

La RECHERCHE DES DERMATOCYSTIDES et leur réaction au sulfobenzaldéhyde

Marcel Lecomte

Modus operandi, basé sur une méthode de grattage, qui est une trouvaille de Christian Dagrón¹⁵.

- Déposer sur la partie gauche d'une lame porte-objet une goutte d'acide sulfurique (H₂SO₄) dilué au maximum à 50 % ainsi qu'une goutte de benzaldéhyde (plus généralement, n'importe quel aldéhyde) et mélanger les deux. Il semble que la réaction est beaucoup plus vive et plus nette avec de l'acide sulfurique à 80 %, que nous conseillons.
- Réaliser un scalp assez épais à la lame de rasoir ; il nous apparaît plus facile de « peler » le champignon en enlevant une « épiluchure » d' 1/2 cm de large ; il en résulte un fragment de scalp qui va en s'amenuisant, et dont l'extrémité est quasi prête à l'emploi.
- Le retourner sur une lame de verre et gratter délicatement toute la chair (manipulation délicate qui demande du soin) ; diviser le scalp obtenu en deux parties (la seconde partie sera utilisée pour la recherche des incrustations acido-résistantes).
- SURTOUT, ne pas oublier de retourner à nouveau le scalp pour le replacer à l'endroit ; déposer un des deux morceaux dans le SBA durant 10 à 30 secondes, selon la dilution de votre acide sulfurique.
- Placer une goutte d'eau au centre de la lame.
- Y faire glisser le scalp, placer la lamelle couvre objet et observer → les dermatocystides apparaissent comme des « têtards » dont la couleur varie du gris bleu au noir. On dit alors qu'elles sont SBA+.

Ces réactifs demandent de la méthode et de l'organisation, si on veut observer, réaliser des photos ou dessiner, car leur durée d'utilisation est limitée à très limitée.

Réactif	Couleur	Durée d'utilisation
SV	Jaune vif	1 heure
SBA	Jaune clair	10 minutes
SP	Jaune clair, verdissant	10 minutes
SBAA	Rouge orangé clair	5 minutes
SA	Rouge carmin clair	1 à 2 minutes

Quelques remarques

- Il faut savoir que les *Compactae* (*R. nigricans* est la plus connue), les *Delicineae* (*R. delica...*) et les *Foetentineae* (*R. foetens...*) ont des dermatocystides grêles, parfois difficiles à observer ; quelques ochrosporées douces : *R. romellii*, *R. curtipes*, *R. rubroalba*, peuvent paraître acystidiées en première observation (elles sont seulement beaucoup moins abondantes chez ces espèces).
- Après application d'un réactif SA, on voit généralement apparaître des corpuscules gris noirâtres dans les dermatocystides positives de la cuticule des russules.
- Chez *Russula albonigra*, ces corps noirâtres sont remplacés par une grande inclusion jaunâtre, tant dans les dermatocystides que dans les cystides hyméniales.
- Certains réactifs SA peuvent aussi être employés macroscopiquement (réaction des *Roseinae* en rose vif à la SV – voir photo p. 5).
- La réaction est toujours très nette sur le frais, mais parfois à peine sensible sur matériel sec. Autant que possible, observer ce caractère avant de mettre en herbier ! (voir tableau ci-dessous).
- Il est préférable d'utiliser ces réactifs en préparation extemporanée, car les solutions acides s'avèrent instables, polymérisent rapidement et ne se conservent pas, sauf pour le sulfobenzaldéhyde (SBA).
- Dans la pratique, si on ne souhaite pas multiplier les produits, notre préférence va au SBA et à la SV, qui donnent entière satisfaction dans quasiment tous les cas.

¹⁵ Mycologue parisien décédé prématurément en 2000, et bien connu pour sa minutie et sa très grande précision scientifique ; il a mis au point un code de couleurs, destiné spécialement au codage de la sporée des russules. Ce référentiel mentionne les correspondances avec le code de Romagnesi (1985), dont il représente une version plus développée et surtout plus fiable au rendu des couleurs. Ce code est quasi introuvable car il n'avait été réalisé qu'en quelques dizaines d'originaux, et il est impossible de le reproduire par les procédés de copie classiques.

