vanilline, etc. On utilisait autrefois la solution de résine de gaïac dans différents tests biochimiques permettant de déceler la présence de sang dans les fèces.



Réaction du gaïac sur *Russula cicatricata* - photo M. Paquay

La résine de gaïac commerciale peut être plus ou moins pure et se présenter sous différentes formes : poudre brune homogène, masses vitreuses rouge-noires ou blocs brunâtres. Elle contient même souvent des restes de bois (fibres, morceaux d'écorce, etc.), qui ne nuisent en rien à la qualité du réactif. Il est d'ailleurs possible d'utiliser le bois de gaïac lui-même, mais

l'inconvénient est alors relatif au dosage. La nomenclature pharmaceutique voudrait qu'on appelle soluté le réactif obtenu à partir de la résine pure, et teinture celui qu'on obtient par macération du bois dans l'alcool.

• UTILISATION :

La solution alcoolique de résine de gaïac est l'un des réactifs macrochimiques les plus utilisés. C'est sans doute celui qui donne les réactions les plus spectaculaires. D'une manière générale, la teinte obtenue est bleue ou turquoise, mais ce qui importe ici est la vitesse et l'intensité de la réaction. Il arrive qu'elle n'ait pas lieu du tout, ou qu'elle donne une coloration jaunâtre. La solution classique (gaïac à 10% dans l'alcool à 80°³⁰) provoque, par exemple, l'apparition rapide d'une coloration bleue intense sur le stipe de *Russula ochroleuca*.

²⁹ Une bonne solution de protection consiste à entourer le flacon d'un papier alu, imperméable aux rayons lumineux.

³⁰ Attention ! ne pas oublier que la dissolution de l'alcool pur ne répond pas à une règle arithmétique simple ; il faut de référer aux tables de Gay-Lussac (appelées aussi « Tables de mouillage de l'alcool ») ; ainsi, pour transformer de l'éthanol à 96° en éthanol à 80°, il faut y ajouter 22,45 g d'eau pur e.

D'un point de vue biochimique, la résine de gaïac met en évidence les phénoloxydases³¹.

Il existe de nombreux autres réactifs des phénoloxydases, qui donnent des produits diversement colorés : amidopyrine, gaïacol, α -naphтол, etc.

• DANGERS :

L'alcool que contient le réactif est inflammable, mais c'est là le seul danger que présente le soluté de résine de gaïac.

• CONSERVATION :

Il est une précaution à prendre pour que la teinture de gaïac garde son efficacité le plus longtemps possible, c'est de la conserver dans un flacon hermétiquement fermé. En effet, si la réaction d'oxydation de l'acide β -gaïaconique se fait très rapidement grâce à la catalyse par les phénoloxydases des champignons, elle se fait aussi, quoique beaucoup plus lentement, sous l'action directe de l'oxygène de l'air, sans aucune catalyse. D'autre part, l'alcool est volatil.

L'efficacité du réactif peut être évaluée en l'essayant sur *Russula ochroleuca* : la réaction bleue doit être immédiate et très intense. Sur *Russula fellea*, il doit donner une réaction faible et très lente. Ce dernier test, très précieux, permet de s'assurer que la concentration du réactif en résine de gaïac n'est pas trop élevée. Dans tous les cas, il est préférable de renouveler la solution tous les ans.

4. Soude à 10% dans l'eau bidistillée

« Soude » est le terme courant pour désigner l'hydroxyde de sodium, qui se présente sous forme de pastilles blanches. La soude, tout comme la potasse d'ailleurs, est fortement hygroscopique et est une base forte. Exposées à l'air, les pastilles de soude, après un certain temps, deviennent liquides tant elles ont capté de vapeur d'eau.

Réaction de la soude sur *Cortinarius fulvoincarnatus* - photo J.P. Legros

• UTILISATION :

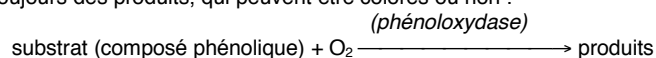
La soude (NaOH) à 10% et la potasse (KOH) à 10% sont des réactifs très proches, et les réactions qu'elles provoquent sont souvent assez similaires. Il est néanmoins des cas où l'une doit être utilisée et pas l'autre. La soude est employée dans plusieurs genres de champignons, mais c'est sans doute lors de la détermination des impénétrables cortinaires qu'on y a le plus souvent recours. La soude provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration noire sur le stipe de *Cortinarius semisanguineus* (d'après BATAILLE, 1969). Certains auteurs conseillent d'employer la soude à une concentration de 40% plutôt que de 10%. C'est pourtant la solution à 10% qui donne les résultats les plus nets, car la solution à 40%, lors des réactions, digère autant la chair des champignons qu'elle ne la colore. Enfin, la soude est utilisée à différentes concentrations (généralement 10%, 5% ou 2%) en microscopie, en tant que succédané de la potasse. C'est un assez bon milieu de montage.



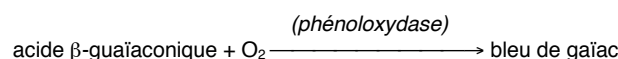
• DANGERS :

Les propriétés basiques de la soude la rendent corrosive, malgré la dilution importante. Il convient donc d'éviter tout contact avec la peau, et surtout avec les yeux.

³¹ Celles-ci sont des enzymes qui ont la propriété d'oxyder les composés phénoliques grâce à l'oxygène de l'air (O₂). Si on soumet à l'action d'une phénoloxydase (d'origine fongique) un composé phénolique (dit substrat vis-à-vis de l'enzyme) qui lui est adapté, alors on obtient toujours des produits, qui peuvent être colorés ou non :



Si les produits de la réaction sont colorés, alors la substance phénolique est susceptible d'être utilisée comme réactif macrochimique, puisque son application sur la chair d'un champignon qui possède une phénoloxydase adaptée provoquera l'apparition d'une coloration (qui est donc celle des produits de l'oxydation). Dans la résine de gaïac, le composé phénolique responsable de la réaction est l'acide β -guaïaconique, qui, sous l'action des phénoloxydases fongiques, donne un produit coloré en bleu, le bleu de gaïac :



• CONSERVATION :

La seule règle à observer pour que la soude reste efficace le plus longtemps possible est de la conserver dans un flacon bien fermé, qu'on ouvre le moins souvent et le moins longtemps possible. En effet, le CO₂ atmosphérique réagit avec la soude pour donner du carbonate de sodium (Na₂CO₃), qui précipite au pH alcalin de la solution, ce qui se traduit par l'apparition de cristaux brillants.

