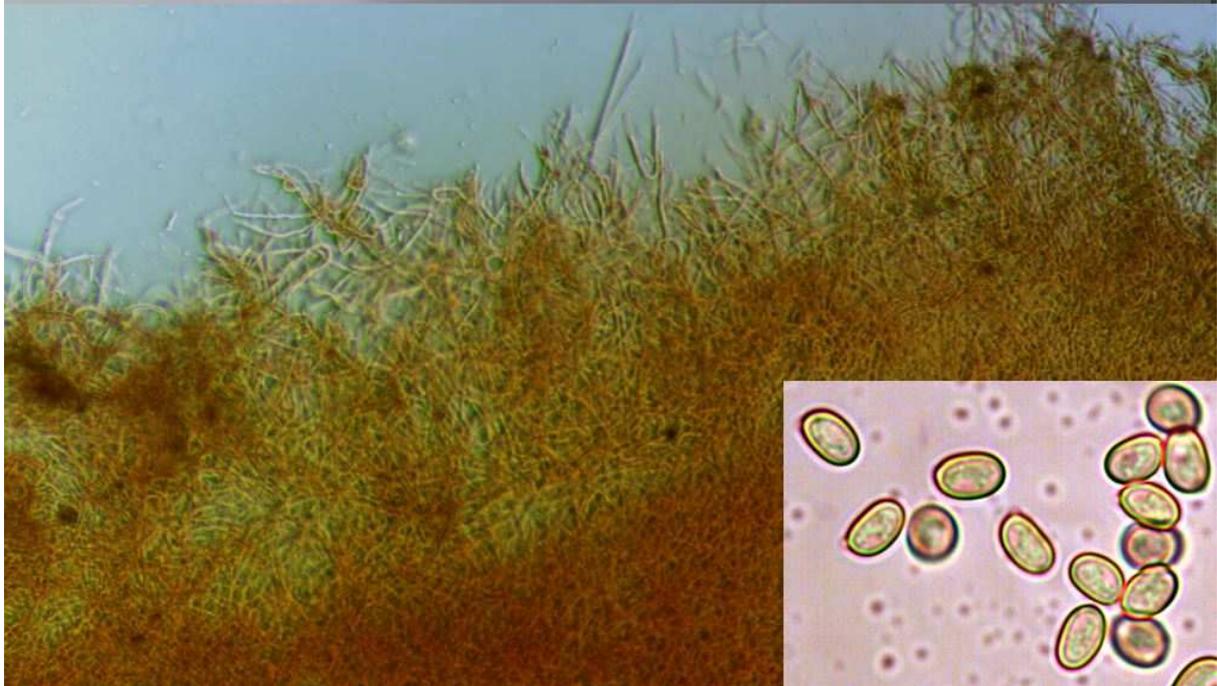


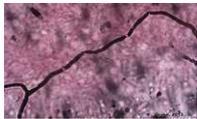
SÉMINAIRE de MICROSCOPIE 2014

Organisé par l'Association des Mycologues Francophones de Belgique



Cuticule et spores de *Paxillus involutus*.

Photos de la page de couverture :



Hyphe laticifère chez *Lactarius controversus* - réaction à la sulfovanilline.
Observation x40, dans l'eau.



Endomycorhize en pelote dans des radicules de laitue.
- coloration au bleu coton acétique.

MANUEL DE MICROSCOPIE

**à l'attention
des passionnés de mycologie.**

Tome III

Marcel Lecomte

Avec la collaboration de Françoise Draye
de Jean-Pierre Gaveriaux
et de Pierre-Arthur Moreau

**« Il suffit, pour être réellement heureux,
de trouver quelque chose
qui nous intéresse passionnément. »**
(C. Kinsley)

Nous adressons nos remerciements les plus vifs à :

L'A.M.F.B. (Association des Mycologues Francophones de Belgique),
qui a financé l'impression de cette publication.

Françoise Draye,
pour ses préparations talentueuses et ses photographies.

André Fraiture,
qui a supervisé l'aspect mycologique et rédigé l'introduction.

Jean-Pierre Gaveriaux,
Pour son apport indispensable à l'étude des lichens.

Pierre-Arthur Moreau,
pour son aide, ses textes et ses conseils précieux.

Guy Moussy,
qui nous a initié aux maladies de la vigne.

Paul Pirot,
qui a assuré la correction orthographique et grammaticale des textes.

André Advocaat, Guy Auderset, Luc Bailly, Olivier Barth, Etienne Charles,
Bernard Clesse, Philippe Clowez, Guy Exbrayat, Alain Ferville, André Fé-
vrier, Jean-Pierre Gaveriaux, Amélie de Gervillier, Daniel Ghyselink, Oli-
vier Gonnet, Jacques Guimberteau, Jean Leclercq, Jean-Paul Maurice,
Camille Mertens, Joseph Pellicani, Patrice Tanchaud, Joserra Undagoitia,
François Valade, Arthur Vanderweyen, Michel Vérollet,
pour les photos aimablement mises à notre disposition.

Didier Baar (†), Michel Blaise, G.H. Cléménçon, Régis Courtecuisse, Jean-
Pierre Gaveriaux, Alain Henriot, Klaus Herrmann, Jean Lachapelle (†),
Claude Lejeune (†), Paul Leroy, Albert Marchal, Pierre-Arthur Moreau,
Serge Roelandts, Arthur Vanderweyen,
qui ont contribué à nos progrès en microscopie.

Le réseau Internet, et tous les auteurs qui acceptent de partager gracieu-
sement leur expérience, leurs idées, leurs images, leurs croquis et leurs
publications.

Préface

Les séminaires consacrés à la microscopie sont très rares. D'une façon générale, on peut d'ailleurs dire que la microscopie a tendance à être un peu négligée par les mycologues d'aujourd'hui. Le fait qu'elles aient été principalement développées au XXème, voire au XIXème siècle, confère peut-être à ces techniques une connotation vieillotte, bien imméritée. Peut-être aussi, les scientifiques d'aujourd'hui, parfois tentés de paraître « à la page », préfèrent-ils avoir recours à la microscopie électronique, technologie plus récente, plus performante, du moins en termes de grossissement, et qui utilise un appareillage hors de portée des amateurs. Finalement, le raz-de-marée de la biologie moléculaire est venu supplanter, non seulement l'observation au microscope, mais toute la systématique traditionnelle, basée sur l'observation et la description des caractères anatomiques et morphologiques.

Les méthodes de la microscopie optique paraissent souvent rébarbatives aux yeux des mycologues d'aujourd'hui, qu'ils soient professionnels ou amateurs. Elles requièrent l'usage de produits rares, de méthodes peu connues, d'un savoir-faire qui ne s'acquiert qu'au prix d'une longue pratique et surtout, elles nécessitent patience, minutie et souvent beaucoup de temps, ... tous « ingrédients » qui ne sont plus guère prisés à notre époque du « clé sur porte » et du potage instantané. Rien d'étonnant, dès lors, à ce que la plupart des traités de microscopie mycologique datent de plus de 20 ou 30 ans. Heureusement, certains spécialistes continuent à développer ces techniques et à enrichir notre connaissance des caractères microscopiques des différentes espèces fongiques. On peut citer le *Manuale di microscopia dei funghi* de M.T. Basso¹ et, surtout, les publications de Cléménçon², qui reste le « grand maître » actuel de cette discipline.

Marcel Lecomte est un mycologue amateur passionné. Comme beaucoup d'amateurs, c'est aussi un autodidacte. Je le sais pour l'avoir expérimenté durant des années, lors de mes débuts en mycologie : s'avancer seul à la découverte d'un domaine inconnu n'est pas sans inconvénients. Combien d'erreurs ne commettons-nous pas, que la présence d'un mentor nous eût évitées, et comme il nous faut parfois attendre longtemps avant d'en prendre conscience et de pouvoir les corriger ! Les risques de ce cheminement solitaire sont toutefois compensés par deux avantages. Le premier est que, comme il a dû trouver son chemin par lui-même, l'autodidacte le connaît beaucoup mieux que celui qui s'est laissé conduire. Le second avantage est que, avançant au hasard, il s'écarte des chemins battus et peut, s'il a de la chance, faire des découvertes qui restent pratiquement inaccessibles aux autres. Et puis, que dire du plaisir que l'amateur retire de ses recherches : l'émotion ressentie devant la beauté de certaines observations, la jubilation de découvrir au détour d'un chemin forestier une espèce qu'il connaît par les livres depuis des années, le fait de sentir ses connaissances croître et d'y voir chaque jour un petit peu plus clair dans ce domaine qui lui était entièrement obscur au départ. Tout cela constitue une telle motivation qu'elle permet au passionné d'avancer sans efforts sur cette voie qui semble souvent bien rebutante à celui qui ne la suit pas.

Intéressé par la microscopie dès sa jeunesse (la passion pour la mycologie est venue plus tard), Marcel a consacré, surtout ces quinze dernières années, un temps considérable à parcourir les forêts à la recherche de sujets d'observation, à fréquenter les congrès - principalement en Belgique et en France - à réaliser des préparations microscopiques en utilisant des techniques très variées, à préparer lui-même les nombreux réactifs macro- et microscopiques nécessaires au mycologue. Le chemin fut long mais l'expérience ainsi acquise est à ce point solide qu'elle lui permet à présent de diriger des séminaires de microscopie, fréquentés par des naturalistes de Belgique et de divers pays étrangers.

Avec cette publication, Marcel Lecomte nous offre aujourd'hui une nouvelle brassée d'informations concernant les techniques de microscopie. Bonne nouvelle pour les mycologues : ce fascicule étant entièrement consacré à la microscopie fongique, ils s'y plongeront avec grand intérêt et y trouveront bien des recettes utiles. L'ouvrage que Marcel nous propose ici n'est pas un traité classique. C'est plutôt une promenade, à laquelle il nous convie et qui nous fait visiter au passage de très nombreuses facettes de la microscopie appliquée à l'étude des champignons. Il nous fait partager l'expérience qu'il a acquise, nous décrit de façon pratique les techniques à appliquer et nous montre les résultats obtenus, nous prévient des erreurs à ne pas commettre et nous signale le danger éventuel que représente la manipulation de certains réactifs. Gageons que le lecteur consultera souvent ce livre avec profit.

André Fraiture

Président de l'Association des Mycologues Francophones de Belgique
Mycologue au Jardin botanique national de Belgique

¹ Voir les références bibliographiques en fin d'ouvrage.

² Idem.

Introduction

Au début du mois de mars 2012, me retrouvant en face de 54 passionnés de microscopie, j'ai eu le bref sentiment d'avoir accompli du bon travail, un peu comme un artisan, fier de son ouvrage ... voire même, présomptueusement certes, comme un artiste contemplant une œuvre unique. Avant cela, j'avais consacré des centaines d'heures à rédiger un fascicule de 195 pages, qui fut accueilli avec beaucoup d'intérêt et nombre d'éloges par les participants. J'avais pris la décision d'en rester là, et de m'octroyer un repos bien mérité, ce qui fut clairement annoncé en début de session, considérant que j'avais atteint mes limites de connaissances et d'engagement physique.

Et puis, il y eut cette fin de congrès fatidique, où j'ai entendu dire qu'on ne pouvait en rester là et qu'une telle organisation demandait au moins une ultime édition. Mon ami Claude Quintin s'est alors proposé d'assumer la totalité des tâches administratives : logistique, intendance, gestion des réservations, et de prendre en charge d'autres « détails » fastidieux et très chronophages. Je n'aurais plus, en principe, qu'à m'occuper de l'enseignement. Après avoir consulté mon équipe de fidèles, sans qui rien n'avait été et ne serait éventuellement possible, et sans doute me trouvant dans un état second ou euphorique, je me suis entendu donner mon accord téméraire pour une dernière session en 2014.

Rentré chez moi, et revenu à la réalité, j'ai réalisé l'ampleur de cet engagement quelque peu fou... Mais trop tard pour faire marche arrière ! Et puis, voilà un nouveau défi à relever ! Quoi de plus excitant : j'adore ... J'ai commencé à élaborer la table des matières qui se trouve à la page suivante, et au fil du temps, je me suis rendu compte de la masse des lacunes dans ce qui était devenu « 2012, tome 1 ».

Et voilà ! Deux années passées à consulter et fouiller toute la littérature dont je dispose, à revoir pas à pas toutes les techniques anciennes ou récentes que je maîtrise avec un certain succès, à leur apporter les améliorations rendues possibles par les produits et matériaux modernes, à les actualiser et composer des modes opératoires illustrés, parfois à les simplifier afin de les rendre plus accessibles à des amateurs ne disposant pas d'un laboratoire spécialisé, et encore moins de subsides plantureux.

Et puis de nouvelles pistes à explorer, des milliers de préparations à réaliser, générant des centaines de photos à trier ... et puis la mise en page de tout cela pour arriver à « 2014, tomes II et III », que vous êtes en train de consulter.

Avec surtout et prioritairement en arrière-pensée, la volonté de transmettre un bagage de connaissances, des tours de main et contribuer à la formation de jeunes successeurs.

J'ai à nouveau une pensée émue et reconnaissante pour mes parents, qui, malgré leur manque de moyens et à force de privations, m'ont offert un microscope monoculaire dans ma prime adolescence, répondant à mon besoin instinctif de « voir ce que les autres ne voyaient pas », et grâce auquel le mot « ennui » n'a jamais fait partie de ma vie. Cela m'a permis, chaque fois que c'était nécessaire, d'oublier les vicissitudes ou la banalité du quotidien, et plus encore, les déceptions relationnelles.

En parallèle, mes remerciements les plus vifs et les plus chaleureux vont à Marité, mon épouse, qui a toujours encouragé ma passion dévorante pour la microscopie, et accepté avec le sourire tout ce que cela impliquait : mes interminables soirées et mes veilles nocturnes avec un ordinateur posé sur les genoux, à rédiger encore et encore ... les milliers d'heures passées dans mon petit laboratoire, penché sur un microscope ou une loupe stéréoscopique ... les odeurs chimiques ou autres qui envahissaient souvent la maison, au fil de mes errements et expérimentations ... les dépenses parfois inconsidérées, même si elles me paraissaient justifiées, dans ma logique passionnée. Sans elle et son ouverture d'esprit, rien de ces 500 pages de littérature, fruit et synthèse de 55 ans de pratique, n'aurait existé.

Marcel Lecomte
Cognelée, 15 mars 2014

Table des matières

1. PRÉFACE
2. INTRODUCTION
3. TABLE DES MATIÈRES
4. ABRÉVIATIONS UTILISÉES
- 5. MYCOLOGIE (APERÇU)**
6. MILIEUX D'OBSERVATION, MILIEUX DE MONTAGE ET COLORANTS : LES MILIEUX FLUIDES
8. LES MILIEUX VISQUEUX
10. LE MONTAGE DE PIÈCES NON COLORÉES DANS UN MILIEU DÉFINITIF COLORÉ
11. UN PROTOCOLE DE TRAVAIL PERSONNEL
12. L'INDISPENSABLE : LE MYCÉLIUM
15. L'OBSERVATION EXTEMPORANÉE DES SPORES ET, PAR EXTENSION, DES ÉLÉMENTS CONSTITUTIFS DE L'HYMÉNIUM : ASQUES ET PARAPHYSES
17. LES BASIDES
19. LES CYSTIDES
22. UNE DÉCOUVERTE : LES CYSTIDES TRABÉCULAIRES
23. DES CELLULES PARTICULIÈRES
25. LES FROTTIS MYCOLOGIQUES : SPORES ET CONIDIES
28. LA TRAME DES LAMES DE CERTAINS BASIDIOMYCETES
31. LES POILS CUTICULAIRES
32. LES SETULES HYMENIALES
33. LES CUTICULES
36. ÉTUDE REALISEE SUR LA CUTICULE DE *SUILLUS GRANULATUS*
38. LES TYPES D'HYPHES CHEZ LES BASIDIOMYCETES
43. BASIDIOMYCETES : LA DOUBLE COLORATION DE ROUTINE
45. LES PIGMENTS
48. UN COLORANT TROP PEU UTILISE : LE BLEU DE CRESYL
51. LA SIDEROPHILIE DES BASIDES
53. LE MELANGE DE GIEMSA
55. UNE OBSERVATION INTERESSANTE CHEZ *ARMILLARIA SP.*
57. LA CUTICULE CHEZ *RUSSULA VIOLEIPES*
59. LA RECHERCHE DES INCRUSTATIONS ACIDO-RESISTANTES
60. OBSERVATION DES DERMATOCYSTIDES
63. LE GENRE *LACTARIUS*
65. *SORDARIA MACROSPORA* : REPRODUCTION ET GENETIQUE
70. ARBRES ET CHAMPIGNONS : LES ECTOMYCORHIZES
73. PLANTES ET GLOMEROMYCETES : LES ENDOMYCORHIZES
78. PLANTES ET GLOMEROMYCETES : LES SPORES
81. LES MYCORHIZES ORCHIDOÏDES
84. LES ROUILLES
87. LES CHARBONS
89. LES OÏDIUMS
94. LA VIGNE A BEAUCOUP D'ENNEMIS
96. LES MILDIOUS
98. LES LICHENS
113. UN LICHEN COURANT DANS LE NORD
115. LES MOISSISSURES
119. LES LEVURES
- 121. LES BACTERIES**
123. UNE COLORATION SIMPLE AU BLEU DE METHYLENE
124. *PSEUDOMONAS* ET ENTEROBACTERIES
125. LA COLORATION DIFFÉRENTIELLE DE GRAM
127. UN RACCOURCI INTÉRESSANT : LA POTASSE
127. LES BACTERIES BUCCALES
128. LES BACTERIES DU YAOURT
129. VOILE BACTERIEN ET BACILLE SUBTIL
130. COLORATION DES MYCOBACTERIES : LA COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN - LA COLORATION DE KINYOUN ET DE ZIEHL-ARMAND - LA COLORATION A L'AURAMINE, LA COLORATION DE DUGOMMIER ET LA METHODE DE SMITHWICK – LA METHODE DE KUBICA – LA COLORATION DES MYCOBACTERIES SELON HAGEMANN-HERMANN ET LA COLORATION A L'ORANGE D'ACRIDINE
- 135. Ma bibliothèque personnelle**

Abréviations utilisées et conventions

BC = baume du Canada
 BCA = bleu coton acétique
 BCL = bleu coton lactophénolé (= bleu de méthyle au lactophénol)
 BDC = bleu de crésyl
 BP = boîte de Pétri
 CLP = chloral lactophénolé ou chloral-lactophénol
 CP = contraste de phase
 DC = double coloration
 DIC = contraste interférentiel de Nomarski (Differential interference Contrast)
 GDS = glycérine + sodium Diméthyle Sulfoxyde
 Eau = lorsque nous la mentionnons, il s'agit toujours d'eau bidistillée, sauf indication contraire.
 Eau acétique = c'est un mélange d'eau bidistillée et d'acide acétique glacial (5 %)
 FAC = fuchsine acide, lactique
 IAR = incrustations acido-résistantes
 IR = indice de réfraction
 LCO = lame couvre-objet
 LPO = lame porte-objet
 min. ou ' = minute
 MO = mode opératoire ou modus operandi
 N ou n = indice de réfraction d'un liquide ou d'une matière
 NA = non amyloïde
 ND = non dextrinoïde
 PEG = polyéthylène glycol
 p. ex. = par exemple
 PVA = alcool polyvinylique
 PVAL = alcool polyvinylique + acide lactique
 PVAL-BA = alcool polyvinylique lactique, coloré dans la masse au bleu d'aniline
 PVAL-BM = alcool polyvinylique lactique, coloré dans la masse au bleu de méthyle (bleu coton)
 PVAL-FA = alcool polyvinylique lactique, coloré dans la masse à la fuchsine acide
 PVALPh = alcool polyvinylique lactophénolé
 RCA = rouge Congo ammoniacal
 RC SDS = rouge Congo aqueux au Sodium Dodécyl Sulfate
 SA = ensemble des réactifs sulfoaldéhydiques
 SBA = sulfobenzaldéhyde
 SDS = sodium dodécyl sulfate, préconisé en mélange avec le rouge Congo aqueux, par Cléménçon
 sec. ou " = seconde
 SF = sulfoformol
 SP = sulfopipéronal
 SV = sulfovanilline
 µm = micron
 x10 ou 10x : nous écrivons indifféremment cette valeur, qui indique le grossissement d'un objectif, utilisé avec un oculaire de 10x.
 30° : une température mentionnée est toujours exprimée en degrés Celsius.

Sauf mention contraire, tous les textes et photos, insérés dans ce fascicule, sont de Marcel Lecomte³.

³ Marcel Lecomte, rue Basse Chaussée, 117 B-5022 COGNELEE/NAMUR (Belgique) – mlecomte@skynet.be

MYCOLOGIE

Mycélium, spores, asques et basides

Frottis, colorations et pigments

Gloméromycètes et endomycorhizes

Lichens

Levures et moisissures

Rouilles, Charbons, Oïdiums & Mildious



Ascospores chez *Ascobolus albidus* (préparation et photo D. Ghyselincq).