Le code de Romagnesi offre 10 couleurs de référence ; cependant, nous considérons (avis personnel) qu'il est d'une fiabilité relative car la qualité de l'impression est très variable selon les éditions, et l'âge du livre (voir représentation en p. 9).

Le code de Dagrón comprend 26 dégradés de couleur représentés par des carrés de 25 mm de côté (quatre couches de peinture glycérophthalique bien résiniifiée - voir représentation en p. 9).

- Une trop grande concentration d'acide rend les coupes plus difficiles à déchiffrer (surtout, ne pas utiliser d'acide sulfurique pur), et ne facilite pas obligatoirement la réactivité, suite au mauvais pouvoir pénétrant de la solution dans les cellules ; une solution diluée d'acide se révèle plus efficace à ce niveau.
- Pour l'observation du scalp après réaction, nous conseillons fortement d'utiliser de l'eau bidistillée. En ce qui concerne la SV, il y a parfois recristallisation de la vanilline (notamment quand les cristaux n'ont pas été complètement dissouts dans la goutte initiale d'acide à 50%) lorsqu'on transfère dans une goutte d'eau du robinet. Lorsqu'on place dans une goutte d'eau après réaction dans le SBA, on peut voir apparaître un précipité blanchâtre, qui personnellement ne nous dérange pas et ne fausse pas l'observation. Cependant, il est possible d'éviter ces petits inconvénients en transférant la pièce à observer dans une goutte d'acide à 50%. **MAIS dans ce cas**, il faut se montrer très prudent lors de l'observation à l'immersion, afin de ne pas placer l'objectif 100x en contact avec l'acide sulfurique, suite à une mauvaise manœuvre (débordement ou bris de lame)... et cela n'arrive pas qu'aux débutants !

Observations possibles sur matériel sec : nous maintenons cependant fermement que les résultats obtenus sont moins fiables que sur du matériel frais.

Réactif	Ramollisseur	Éléments observables
SV	NH ₄ OH	Dermatocystides & cystides hyméniales
SV	Aucun	Hyphes primordiales cuticulaires (mais c'est bien meilleur avec la fuchsine de Ziehl ou le rouge Congo)
SP	NH ₄ OH	Dermatocystides & cystides hyméniales
SBA	Aucun	Aucun
SBAA	Aucun	Aucun
SA	Aucun	Aucun

Voici la traduction d'un extrait de « *Perspectives in the new Russulales* » (2006), traitant des **hyphes gléoplères**.

« Un des bons synapomorphes¹⁶ pour les Russulales est la présence d'un système d'hyphes gléoplères¹⁷ dans la trame, l'hyménium, la cuticule, même dans le mycélium de culture (Larsson et Larsson, 2003) et la gaine ectomycorhizienne (Eberhardt 2000). Notre connaissance des hyphes gléoplères dans les Russulales et notre capacité à utiliser cette information précisément de façon systématique, demeure difficile pour plusieurs raisons. Une d'elles est l'usage imprécis des termes et des réactions de coloration utilisées pour distinguer les différents types d'hyphes gléoplères. La nature vasculaire ou conductrice de ces hyphes a été envisagée en raison de la similitude de leur apparence avec les laticifères à latex qu'on trouve dans les plantes. Fayod (1889) décrit deux types d'hyphes vasculaires, les vaisseaux oléifères et les vaisseaux laticifères. Ce fut une première tentative de distinguer les hyphes contenant du fluide, chez *Russula* et *Lactarius*, des hyphes réfractives ou « vasculaires » trouvés dans de nombreux autres genres de champignons.

Chez les Agaricales, Singer (1975) distingue cinq types d'hyphes laticifères, y compris des « lactifères » et des « hyphes oléifères ». Les lactifères contiennent du latex analogue aux lactifères chez les plantes, le fluide étant une émulsion composite constituée de nombreux composants. Les hyphes oléifères contiennent des substances résineuses qui présentent un goût âcre, selon Singer.