5. Sulfate de fer, cristal

Il existe deux « variétés » de sulfate de fer : le sulfate ferreux, ou sulfate de fer (II), dont la formule est FeSO₄, et le sulfate de fer (III), ou sulfate ferrique, qui répond à la formule Fe₂(SO₄)₃. C'est l'état d'oxydation³² de l'atome de fer qui est responsable des différentes variétés³³. C'est le sulfate ferreux que l'on utilise en mycologie. Celui-ci peut être soit anhydre (libre de toute molécule d'eau), soit hydraté. C'est la forme hydratée, que l'on appelle aussi cristallisée, qui est la plus employée. En effet chaque molécule de sulfate de fer (II), en cristallisant, capture sept molécules d'eau : on parle de sulfate ferreux heptahydraté (FeSO₄.7H₂O). Ce corps est susceptible, avec le temps, de perdre ses molécules d'eau et donc de se déshydrater : c'est l'efflorescence des cristaux.



Réaction en orange-rose du sulfate de fer sur *Russula heterophylla* - photo M. Lecomte

• UTILISATION :

Pour l'utilisation, il suffit de frotter le cristal sur la partie du champignon à tester. Certains auteurs conseillent l'utilisation de la solution à 10% de sulfate de fer. Les réactions que provoque cette solution sont généralement beaucoup plus rapides et plus vives que celles que provoque le cristal, mais la solution ne se conserve que peu de temps³⁴ ; c'est pourquoi, d'une manière générale, le cristal lui est préféré. Le sulfate de fer est surtout employé lors de la détermination des russules, chez lesquelles il provoque des réactions variées ; par exemple chez

Russula nigricans, dont la chair vire au vert sombre suite à l'application du sulfate de fer (réaction assez lente).

• DANGERS :

Le cristal de sulfate de fer est vraiment un réactif peu dangereux. Eviter toutefois un contact prolongé avec la peau, en raison de l'acide sulfurique qu'il contient (en très faible quantité), suite à sa préparation.

• CONSERVATION :

L'ion fer II a tendance à s'oxyder, avec le temps, en fer III. C'est pourquoi il faut conserver le cristal de sulfate de fer dans un flacon bien fermé, à l'abri de l'oxygène, de l'humidité et de la lumière. Une autre raison de tenir le flacon hermétiquement fermé est l'efflorescence du cristal : il perd son eau en vieillissant. Il faut donc absolument le garder à l'écart de tout agent desséchant. On peut, pour limiter encore l'oxydation et l'efflorescence du cristal, enduire celui-ci d'une couche d'huile (d'après CHARBONNEL, 1995). De même, les vapeurs ammoniacales lui sont fortement nuisibles. Enfin, le cristal est assez fragile, aussi faut-il éviter les chocs.

³² L'état (ou étage, ou nombre) d'oxydation d'un atome correspond, *grosso modo*, au nombre d'électrons qu'il a perdus ou gagnés lors de sa transformation (réversible !) en ion. L'atome neutre a toujours un état d'oxydation égal à zéro.

³³ Dans le FeSO₄, le fer est à l'état +2 (Fe²⁺ ; ion ferreux), c'est-à-dire qu'il a perdu deux électrons, tandis que dans le Fe₂(SO₄)₃, il en a perdu trois ; le fer est alors à l'état +3 (Fe³⁺ ; ion ferrique).

³⁴ Cet inconvénient du sulfate de fer aqueux a été solutionné ; en effet, suivant les conseils de Philippe Dufour, nous avons réussi à stabiliser la solution aqueuse, par addition d'une quantité précise d'acide sulfurique ; le produit obtenu est stable et ne s'oxyde pas durant des années.

6. Sulfoformol

Le sulfoformol est un liquide incolore à l'odeur irritante. Il fait partie de la famille des réactifs sulfoaldéhydiques, qui résultent de la dissolution d'un aldéhyde dans l'acide sulfurique. Le formol est le plus simple des aldéhydes parce qu'il ne possède qu'un seul atome de carbone. Le benzaldéhyde, l'anisaldéhyde, le pipéronal et la vanilline sont également des aldéhydes, plus complexes. Dissous dans l'acide sulfurique, ils donnent respectivement le sulfobenzaldéhyde, le sulfoanisaldéhyde, le sulfopipéronal et la sulfovanilline.

- UTILISATION :

On utilise le sulfoformol pour l'étude de différents genres, et notamment *Lactarius*, *Russula* et *Tricholoma*. Le sulfoformol provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration bleue sur la chair de *Lactarius pergamenus* (d'après MARCHAND, 1980). C'est le plus utilisé des sulfoaldéhydiques pour la macrochimie. Il a aussi eu quelques applications microscopiques, mais la tendance actuelle, à ce niveau, est en faveur de la sulfovanilline.

Réaction en bleu des mers du Sud, avec le sulfoformol, sur *Lactarius pergamenus* - photo M. Lecomte

- DANGERS :

Le sulfoformol est un réactif dangereux. Il contient de l'acide sulfurique qui, même dilué, reste extrêmement corrosif, et du formol, dont les vapeurs sont irritantes et toxiques. Eviter donc tout contact avec la peau ou les yeux, et éviter de respirer les vapeurs. Prendre des précautions particulières lors de la préparation de ce réactif, car l'élévation de température due à la dilution de l'acide sulfurique favorise l'évaporation du méthanal. D'autre part, il faut garder présent à l'esprit que la moindre goutte d'acide sulfurique, même sensiblement dilué, qui tombe sur un vêtement, provoque à coup sûr l'apparition d'un trou.



- CONSERVATION :

L'acide sulfurique, même dilué par le formol, reste hygroscopique, c'est-à-dire qu'il a tendance à absorber la vapeur d'eau contenue dans l'atmosphère. Il convient donc de conserver le flacon bien fermé, et à température ambiante (non pas au réfrigérateur), car la polymérisation du formol est favorisée par le froid. Il est préférable de tenir le sulfoformol à l'écart de toutes vapeurs ammoniacales³⁵. Dans tous les cas, il est conseillé de renouveler chaque année ce réactif³⁶.

Réactifs mixtes

1. Acide sulfurique dilué 2x

L'acide sulfurique (H_2SO_4) est un liquide dense et épais à température ambiante. Celui du commerce contient généralement 95-98% de H_2SO_4 . Dilué deux fois, il en contient donc un peu moins de 50%. C'est un acide fort.

Dermatocystides, vues dans le sulfobenzaldéhyde, chez *Russula luteotacta* - photo M. Lecomte

- UTILISATION :

L'acide sulfurique est essentiellement utilisé sous forme de sulfovanilline, qui est un réactif aussi bien macrochimique que microscopique. La sulfovanilline, au même titre que le sulfopipéronal, le sulfoformol (voir paragraphe 3.6), le sulfobenzaldéhyde ou le sulfoanisaldéhyde, fait partie des réactifs sulfoaldéhydiques, qui résultent de la dissolution d'un aldéhyde (vanilline, pipéronal, formol, benzaldéhyde ou anisaldéhyde) dans l'acide sulfurique. La sulfovanilline est le plus utilisé des réactifs sulfoaldéhydiques. On la prépare de la manière suivante : dissoudre extemporanément quelques cristaux de vanilline dans une grosse goutte d'acide sulfurique dilué deux fois en mélangeant avec une aiguille en verre. La solution obtenue est jaune clair et s'altère



³⁵ Avec l'ammoniaque, l'acide sulfurique réagit pour donner de l'hydrogénosulfate d'ammonium (NH_4HSO_4), puis du sulfate d'ammonium - (NH_4)₂SO₄ -, ce qui pollue le réactif.