MILIEUX D'OBSERVATION, MILIEUX DE MONTAGE ET COLORANTS

La question nous est souvent posée de savoir quel est le meilleur milieu d'observation à utiliser en routine pour obtenir une image qui soit la plus proche possible de la réalité, et qui présente une qualité optimale.

Notre réponse est simple : le milieu idéal n'existe pas ... chacun présente des avantages et des inconvénients, avec cependant des préférences que nous mentionnons en fin d'article !

Nous n'évoquerons ici que les milieux non colorés, qui parfois vont laisser apparaître des problèmes de contraste (dans ce cas, l'utilisation d'un microscope à contraste de phase apporte un « plus » incontestable).

Une notion importante à maîtriser : l'indice de réfraction⁴

Plus la valeur de « n » augmente, plus la qualité de l'observation s'améliore. Notez que cette augmentation de valeur n'est pas une simple progression arithmétique. Passer de 1,3 à 1,45 constitue une amélioration considérable.

Ceux qui nous intéressent directement dans le cas présent : air (1,0008), ammoniacque (+/- 1,30), eau (1,33), eau glycinée (1,40), acide lactique (1,439), lactophénol (1,44), glycérine (1,47), chloral lactophénol (1,49), lactoglycérol (1,49), glycérol pour microscopie (1,70).

Pour information, baume du Canada (1,526), huile à immersion synthétique (1,53) et huile à immersion Zeiss (1,55).

Passons en revue diverses possibilités !

Les milieux fluides

Nous conseillons de les éviter lorsqu'il s'agit d'observer de très petits sujets (comme des spores, des conidies ou des grains de pollen) qui risquent de se déplacer et de « rouler » dans la préparation, à la moindre erreur de manipulation.



EAU « DE SOURCE » OU DE DISTRIBUTION

Il s'agit d'une eau potable, qui provient le plus souvent d'une nappe souterraine, d'une rivière ou d'une source apparente, et qui subit de nombreux traitements avant d'arriver au consommateur, sous forme embouteillée ou par un réseau de distribution.

Elle contient des minéraux (sels de calcium et de magnésium : on la qualifie alors de « dure » ou « calcaire »), du chlore (hypochlorite de soude) à 0,1 mg/l, des traces de

nombreux produits +/- toxiques tels que sulfates, nitrates, chlorures, plomb, arsenic, cadmium, des hydrocarbures, des pesticides et insecticides (en quantité insuffisante pour être directement nuisibles à l'être humain) et des éventuelles bactéries non pathogènes.

Nous la déconseillons fortement car elle peut générer des précipités peu esthétiques.

EAU DÉMINÉRALISÉE (OU DÉIONISÉE)

L'eau est déminéralisée par passage sur une résine échangeuse d'ions qui permet d'échanger les ions dérangeants (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , ...) contre des ions moins gênants (H^+ , Na^+ ...). Elle a perdu son caractère calcaire, mais elle peut contenir encore des matières organiques et des bactéries. Elle n'est donc pas stérile. Elle convient très bien pour des tests chimiques, qu'elle ne perturbe pas.

Nous ne l'utilisons pas pour les mêmes raisons que la précédente.

⁴ L'indice de réfraction (**n** ou **N**) est une indication numérique qui sert à exprimer le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et la vitesse de la lumière dans le milieu de propagation. Plus explicitement, il correspond au facteur de proportionnalité existant entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction. L'IR est un nombre sans unité où le vide ($n = 1$) est posé comme ayant la plus faible indice de réfraction.

EAU BIDISTILLÉE

L'eau bidistillée contient des gaz dissous comme O₂ et CO₂, mais rien d'autre. Lors de la distillation⁵, aucun ion n'est entraîné par la vapeur d'eau. L'eau récupérée est donc "pure" et, en principe, stérile. Mais tout contact avec les spores en suspension dans l'air va la polluer à nouveau. Pour qu'elle reste stérile, elle doit être conservée dans des récipients étanches. Elle convient pour des applications médicales.

C'est le premier milieu à utiliser sur du matériel encore vivant, car il n'est pas létal et permet de mettre en évidence des structures susceptibles de disparaître dans nombre d'autres milieux, comme les différents pigments cellulaires (pariétaux, zébrants, intracellulaires) ou cuticulaires.

A utiliser uniquement sur du matériel frais.

SOLUTION ISOTONIQUE DE NaCl

C'est une solution aqueuse de chlorure de sodium, à 9 g/l, appelée également sérum physiologique. Dans cette solution isotonique, le volume des spores est en principe immuable.

Nous ne la considérons pas comme meilleure que le précédent milieu évoqué, car nous n'avons jamais remarqué de variation de volume des spores dans l'eau bidistillée (en considérant que nous travaillons essentiellement sur des spores issues d'une sporée, donc matures).

A utiliser uniquement sur du matériel frais.

AMMONIAQUE PURE ET AMMONIAQUE À 50 %

L'ammoniaque concentrée a le pouvoir de ramollir les hyphes de champignons frais et de regonfler les exsiccata. C'est, en outre, le solvant de colorants tels que le rouge Congo.

C'est un produit 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. Soulignons son agressivité au niveau des poumons ; c'est à utiliser seulement dans une pièce bien ventilée. On l'utilise d'autre part pour l'étude des chrysozystides (cystides dont le contenu vire au jaune sous l'action des bases) dans des genres comme *Hypholoma* ou *Stropharia*, notamment.

En 1976, Robert Kühner a énoncé une règle essentielle, qu'il considère comme valable pour tous les Hyménomycètes à lames : « *Les spores dont au moins une couche de la paroi gonfle fortement par le procédé ammoniac-acétique⁶ sont toujours fortement dextrinoïdes⁷ jusqu'à maturité et puissamment cyanophiles⁸ ».* C'est le cas notamment du genre *Lepiota*.

L'ammoniaque diluée deux fois a une action moins drastique sur les hyphes que la solution concentrée, c'est pourquoi elle est parfois préférée. En outre, elle est moins agressive pour les voies respiratoires. C'est un milieu intéressant, en tenant compte des réserves et restrictions émises.

POTASSE

La concentration en potasse la plus utilisée en microscopie est, en fait, non pas de 2-3 % mais de 5 %. La solution à 5 % convient bien pour la plupart des observations. Globalement, la potasse a comme 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 précaution car elle est susceptible de dissoudre certains éléments, dont notamment l'ornementation des spores chez les Ascomycètes.

La solution à 3 % est parfois préférée parce que son action est plus douce que celle de la potasse à 5 %. Elle peut, par conséquent, être utilisée pour des champignons plus délicats. Elle constitue un élément essentiel de travail pour Robert Kühner (il l'appelle "lessive de potasse") ; la règle générale est de chauffer à 60° C à l'étuve, durant quelques heures.

Ainsi, pour les Agaricoïdes chromosporés, et notamment les *Galerina*, il décolore la paroi sporique en 3 heures de ce traitement ; on arrive alors à y visualiser facilement les 3 enveloppes fondamentales de la spore de ce genre : endospore, épispore, myxosporium. Ainsi traitées, ces spores présentent une affinité extrême pour le bleu coton, jusqu'à devenir bleu sombre opaque ; il a qualifié ce phénomène « d'ultracyanophilie ».

⁵ Il s'agit d'une distillation simple : l'eau à traiter est portée à ébullition ; la vapeur d'eau passe ensuite dans une colonne de refroidissement (un condensateur) où elle retrouve sa phase liquide.

⁶ Traiter les spores à l'ammoniaque (milieu basique) et ensuite par l'acide acétique (milieu acide).

⁷ Elles réagissent très nettement en brun rougeâtre, en présence d'iode (Iugol, melzer, IKI).

⁸ Ce terme est applicable lorsqu'elles sont très avides de bleu, notamment du bleu coton (bleu de méthyle), du bleu de crésyl ou du bleu de toluidine.

Pour Guillaume Eyssartier, la potasse à 2-3 % s'avère également très intéressante, au niveau des pigments pariétaux, qui se rencontrent dans de nombreux groupes de champignons.

« La technique est simple : il suffit de prendre un peu du revêtement du chapeau de n'importe quel champignon à pigment pariétal, et de le monter dans un milieu suffisamment pâle pour ne pas trop gêner l'appréciation des couleurs, et pas trop agressif pour ne pas dissoudre les pigments. Je monte en général dans une goutte d'une lessive de potasse à 2 ou 3 %. Comme champignon d'initiation, je conseille un cortinaire du groupe de *Cortinarius paleaceus* : les pigments sont remarquables chez les *Cortinariaceae* ; en effet, je pense que l'on peut raisonnablement dire qu'ils ont tous au moins des pigments pariétaux. Tous les *Omphalina* également ont des pigments de ce type, mais aussi les clitocybes du groupe de *C. gibba*, *C. squamulosa*, etc., les tricholomes du groupe de *T. pardinum*, *T. terreum*, etc., les lépiotes du groupe de *L. rhodorhiza*, *L. felina*, etc. Bref, difficile d'être exhaustif ! »

Selon Jacques Melot : « L'étude des cortinaires frais doit se faire dans l'eau ; sur matériel sec, dans une solution aqueuse de potasse à 2 ou 3 %, jamais dans le rouge Congo (ammoniacal ou non) ».

La potasse est également employée en microscopie à la concentration de 20 à 30 % (de même que la soude, d'ailleurs), où elle sert essentiellement d'agent de dissociation pour les espèces coriaces (polypores, croûtes), ou gélatineuses (*Auricularia*, *Tremella*).

Les milieux visqueux

Ces milieux d'observation s'avèrent très intéressants, en raison de leur viscosité plus ou moins forte, lorsqu'il s'agit de photographier des éléments ronds ou ovales, de petite taille (comme les spores ou les conidies de champignons) ou de taille moyenne (grains de pollen), qui ont une fâcheuse tendance à se déplacer lorsqu'ils sont observés dans l'eau. En outre, leur indice de réfraction est nettement supérieur aux milieux fluides.



EAU GLYCÉRINÉE

Il s'agit d'une solution aqueuse de glycérine pure, à 50 %.

C'est un de nos milieux préférés : non toxique, pas d'odeur, non corrosif, très facile à nettoyer.

GLYCÉRINE PURE & GLYCÉROL SPÉCIAL MICROSCOPIE

Ces deux produits sont particulièrement visqueux et ne sont destinés qu'à des observations particulières et limitées (spores), car leur viscosité importante rend toute dissociation très difficile, voire impossible. Pour information, le second mentionné remplace avantageusement l'huile d'immersion classique, s'avère beau-coup plus facile à nettoyer, et surtout, n'est pas dommageable pour les objectifs.

ACIDE LACTIQUE

L'acide lactique concentré est un regonflant très énergique des exsiccata. Son indice de réfraction assez élevé en fait un bon milieu d'observation pour de nombreux objets, et spécialement pour les spores. Sa viscosité présente l'inconvénient de rendre la dissociation difficile. Seul, il est relativement peu utilisé, mais il entre dans la composition de plusieurs milieux d'observation de très grande valeur, tels le lactophénol ou, mieux encore, le chloral-lactophénol et le lactoglycérol.

LACTOPHÉNOL DE AMANN

Le lactophénol est reconnu comme un très bon milieu d'observation. Son indice de réfraction assez élevé permet la réalisation de préparations très lisibles, mais sa viscosité importante rend la dissociation difficile, et ne leur confère qu'un faible contraste. Il est intéressant, notamment, pour laver les préparations réalisées dans le bleu de méthyle (bleu coton) au lactophénol. Le fond étant ainsi décoloré, le contraste s'en trouve amélioré, ce qui est toujours intéressant pour la microphotographie.

CHLORAL-LACTOPHÉNOL

C' est un liquide visqueux, homogène, transparent et incolore, résultant du mélange de trois substances : hydrate de chloral, phénol et acide lactique. Le chloral-lactophénol est un des meilleurs milieux d'observation qui soit. Il est supérieur au lactophénol parce que son indice de réfraction est supérieur et que la dissociation y est plus facile grâce à la présence d'hydrate de chloral, qui ramollit les structures. Son N élevé permet la réalisation de préparations très claires, où chaque membrane apparaît sous la forme d'un trait fin et unique. Il est particulièrement indiqué pour la mesure des éléments observés, bien que certains auteurs lui reprochent de gonfler trop fortement les cellules, ce qui altère un peu les données. 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 assez souvent de contraste.

Sa viscosité lui donne l'avantage de permettre la réalisation de préparations semi-permanentes (pouvant être conservées de quelques semaines à plusieurs mois, à condition de luter la LCO). De plus, il n'est pour ainsi dire pas volatile 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.

Un inconvénient relatif (à nos yeux) : la présence de phénol qui est un produit toxique (surtout lors d'expositions régulières et prolongées), nécessitant de travailler dans un local bien ventilé.

LACTOGLYCÉROL SELON CLÉMENÇON

C'est un mélange d'eau bidistillée, de glycérine pure et d'acide lactique concentré. G.H. Cléménçon le préconise pour l'observation de champignons aux hyphes à parois fines. Il est surtout moins toxique (pas de phénol) et moins corrosif que le précédent. Son N normal est d'environ 1,42.

Dans notre formule personnelle, nous avons remplacé la glycérine par le glycérol spécial microscopie, ce qui fait passer le N à +/- 1,49.

C'est maintenant notre milieu de prédilection, surtout qu'à long terme, il n'y a aucune évaporation ou rétraction. Il est très facile d'y faire disparaître, par chauffage, les ennemis jurés du microscopiste : les bulles d'air. Et le simple fait de luter au vernis à ongle, permet de transformer une bonne préparation extemporanée en une préparation semi-définitive, voire définitive.

Il s'utilise aussi bien sur du matériel frais que sur des exsiccata.

NOTRE TIERCE PERSONNEL :

1. Lactoglycérol

2. Eau glycinée

3. Chloral lactophénol



Les colorants ou réactifs indispensables

Basidiomycètes

Basides, cystides : rouge Congo SDS et ammoniacal, phloxine B, safranine, bleu de crésyl, melzer.

Ascomycètes

Asques et ascospores, paraphyses : bleu coton, bleu de crésyl, lugol.

Le montage de pièces non colorées dans des milieux définitifs colorés

Au fil du temps, et grâce aux conseils éclairés de notre ami Paul Leroy, nous avons accordé notre préférence à ces types de milieu qui présentent des avantages incontestables en mycologie microscopique :

- ++ Respect de la forme de pièces délicates.
- ++ Risque de surcoloration ou de saturation quasi nul.
- ++ Facilité d'emploi.
- ++ Pas de problèmes liés à la déshydratation car le solvant est l'eau.
- ++ Possibilité de faire disparaître les bulles éventuelles par la chaleur.

Après de multiples essais, notre choix s'est porté sur 4 milieux, dont le composant de base⁹ est le PVA lactique, phénolé ou non.

Il s'avère très difficile de bien doser le colorant brut si on travaille sur de petits volumes, inférieurs à 50 cc : une minuscule pointe de scalpel suffit. Il vaut mieux sous-colorer au départ. Passer à l'agitateur magnétique durant 6 h. minimum ; rectifier éventuellement avec quelques grains de colorant par la suite.



NOS PRÉFÉRENCES

- ++ PVALPh + fuschine acide : coloration du cytoplasme.
- ++ PVALPh + bleu d'aniline : idem.
- ++ PVA + rouge Congo : pas d'acide lactique, car cela noircit le RC : excellent colorant pariétal.
- ++ PVALPh + bleu de méthyle : tout en colorant surtout le contenu cellulaire, il a la particularité de teinter la paroi de la plupart des hyphes et spores, ce qui en fait un colorant d'usage général.

MODE OPÉRATOIRE

- Déposer une petite goutte de PVA coloré au centre de la LPO.
- Prélever un morceau de taille adaptée, de la pièce à conserver ; le passer dans de l'eau bidistillée et éponger ; le poser sur la goutte.
- Déposer une petite goutte de PVA coloré au centre d'une LCO.
- Retourner vivement la LCO et poser délicatement sur la LPO.
- Éliminer les éventuelles bulles d'air par la chaleur.
- Après quelques heures, luter au vernis à ongles.

⁹ Préparation du support, que nous appelons PVALPh : solution aqueuse de PVA à 15 % (préparée à chaud) → 56 cc ; acide lactique → 22 cc ; phénol en solution aqueuse saturée (84 g/l, à 20°C) → 22 cc.

Un protocole de travail personnel

Après avoir réalisé des milliers de préparations extemporanées, nous en sommes très vite arrivés à la conclusion que l'utilisation des colorants, (dès qu'il s'agit de sauvegarder des traces sous forme de photos ou de préparations définitives), constitue un exercice périlleux, car souvent, on arrive à une saturation très dommageable et difficile à corriger, sinon en appliquant une régression par l'acide chlorhydrique ou acétique très dilués, mais cette pratique est difficile à maîtriser dans le temps.

Nous avons vite opté pour les cuvettes à coloration dans lesquelles nous posons une goutte du colorant qui nous semble approprié, additionné de 5 gouttes d'eau. C'est l'occasion également de tester divers produits.



▲ Exemple illustré du traitement de CT dans *Polyporus brumalis*, traitées dans 6 colorants. La cuve 3 (RC SDS) indique que les coupes n'ont pas été suffisamment rincées, car elles ont noirci le colorant, à cause du fixateur acide (dont le RC est un révélateur).

MODE OPÉRATOIRE

- ++ Réaliser des coupes les plus fines possible (ou prélever un morceau de lame, selon le but recherché).
- ++ Les placer dans le fixateur AFA¹⁰ durant 1 à 2 heures.
- ++ Rincer soigneusement dans un bain aqueux pour neutraliser l'acide (y placer 2 ou 3 gouttes de potasse à 5 %, sinon le RC va noircir) ; puis appliquer 2 bains successifs à l'eau pure.
- ++ Entretemps, préparer les colorants dans les cuves (dilution 1/5) ; il sera encore temps par la suite d'ajouter un peu de colorant si la coloration vous semble trop claire.
- ++ Y plonger le matériel durant un temps +/- long, et contrôler de temps en temps la coloration, qui doit rester légère.
- ++ Rincer à l'eau courante (avec une pipette).
- ++ Observer dans l'eau glycinée, l'acide lactique ou l'hydrate de chloral (tous ces milieux ont un indice de réfraction supérieur à celui de l'eau).

¹⁰ Alcool formolé acétique de Locquin : éthanol à 80° (100 cc) + formol pur (10 cc) + acide acétique glacial (5 cc) + saccharose (10 cc) + eau bidistillée (20 cc) ; on peut utiliser une variante sans acide, avec 15 cc de formol au lieu de 10.

L'indispensable : le mycélium

C'est le nom qui est attribué à la partie végétative d'un champignon ou de certaines bactéries filamenteuses. Il est composé d'un ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, appelés hyphes, qui sont caractérisées par une croissance apicale rapide, et qu'on trouve dans le sol (ou le support de culture). Ces hyphes constituent également la chair des champignons charnus ; selon, les cas de figure, elles présentent des boucles de conjugaison.



Mycélium naissant sur feuilles de hêtre ▲ et mycélium d'*Agrocybe rivulosa*, qui envahit le mulch des parterres. ▲

LE MYCÉLIUM JOUE PLUSIEURS RÔLES ESSENTIELS DANS LA NATURE

++ Il sécrète des enzymes puissantes, qui lui permettent de décomposer la matière organique la plus dure, comme la cellulose ou la lignine du bois. Celles-ci brisent les chaînes de polymères et les dégradent en éléments plus simples (monomères).

++ Il vit en association étroite avec beaucoup d'espèces végétales (ectomycorhizes et endomycorhizes), et joue un rôle essentiel, voire vital, dans de nombreux écosystèmes, en contribuant par son action à la vigueur et la protection des plantes.

++ Il facilite l'absorption de l'eau et des nutriments chez la plante qu'il colonise ; en outre, il produit des substances chimiques assimilées à des antibiotiques, qui protègent son hôte des agressions microbiennes ou autres.

++ Il contribue à la dégradation et la décomposition de ce qu'on appelle la nécromasse, c'est-à-dire l'ensemble des organismes, animaux, végétaux ou fongiques, morts.



▲ Mycélium et rhizomorphes d'*Armillaria* sp. (photo G. Exbrayat).



▲ Un mycélium redoutable : les rhizomorphes d'*Armillaria mellea*, qui tue inexorablement son hôte.

Un champignon se reproduit par l'intermédiaire d'une spore ; celle-ci germe et donne naissance à un filament mycélien, dit haploïde (il contient n chromosomes) appelé **mycélium primaire**. Mais ce n'est pas suffisant ; il reste stérile. Il doit rencontrer un autre filament primaire de polarité opposée. Cette rencontre va générer un **mycélium secondaire** fertile, car porteur de cellules comptant deux noyaux (avec un bagage de $2n$ chromosomes). Les fils mycéliens se ramifient et divergent dans toutes les directions. Dans les meilleures des conditions, le mycélium va former un disque fertile sous la surface du substrat, ou sur celui-ci.