Romagnesi (1985) a reconnu deux types de lactifères chez *Russula* : un avec un jaune homogène et un contenu huileux, semblable aux hyphes qu'on retrouve dans plusieurs autres types de champignons, et un autre type avec un contenu similaire à celui trouvé dans les macrocystides de *Russula* et *Lactarius*.

Stalpers (1996) définit 10 termes en relation avec le système d'hyphes gléoplères. Cléménçon & al (2004), dans une tentative d'ajouter des précisions aux définitions, a proposé le terme d'hyphes sécrétoires, pour remplacer « hyphes vasculaires » et trouvé, à travers l'utilisation de techniques variées de coloration différentielle, que les hyphes oléifères ne contiennent pas de matières grasses. En conséquence, il a introduit le terme de « thromboplères ».

Le principal moyen de distinction entre les différents types d'éléments est la coloration différentielle des hyphes gléoplères. Nombre de colorants ont été utilisés, y compris les colorants généraux cytoplasmiques et une pléthore de colorants plus spécifiques dont les actions ont été corrélées à certains

¹⁶ Qui partage plusieurs taxons aux mêmes caractéristiques évoluées, critère essentiel, selon les cladistes, de la monophylie.

¹⁷ Les hyphes gléoplères sont des hyphes qui contiennent des cristaux et/ou des gouttelettes plus ou moins réfringentes mais qui ne se colorent pas au bleu coton. Par contre, elles se colorent en rouge avec le Soudan III. Ces hyphes sont très proches des laticifères.

types de contenus. Il a été démontré que le stéaryl-velutinal est responsable de la réaction bleu foncé des hyphes gléoplères, lorsqu'ils sont traités avec la sulfovanilline (Camazine et Lupo 1984), par exemple. La plupart des colorants sont des composés sulfoaldéhydiques, comme la sulfovanilline, le sulfoformol et le sulfobenzaldéhyde, qui semblent indiquer une variété de différents contenus dans les hyphes. Cependant, les formulations et les protocoles de colorations sont nombreux, ce qui conduit à la confusion et la frustration dans leur utilisation et interprétation. On en sait relativement peu sur la composition chimique du fluide présent dans les hyphes gléoplères des Russulales, en dépit de l'isolement d'un certain nombre de nouveaux composés dans les dix dernières années. Un grand nombre des composés décrits sont des sesquiterpènes avec des squelettes « lactarane » (Hansson et Sterner 1991). Ces composés sont largement cytotoxiques et instables, changeant rapidement de nature, à la moindre modification. Des changements microscopiques semblables ont également été notés par Verbeke (1997), qui a remarqué que le latex frais des *Lactarius* apparaît comme une émulsion contenant de nombreuses petites guttules ; mais lors du séchage, il se transforme en une masse dense de cristaux. Les réactions de coloration sont également différentes sur les échantillons frais et séchés. Larsson et Larsson (2003) ont discuté de trois catégories de réactions dans la coloration des Russulales.

- Chez la plupart des taxons, les hyphes gléoplères donnent une réaction positive avec le sulfobenzaldéhyde.
- Chez d'autres, ils ne réagissent positivement que lorsqu'ils sont frais, mais perdent cette réaction après une certaine période de stockage.
- Certains taxons ne donnent jamais donner une réaction positive.

Ils ont suggéré que l'analyse de séquences et les caractéristiques morphologiques confirment l'hypothèse que toutes les hyphes gléoplères, chez les Russulales, sont homologues. A ce jour, il n'existe aucun consensus clair quant à la fonction de ces éléments. Sur la base de la chimie du fluide contenu dans les hyphes de *L. velutinus*, Camazine et Lupo (1984) ont suggéré que les hyphes laticifères fonctionnent comme un entrepôt pour les précurseurs de composés dialdéhydes¹⁸. Ces composés sont largement instables et changent rapidement de forme (de non toxiques à toxiques), conduisant à l'hypothèse qu'ils sont des agents chimiques de défense protégeant les structures productrices de spores. »

Bibliographie

BOIDIN J., 1951 - *Les réactifs sulfoaldéhydiques. Leur intérêt pour la détermination et la classification des Théléphoracées (Basidiomycètes)*. Bull. Soc. Nat. Oyonnax 5 : 72-79.