³⁶ Nous émettons beaucoup plus de réserves à ce sujet, car ce mélange est très instable et polymérise presque toujours après quelques jours.

rapidement. Certains auteurs préfèrent préparer la sulfovanilline à partir d'acide sulfurique concentré, plutôt que dilué deux fois.

Au point de vue macrochimique, la sulfovanilline est surtout destinée à l'étude des russules, sur la chair desquelles elle provoque couramment de belles réactions rose-rouge vif (chez *Russula integra*, par exemple, d'après BATAILLE, 1969). L'acide sulfurique est également utilisé pur en macrochimie : concentré (95-98%), il provoque par exemple une réaction lilas-violet pâle sur les lames d'*Amanita phalloides* (d'après CHARBONNEL, 1995) ; il est aussi employé dans d'autres genres. De plus, il entre dans la composition de différents réactifs macrochimiques, tels que la phénolaniline.

Pour la microscopie, on n'utilise l'acide sulfurique que sous forme de réactifs sulfoaldéhydiques. La sulfovanilline colore en gris ardoise le contenu des laticifères et des cystides (on parle alors de gloeocystides) de nombreux lactaires et 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 observe également des gloeocystides chez certains cortices, tels que *Peniophora* (Jean-Marie PIRLOT). On n'utilise pas l'acide sulfurique seul comme milieu de montage parce qu'il détruit les hyphes et donne de très mauvaises préparations.



Mise en évidence des dermatocystides, grâce au sulfobenzaldéhyde, chez *Russula parazurea* - photo M. Lecomte

• DANGERS :

L'acide sulfurique, même dilué, est un réactif extrêmement dangereux car, étant très corrosif, très oxydant et fortement déshydratant, il détruit la plupart des matières organiques. De nombreux plastiques sont attaqués par lui. Il faut donc absolument éviter tout contact avec la peau et, *a fortiori*, avec les yeux ou la bouche. Garder présent à l'esprit que la moindre goutte d'acide sulfurique, même sensiblement dilué, qui tombe sur un vêtement, provoque à coup sûr l'apparition d'un trou. En ce qui

concerne la dilution, il faut savoir que le mélange de l'acide sulfurique avec l'eau s'accompagne d'un important dégagement de chaleur. Aussi, 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 côtés³⁷. Enfin, il faut éviter de mélanger l'acide sulfurique avec des bases (ammoniaque, soude, potasse), car la réaction pourrait être assez violente.

• CONSERVATION :

L'acide sulfurique doit être conservé dans un flacon en verre, muni d'un bouchon en plastique résistant. Dilué, il reste hygroscopique. Il convient donc de garder le flacon bien fermé.

Réaction en mauve violet aux vapeurs d'ammoniac chez *Lactarius necator* - photo M. Lecomte



2. Ammoniaque concentrée

L'ammoniaque est une solution aqueuse concentrée d'ammoniac (NH_3), qui est un gaz à l'odeur extrêmement irritante. Les solutions commerciales contiennent généralement entre 20 et 30% de ce gaz³⁸.

³⁷ Nous vous conseillons fortement d'effectuer cette opération sur un bain de glace et de travailler avec des flacons résistants à la chaleur (pyrex).

³⁸ Les solutions commerciales contiennent beaucoup d'impuretés ; il est de loin préférable de travailler avec de l'ammoniaque très pur, de laboratoire.

• UTILISATION :

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, quoique cette dernière méthode soit moins efficace et moins couramment employée. L'ammoniaque donne, par exemple, une belle réaction rose violacé sur les tubes de *Daedaleopsis confragosa*³⁹. On l'utilise également pour l'étude des *Xerocomus*, ainsi que pour de nombreux autres genres.



Réaction en mauve violet aux vapeur d'ammoniac chez *Haplophilus rutilans* - photo M. Paquay

Du côté de la microscopie, 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 ou, anciennement, le vert d'anthracène.

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 d'autre part pour l'étude des chrysocystides (cystides dont le contenu vire au jaune sous l'action des bases) dans des genres comme *Hypholoma* ou *Stropharia*, notamment. De même, les cystides de certains *Inocybe* jaunissent dans l'ammoniaque à des degrés divers, ce qui est intéressant pour leur identification (Jean-Marie PIRLOT, communication orale). Enfin, certains auteurs préfèrent diluer deux fois l'ammoniaque, car son action sur les hyphes est alors moins drastique,

et elle peut dès lors être appliquée au montage d'objets plus délicats.

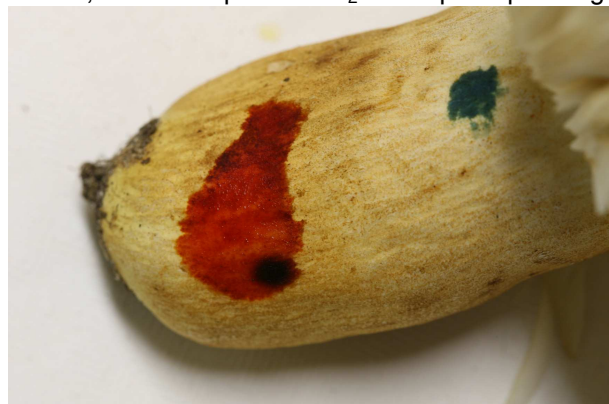
• DANGERS :

L'ammoniaque n'est pas à proprement parler un produit dangereux. Toutefois, étant très volatile, elle libère le gaz ammoniac, qui est fortement irritant. Ses propriétés basiques la rendent corrosive ; donc éviter le contact avec la peau et surtout avec les yeux, et éviter de respirer les vapeurs, car il a aussi des propriétés suffocantes. D'autre part, il est bon de savoir que l'ammoniaque, au contact de l'iode, provoque des réactions à caractère explosif.

• CONSERVATION :

Il convient, pour que l'ammoniaque reste efficace le plus longtemps possible, de la conserver dans un petit flacon bien fermé, qu'on ouvre le moins souvent et le moins longtemps possible. Cela pour deux raisons : d'une part l'ammoniac se dégage de la solution, et d'autre part le CO₂ atmosphérique réagit avec l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) pour donner du carbonate d'ammonium (NH₄)₂CO₃, qui précipite au pH alcalin de la solution, ce qui se traduit par l'apparition de cristaux brillants. Ces deux phénomènes ont pour résultat d'abaisser le titre (concentration) de la solution.