Le mycélium se nourrit, grandit, et accumule des réserves : c'est la partie souterraine de l'organisme ; dans certaines conditions climatiques peu favorables (selon la théorie du stress), un primordium va se développer et former un sporophore (partie visible du champignon) qui produira à son tour des spores ; et ainsi, le cycle reproducteur sera bouclé.



◀ Un rond de sorcière formé par *Pholiota gummosa*, sur un sous-sol chargé de déchets ligneux.

La durée de vie d'un sporophore est relativement brève : de quelques heures à quelques mois pour les Aphylophorales. En général, il persiste durant quelques jours. Par contre, la durée de vie de certains mycéliums est bien plus longue. Après fructification, ils ne disparaissent pas, mais continuent une forme de vie végétative, jusqu'à épuisement de toutes

les ressources du substrat ; face à des conditions défavorables, comme le froid, mais surtout la sécheresse, ils peuvent se mettre au repos durant des mois ou des années avant de fructifier à nouveau. Un mycélium croît toujours en longueur et en surface, afin d'augmenter au maximum ses capacités d'absorption.

Avec le temps, et la disparition des éléments nutritifs, la partie centrale se vide peu à peu de son contenu, et il ne subsiste alors qu'un anneau, à croissance centrifuge : c'est ce qui va générer les

fameux « ronds de sorcières », qu'on observe parfois en forêt (*Clitocybe nebularis* p. ex.) ou dans les prés (*Marasmius oreades*). Le mycélium enrichit le sol en azote, ce qui a pour conséquence que l'herbe paraît alors bien plus verte à l'intérieur du rond de sorcière.



▲ Une litière de pessière complètement envahie par *Mycena leptocephalo*.

Selon des sources bien informées, dans le Michigan (USA), des chercheurs ont découvert un mycélium qui occupe à lui seul une surface de 15 hectares, pèse plus de 100 tonnes et est âgé de plus de 1 500 ans.

En 2000, en Oregon, on a trouvé un mycélium d'*Armillaria ostoye*, mesurant 5,5 km de diamètre et s'étendant sur une superficie de 890 hectares ; il serait vieux de plus de 2 400 ans¹¹.



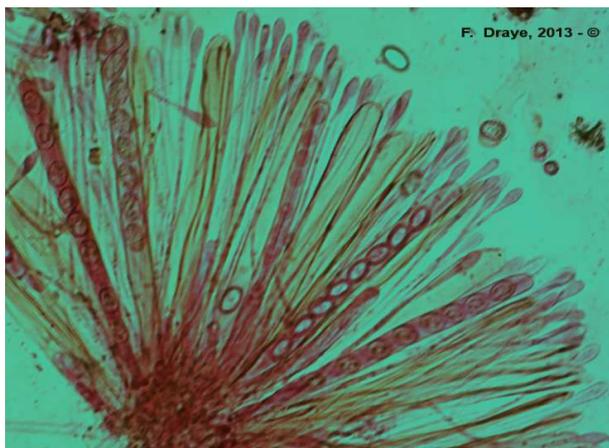
◀ Un mycélium poussant en ligne : *Cortinarius glaucopus*



▲ Un mycélium parasite de vieilles russules pourrissantes : *Microcollybia cookei*

¹¹ Canadian Journal of Forest Research, avril 2003

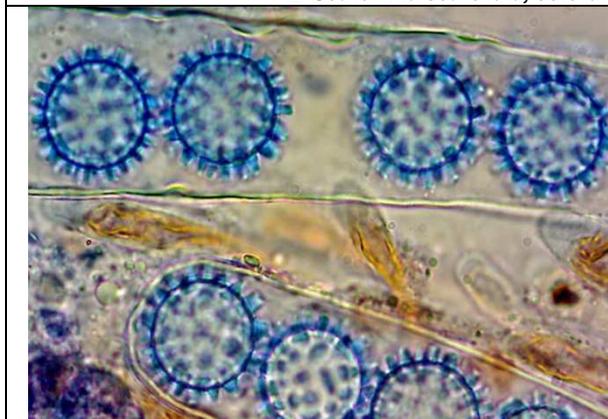
L'observation extemporanée des spores et, par extension, des éléments constitutifs de l'hyménium : asques et ascospores



Les Ascomycètes constituent une classe de champignons caractérisés par une surface hyméniale composée d'ASQUES et de PARAPHYSES. Les asques contiennent des ASCOSPORES, généralement au nombre de 8, mais parfois d'un multiple important (jusqu'à 256). Les paraphyses jouent un rôle de « remplissage » des espaces entre les asques, et peuvent présenter des formes variées qui seront utilisées pour la détermination.



▲ *Scutellinia scutellata*, coloration au bleu coton et à la phloxine B.



▲ *Scutellinia trechispora* (photo F. Valade)



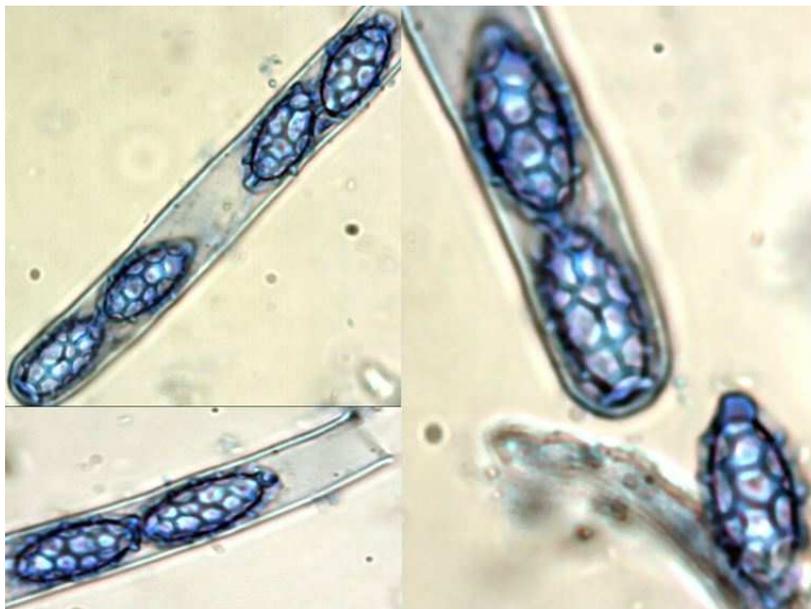
▲ *Peziza vaccini* (photo F. Valade)



▲ *Ascobolus brassicae* (photo D. Ghyselinck)



▲ *Ascobolus foliicola* (photo D. Ghyselinck)



◀ Ascospores à réseau d'*Aleuria aurantia*, colorées au bleu de crésyl.

Ces spores d'assez bonne taille (14-15 x 9-10 µm) constituent un matériel de travail idéal pour étudier les Ascomycètes, car cette espèce est relativement commune et facile à déterminer.

L'ornementation est mise en évidence avec différents types de bleus : crésyl, méthyle, toluidine, ou tout autre colorant pariétal.

Elles sont libérées des asques à maturité, par rupture de l'extrémité apicale (visible en bas, à gauche). Cependant, il est intéressant de constater que durant la phase de ma-

turation, l'ornementation est absente, et on y distingue nettement 2 grandes vacuoles.

Les paraphyses (éléments de « remplissage » constituant la chair) contiennent quantité de grains de carotène, qui donnent cette belle couleur orangée. ▼



Les basides

La baside est l'élément indispensable de reproduction de nombre de champignons, qu'on a regroupés dans la division des *Basidiomycota*. La plupart d'entre eux ont un hyménium constitué de lames (Agaricales) ou de tubes (Boletales, Aphyllophorales).



◀ *Russula trachyspora*, avec basides tétrasporiques et cystides mucronées.

Les *Basidiomycota* présentent des hyphes cloisonnées (septées) ; chaque cellule de l'hyphe contient un ou 2 noyaux au maximum ; les spores sont générées par des **basides** et portées par des **stérigmates** (très souvent au nombre de 4 (tétrasporidie) plus rarement de 2 (bisporidie)). On parlera de basides bi- ou tétrasporiques.

Il n'y a pas d'acte sexuel sur le mycélium. Des **basidiospores** de polarité différente émettent chacune un **mycélium primaire** ; ces mycéliums se rencontrent et, s'ils sont compatibles, forment un **mycélium secondaire**, où chaque cellule contient 2 noyaux qui ne fusionnent pas.

Ce mycélium secondaire va générer une fructification appelée **sporophore** ; c'est ce qui est appelé à tort « champignon » par la majorité des gens.

Ce sporophore est constitué d'hyphes à 2 noyaux ; une partie d'entre elles va se spécialiser en un **hyménophore** (hyménium) formé de lames, de tubes, d'aiguillons ou de plis lamelliformes, qui vont produire des basides. Dans la baside va s'opérer la fusion des noyaux pour ensuite, par une division rapide, donner des basidiospores à un noyau. Et le cycle sexuel peut ainsi recommencer.



Baside 4-sporique, avec 4 stérigmates et 4 basidiospores naissantes ▲

Division des Basidiomycota (spores portées par des basides)	classe	Sous-classe	ordre
	Ustilaginomycètes (=Teliomycètes) → Charbons		Ustilaginales, Urocystales
	Urédiniomycètes (=Teliomycètes) → Rouilles	Urediniomycetidae	Uredinales
		Microbotryomycetidae	
	Hétéro- ou Phragmobasidiomycètes (basides cloisonnées ; spores secondaires)		Auriculariales, Tremellales
	Groupes de transition (basides incomplètement cloisonnées ; spores secondaires)		Exobasidiales, Dacrymycetales, Syzygosporales
	Holo- ou Homobasidiomycètes (homobaside ; pas de spores secondaires)	Aphyllophoromycetidae (hyménophore continu avec la chair)	Corticiales, Polyporales, Ganodermatales, Cantharellales, Clavariales, Hymenochaetales, Telephorales, Hericiales
		Gasteromycetidae (hyménophore interne = gléba)	Hymenogastreales, Melanogastreales, Lycoperdales, Sclerodermatales, Tulostomatales, Nidulariales, Hysterangiales, Phallales
		Agaricomycetidae (hyménophore différencié de la chair)	Tricholomatales, Agaricales, Amanitales, Pluteales, Entolomatales, Cortinariales, Russulales, Boletales



Dissociation de l'hyménium d'*Inocybe piriodora* ▶

Bolbitius titubans (= *vitellinus*): basides 4-sporiques ▼

◀ Basides & basidioles chez *Xerocomus ferrugineus*



M. Lecomte - 2013 ©



M. Lecomte - 2013 ©



▲ Baside bisporique chez *Bolbitius titubans* ▲
avec les 2 stérigmates bien visibles.



▲ Baside tétrasporique chez *Coprinus disseminatus*.

Les cystides

Elles présentent des formes très différentes et caractéristiques, qui peuvent fortement aider à la détermination. Depuis quelques dizaines d'années, une pléiade d'auteurs leur a attribué nombre d'appellations selon leur situation¹² et leur rôle supposé. On se retrouve devant un imbroglio de termes parfois incompréhensibles (voir le tri effectué à ce sujet par H.G. Cléménçon¹³).



▲ Cystides en tire-bouchon chez *Hemimycena tortuosa*



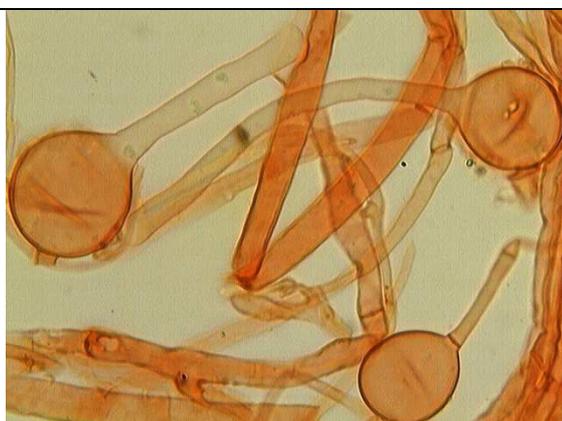
▲ *Inocybe gausapata*, avec lamprocystides ornées de cristaux (colorer avec le réactif de Bailenger).



▲ *Russula trachyspora*, avec cystide mucronée.



▲ Cheilocystides capitées de *Galerina clavata* (J. Pellicani).



▲ Caulocystides sphéropédonculées de *Coprinellus domesticus* (J. Pellicani).

¹² Les cystides portent nombre d'appellations, selon leur positionnement : pleurocystides (situées sur la face des lames), cheilocystides (situées à l'extrémité des lames), piléo ou dermatocystides (situées sur la cuticule), caulocystides (situées sur le pied).

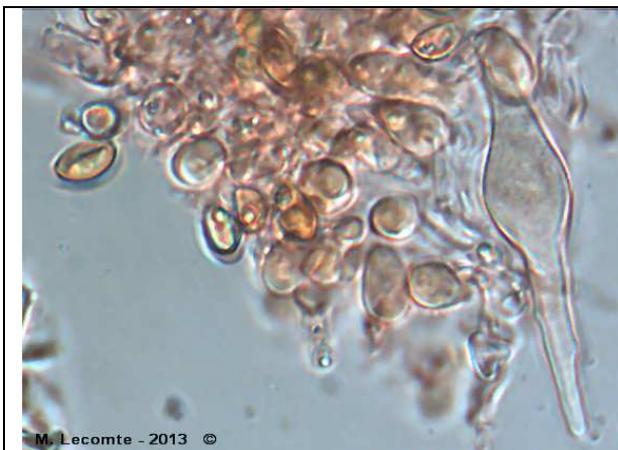
¹³ CLÉMENÇON H.G., 2004 - *Citology and Plectology of the Hymenomycetes*, Berlin, Cramer, 230-232.



▲ Cystide lécythiforme (en bouchon de carafe) de *Conocybe subovalis*



▲ Piléocystides cuticulaires de *Pluteus hispidulus* var. *hispidulus*



M. Lecomte - 2013 ©



F. Draye, 2013 - ©

▲ Cheilocystides chez *Agrocybe arvalis* ▲



M. Lecomte 2013 ©



F. Draye, 2013 - ©

▲ Pleurocystides chez *Agrocybe arvalis* ▲



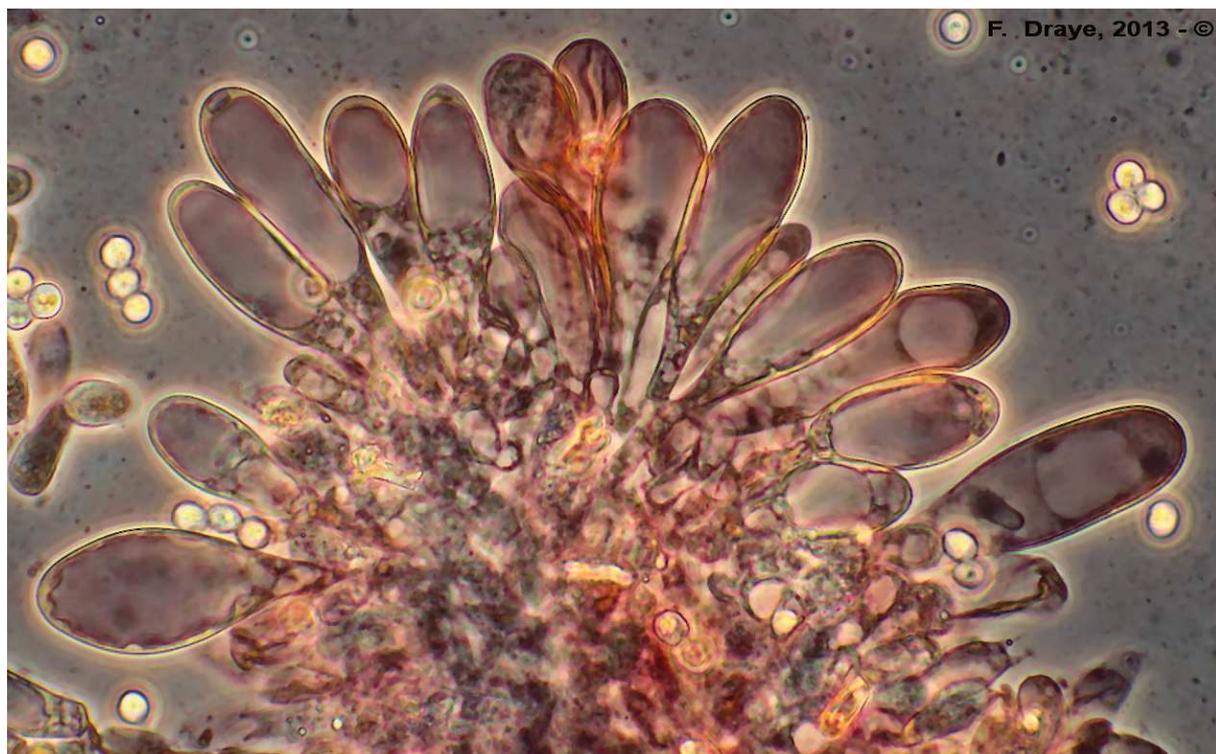
F. Draye, 2013 - ©

▲ Cystide en forme de bouteille chez *Inocybe calospora*

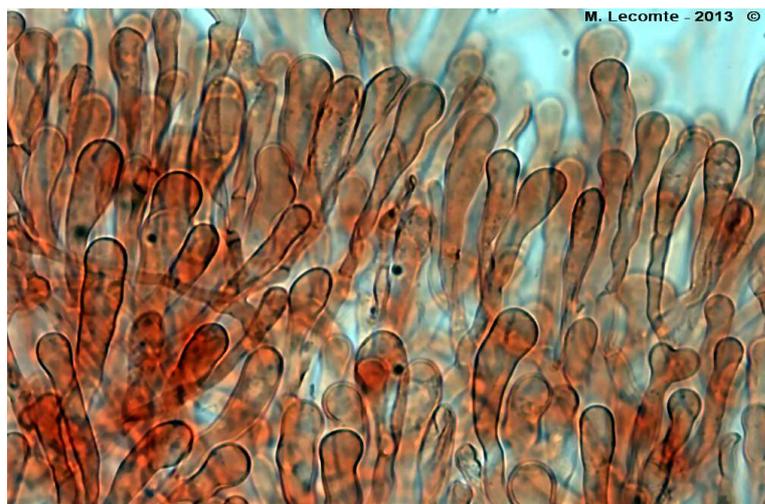


M. Lecomte - 2013 ©

▲ Cystide à crochets chez *Pluteus cervinus*



▲ Cheilocystides chez *Pluteus hispidulus* var. *hispidulus* ▲



◀ Pilécystides (sur la cuticule) chez *Bolbitius vitellinus*

Chrysocystides chez *Hypholoma fasciculare* ▼

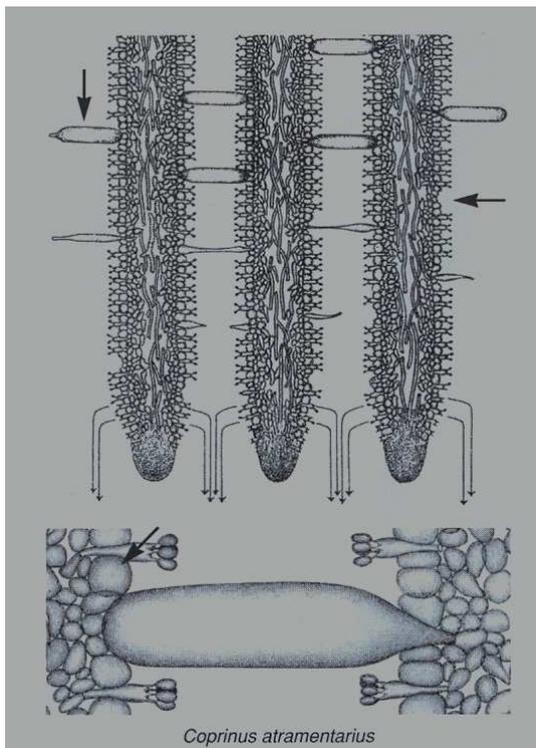
Les chrysocystides, au sens restreint de Romagnesi, sont typiques des *Hypholoma*, et ce terme a été étendu aux *Stropharia* et aux *Pholiota*.

Elles contiennent au sein d'une vacuole une, voire plusieurs masses fortement réfringentes, qu'on peut colorer facilement au bleu coton. Ces masses deviennent naturellement jaunâtres avec l'âge, mais ce jaunissement est exacerbé en présence de solutions alcalines bien dosées (soude, potasse, ammoniac).

L'expérience montre qu'il est beaucoup plus facile de les mettre en évidence sur des exemplaires relativement âgés.