BOM M., 1988 – *Clé monographique des russules d'Europe*. Documents Mycologiques, tome XVIII, fascicule 70-71 : 1-117

BOOTH C., 1979 – *Methods in microbiology*, volume 4. Academic Press, London

CAMAZINE S, LUPO AT., 1984 - *Labile toxic compounds of the Lactarii : the role of the laticiferous hyphae as a storage depot for precursors of pungent dialdehydes*. Mycologia 76 : 355–358.

CHARBONNEL J., 1995 – *Les réactifs mycologiques. Tome 1 : les réactifs macrochimiques*. Edité à cpte d'auteur : 236-252

CHARBONNEL J., 2004 – *Les réactifs mycologiques. Tome 2 : les réactifs microchimiques*. Edité à cpte d'auteur : 215-240

FAVRE-BONVIN J., GLUCHOFF-FIASSON K. & BERNILLON J., 1982 - *Structure du stéaryl-vélutinal, sesquiterpénoïde naturel de Lactarius velutinus Bert*. Tetrahedron Letters, 23 (18) : 1907-1908.

HANSSON T., STERNER O., 1991 - *Studies of the conversions of sesquiterpenes in injured fruitbodies of Lactarius vellereus : a biomimetic transformation of stearyl-velutinal to isovelleral*. Tetrahedron Lett. 32 : 2541–2544.

JI-KAI LIU, 2007 - *Secondary metabolites from higher fungi in China and their biological activity*. Drug Discov Ther 2007, 1 (2) : 94-103.

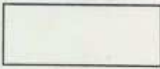
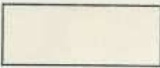






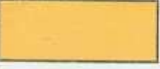

MILLER S., LARSSON E. & K.H., NUYTINCK J., VERBEKEN A., 2006 – *Perspectives in the new Russulales*. Mycologia, 98 (6) : 960-970

ROMAGNESI H., 1964 - *Sur deux réactions microchimiques associées chez certains Basidiomycètes supérieurs*. Rev. de Mycol. XXIX : 93-100.

Nos remerciements vont à Guy Garcia, Pascal Hériveau et Jean-Michel Trendel, pour leurs conseils et leur aide efficace.

¹⁸ Composé possédant deux fois la fonction aldéhyde.

◀ Le code de Romagnesi

LEUCOSPORÉES (sporée blanche ou blanchâtre) I		a (sp. blanche)	(<i>R. cyanoxantha</i>)
		b (sp. blanchâtre)	(<i>R. emetica</i>)
PALLIDOSPORÉES (sporée crème) II		a (sp. crème blanchâtre)	(<i>R. lepida</i>)
		c (sp. crème moyen)	(<i>R. grisea</i>)
		d (sp. crème foncé)	(<i>R. amoenicolor</i>)
OCHROSPORÉES (sporée ocre) III		a (sp. ocre pâle)	(<i>R. exalbicans</i>)
		c (sp. ocre foncé)	(<i>R. xerampelina-erythropoda</i>)
XANTHOSPORÉES (sporée jaune) V		a (sp. jaune pâle)	(<i>R. faginea, xer. des hêtres</i>)
		c (sp. jaune moyen)	(<i>R. integra</i>)
		e (sp. jaune vif)	(<i>R. decipiens</i>)

Le code de Dagron ▶

1	I a		carpini	IVc	26
2	I b	vesca	olivacea	IVd	25
3		rosea			24
4	II a		maculata	IVc	23
5	II b	melliolens			22
6	II c		romellii	IVb	21
7					20
8	II d	sardonica			19
9	III a			IVa	18
10			turci		17
11	III b	velenovskiyi	badia		16
12	III c	exalbicans			15
13	III d	badia & turci			14

Nous tenons à préciser que les deux reproductions ci-jointes ne correspondent pas à la réalité des couleurs et qu'elles ne doivent en aucune manière être utilisées comme référentiels.