Réaction rougeâtre de la potasse à 10 %, à la base du pied de *Russula insignis* - photo M. Lecomte



3. Potasse à 10% dans l'eau bidistillée

La potasse (KOH), en vérité hydroxyde de potassium, se présente sous forme de pastilles blanches, tout comme la soude. Les propriétés de ces deux corps sont d'ailleurs pratiquement identiques.

³⁹ C'est très spectaculaire également sur *Lactarius necator*.

• UTILISATION :

Les utilisations macrochimiques de la potasse sont elles aussi semblables à celles de la soude. La potasse fait par exemple virer au rouge violacé la chair de *Cortinarius violaceus* (d'après BATAILLE, 1969). Certains auteurs préfèrent la solution de potasse à 40% - avec l'inconvénient que l'on sait.

Du point de vue de la microscopie, la concentration en potasse la plus utilisée est, en fait, non pas de 10% mais de 5%. La solution à 5% convient bien pour la plupart des observations. 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% exerce une action beaucoup plus rapide. Mais elle présente, d'un autre côté, le désavantage d'être très agressive et de dissoudre certains éléments, tels que l'ornementation des spores de certains ascomycètes. Il ne faut donc l'utiliser que pour les polypores et les croûtes, quoiqu'elle puisse être intéressante lors de l'observation des champignons gélatineux (*Auricularia*, *Tremella*), parce que la potasse concentrée liquéfie les mucilages, ce qui est d'un grand secours lors de la dissociation.



Réaction jaune citron vif de la potasse à 10 %, sur la cuticule de *Amanita virosa* - photo M. Lecomte

Globalement, la potasse offre les avantages de regonfler les exsiccata et de ramollir les tissus, mais elle altère souvent les cellules. C'est finalement un assez bon milieu d'observation, mais dont il faut se servir avec une certaine circonspection. On utilise aussi, quelquefois, une solution à 2% qui est encore plus douce que la solution à 5%.

• DANGERS ET CONSERVATION :

La potasse présente les mêmes dangers que la soude. Les recommandations relatives à sa conservation

sont les mêmes que pour la soude. Le sel qui précipite suite à la réaction entre l'hydroxyde de potassium et le gaz carbonique est le carbonate de potassium (K_2CO_3).

4. Vanilline



Dermatocystides de *Russula luteotacta* observées dans la sulfovanilline - photo M. Lecomte

La vanilline est une poudre blanche à la forte odeur de vanille. Elle fait partie de ce que l'on appelle les composés aromatiques parce que sa structure de base est une chaîne hydrocarbonée cyclique à six carbones : la vanilline dérive du benzène.

- UTILISATION :

Elle est essentiellement utilisée sous forme de sulfovanilline (qui a été traitée avec l'acide sulfurique). Si on dissout la vanilline dans l'acide chlorhydrique, on obtient de la chlorovanilline, qui est un réactif macrochimique peu utilisé.

- DANGERS :

Additif alimentaire des plus banals, la vanilline n'est pas un produit dangereux ; elle est cependant un peu nocive. Il est préférable d'éviter le contact avec les mains, non pas à cause d'un danger quelconque, mais bien parce que son odeur forte et tenace masque tous les autres parfums, et notamment ceux des champignons. La sulfovanilline, quant à elle, contient de l'acide sulfurique, avec tous les dangers que cela comporte.

- CONSERVATION :

La vanilline, dont la structure de base est un cycle benzénique, comprend plusieurs liaisons doubles entre atomes, ce qui la rend sensible aux radiations ultraviolettes. Il est donc impératif de la conserver à l'obscurité, et de préférence dans un flacon bien fermé, pour la protéger de l'action oxydante de l'oxygène de l'air.

Partie 3 : Réactifs pour la microscopie.

1. Acide lactique concentré

L'acide lactique commercial est rarement pur : il s'agit généralement d'une solution très concentrée (environ 90%), du mélange des deux énantiomères dans l'eau (on parle de mélange racémique).

- UTILISATION :

C'est un regonflant très énergique des exsiccata. Son indice de réfraction assez élevé ($n = 1,439$) en fait un bon milieu d'observation pour de nombreux objets, et spécialement pour les spores. 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 que le lactophénol ou, mieux, le chloral-lactophénol. C'est d'autre part le solvant du bleu de méthyle (ou bleu coton) dans le colorant dit « bleu coton lactique ».

- DANGERS :

L'acide lactique n'est pas dangereux : on l'emploie couramment comme condiment dans des préparations alimentaires, car il est plus doux que l'acide acétique (constituant principal du vinaigre). Toutefois, en concentration élevée, il devient irritant ; aussi faut-il éviter tout contact avec la peau, et surtout avec les yeux.

- CONSERVATION :

La conservation de l'acide lactique ne pose aucun problème particulier. Il vaut mieux cependant, comme pour tous les acides, éviter de laisser le flacon ouvert lors de la manipulation d'ammoniaque (il se formerait du lactate d'ammonium).

2. Ammoniaque diluée 2x

Les propriétés de l'ammoniaque ont déjà été décrites. Etant donné que l'ammoniaque concentrée contient 20 à 30% de NH_3 (qui est le gaz ammoniac), la solution diluée deux fois en contient 10 à 15%. Cependant, la distinction entre solution concentrée et solution diluée deux fois est un peu arbitraire parce que la concentration en NH_3 des solutions diminue rapidement au cours du temps (lorsque le flacon a été ouvert quelques fois), tant l'ammoniac est volatil. Il est bien évident que cette diminution de concentration est beaucoup plus rapide pour la solution concentrée que pour la solution diluée, ce qui fait qu'au bout du compte, la distinction n'est vraiment valable que pour les solutions assez récentes et conservées dans des conditions idéales.

- UTILISATION :

Les utilisations de l'ammoniaque diluée deux fois sont, en ce qui concerne la microscopie, semblables à celles de l'ammoniaque concentrée. Néanmoins, diluée deux fois, l'ammoniaque a une action moins forte sur les tissus que la solution concentrée, ce qui permet de l'employer au montage d'objets plus

déliçats. Par contre, en macrochimie, la solution diluée deux fois n'est pas employée parce que l'ammoniaque concentrée donne toujours des réactions plus nettes sans détruire la chair des champignons pour autant.

• DANGERS ET CONSERVATION :

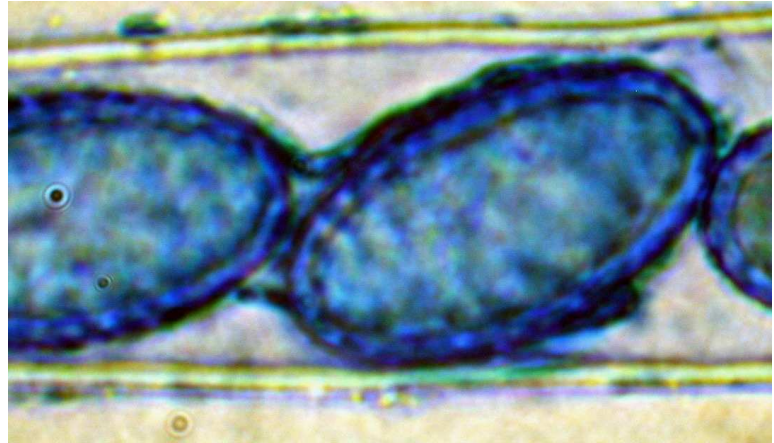
Les dangers que présente l'ammoniaque diluée deux fois sont les mêmes que pour la solution concentrée, même si le facteur de dilution les atténue quelque peu. Les conseils relatifs à la conservation sont identiques, également, pour les deux solutions (toujours au facteur de dilution près).