Une découverte : les cystides jointives de certains *Coprinus*

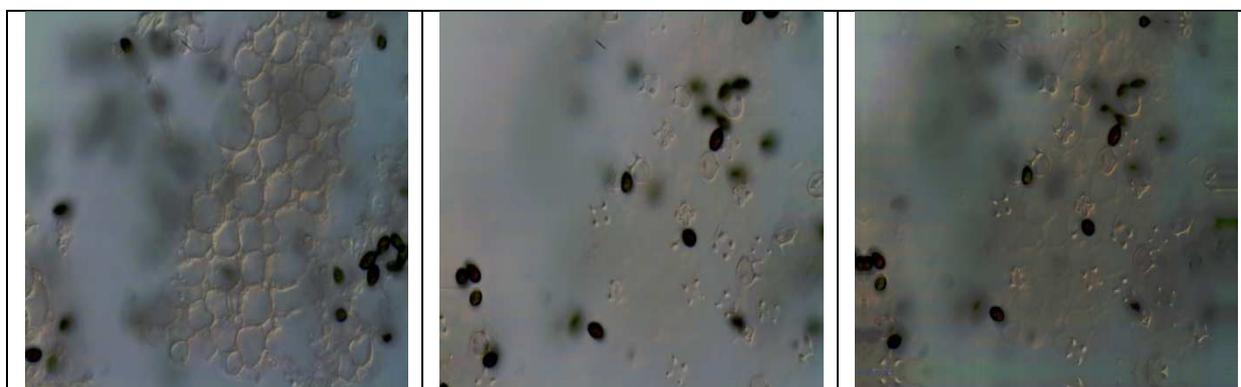


Décidément, le livre de Cléménçon (2004 - croquis ci-joint) est vraiment très riche en enseignements et en découvertes. Il nous aura fallu sa lecture pour apprendre l'existence de ce qu'il qualifie de « trabecular cystidia », que nous n'avons pu traduire que par « cystides trabéculaires », car nous n'en avons trouvé mention nulle part ailleurs, auparavant (et pourtant, Micheli les a mentionnées pour la 1^{ère} fois en 1729).

Il s'agit de cystides de grande taille (jusque 200 µm), incolores, profondément ancrées dans l'hyménium et qui jouent un rôle de stabilisation, en maintenant un alignement correct et géométrique des lames, un peu comme des entretoises ; cela permet d'éviter qu'elles se collapsent. On les rencontre chez les exemplaires jeunes, et dans la partie apicale du chapeau. Elles s'étiolent et finissent par disparaître, lorsqu'on progresse vers l'arête des lames.

Il n'est pas facile de les mettre en évidence, et quasi impossible de les observer in situ, car le moindre prélèvement suffit à les détacher de leurs supports. Une coloration au RC est intéressante, mais nous préférons les contraster avec de la nigrosine.

Nous en avons observé chez *C. micaceus*, *C. atramentarius*, *C. cinereus* ...et elles doivent être recherchées chez toutes les espèces rencontrées.



Des éléments particuliers chez *Coprinus atramentarius* ; les pseudoparaphyses concaves (photo de gauche) qui entourent les basides tétrasporiques (photos centrale et à droite) – nous avons pu mettre en évidence les différents éléments, sur la même préparation, en faisant passer la mise au point du plan inférieur au plan supérieur, où on distingue nettement les extrémités des 4 stérigmates de chaque baside.

Des cellules particulières



▲ Les sphérocytes de l'anneau d'*Amanita citrina*



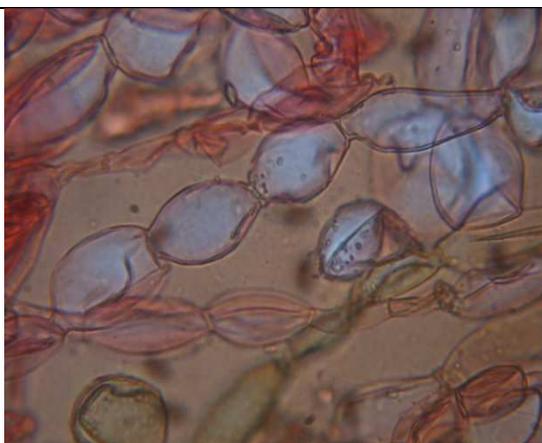
▲ Les sphérocytes du voile d'*Amanita rubescens*



▲ Trame de l'anneau d'*Amanita muscaria*



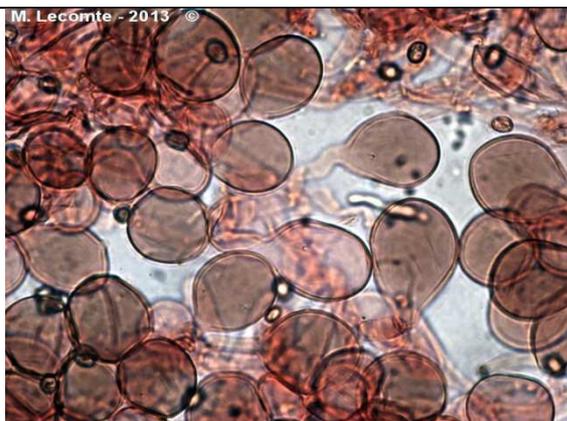
▲ Cellules des flocons cuticulaires d'*Amanita muscaria*



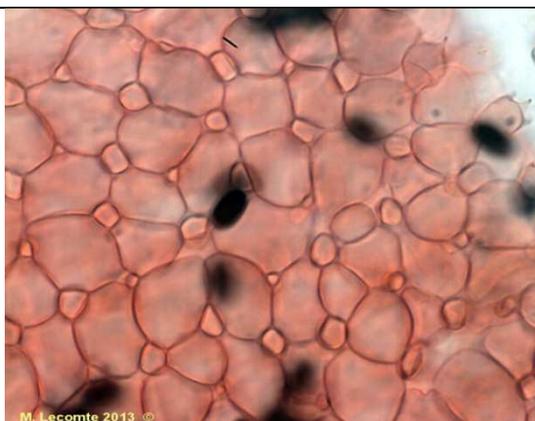
▲ Voile pileïque de *Coprinellus domesticus* (J. Pellicani)



Les sphérocytes de la chair de *Russula emetica*



Cuticule cellulodermique de *Lepiota* sp.



Pseudoparaphyses concaves de *Coprinus atramentarius*

Les frottis mycologiques : spores et conidies

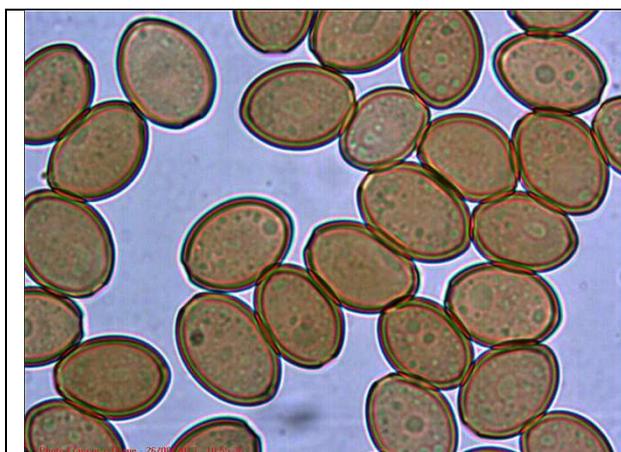
La photographie des spores s'avère peu facile lorsqu'on travaille sur un prélèvement d'un bout de lame ; même si les résultats sont parfois excellents (voir page suivante), on doit souvent faire face à des inconvénients importants, avec notamment un fond d'image encombré, ne privilégiant pas le contraste, et mettant en évidence le manque de profondeur de champ, typique des objectifs puissants. Aussi, nous conseillons vivement d'utiliser un échantillon de sporée, qui va permettre, avec un peu de méthode, de travailler dans un seul plan.



▲ *Agrocyste rivulosa*



▲ *Conocyste subovalis*



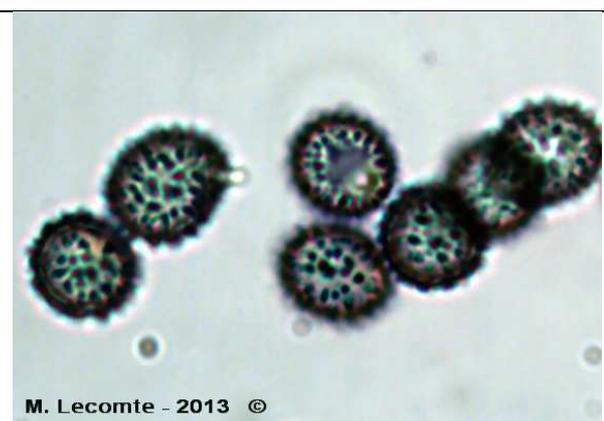
▲ *Agrocyste pediades*



▲ *Inocyste calospora*



▲ *Entoloma lividum*

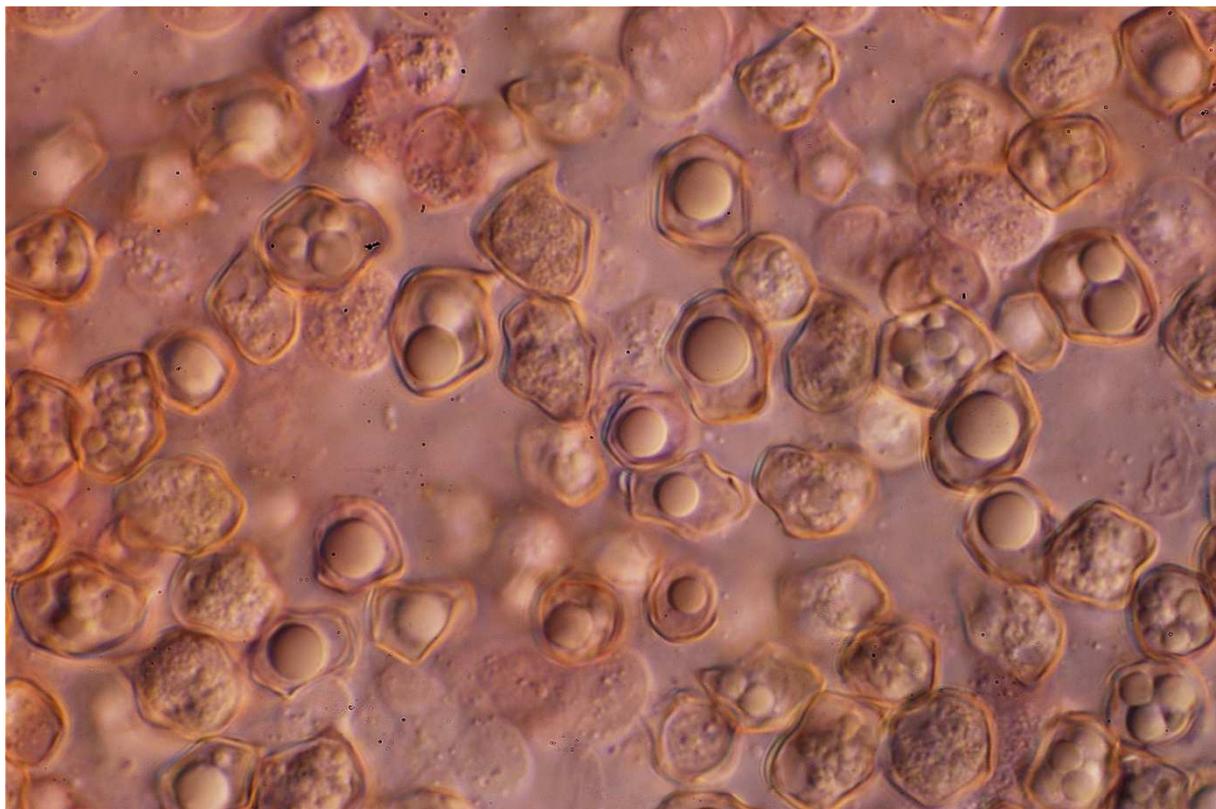


▲ *Russula faginea*

Personnellement, nous travaillons volontiers sur des frottis fixés à l'eau albuminée, avec comme inconvénient que les colorants ou réactifs peuvent colorer les particules d'albumine. Pour des spores colorées, nous les plaçons directement dans un milieu assez visqueux, comme l'eau glycinée (50/50), l'acide lactique ou l'hydrate de chloral, voire le PVA ou le glycérol.

Il nous paraît très intéressant de mentionner la technique du « papier collant », sur lequel spores (ou conidies) vont adhérer par pression contrôlée, en une seule couche. Découper un carré de 5 x 5 mm dans le prélèvement, poser sur une LPO, colorer, poser une LCO et observer ; c'est excellent pour des préparations extemporanées, mais peu conseillé pour des préparations définitives, car le papier collant jaunit et devient opaque.

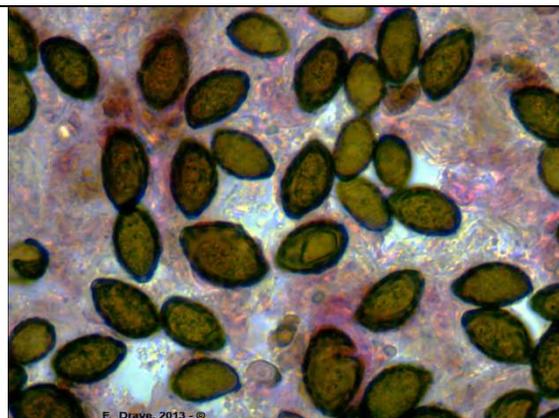
Spores & conidies observées directement sur le tissu hyménial



▲ Spores d'*Entoloma sericellum* observées en DIC dans le RC (Joserra Undagoitia) ▲



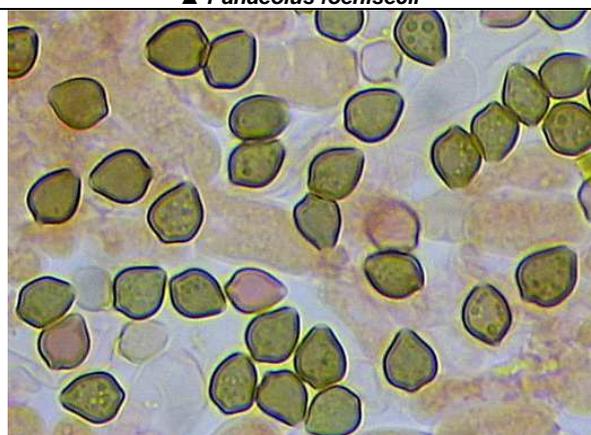
▲ *Russula trachyspora* dans le melzer



▲ *Panaeolus foenicij*



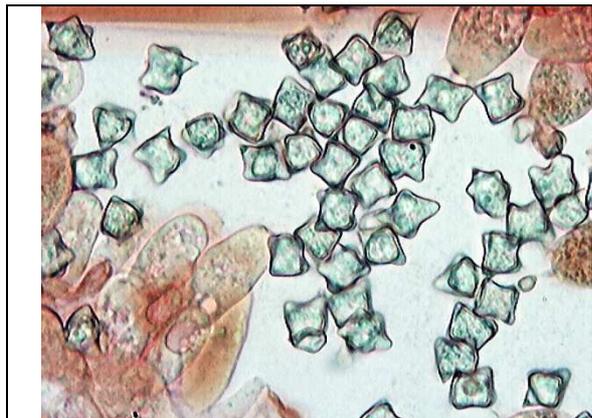
▲ *Leccinum pulchrum*, double coloration (RC + phlox. B)



▲ *Psilocybe phyllogena* (photo D. Ghyselinck)

La photographie des spores s'avère peu facile lorsqu'on travaille sur une dissociation ; cela demande beaucoup de soin, et les résultats sont souvent décourageants, en raison d'un arrière-plan empêchant

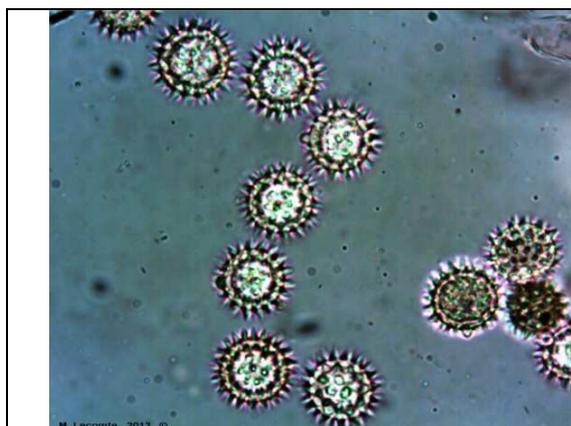
un bon contraste, et la présence d'éléments se situant souvent sur des plans différents. C'est pourquoi nous conseillons de travailler sur une sporée, chaque fois que cela s'avère possible.



▲ *Entoloma conferendum* (J. Pellicani)



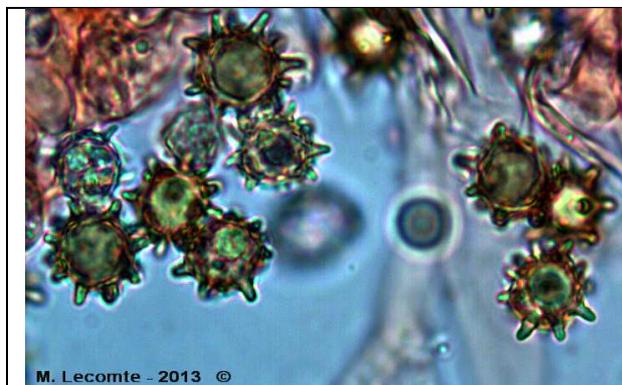
▲ *Agrocybe arvalis*



M. Lecomte - 2013 ©



Laccaria tortilis (J. Pellicani) ▲



M. Lecomte - 2013 ©

▲ *Inocybe calospora*



M. Lecomte - 2013 ©

▲ *Inocybe margaritispora*



F. Draye, 2013 - ©

▲ *Psathyrella pseudogracilis*

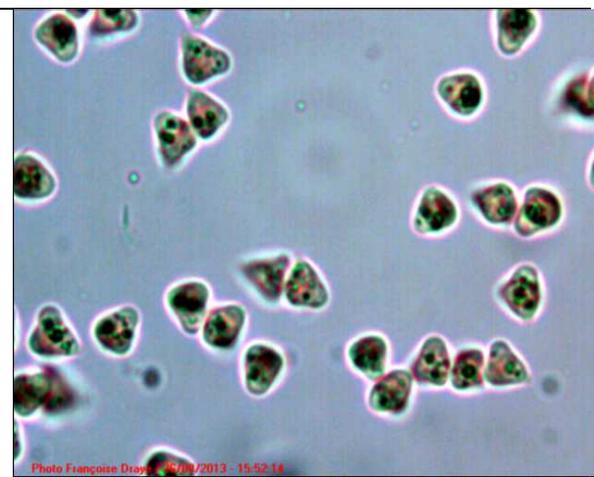
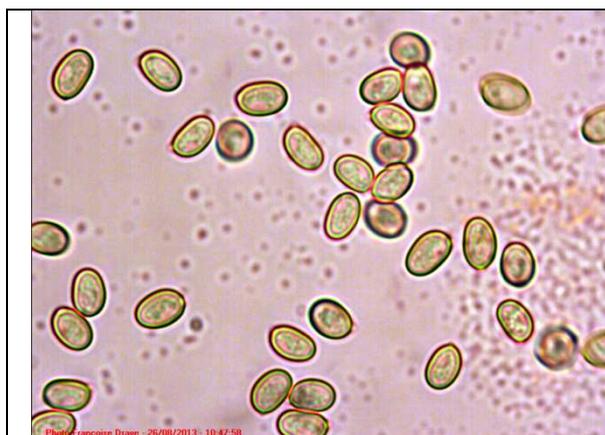
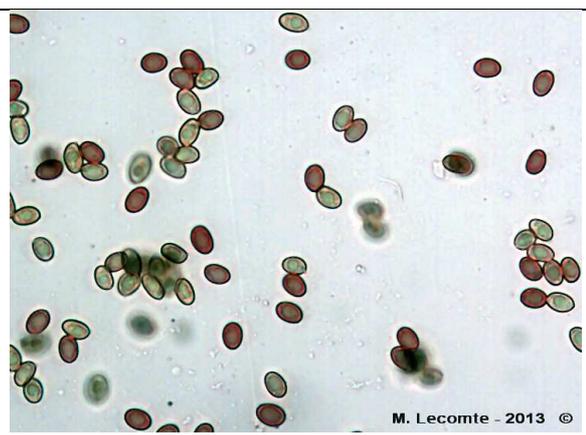
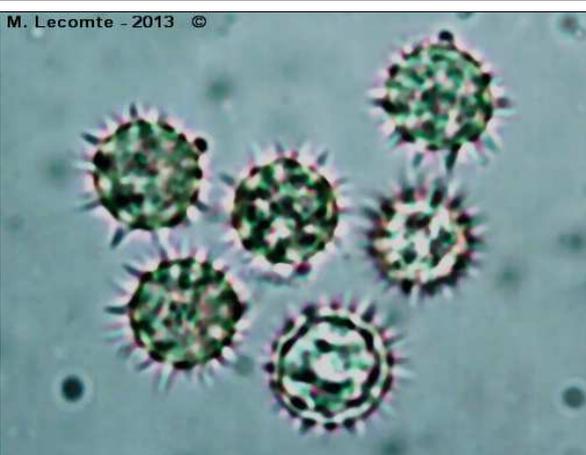
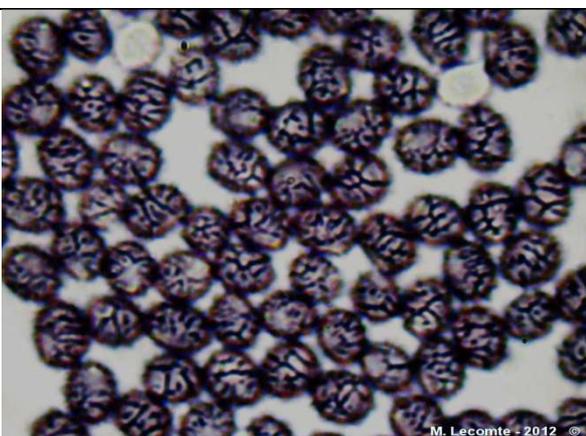
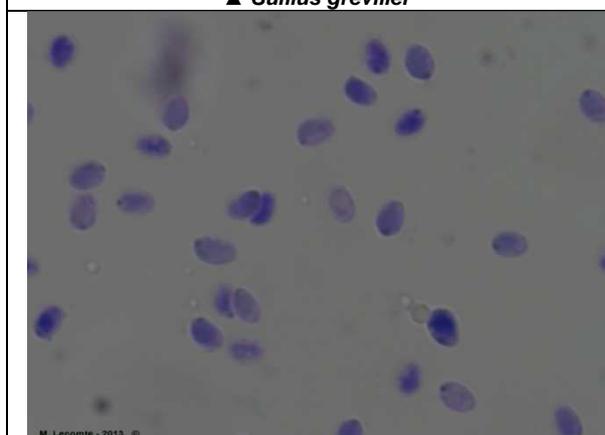