3. Bleu coton au lactophéno

Coloration des ascospores de *Peziza vesiculosa* au bleu coton lactophéno - photo M. Lecomte

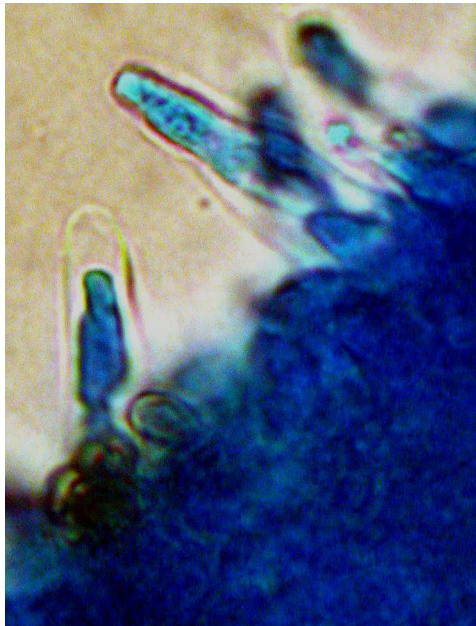
Le vrai nom du bleu coton est le bleu de méthyle (à ne pas confondre avec le bleu de méthylène !). Le numéro du *Color Index* (C.I., c'est la référence internationale en matière de colorants) pour le bleu de méthyle est le 42780.

Le bleu de méthyle est un colorant acide ; il résulte de cet état de choses qu'il a une affinité particulière pour les structures à caractère basique. C'est le colorant le plus adapté à la mycologie générale parce qu'il est spécifique de la callose, qui est un des principaux constituants de la paroi des hyphes des champignons.



• UTILISATION :

Le bleu de méthyle au lactophéno est un bon milieu d'observation pour les champignons. Il ne se fixe pas électivement sur certaines cellules, mais il a la particularité de teinter la paroi de la plupart des hyphes, ce qui en fait un colorant d'usage général. Néanmoins, il met particulièrement bien en évidence les ornements des spores chez les Ascomycètes (chez *Scutellinia*, par exemple). D'autre part, c'est aussi un réactif microchimique à proprement parler, en ce sens qu'on peut dire de certaines structures qu'elles sont cyanophiles si elles prennent le bleu de méthyle avec une intensité spectaculaire, ce qui est relativement courant. C'est le cas, notamment, du contenu amorphe des chrysocystides, sur lequel le bleu coton se fixe avec une intensité remarquable (Jean-Marie PIRLOT, communication orale).



Chrysocystides de *Pholiota lenta* colorées au bleu coton lactophéno - photo M. Lecomte

Pour avoir les meilleures préparations possibles, on a intérêt à colorer les éléments à observer dans ce réactif, mais à les laver et à les monter dans le lactophéno pur. Le contraste s'en trouve augmenté, ce qui est très utile pour la photomicrographie. Le lactophéno a deux avantages : son indice de réfraction élevé ($n = 1,44$) rend les préparations très transparentes, ce qui facilite leur interprétation (toutefois, le chloral lactophéno lui est encore supérieur à ce point de vue). D'autre part, sa viscosité importante permet de conserver les préparations quelques jours, voire quelques semaines, sans altération : il permet la réalisation de préparations semi-permanentes. Mais cette viscosité est également un désavantage, car la dissociation est très difficile dans ce réactif (à ce point de vue, le bleu de méthyle

acétique est supérieur au bleu de méthyle au lactophéno).

Concrètement, le bleu de méthyle au lactophéno n'est donc véritablement intéressant que pour l'observation des spores et des hyphes de champignons frais et bien mous. Le bleu de méthyle est aussi utilisé en solution acétique ou lactique, mais, d'une manière générale, la solution dans le lactophéno leur est préférée. Un chauffage modéré facilite généralement la dissociation, en rendant le

milieu plus fluide. De plus, le chauffage accélère et intensifie la coloration. Mais chauffer déforme souvent les hyphes et provoque l'éclatement de certaines spores.

- DANGERS :

C'est un réactif relativement dangereux par le phénol qu'il contient, qui est toxique et corrosif, ainsi que par l'acide lactique, qui est irritant. Il est donc préférable d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux. D'autre part, le bleu coton, comme son nom l'indique, se fixe très bien sur le coton (et sur d'autres textiles), où il fait des taches indélébiles.

- CONSERVATION :

Le lactophénol contient du phénol, qui est un dérivé du benzène. Sa formule compte trois liaisons doubles ; il est donc sensible aux radiations ultraviolettes. Quant au bleu de méthyle, s'il est bleu, c'est parce qu'il absorbe les autres couleurs de la lumière visible grâce à ses innombrables liaisons doubles entre atomes. Cette absorption de lumière est susceptible, à long terme, de détruire le colorant. Il faut dès lors conserver le bleu coton au lactophénol à l'obscurité, dans un flacon en verre (le plastique pourrait être attaqué) fermé hermétiquement (risque d'altération par l'oxygène de l'air et de dilution par absorption de vapeur d'eau).

4. Chloral-lactophénol

Le chloral-lactophénol est un liquide visqueux. C'est un mélange de trois substances : hydrate de chloral, phénol et acide lactique. L'hydrate de chloral est un solide blanc, très soluble dans l'eau et à l'odeur forte, caractéristique. Le phénol et l'acide lactique ont déjà été décrits.

- UTILISATION :

Le chloral lactophénol est un des meilleurs milieux d'observation qui soit. Son indice de réfraction élevé ($n = 1,49$) permet la réalisation de préparations très claires, où chaque membrane apparaît sous la forme d'un trait unique, fin. Il est particulièrement indiqué pour la mesure des éléments observés, bien que certains auteurs lui reprochent de gonfler trop fortement les cellules, ce qui fausse un peu les mesures. Ce défaut n'est pas trop grave à condition que soit toujours mentionné le milieu dans lequel la mesure a été effectuée (règle importante que, malheureusement, très peu d'auteurs respectent). Il a un autre inconvénient : s'il rend les préparations très claires, celles-ci manquent quelquefois de contraste.