Photo Françoise Draye - 25/08/2013 - 15:52:14

▲ *Sistotrema subtrigonospermum*

▲ *Paxillus atrotomentosus*▲ *Paxillus involutus*▲ *Inocybe piriodora*▲ *Laccaria proxima*▲ *Suillus grevillei*▲ *Lactarius hepaticus*

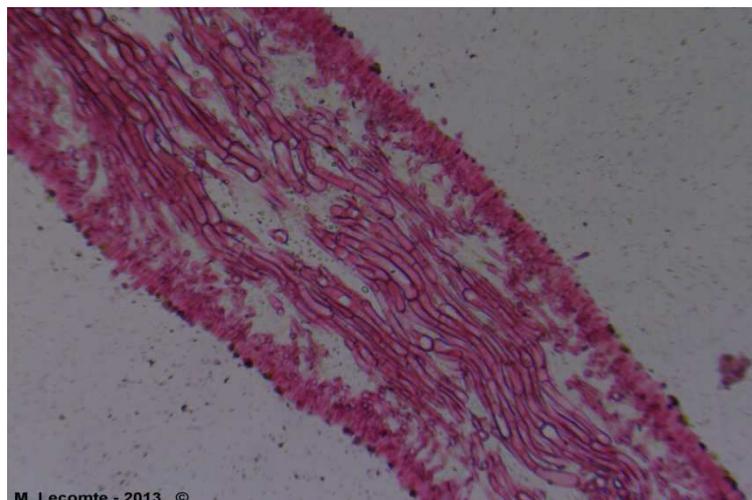
Clitocybe sp. - observation dans le bleu de crésyl - spores très petites (4-5 µm de long).



Spores de *Coprinus atramentarius*, observées dans la nigrosine (produit de contraste).

La trame des lames de certains Basidiomycètes

L'étude de la structure de la trame hyméniale chez les Basidiomycètes à lames s'avère très intéressante pour différencier certains genres. Les cas de figure suivants sont à envisager :

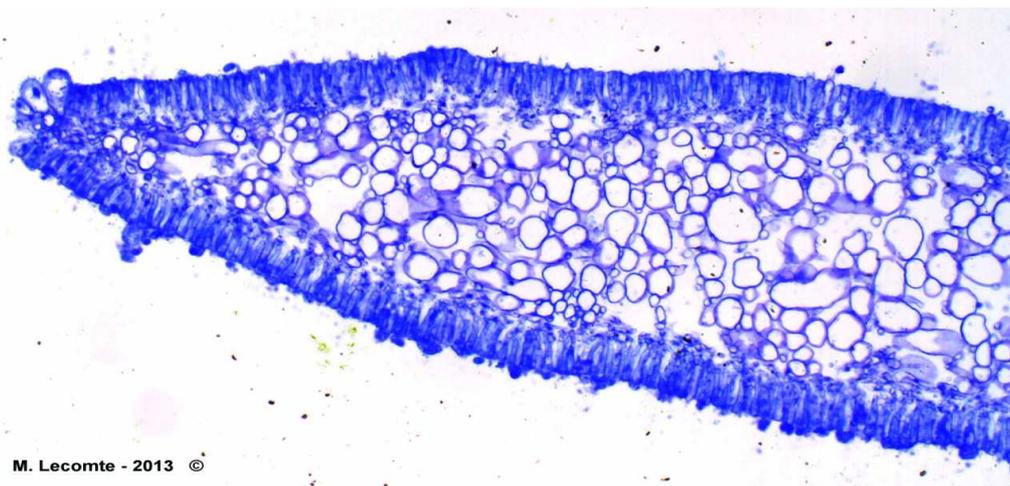


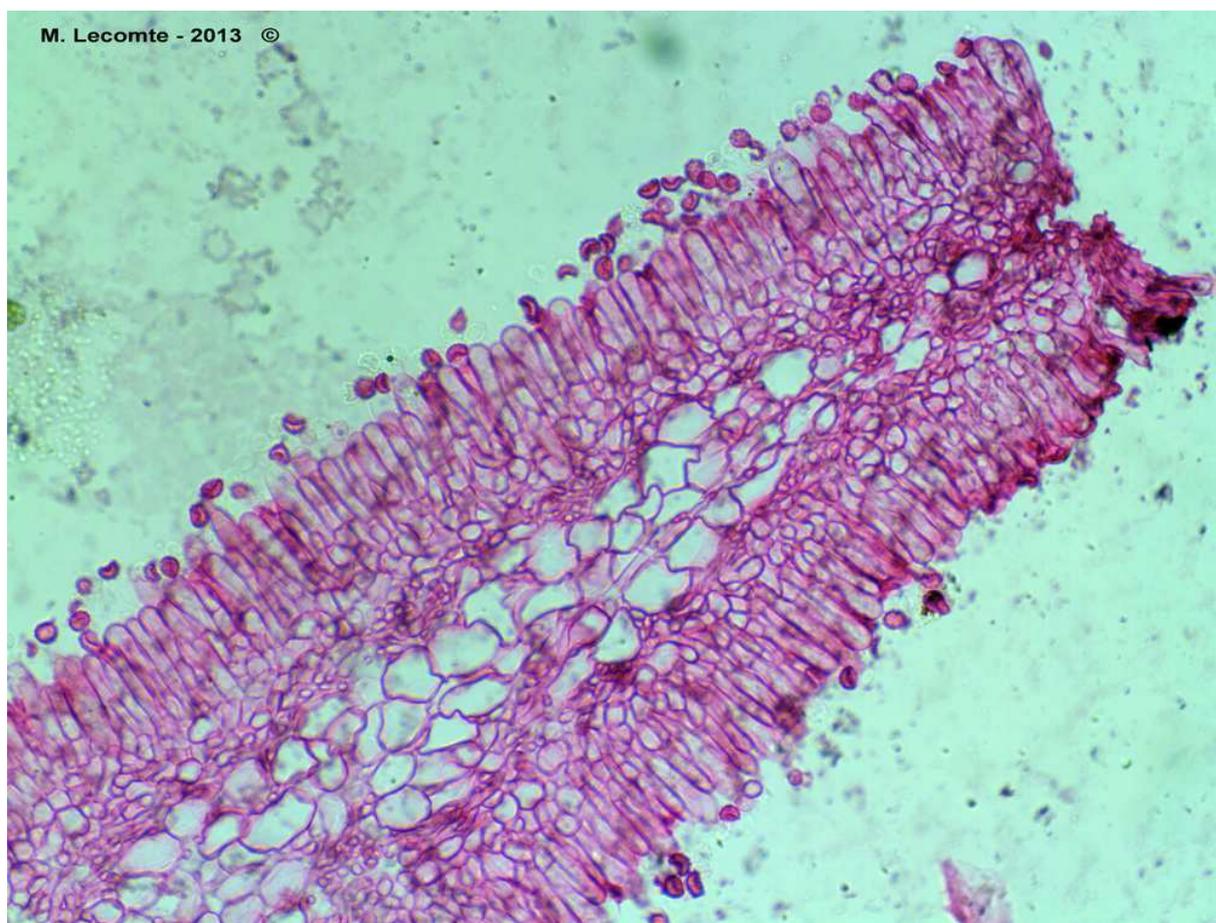
La trame est cassante (ici, *Mycena metata*).

▲ La **STRUCTURE BILATÉRALE** : au départ de l'axe de la lame, les hyphes s'écartent en éventail oblique, vers la bordure, un peu comme l'ensemble des arêtes d'un poisson (ici, *Pluteus cinereofuscus*).

◀ La **STRUCTURE PARALLÈLE** ou **RÉGULIÈRE** : les hyphes sont parallèles entre elles, suivant l'axe et le bord de la lame (ici, *Tubaria hiemalis*).

▼ La **STRUCTURE À SPHÉROCYTES** : les cellules constitutives sont de forme ovale à arrondie, et confèrent à la chair un aspect nettement cassant (ici, *Mycena metata*).





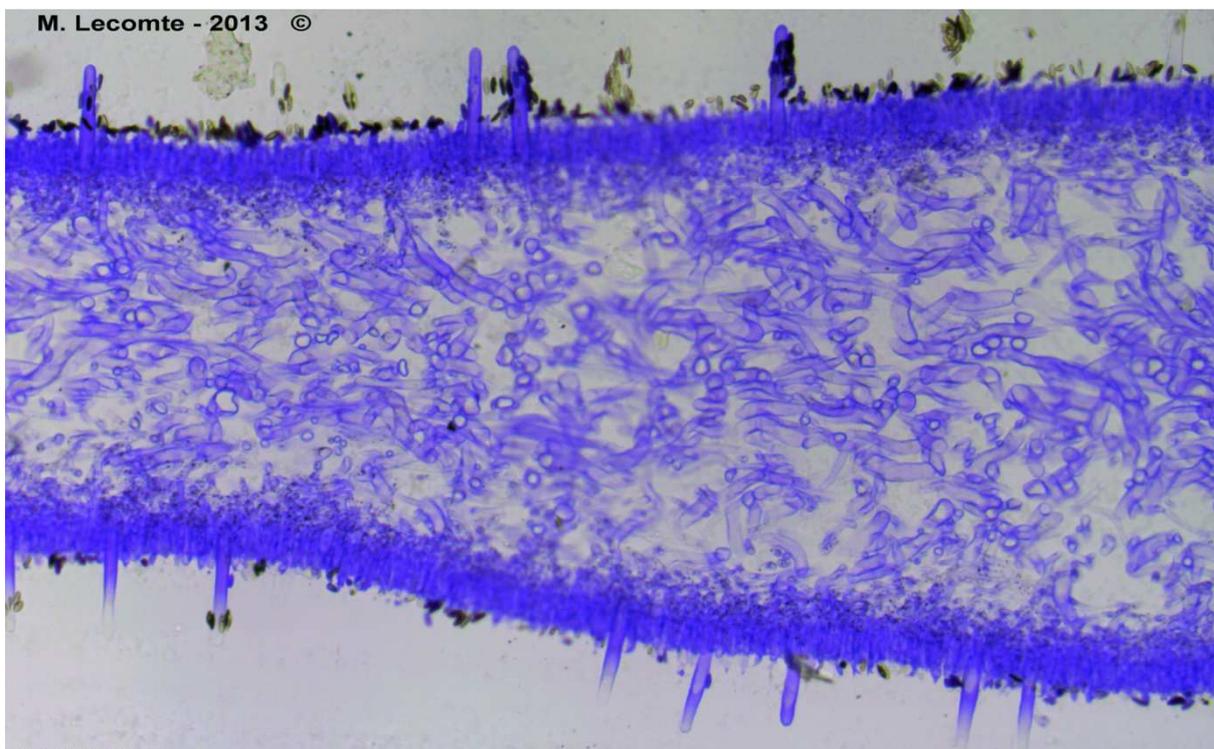
La structure à sphérocytes est bien visible chez les Russules (▲ ici, *Russula ionochlora*). Par contre, chez les lactaires, il n'y a pas de sphérocytes dans la trame des lames, mais uniquement des hyphes et des laticifères (▼ ici, *Lactarius blennius*).





M. Lecomte - 2013 ©

La **STRUCTURE EMMÊLÉE** : les hyphes sont +/- enchevêtrées et sont disposées sans ordre apparent, partant dans toutes les directions (▲ *Psathyrella spadiceogrisea* & *Chroogomphus ochraceus* ▼).



M. Lecomte - 2013 ©

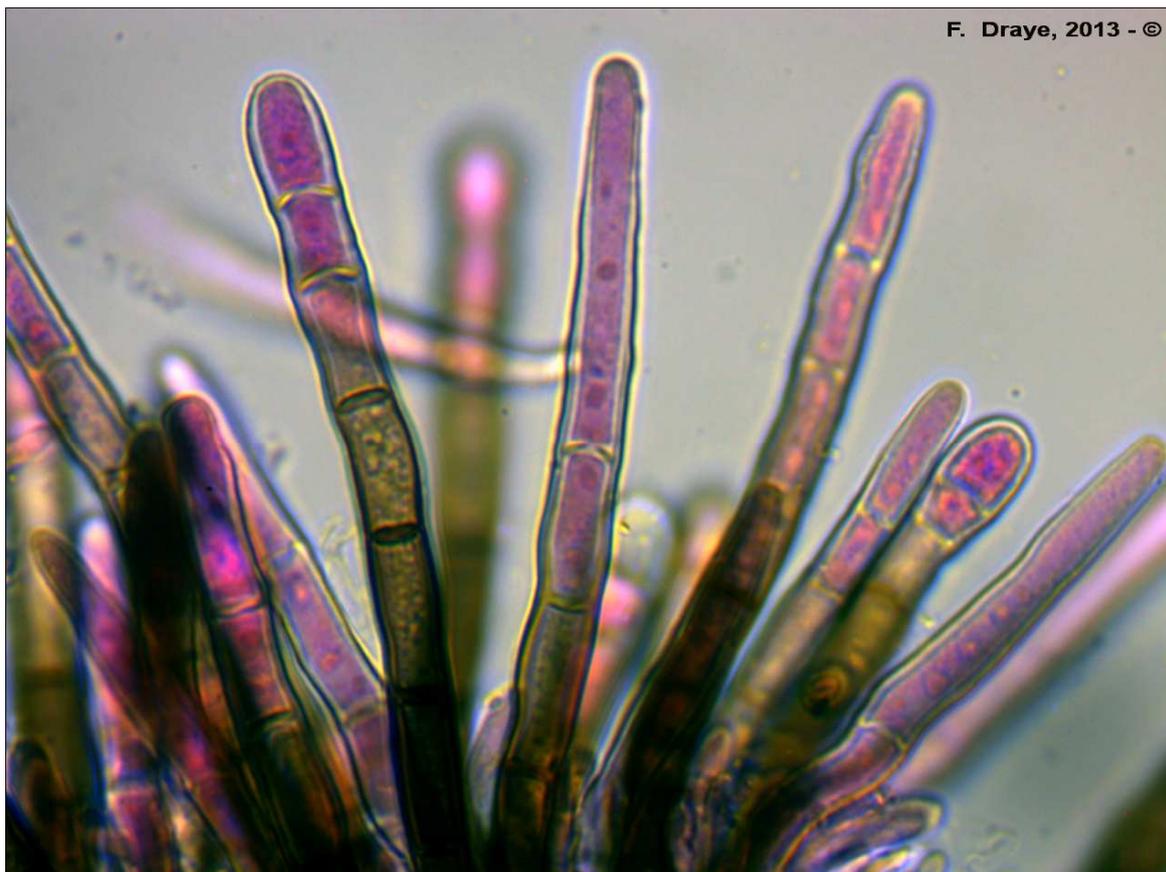
Dans la **STRUCTURE INVERSÉE BILATÉRALE**, les hyphes semblent prendre naissance au bord de la lame et convergent vers l'axe et le sommet de celle-ci.

Ce sont là les 5 types classiques de trames décrites par nombre d'auteurs.

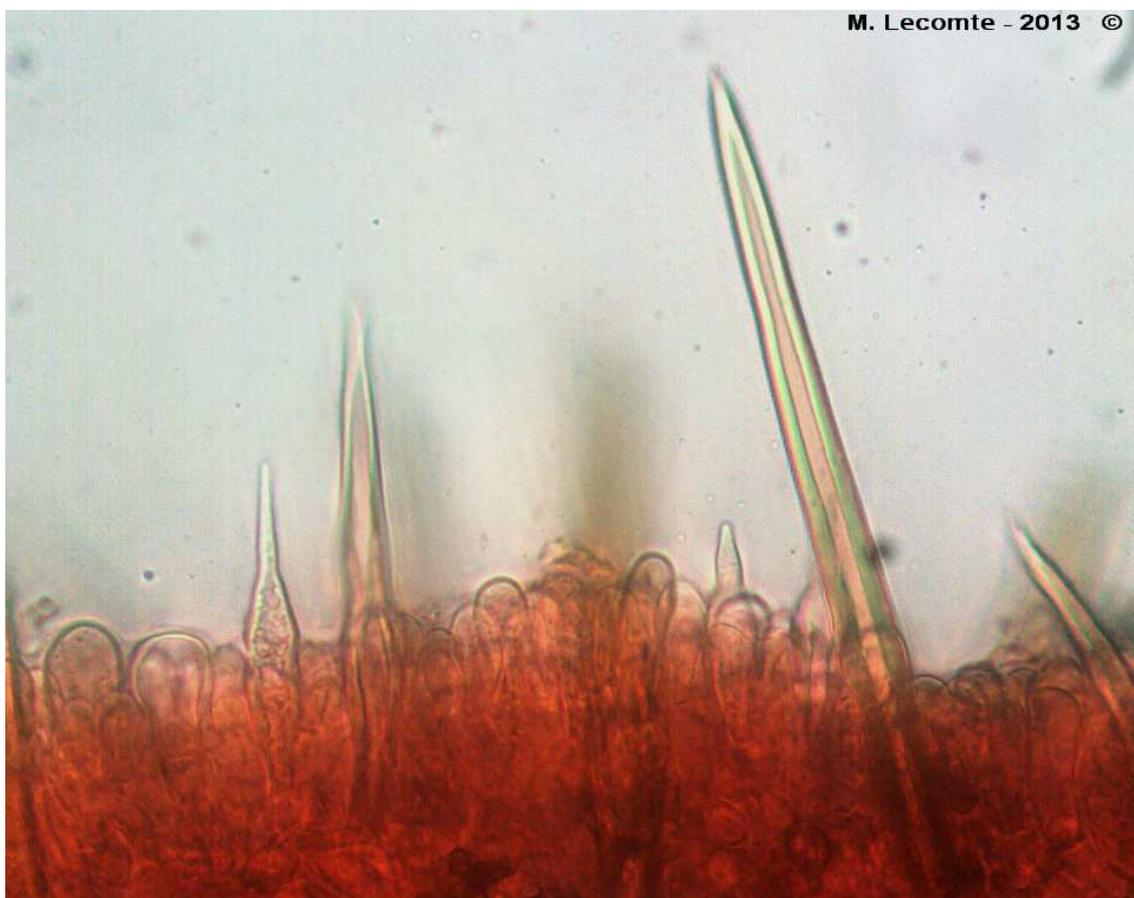
Cependant, H. Cléménçon et son équipe¹⁴, que nous considérons comme notre référence absolue en matière de microscopie mycologique, décrivent 12 types de structure pour la trame hyménophorale, qui nous semblent plus proches de la réalité, en décrivant des trames intermédiaires des classiques habituelles. Certains trouvent là matière à critique, mais « La critique est aisée, seul l'art est difficile ! » : chacun est libre d'adhérer ou non à cette vision plus réaliste, et bien illustrée.

¹⁴ « *Citology and Plectology of the Hyménomycètes* », 2012, 2nd revised edition, p. 323.