Sa viscosité lui donne l'avantage de permettre la réalisation de préparations semi-permanentes, sans pour autant rendre la dissociation trop difficile. L'hydrate de chloral, en effet, ramollit très bien les tissus et facilite cette opération. A ce point de vue, comme à beaucoup d'autres, le chloral lactophénol est très supérieur au lactophénol. De plus, il n'est pour ainsi dire pas volatil et ne cristallise pas avec le temps. Cela permet de ne pas avoir à se soucier d'ajouter du milieu de montage en cours d'observation. Enfin, les milieux visqueux sont toujours intéressants pour la photomicrographie, car ils limitent le mouvement des objets au cours de l'exposition, qui peut être de plusieurs secondes.

- DANGERS :

Les dangers sont les mêmes que pour le bleu de méthyle au lactophénol, si ce n'est que le chloral lactophénol contient, en plus, de l'hydrate de chloral, qui est loin d'être un produit inoffensif (il est toxique et irritant). Eviter donc absolument de respirer les vapeurs.

- CONSERVATION :

Les recommandations sont les mêmes que pour le bleu de méthyle au lactophénol, car les deux réactifs contiennent du phénol.

5. Eau bidistillée

L'eau bidistillée est une eau qui, comme son nom l'indique, a été distillée deux fois successivement. En principe, elle ne contient donc aucune impureté⁴⁰. En théorie, son pH est de 7.

⁴⁰ Mais en pratique, les gaz de l'atmosphère, tels que le dioxygène (O₂), le diazote (N₂) ou le dioxyde de carbone (CO₂) ont tôt fait de s'y dissoudre. Elle reste néanmoins intéressante parce qu'elle ne contient pas (ou presque pas) de substances minérales telles que le sodium (Na⁺), le potassium (K⁺), le chlore (Cl⁻), le calcaire (essentiellement CaCO₃), etc.

Spores de *Tuber indicum* observées dans l'eau - photo M. Lecomte

• UTILISATION :

Elle est souvent utilisée pour se faire une idée générale des tissus à observer. C'est en effet un liquide naturel, qui modifie peu les éléments fongiques et qui, en particulier, n'altère jamais les pigments. Par ailleurs, l'eau est, même indirectement, le solvant de la grosse majorité des réactifs que l'on utilise en mycologie.

Mais ses inconvénients sont nombreux : elle a un très faible indice de réfraction ($n = 1,333$), ce qui rend les préparations difficilement lisibles. De plus, comme elle est incolore, les éléments qu'on y observe manquent sensiblement de contraste.

D'autre part, elle a tendance à faire gonfler (voire éclater) les hyphes par le phénomène de turgescence, qui est dû au fait que la concentration en éléments dissous est beaucoup plus importante dans les cellules que dans l'eau. Or les éléments en question ne peuvent pas traverser les membranes cellulaires tandis que l'eau, elle, peut le faire. Pour équilibrer la différence de concentration, l'eau a donc tendance à entrer dans les cellules, ce qui provoque la turgescence. Ce gonflement a non seulement le désavantage de déformer les hyphes mais, en plus, si l'eau n'altère pas les pigments dissous dans le cytosol (liquide intérieur de la cellule), la turgescence les dilue. L'intensité de leur couleur diminue donc et ils peuvent devenir invisibles.

Pour empêcher la turgescence, on peut utiliser la solution dite physiologique, qui contient 9 g de chlorure de sodium (NaCl) par litre, et qui est en équilibre avec la concentration du cytosol. Pour mettre les pigments en évidence, on utilise quelquefois une solution beaucoup plus concentrée en NaCl (ou en d'autres substances, comme certains sucres), qui a l'effet inverse de la turgescence : elle contracte les cellules (que l'on dit alors plasmolysées), parce que sa concentration est supérieure à celle du cytosol. Enfin, dernier inconvénient de l'eau bidistillée, c'est qu'elle ne contient aucun agent ramollissant, ce qui ne facilite pas la dissociation.

• DANGERS :

L'eau bidistillée ne présente vraiment aucun danger.

• CONSERVATION :

Il convient de conserver l'eau bidistillée dans des flacons bien fermés, et cela pour limiter le plus possible la dissolution du dioxyde de carbone (CO_2) et la formation subséquente d'acide carbonique (H_2CO_3). Le résultat est une diminution du pH, c'est-à-dire une acidification de l'eau. Il est cependant à remarquer que cette acidification est réversible, puisqu'il suffit de faire bouillir l'eau pour que le gaz carbonique s'échappe.

6. Lactophénol

Le lactophénol est un liquide visqueux et incolore, à l'odeur de phénol. C'est un mélange de plusieurs constituants : phénol, acide lactique, glycérine et eau bidistillée.

• UTILISATION :

Le lactophénol est reconnu comme un très bon milieu d'observation. Son indice de réfraction assez élevé ($n = 1,44$) permet la réalisation de préparations très lisibles, mais sa viscosité importante rend la dissociation difficile, quoiqu'elle permette de conserver les préparations pendant quelque temps. 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.

Le lactophénol est intéressant, notamment, pour laver les préparations réalisées dans le bleu de méthyle au lactophénol. Le fond étant ainsi décoloré, le contraste s'en trouve amélioré. D'autre part, un fond incolore est toujours intéressant pour la photomicrographie, et, de plus, la viscosité du lactophénol limite le mouvement des objets au cours de l'exposition.



- DANGERS ET CONSERVATION :

Ces deux points ont été traités avec le bleu coton au lactophénol. Les dangers et les recommandations relatives à la conservation sont les mêmes.

7. Potasse à 5% dans l'eau bidistillée

Les propriétés de la potasse ont déjà été décrites.

- UTILISATION :

On l'utilise, en microscopie, à différentes concentrations : 10%, 5% et 2%. La solution à 5% est la plus universellement employée. Elle a des effets semblables à l'ammoniaque concentrée, mais elle présente l'avantage sur cette dernière 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 ; on peut même y dissoudre du rouge Congo. Globalement, la potasse offre les avantages de regonfler les exciccata et de ramollir les tissus, mais elle altère souvent les cellules. C'est, finalement, un assez bon milieu d'observation, mais dont il faut se servir avec une certaine circonspection parce qu'il est susceptible de dissoudre certains éléments, dont notamment l'ornementation des spores chez les ascomycètes.

La solution à 10%, plus concentrée, est utilisée pour la dissociation de champignons coriaces (polypores, croûtes), ou gélatineux (*Auricularia*, *Tremella*), tandis que la solution à 2% est préférée par certains auteurs en vertu de son action plus douce.