Les poils cuticulaires

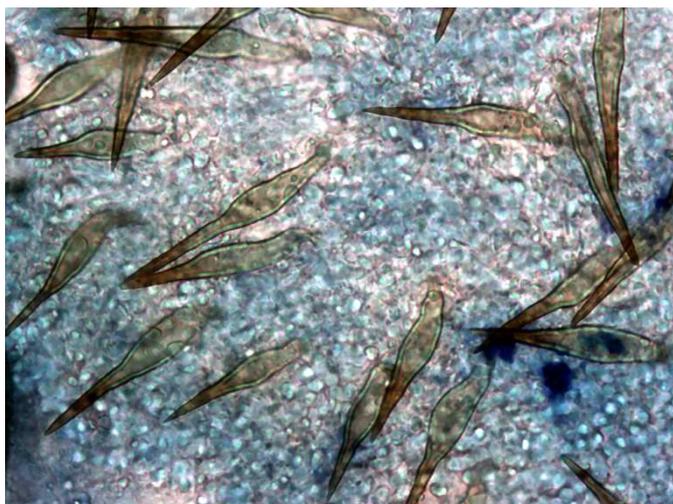


▲ Poils de *Dasyscyphus nidulus*, sur sceau de Salomon (*Polygonatum multiflorum*) ▲



▲ Piléocystides et poils cuticulaires chez *Xerula pudens* ▲

Les sétules hyménales



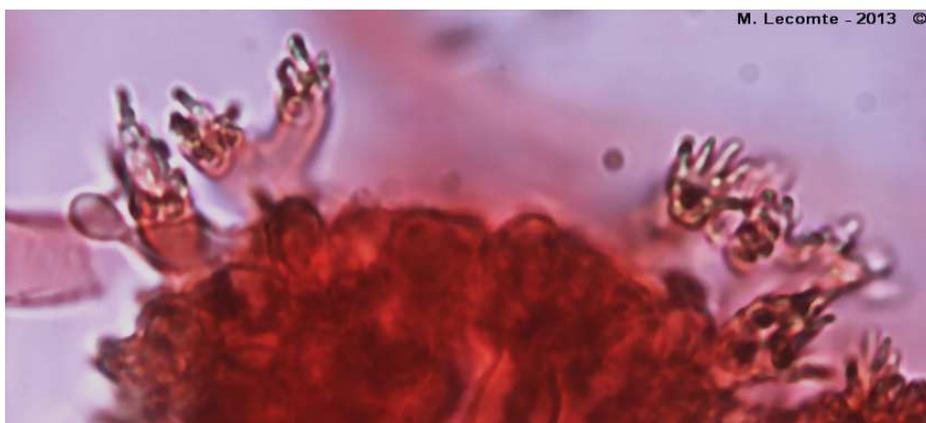
Chez *Marasmius cohaerens*, les sétules (petites soies) sont nombreuses sur les faces et sur l'arête des lames, et mesurent jusqu'à 100 μm de long ; elles sont généralement jaunâtres, à paroi épaisse, et on peut les colorer facilement dans le bleu de crésyl ou le RC SDS. A l'usage, on constate que leur fréquence est très variable selon les récoltes.



Sétules chez *Marasmius cohaerens* ▲ ▼ ►



M. Lecomte - 2013 ©



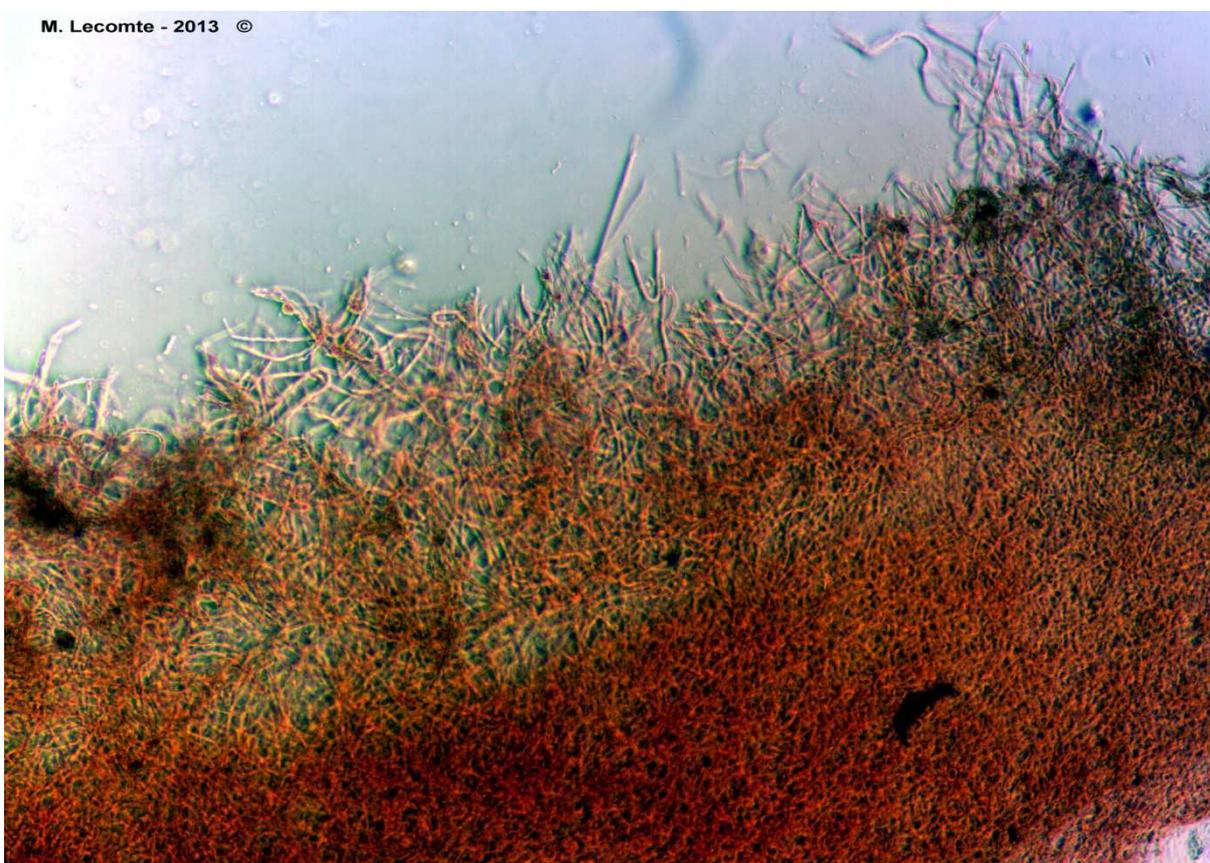
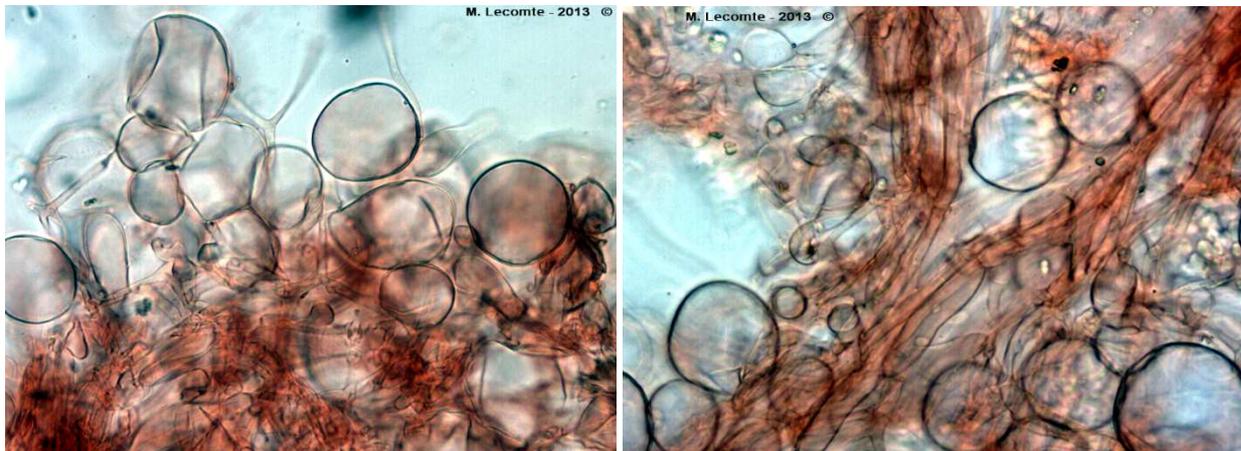
M. Lecomte - 2013 ©

L'épicutis de ce champignon se différencie de la normale par la présence de cellules en brosse, présentant des diverticules assez longs, souvent digités.

Les cuticules

L'étude de la cuticule des Basidiomycètes à pied va s'avérer particulièrement intéressante pour la détermination d'une section ou d'un genre, et pas seulement chez les Russulales.

▼ Mélange de sphérocytes et d'hyphes dans la cuticule de *Cystolepiota seminuda* ▼



▲ Cuticule trichodermique (chevelu dense d'hyphes qui donnent une sensation de velours) posée sur un lit d'hyphes étroitement entremêlées, chez *Paxillus involutus*.

◀ Cuticule trichodermique chez *Ganoderma applanatum*.

Nous avons expérimenté nombre de techniques destinées à mettre en évidence la trame d'une cuticule de Basidiomycète, avec souvent l'insuccès et la déception à la clé. Seules les coupes réalisées selon la technique de Cléménçon, après inclusion dans de la résine synthétique nous ont apporté une réelle satisfaction par leur qualité et leur précision. Par contre, ce mode opératoire présente un inconvénient majeur : sa complexité, sa chronophagie et son coût de mise en œuvre, trois éléments qui plaident en sa défaveur et découragent nombre d'amateurs.

Et puis, ce 24 octobre 2013, lors du congrès de Nouan-Le-Fuzelier, nous avons eu le plaisir de passer trois jours en compagnie d'Alain Ferville, un spécialiste passionné des inocybes. Nous avons sympathisé, et connaissant ma passion de la microscopie, il m'a montré une technique de coupe absolument géniale dans sa simplicité et la qualité de ses résultats.

PRÉALABLE

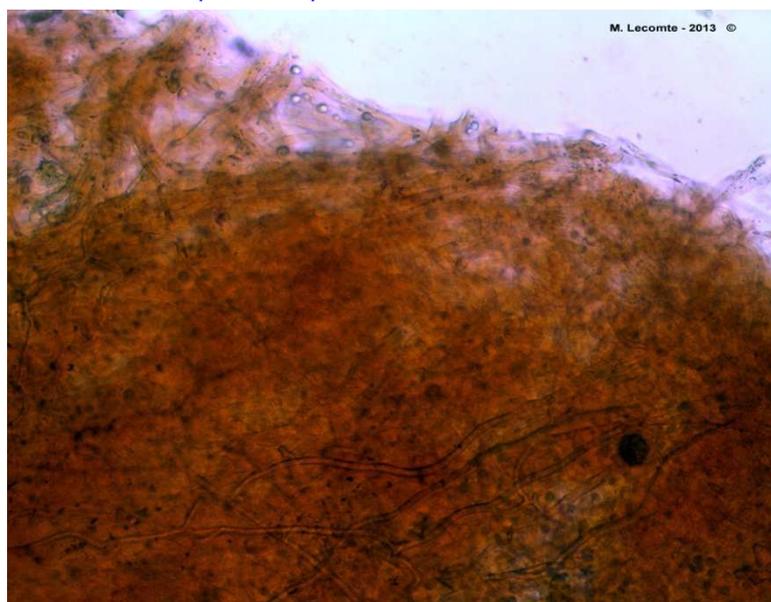
- + Travailler impérativement sur des exsiccata.
- + Garder une pelure d'orange de 4 à 5 cm² dans un sachet hermétique.

MODE OPÉRATOIRE

- + Prélever 1/8 à 1/16^{ème} de chapeau (coupe radiale, comme on découpe une tarte).
- + Placer le fragment dans le sachet avec le zeste d'agrumes, durant 5', afin de le ramollir légèrement.
- + Le positionner lames vers le haut, et gratter délicatement les lames avec une pointe de bistouri.
- + Éliminer les débris de grattage à l'aide d'un pinceau à poils fins.
- + Sous la loupe binoculaire, réaliser des coupes les plus fines possible :
 - utiliser une lame de rasoir pour rabot mécanique,
 - utiliser un support de coupe en PVC dur afin de ne pas ébrécher la lame,
 - utiliser l'ongle comme guide de coupe.
- + Réaliser une dizaine de coupes afin de choisir la plus performante.
- + Les prélever à l'aide d'une pointe de seringue à aiguille extrafine, imprégnée d'un peu de salive.
- + Déposer la coupe choisie sur une LPO, dans une goutte de potasse à 10 ou 5 %, afin de la ramollir.
- + Poser une LCO et observer à 40x (réaliser les photos éventuelles le plus vite possible, car la potasse dissout les pigments éventuels, et ensuite les tissus).

Octobre 2013 fut décidément une bonne période, puisque durant la semaine suivante, lors de la session organisée par la S.M. de Poitiers, nous avons eu le plaisir d'assister à 2 journées de conférences et TP animés par P. A. Moreau, et traitant des Russulales.

Dans cet Ordre, l'étude de la cuticule, que ce soit en coupe transversale, ou sous forme de scalp, s'avère d'une importance primordiale.



◀ CT dans la cuticule de *Lactarius glycosmus*, montrant les rares hyphes du revêtement, enrobées dans un gélin, avec en sous-couche, des hyphes entremêlées et des laticifères.

MÉTHODE 1 : observation de la trame

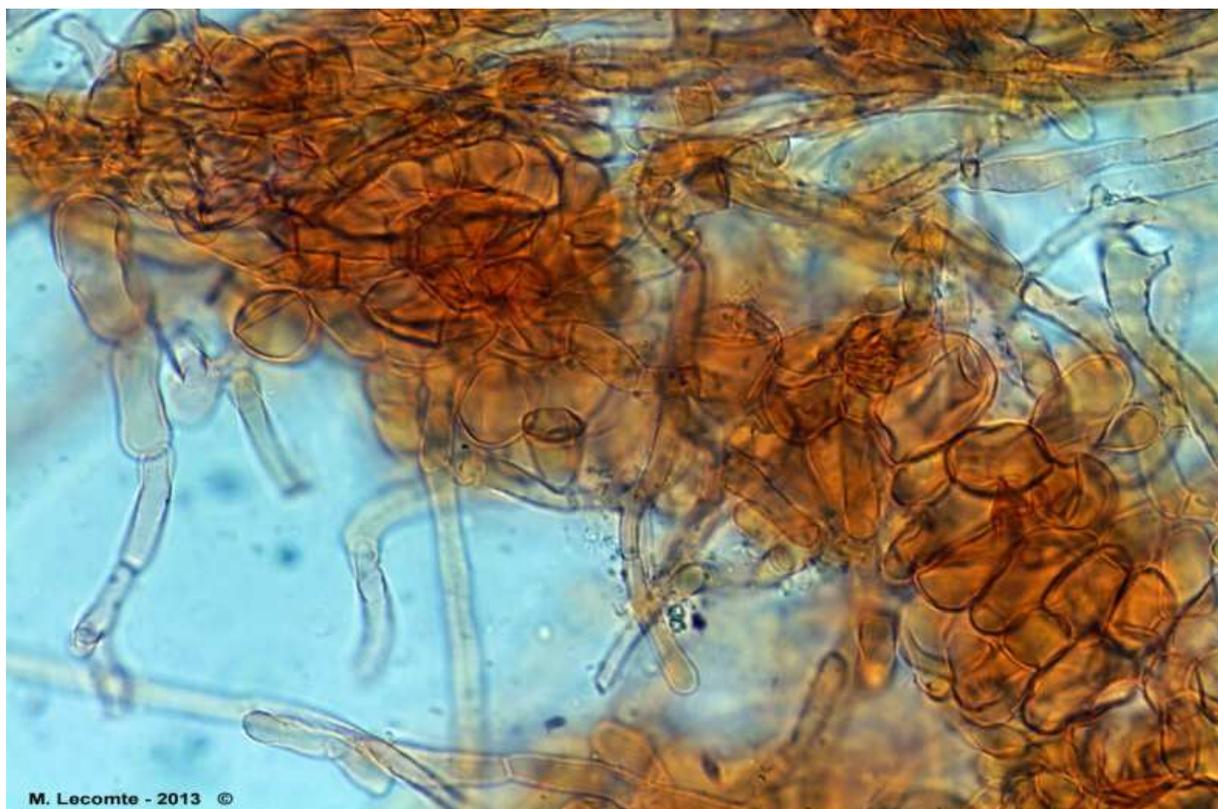
- ++ Réaliser des coupes transversales les plus fines possible, dans la chair du chapeau (ou du pied, accessoirement).
- ++ Placer les coupes dans un verre de montre et baigner avec du RC ammoniacal ou du RC SDS.
- ++ Laisser agir le colorant durant 2-3 minutes.
- ++ Rincer les coupes à l'eau bidistillée.
- ++ Observer à 100x dans l'eau

glycérinée (50/50).

- ++ Repérer les sphérocytes : ce sont des cellules globuleuses, collées les unes aux autres, sans éléments ligatifs, ce qui explique la structure granuleuse particulière de la chair.

MÉTHODE 2 : Pour voir tous les éléments de l'épicutis

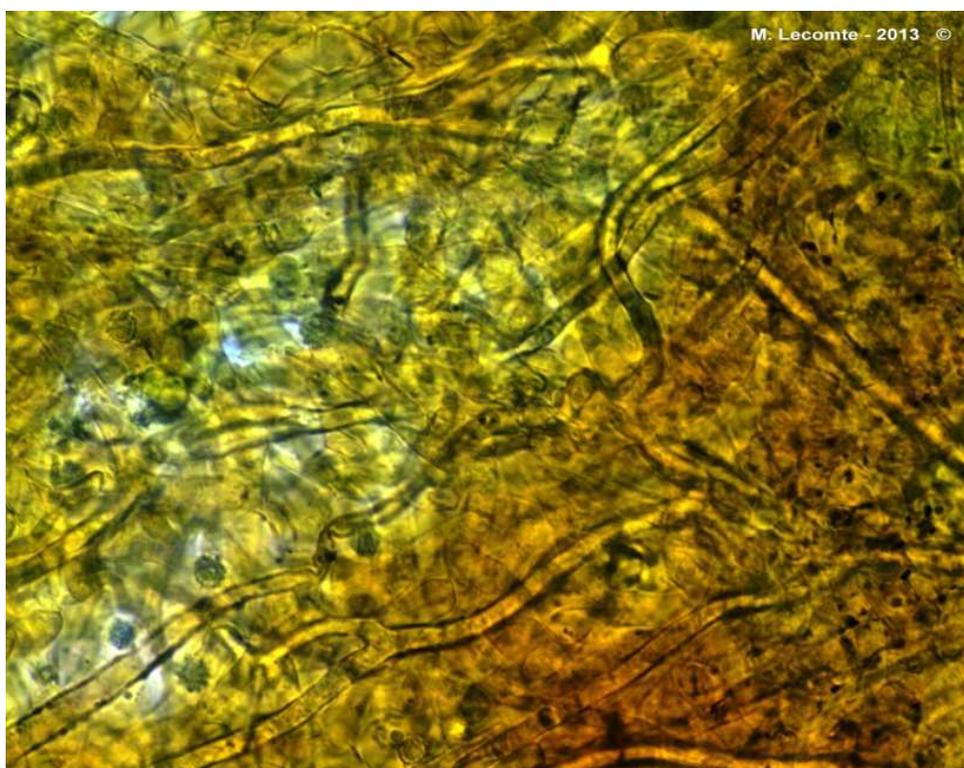
- ++ Décaper le scalp à l'eau de Javel durant 30 secondes.
- ++ Rincer à l'eau.



▲ CT dans la chair, sous la cuticule de *Lactarius glyciosmus*, montrant les hyphes mêlées de nombreux sphérocytes.

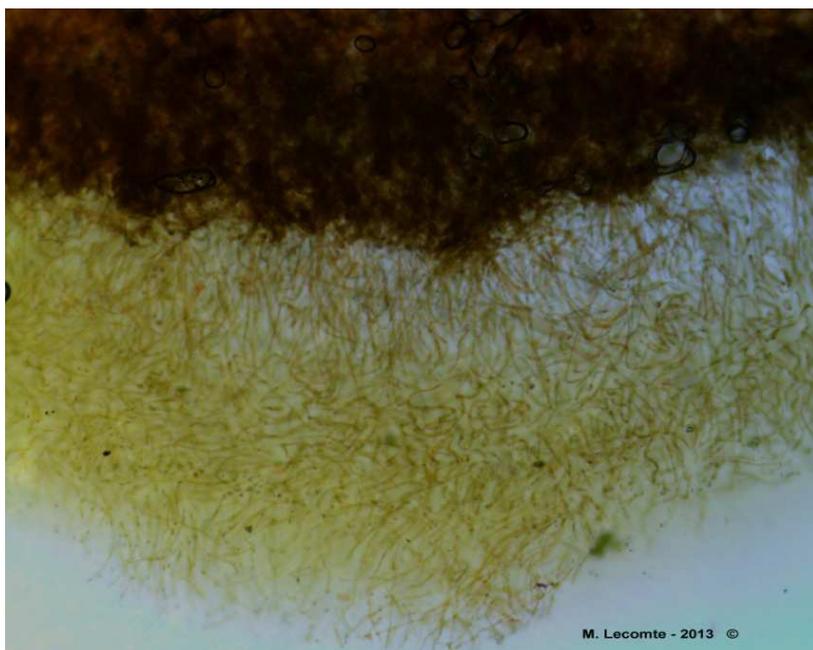
++ Colorer au RCA (pour un exsiccatum) ou au RC SDS (pour du matériel frais).

→ ATTENTION ! cette pratique permet de rendre la préparation plus lisible, et plus facile à dessiner ou à photographier, MAIS il n'est plus possible après ce traitement, de diagnostiquer une réaction SBA ou de mettre en évidence des incrustations AR.



▲ Sur la même préparation, on distingue très bien les nombreuses hyphes laticifères.

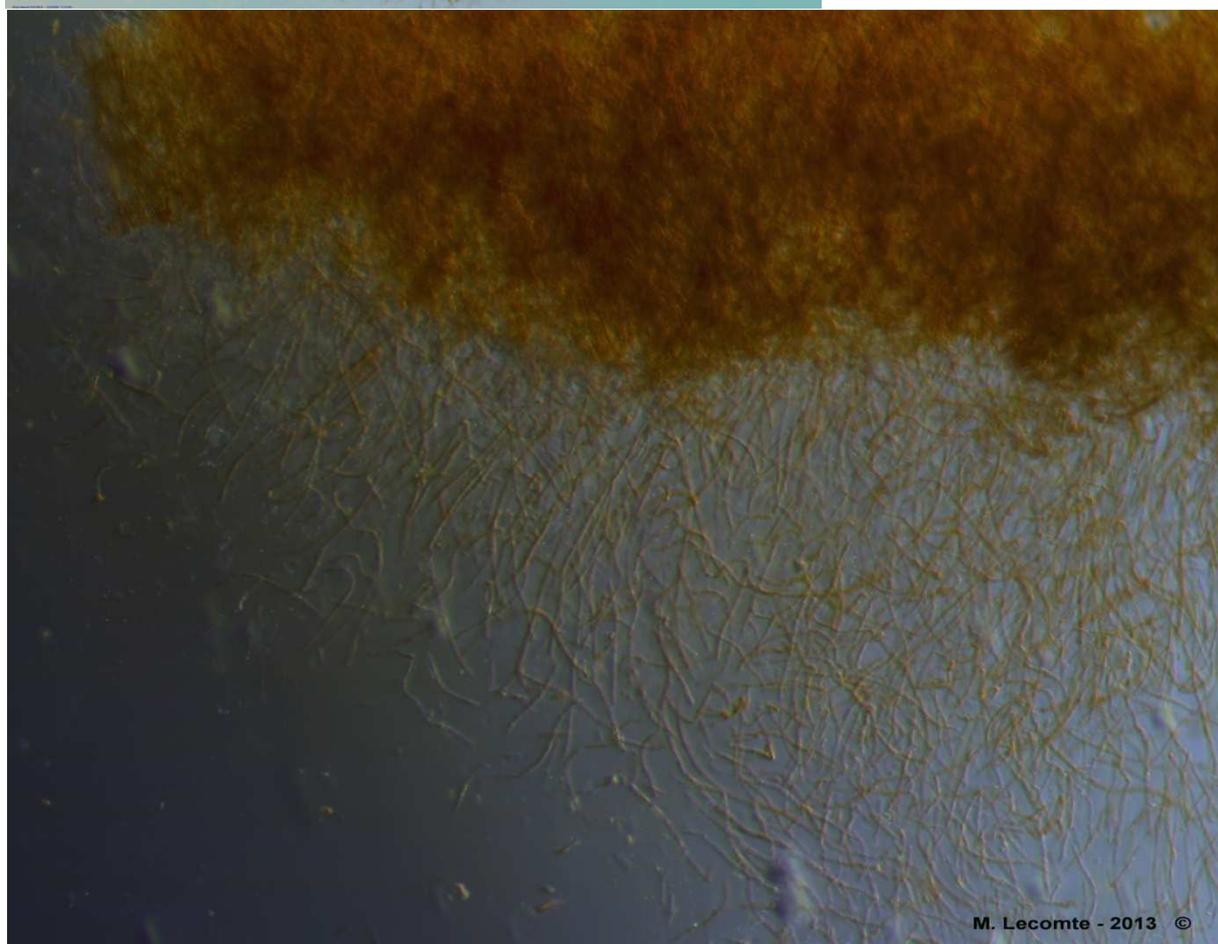
Etude réalisée sur la cuticule de *Suillus granulatus* (Bolétales - Suillaceae)



Un exemple de cuticule ixotrichodermique : cela signifie qu' on trouve une masse dense d'hyphes entremêlées, surmontées d'une couche dense de poils fins (appelés « poils du chevelu » pour les Russulales, selon Romagnesi), ceux-ci étant englués dans un gélif qui rend la cuticule visqueuse.

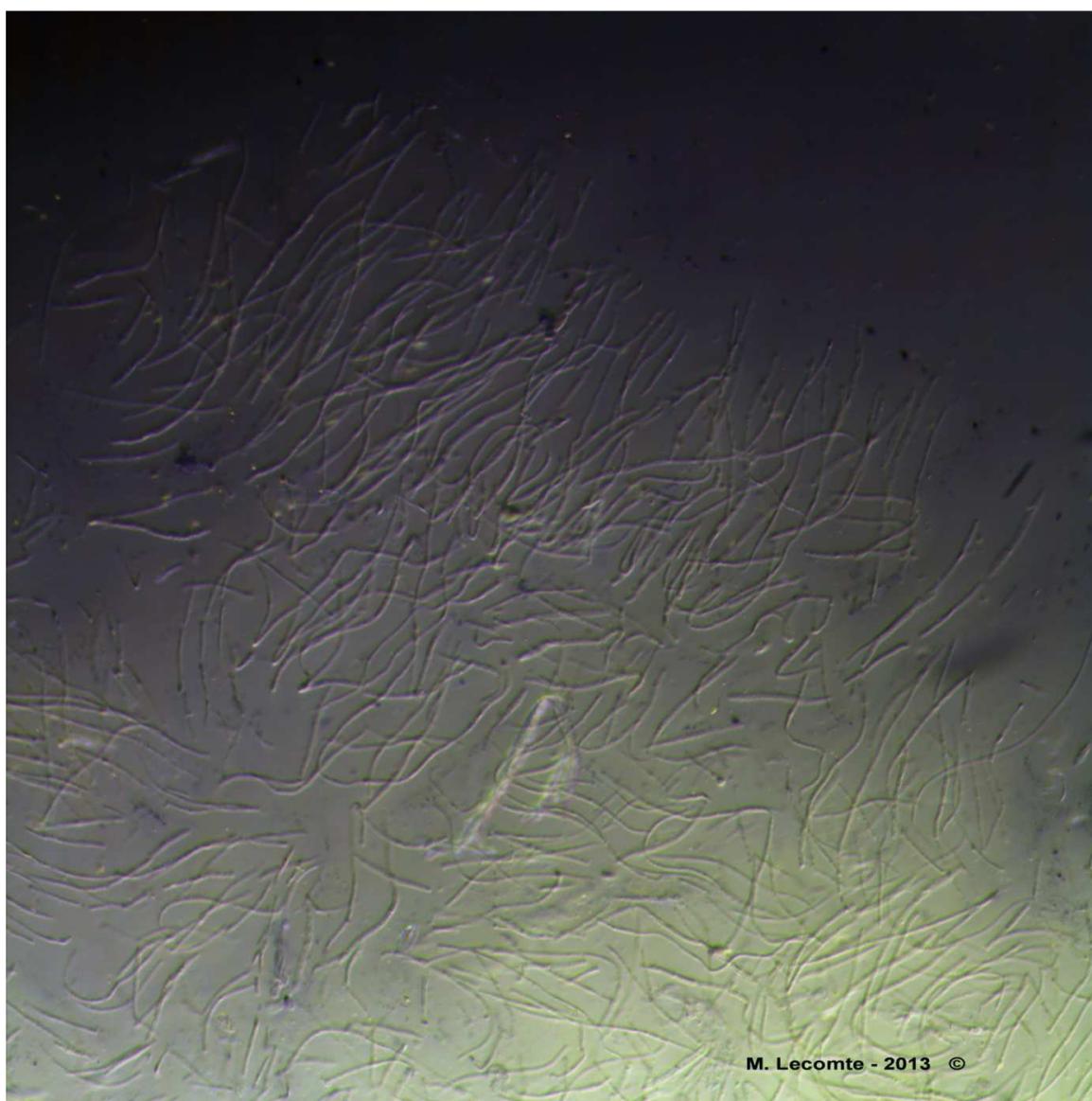
Observation ici dans de l'eau glycinée, après coloration au RC SDS.

◀ Ce genre de préparation est difficile à négocier en raison de la présence inévitable de bulles d'air disgracieuses, mais on distingue très bien la limite gélifiée.



Il est très possible d'éliminer les bulles par chauffage, jusqu'au 1er bouillon ; cependant, cette pratique dissocie le gélif, le fluidifie et le fait quasi disparaître, ce qui rend les poils du chevelu moins serrés, et fausse l'observation.

▲ Cette préparation a été réalisée dans de la nigrosine (ce produit ne colore pas les éléments, mais génère un fond noir, très intéressant pour créer un contraste marqué). Tout ce qui apparaît en brun roussâtre révèle le contenu des hyphes et des pilécystides, dont les vacuoles sont remplies de pigments (voir détail en page suivante). Objectif 10x avec CP.



▲ Préparation colorée à la nigrosine (la barrière entre le gélin et le fond noir est évidente ; il y a eu un peu de pénétration superficielle suite au passage à la flamme) ; observation en DIC, ce qui met particulièrement en évidence le relief des poils du chevelu.

Les types d'hyphes chez les Basidiomycètes

Texte d'origine : P.-A. Moreau
Adaptation & addenda : M. Lecomte

Introduction

Pour la plupart des mycologues non professionnels, la méthode classique d'identification des champignons est généralement basée :

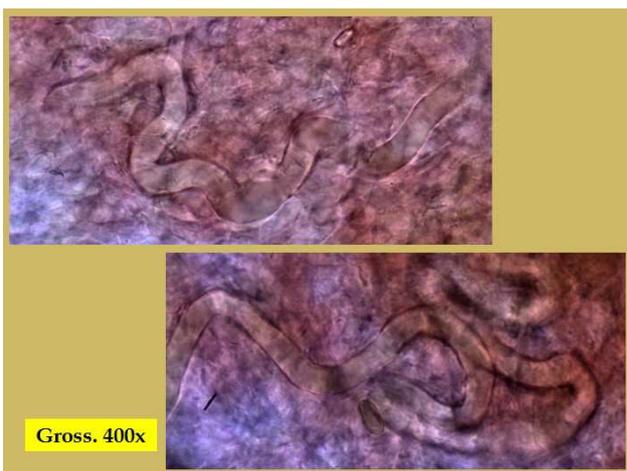
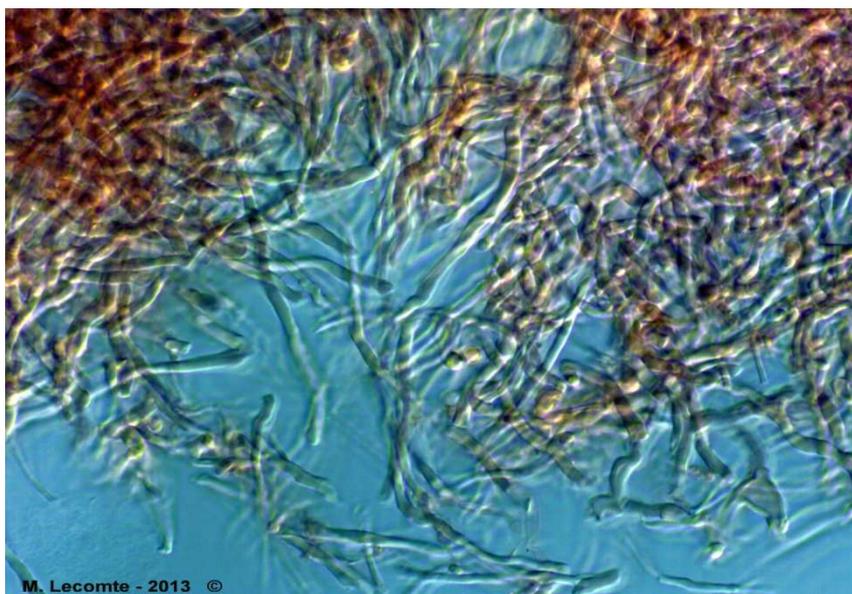
- sur les spores (éléments de dissémination en cas de reproduction sexuée),
- sur les conidies (nom donné aux « spores » chez les anamorphes, qui présentent une reproduction asexuée très rapide, qu'on peut assimiler à un clonage),
- sur les cellules spécialisées de la surface du sporophore (cystides¹⁵, basides et nombre de stérigmates),
- sur les dermatocystides (pilécystides) de la cuticule du chapeau (*Russula p.ex.*),
- sur les caulocystides présentes à la surface du pied (*Inocybe p. ex.*).

Des hyphes banales qui constituent la masse de chair du champignon (ici, hyphes génératrices - ou végétatives - chez *Polyporus brumalis*) ▶

La structure même du sporophore, à l'exception des revêtements, est rarement utilisée comme critère d'identification, car elle est peu spécifique : au sein d'un même genre, les espèces partagent généralement un même type d'organisation des hyphes.

En revanche, elle devient importante pour définir des genres, voire des familles.

Chez les *Aphylophoromycetideae*, les hyphes sont souvent très différenciées et les divers types permettent de délimiter des genres voisins (notamment chez les Polypores¹⁶).



◀ Hyphes oléifères chez *Boletus moravicus*

Dans son système de classification, H. Cléménçon (2004) fait la différence entre les **hyphes laticifères** (qui génèrent du latex et qui se colorent généralement en gris bleu à la sulfovanilline), les **hyphes oléifères** (qui ne contiennent pas de latex, mais parfois des substances résineuses, réagissant occasionnellement à la sulfovanilline), et les **hyphes coccinoïdes**, à contenu lipidique non réactif aux sulfoaldéhydes, qui sont souvent colorées en sombre (au moins au niveau de la paroi), avec une surface semblable à une passoire, en raison de perforations sinueuses et de trous dans les filaments par ailleurs solides.

Dans le cas présent, leur aspect sinueux est interpellant, car, en général, elles sont rectilignes. Les bolets, comme les paxilles, présentent une structure composée d'hyphes larges et très longues, souvent à contenu jaunâtre.

¹⁵ Les cystides portent nombre d'appellations, selon leur taille ou leurs propriétés : macrocystides ou lamprocystides (de grande taille), leptocystides (de petite taille), gléocystides (positives à une réaction aldéhydrique), chryso-cystides (à contenu jaunissant à l'ammoniaque).

¹⁶ Tout au long de ce texte, nous utiliserons cette expression dans son sens large, c'est-à-dire pour désigner des espèces à hyménium poré, poussant sur du bois et de consistance ligneuse ou très coriace. On parlera aussi d'agarics au sens large, pour désigner des espèces à hyménium lamellé.

Chez les *Agaricomycetidae*, l'orientation générale des hyphes de la trame des lames (parallèle, em-mêlée, bilatérale divergente, bilatérale inversée, à sphérocytes) est un caractère de délimitation important entre les familles. Même chez eux, la structure de la chair, longtemps négligée, contient de nombreuses informations présentant un grand intérêt pour le systématique.

C'est un panorama des différentes informations que l'on peut trouver dans l'intimité des sporophores, et qui sont souvent ignorées des mycologues, qui est proposé ci-dessous.

Hyphe hydroplère dans le pied de *Mycena galopus* (section *Fuliginellae*, groupe des *Lactipedes*, à latex de différentes couleurs, aqueux, blanc, rouge, orange, selon les espèces). ▶



Anatomie d'un carpophore

Les *Basidiomycota* - à l'exception des groupes les plus archaïques : Pucciniomycètes (Rouilles), Ustilaginomycètes (Charbons), tous parasites, et de quelques espèces particulières - forment leur spores à la surface (hyménium) ou à l'intérieur (gléba) de structures charnues : les sporophores.

Précisons à cette occasion, que ce terme prévaut sur l'appellation de « carpophore », depuis que les Fungi ont été séparés des Végétaux et constituent un règne à part entière. Ces sporophores sont constitués d'hyphes plus ou moins différenciées, formant une structure appelée **plectenchyme** (on ne parle pas de tissus chez les champignons).

On ne parle pas de tissus chez les champignons).

Les hyphes sont orientées de diverses manières selon leur situation :

- dans le pied, ainsi que dans le mycélium (rhizomorphes p.ex.), elles sont toujours parallèles et d'orientation longitudinale,
- dans le chapeau, elles sont radiales (comme les baleines d'un parapluie),
- dans l'hyménophore, elles s'orientent verticalement depuis la chair du chapeau, et poursuivent leur croissance vers le bas (géotropisme).

On peut cependant rencontrer des hyphes ne respectant pas l'orientation générale : c'est souvent le cas des **hyphes sécrétrices**, qui sillonnent la trame dans diverses directions.

Les hyphes génératrices (ou végétatives)

Toutes les hyphes vivantes, cloisonnées, sont appelées **hyphes génératrices**. Ce sont elles qui assurent la croissance et le métabolisme du sporophore. Comme toute cellule fonctionnelle, elles contiennent noyau, vacuoles et cytoplasme.

Cloisons et boucles



◀ **Boucle de conjugaison chez *Marasmiellus ramealis*.**

Les hyphes des *Basidiomycota* sont toujours cloisonnées (sauf aux premiers stades de la germination). Les cloisons sont pourvues d'un **dolipore** : perforation permettant, par diffusion, la circulation d'eau, de nutriments et de métabolites de part et d'autre de la cloison.

Chez de nombreuses espèces, on observe des **boucles** (plus techniquement appelées boucles dangeardiennes, boucles de conjugaison ou anses d'anastomose). Ce sont des restes du processus de division des noyaux lors de la division cellulaire ; elles n'existent qu'en raison de la présence de dicaryons (deux noyaux appariés) caractéristiques du mycélium secondaire des *Basidiomycota*. Toutefois, un grand nombre d'espèces ne forment pas de boucles, et celles-ci peuvent être inconstantes, ou localisées à l'extrémité inférieure des basides, chez certaines espèces.

Certaines boucles ont des particularités remarquables.

- **Boucles « en médaillon »** : elles se trouvent chez les *Basidiomycota* archaïques (Tremellomycètes et Dacrymycètes), mais aussi ponctuellement chez divers polypores, clavaires (basides de *Clavaria argillacea*) et agarics (en particulier chez les *Gliophorus*). Elles sont caractérisées par un espace ouvert entre la boucle et la cloison.
- **Boucles verticillées (ou multiples)** : lorsque plusieurs boucles (2, rarement plus) sont présentes sur une même cloison. Cas rare, observable chez quelques polypores (notamment *Climacodon pulcherrimus* ou *Coniophora puteana*).
- Des **fausses-boucles** sont parfois présentes chez des espèces normalement non bouclées. Elles peuvent induire en erreur et sont généralement dues à des anomalies cytologiques ou sexuelles (noyau excédentaire ou hybrides p. ex.).

Différentes sortes d'hyphes génératrices

On appelle « **homomorphe** » une trame constituée d'une seule sorte d'hyphes génératrices, ayant toutes le même aspect. Ce cas est rare (Tremellomycètes, *Athelia*, *Arrhenia*...).

La plupart du temps, le plectenchyme est formé d'hyphes vivantes de formes distinctes (hétéromorphes) ; les hyphes génératrices « de base » sont les plus grêles, de forme cylindrique, non étranglées aux cloisons.

++ Hyphes gélifères : formant une capsule gélatineuse, responsable de la consistance visqueuse ou gélifiée, elles dominent chez les Tremellomycètes et Dacrymycètes ; chez les champignons dits supérieurs, elles sont fréquentes en surface, mais plus rares en profondeur (trame gélifiée de *Russula cyanoxantha* ; chair gélifiée des *Resupinatus*, *Hohenbuehelia* ou *Micromphale*).

++ Hyphes sclérifiées : à paroi épaissie, parfois colorée ou incrustée, elles assurent la rigidité des sporophores de nombreux polypores et croûtes, ainsi que des agarics à texture coriace ; elles sont également appelées **hyphes squelettoïdes**.