- DANGERS ET CONSERVATION :

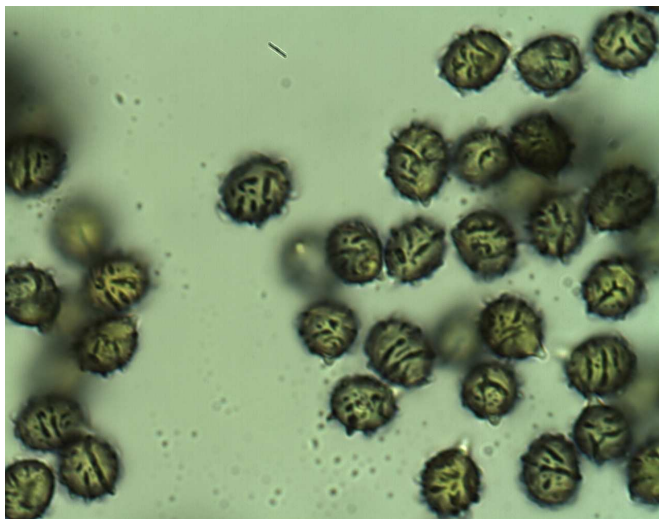
Les consignes de sécurité et de conservation sont les mêmes, à la dilution près, que pour la potasse à 10%.

8. Potasse à 2% dans l'eau bidistillée

La solution de potasse à 5% convient bien pour la plupart des observations, mais la solution à 2% est parfois préférée parce que son action est plus douce. Elle peut, par conséquent, être utilisée pour des champignons plus délicats.

9. Réactif de Melzer

Le réactif de Melzer est un liquide brun, épais, composé d'iode, d'iodure de potassium, d'hydrate de chloral et d'eau. Son odeur est irritante et résulte du mélange de l'odeur de l'iode et de celle de l'hydrate de chloral. Le constituant le plus important de ce réactif est l'iode, qui a la propriété de se fixer sur certains glucides, notamment.



Ornementation sporale de *Lactarius pyrogalus* mise en évidence par le réactif de Melzer - photo M. Lecomte

- UTILISATION :

Le réactif de Melzer est un des milieux de montage les plus utiles pour la microscopie. En effet, c'est un réactif vis-à-vis duquel les éléments observés peuvent avoir trois comportements différents : ou bien ils sont iodo-négatifs, ou bien ils sont amyloïdes ou 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 des cellules dextrinoïdes se teinteront de brun-rouge foncé. La

réaction amyloïde signale généralement la présence d'amidon, tandis que la réaction dextrinoïde révèle le plus souvent les dextrines.

Ainsi, le réactif de Melzer est utilisé dans de nombreux genres, aussi bien chez les Basidiomycètes que chez les Ascomycètes. Il permet de savoir si les spores, notamment chez *Amanita* et *Mycena*, ainsi que chez de nombreux Aphyllophorales, sont amyloïdes ou non, et si, chez les lépiotes *lato sen-*

su, elles sont dextrinoïdes ou pas. Il facilite l'observation et la description de l'ornementation des spores chez *Lactarius* et *Russula*, principalement. Enfin, il intervient lors de la détermination des Ascomycètes, dont le sommet des asques (que ce soit un opercule ou un pore) peut être amyloïde ou non, et lors de l'identification des Mycènes, dont la chair est souvent dextrinoïde, mais pas toujours. Le réactif de Melzer est aussi quelque peu utilisé en macrochimie, mais dans ce domaine, le liquide de Lugol lui est préférable. Le Lugol est un Melzer sans hydrate de chloral, et avec des proportions en iode et iodure de potassium un peu différentes.

Ornementation sporale de *Lactarius luridus* mise en évidence par le Melzer - photo M. Lecomte

• DANGERS :

Le réactif de Melzer est assez dangereux : l'hydrate de chloral est toxique et irritant et l'iode est nocif ; aussi, éviter tout contact avec la peau ou les yeux, et éviter de respirer les vapeurs. L'iode se fixant très bien sur la cellulose (qui est un polymère de glucose, c'est-à-dire de sucre), à laquelle il donne une coloration noirâtre, il faut éviter d'en tacher les vêtements en coton (les taches peuvent être enlevées à l'aide d'une solution diluée de thiosulfate de sodium, mais ce procédé présente un risque de décoloration du tissu).



• CONSERVATION :

Il doit être conservé dans un flacon en verre hermétiquement fermé parce que ce liquide est assez corrosif et que l'iode, volatil, est capable de s'échapper de certains flacons, à travers le plastique. D'autre part, il est préférable de garder le flacon à l'obscurité car la lumière pourrait altérer l'hydrate de chloral.

10. Rouge Congo ammoniacal



Le rouge Congo est un colorant qui fait partie de la catégorie des polyazoïques parce qu'il possède deux chromophores de type azoïque, c'est-à-dire formés chacun de deux atomes d'azote doublement liés, et substitués. Le numéro du *Color Index* du rouge Congo est le 22120. C'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.

Cystides métuloïdes chez *Inocybe lacera*, colorées au rouge Congo ammoniacal - photo M. Lecomte

• UTILISATION :

Le rouge Congo ammoniacal est un excellent milieu pour toutes les observations courantes. Il a les mêmes qualités regonflantes et ramollissantes que 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. Il convient parfaitement lors de la recherche des anses d'anastomose, qu'il met admirablement en évidence. On a intérêt, et particulièrement lors de la photomicrographie, à laver dans l'ammoniaque diluée deux fois

les préparations montées dans le rouge Congo ammoniacal⁴¹. Par cette opération, le fond se décolore et le contraste se trouve encore augmenté. L'ammoniaque diluée deux 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.

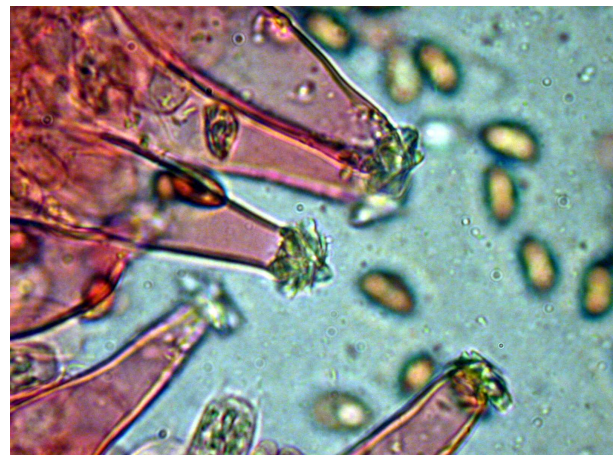
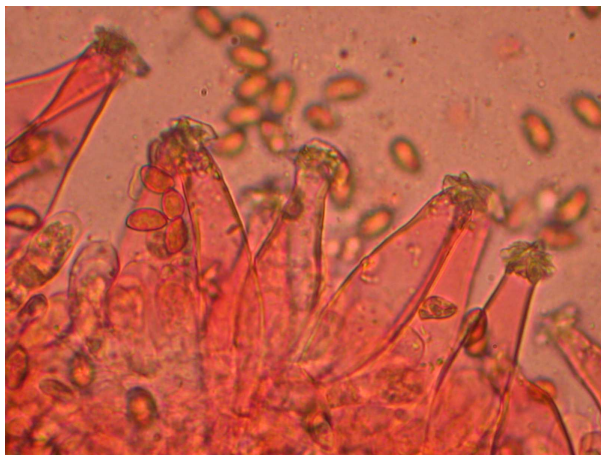


Cystide métuloïde chez *Inocybe margaritispora*, colorées au rouge Congo SDS - photo M. Lecomte

Mais le rouge Congo ammoniacal a les défauts de l'ammoniaque : il est très volatil et la préparation se dessèche au cours de l'observation⁴². Plutôt que d'ajouter du colorant pour maintenir la préparation humide, on a intérêt à ajouter de l'ammoniaque diluée deux fois pour les raisons évoquées précédemment. Par ailleurs, il faut savoir que l'ammoniaque dissout certains éléments comme les incrustations acido-résistantes de la

cuticule des russules. On peut aussi utiliser le rouge Congo ammoniacal au lieu d'ammoniaque pour l'étude des chrysocystides (qui sont des cellules stériles dont le contenu vire au jaune au contact des bases), car le rouge Congo ne masque pas la réaction.

Pour plus de détails sur le rouge Congo SDS, consulter CLÉMENÇON H., : 1999 - Vom Umgang mit Kongorot. - Du (bon) usage du (bon) rouge Congo. Schweiz. Z. Pilzkunde 77 : 247-252.



Cystides métuloïdes chez *Inocybe godeyi*, colorées au rouge Congo SDS ; la photo de gauche a été réalisée au départ d'une préparation non lavée : le contraste est quasi nul ; la préparation de droite a été rincée à l'eau - photos M. Lecomte

• DANGERS :

Tous les dangers que présente le rouge Congo ammoniacal sont dus à l'ammoniaque, sauf le risque de tacher irrémédiablement les vêtements, qui, lui, incombe au rouge Congo. L'ammoniaque, étant très volatile, libère le gaz ammoniac, qui est fortement irritant. Ses propriétés basiques la rendent corrosive, donc éviter le contact avec la peau et surtout avec les yeux, et éviter de respirer les vapeurs.

• CONSERVATION :

Il convient, pour que le rouge Congo ammoniacal reste efficace le plus longtemps possible, de le conserver dans un petit flacon bien fermé, qu'on ouvre le moins souvent et le moins longtemps possible.

⁴¹ Nous insistons fortement sur cette technique de rinçage des préparations, qui peut se faire également avec de l'eau bidistillée : c'est un peu moins efficace, mais beaucoup moins agressif pour les sinus.

⁴² Nous utilisons maintenant le rouge Congo SDS (le Sodium Dodécyl Sulfate est un détergent industriel très puissant) mis au point par H. Cléménçon. Il s'agit d'une solution aqueuse, à utiliser sur du matériel frais : son pouvoir colorant est nettement supérieur au rouge Congo ammoniacal, que nous réservons au matériel sec, en raison de ses capacités regonflantes. Voir à ce sujet la fiche complète sur le site <http://www.champignons-passion.be>

Cela pour deux raisons : d'une part l'ammoniac se dégage de la solution, et d'autre part le CO₂ atmosphérique réagit avec l'hydroxyde d'ammonium pour donner du carbonate d'ammonium, qui précipite au pH alcalin de la solution, ce qui se traduit par l'apparition de cristaux brillants.

Eléments remarquables de la cuticule de *Ripartites sp.*, colorés au rouge Congo SDS - photo F. Draye

Ces deux phénomènes ont pour résultat d'abaisser le titre (concentration) de la solution. Comme la concentration en ammoniac diminue, la solubilité du rouge Congo diminue également, et il finit par précipiter lui aussi.



Bibliographie

- ARNAUD P.**, 1996 - Chimie organique. 16^{ème} édition, Dunod
- AYEL A. & MOINARD A.**, - Microscope. Constitution, fonctionnement, emploi en mycologie. Bulletin spécial numéro 3a de la Société mycologique du Poitou
- BAAR D.**, 1996 - Les préparations microscopiques par dissociation, MYCO', fasc. 3
- BATAILLE F.**, 1969 - Les réactions macrochimiques chez les champignons. Cramer
- BON M.**, 1998 - Champignons de France et d'Europe occidentale. Arthaud
- BOULLARD B.**, 1997 - Dictionnaire des plantes & des champignons. Estem
- BREITENBACH J. & KRÄNZLIN F.**, 1986 - Les champignons de Suisse. Tome 2 : Champignons sans lames. Hétérobasidiomycètes, Aphylophorales, Gastéromycètes. Mykologia
- CHARBONNEL J.**, 1995 - Les réactifs mycologiques. Tome 1 : Les réactifs macrochimiques. Edité à cpte d'auteur
- COURTECUISSIE R. & DUHEM B.**, 1994 - Guide des champignons de France et d'Europe. Delachaux et Niestlé
- DE IZARRA Z.**, - Introduction à l'étude microscopique des champignons. Bulletin spécial n°5 de la Société mycologique du Poitou
- DE IZARRA Z.**, - L'examen des champignons (étude de leurs caractères, avant tout recours au microscope). Bulletin spécial n°6 de la Société mycologique du Poitou
- EHRMANN E.**, 1922 - Traité des matières organiques colorantes et de leurs diverses applications. Dunod
- KÜHNER R. & ROMAGNESI H.** : 1984 - Flore analytique des champignons supérieurs. Agarics, bolets, chanterelles. Masson
- LAROCHE G. & LAROCHE C.** : 1949 - Examens de laboratoire du médecin praticien. 5^{ème} édition, Masson
- LOCQUIN, M.** : 1984 - Mycologie générale et structurale. Masson
- LOCQUIN M. & LANGERON M.** : 1978 - Manuel de microscopie. Masson
- MARCHAND A.** : Champignons du Nord et du Midi. Edité par l'auteur
- Tome 5 : Les russules. 1977 - Tome 6 : Lactaires et pholiotes. 1980
- Tome 7 : Les cortinaires. 1982 - Tome 8 : Les cortinaires (fin). 1983
- MC QUARRIE D. A. & ROCK D. P. A.** : 1992 - Chimie générale. Troisième édition. De Boek
- MERCK** : 1996 - Réactifs, produits chimiques, diagnostica. Catalogue Merck
- MERCK** : 1989 - The Merck Index. Eleventh edition, Merck
- MEYBECK J.** : 1963 - Les colorants. Troisième édition, Presses Universitaires de France
- OTJACQUES P.** : 1955 - Les réactions macrochimiques du genre *Russula* Bulletin du C.M.L.B. (2) : 6-13.
- RAWN J. D.** : 1990 - Traité de biochimie. De Boek
- SÉGUY E.** : Le microscope. Emploi et applications. Lechevalier.
- Tome 1. 1951.
- Tome 2. 1949.
- TONNEAU J.** : 1991 - Tables de chimie. Un mémento pour le laboratoire. De Boek
- UCB** : 1995 - Chimie. Produits pour le laboratoire et l'industrie. Catalogue UCB
- VOLLHARDT K. P. C. & SCHORE N. E.** : Traité de chimie organique. Deuxième édition, De Boek