++ Physalohyphes : les articles sont renflés, à paroi convexe, et étranglés aux cloisons ; elles sont fréquentes, voire dominantes, chez les *Agaricomycetidae*, en particulier chez les espèces éphémères. Ces hyphes assurent par leur turgescence un volume important au sporophore, ainsi qu'une croissance très importante par stockage rapide d'eau. Chez les espèces dites sarcodimitiques, les physalohyphes sont très longues et fusiformes, à paroi souvent épaissie.

+ Acrophysalides : forme particulière de physalohyphes, avec une extrémité libre et généralement clavée (typique des Amanitales et Plutéales).

+ Sphérocytes : une forme particulière de physalohyphes, propre aux *Russulaceae*, disposées en spirales autour d'hyphes génératrices droites et parallèles.

Les hyphes sécrétrices

Ce sont originellement des hyphes génératrices, qui stockent leurs métabolites dans leur cytoplasme ; elles prennent alors un aspect dense, guttulé ou coloré, différent des hyphes voisines. Elles peuvent être de forme identique aux hyphes génératrices, ou au contraire très longues, sinueuses ou vésiculeuses, avec ou sans cloisons.

La terminologie traditionnelle de ces hyphes (e.g. Singer, 1986) a été supplantée par la nouvelle terminologie introduite par Cléménçon (1995), en fonction de l'aspect du contenu de ces hyphes, qui est suivie ici (avec les correspondances).

++ Hyphes hydroplères (correspondant en partie aux **hyphes laticifères**) : ce sont des hyphes vivantes, à contenu aqueux, transparent (coloré ou non), homogène, sous pression. Le liquide s'échappe à la cassure (bien qu'il puisse être rare et incolore). Surtout abondant chez les *Mycena* (*M. galopus*, *M. haematopus*, *M. abramsii*...) et *Hydropus*. Il ne s'agit pas ici de latex, car on n'est pas en présence de composés résinoïdes.

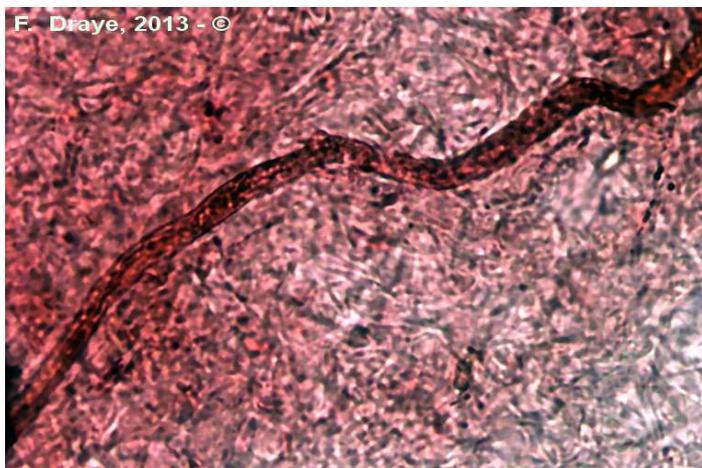


Hyphe laticifère chez *Lactarius chrysorrheus*, traitée à la SV ▲

++ Hyphes hétéroplères (correspondant en partie aux **hyphes laticifères**) : ce sont des hyphes vivantes, à contenu hétérogène (guttulé, mucilagineux). Cléménçon (1995, p. 72) distingue les **hyphes laticifères** (au sens strict), responsables de l'écoulement d'un liquide à la cassure de la chair (*Lactarius*, *Fistulina*), et les **hyphes glioplères (ou gléoplères, ou gloéoplères)**, sans écoulement visible à la cassure (notamment chez *Russula*). Ces dernières réagissent en bleu foncé lorsqu'elles sont traitées avec la sulfovanilline.

Les hyphes glioplères contiennent des cristaux, formant des paillettes, 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.

++ Hyphes thromboplères¹⁷ (correspondant aux **hyphes oléifères**) : nous parlons d'hyphes mortes, à contenu huileux ou résineux, fortement réfringent (présentes chez de très nombreuses espèces, souvent plus fréquentes dans le pied). Ce sont des hyphes laticifères dégénérées.



◀ Hyphe thromboplère chez *Suillus grevillei* - coloration au carbolfuchsin.

Le contenu des hyphes glioplères et thromboplères peut avoir des propriétés chimiques mises en évidence par certains réactifs : chez les *Russulales*, les hyphes glioplères noircissent dans les réactifs sulfo-aldéhydiques ; chez les *Chroogomphus*, les thromboplères ont un contenu amyloïde.

++ Hyphes de stockage : se trouvant dans le mycélium, elles contiennent du glycogène (polysaccharide polymère du glucose) qui est une réserve d'énergie.

On peut les colorer facilement avec un réactif iodé (lugol, IKI de Baral, melzer), ce qui donne une réaction amyloïde, en bleu sombre à noir.



Par contre, dans la chair des sporophores, elles contiennent surtout des lipides.

◀ Hyphe squelettique chez *Piptoporus betulinus*

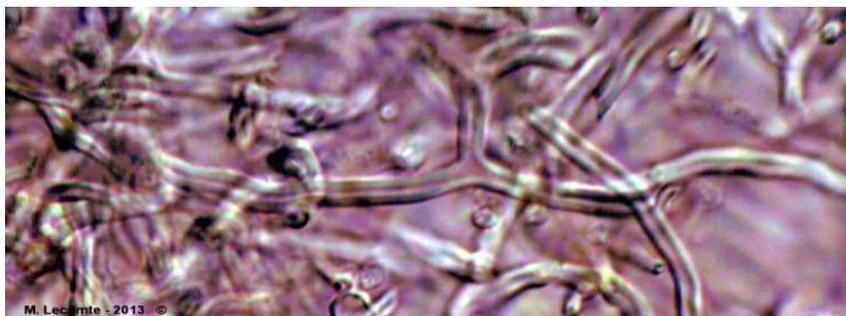
Les hyphes structurales

Chez les *Aphyllorphoromycetideae* en particulier (mais aussi chez certaines *Tremellomycetideae* et chez de nombreux Gastéromycètes), on rencontre des hyphes mortes, à parois fortement épaissies, non cloisonnées, qui peuvent dominer largement les hyphes génératrices. Leur nature a notamment servi de base pour distinguer les nombreux genres de polypores.

++ Hyphes squelettiques : ce sont des hyphes non (ou très rarement) ramifiées, à parois (souvent très) épaissies, atténuées aux extrémités, souvent très longues. Elles peuvent être colorées (pigment pariétal lisse ou épipariétal) ; le contenu, quoique réduit, peut parfois être lui-même coloré ou réfringent. Elles sont responsables de la persistance et de la consistance ligueuse de nombreuses espèces de polypores. Chez certaines espèces, les parois sont amyloïdes (*Amylostereum* sp.,

Antrodia xantha, *Lentinellus castoreus*) ou dextrinoïdes (*Perenniporia fraxinea*, *Lentinellus ursinus*).

Chez *Cinereomyces lindbladii* (polypore résupiné), les hyphes squelettiques sont solubles dans la potasse ; chez *Heterobasidion annosum*, elles sont méta-chromatiques (bleu de crésyl).



◀ Hyphes conjonctives chez *Polyporus brumalis*, qui est dimitique.

++ Hyphes conjonctives (ou liantes, ou ligatives, ou connexives) : ce sont des hyphes courtes, ramifiées

(branchues), terminales, sans boucles, à parois épaissies. Elles sont souvent contournées, et de ce fait parfois difficiles à distinguer chez les espèces à chair très compacte. Elles confèrent à ces espèces

¹⁷ Certains mycologues considèrent que ce terme constitue une synonymie inutile ; chacun fera son choix.

ces une chair particulièrement résistante (*Trametes*, *Pycnoporus*, *Polyporus*), mais elles existent aussi chez *Laetiporus sulfureus*, à chair cassante.

++ Hyphes squeletto-conjonctives : ce cas intermédiaire (hyphes squelettiques longues, ramifiées aux extrémités) est caractéristique du genre *Ganoderma*.

Terminologie des structures

En fonction des hyphes les constituant, les trames sont ainsi qualifiées (les hyphes sécrétrices ne sont pas prises en compte dans cette classification).

+ Monomitique : présence d'hyphes génératrices normales seules.

+ Sarcodimitique : présence d'hyphes génératrices « normales » et de *physalohyphes* longues et fusiformes.

+ Pseudodimitique : présence d'hyphes génératrices sclérifiées (squelettoïdes), sans hyphes squelettiques.

+ Dimitique : présence d'hyphes génératrices et squelettiques.

+ Trimitique : présence d'hyphes génératrices, squelettiques et conjonctives.

+ Pseudotrimitique : présence d'hyphes génératrices et d'hyphes squeletto-conjonctives.

Cas particulier des Gastéromycètes

Chez les *Geastraceae* (*Phallomycetideae*) et les *Lycoperdaceae* (dérivées des Agaricales), la gléba à l'état jeune est constituée de faisceaux radiaux d'hyphes génératrices mêlées respectivement à des hyphes squelettiques et squeletto-conjonctives.

A maturité, les basides formées le long des faisceaux, mais aussi les hyphes génératrices, disparaissent précocement, et la déshydratation précédant la déhiscence du périidium désagrège la gléba, dans laquelle ne restent que les spores et les hyphes de structure. Ainsi, la gléba mûre de *Lycoperdon* ne montre-t-elle que des hyphes squeletto-conjonctives abondamment ramifiées, tandis que celles des *Bovista*, plus comparables aux *Ganoderma*, sont ramifiées en arbuscules aux extrémités. Chez les *Geastrum*, les hyphes squelettiques sont très longues, non ramifiées et atténuées aux deux extrémités.

Chez les *Scleroderma* et *Astraeus*, ce sont des hyphes génératrices sclérifiées qui remplissent la gléba.

On peut donc qualifier la structure de la gléba de ces groupes ainsi, par extension de la classification appliquée au mitisme (et avec des spécificités propres à certains genres) :

++ *Lycoperdaceae* : pseudotrimitiques (hyphes squeletto-conjonctives parfois perforées),

++ *Geastraceae* : dimitiques (hyphes squelettiques parfois incrustées),

++ *Sclerodermataceae* : pseudodimitiques.

Bibliographie

CLÉMENÇON H., 2004 - *Citology and Plectology of the Hymenomycetes*, Berlin, Cramer, 488 p.

CLÉMENÇON H., 2009 - *Methods for working with Macrofungi*, IHW Verlag, 88 p.

CLÉMENÇON H., 2012 - *Großpilze im Mikroskop*, IHW Verlag, Eching, 176 p.

LECOMTE M., 2012 - *Manuel de microscopie à l'attention des passionnés en général et des mycophiles en particulier*, Ed. AMFB, 198 p.

LECOMTE M., PIRLOT J.M. & TRICHIES G., 2012 - *LA microscopie des polypores et corticiés*, Manuel de microscopie (séminaire 2012), Ed. AMFB, 84 : 91.

MOREAU P.A., 2013 - *Les hyphes chez les Basidiomycota*, bulletin SMNF.

PIRLOT J.M., 1997 - *Mitisme des polypores*, Ed. MLB, 30 p.

SINGER R., 1986 - *The Agaricales in Modern Taxonomy*, 4th rev. ed. Koenigstein : Koeltz Scientific Books.

Basidiomycètes : la double coloration (DC) de routine



Sujet d'étude choisi pour cette manipulation : *Agrocybe pediades* (l'agrocybe des pelouses), qui est une espèce assez fréquente dans la région de Namur, en pelouses et prairies. Elle se caractérise macroscopiquement par une saveur et une odeur nettement farineuses.

Le choix de cette espèce a été dicté par la facilité car nous disposons de photos récentes. Vous pouvez réaliser cette DC sur toute espèce de Basidiomycète fraîchement récolté.

A nos yeux, le résultat s'avère également bon si on travaille sur du matériel sec, mais il faut adapter quelque peu le protocole.

POURQUOI DEUX COLORANTS ?

La phloxine B est très affine des substances acidophiles : c'est un colorant basique plasmatique ; elle va donc colorer le contenu des cellules (on obtiendrait le

même résultat avec de la safranine, de l'éosine, de la fuchsine acide, ou du rose Bengale).

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

On va obtenir le résultat suivant :



La paroi sporale se colore en rouge brunâtre ; si les spores sont matures, la paroi est devenue imperméable et ne laisse pas passer la phloxine ; le cytoplasme des spores non mûres prend la belle couleur fuchsia de la phloxine.

PREPARATION DES PRODUITS

- Solution aqueuse à 2 % de phloxine B + 0,5 g de SDS.
- Solution aqueuse à 1 % de rouge Congo + 0,5 g de SDS (pour champignon frais).
- OU solution ammoniacale de rouge Congo à 1 % (pour champignon sec).

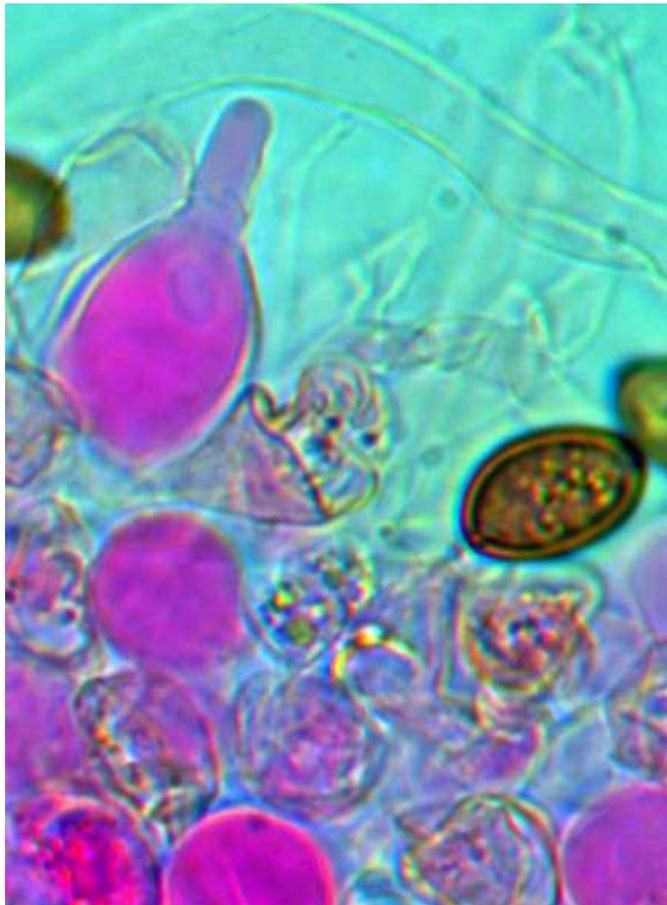
Parfois appelé laurylsulfate de sodium (LSS), le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) est un détergent industriel et un agent tensioactif anionique qui facilite la pénétration d'un colorant dans le cytoplasme. On le retrouve fréquemment dans les shampoings, les bains moussants, les dentifrices ou les mousses à raser. Il est connu sous le code E-487 et employé également en biochimie (manipulation des protéines). Dans le cas présent, il ne doit pas être utilisé en présence de KOH, car il y a formation de précipités.

MODE OPÉRATOIRE

A. Matériel frais :

- Prélever un morceau conséquent de lame ou de chair.
- Le placer au centre d'une LPO.
- Déposer 1 ou 2 gouttes de RC SDS et laisser agir durant 1 à 2 minutes.
- Laver la préparation à l'eau bidistillée.
- Déposer 1 ou 2 gouttes de phloxine et laisser agir durant 1 à 2 minutes.
- Laver la préparation à l'eau bidistillée.

- Prélever un petit fragment du spécimen et le poser sur une nouvelle LPO.
- Poser une goutte d'eau glycinée, puis une LCO.



- Dissocier sans brutalité.
- Observer avec le grossissement adéquat.
- NB : personnellement, nous utilisons un mélange 50/50 de phloxine-RC SDS, ce qui permet de simplifier les manipulations.

B. Matériel sec : même MO que décrit ci-dessus, mais :

- Nous utilisons de la phloxine sans SDS.
- Le colorant pariétal est du rouge Congo ammoniacal.
- Nous remplaçons l'eau de rinçage par de l'ammoniaque à 50 % (ainsi, cette dernière ne dissout que le colorant non fixé sur les structures fongiques).

L'ajout d'ammoniaque dans le rouge Congo est une « mode » répandue en mycologie depuis des décennies.

Elle a 2 raisons :

- ++ Être certain que la solution ne s'acidifie pas (le RC est un révélateur des milieux acides, où il devient bleu).
- ++ Permettre un ramollissement et un gonflement conjugués à une éventuelle coloration, sur des fragments d'exsiccata.

Cependant, cela engendre une conséquence désagréable → instabilité de la solution

ammoniacale à long terme (2 à 3 ans), avec formation d'un précipité qui s'accroît au fil du temps.

Malgré les qualités incontestables du RC SDS sur des champignons frais, certains mycologues conservateurs (et non des moindres) rechignent à utiliser ce colorant, mis au point par H. Clémenton et ses collaborateurs ... et parfois même, le dénigrent sans l'avoir utilisé, ce qui n'est guère valorisant sur le plan humain.

Pour l'avoir utilisé sur des milliers de préparations, nous nous permettons de vous le recommander, car « L'essayer, c'est l'adopter ! ».

LA DOUBLE COLORATION APPLIQUÉE AUX APHYLLOPHORALES

Elle va se révéler très intéressante dans ce cas précis, car elle va permettre de faire la différence entre les hyphes génératrices et les hyphes conjonctives (ligatives).

MODE OPÉRATOIRE (selon J.M. Pirlot)

- + Réaliser des coupes très fines (de préférence dans les tubes, afin de disposer du subhyménium).
- + Placer dans la potasse à 10, 20 ou 30 % durant 30' à 2 h selon l'aspect « coriace » de la chair.
- + Rincer en 3 bains successifs.
- + Colorer au RCA puis à la phloxine B.
- + Rincer et observer dans l'eau glycinée ou l'hydrate de chloral.

→ Les hyphes génératrices (souvent bouclées) ont le cytoplasme coloré en rose ; les hyphes ligatives sont vides et la paroi est colorée en divers tons de rouge.

Les pigments¹⁸

Avec les précieux conseils et la collaboration de Pierre-Arthur Moreau

Extrait de la « Flore analytique des champignons supérieurs », (Kühner & Romagnesi), pp. 176 & 177

2° Topographie des pigments : les substances qui communiquent leurs colorations aux carpophores peuvent se trouver à l'intérieur des hyphes ou fixées à leur membrane.

Les membranes pigmentées le sont parfois uniformément, mais très souvent les parties colorées forment des incrustations qui rendent leur paroi \pm rugueuse ou aspéculée [Fig. 244* A] ; dans les espèces où cette pigmentation est peu évidente sous le microscope, on trouvera l'incrustation particulièrement au voisinage des cloisons transversales. Les pigments intracellulaires se trouvent généralement à l'intérieur de vésicules spéciales, les vacuoles, où ils sont primitivement dissous, mais où ils peuvent précipiter en granulations \pm grosses ; dans la jeunesse, il y a souvent plusieurs vacuoles arrondies qui tranchent par leur coloration sur le fond incolore [Fig. 144* B] ; il n'y a alors aucune difficulté à distinguer la pigmentation vacuolaire d'une pigmentation membranaire uniforme ; mais il arrive qu'avec l'âge, parfois de très bonne heure, la cellule ne renferme plus qu'une grosse vacuole qui la remplit presque tout entière, au point que les dangers de confusion entre les deux types de pigmentation peuvent devenir très grands. On examinera attentivement le voisinage des cloisons transversales, où subsiste souvent une couche plus ou moins épaisse de protoplasme incolore, séparant le contour de la vacuole de la membrane ; on pourra aussi provoquer la contraction de la vacuole en plaçant les coupes dans des solutions assez concentrées de sucre ou de sel de cuisine (plasmolyse) ; il est préférable de commencer par des concentrations assez faibles.

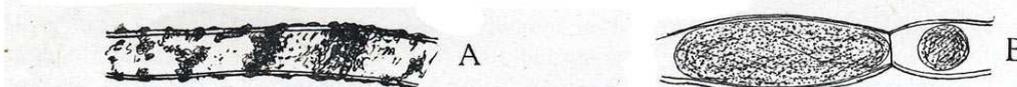


FIG. 244. A : Hyphe à pigment incrustant (H. R.). B : Hyphe à pigment vacuolaire (H. R.).

Les hyphes vivantes produisent toutes sortes de métabolites secondaires¹⁹, certains essentiels au fonctionnement cellulaire, d'autres (déchets du métabolisme) devant être stockés ou évacués par la cellule. Nombre d'entre eux sont colorés et sont responsables des « couleurs » du champignon.

Il s'avère primordial pour le déterminateur de savoir où sont localisés ces pigments, très importants pour l'identification des espèces dans certains genres (notamment *Entoloma* et *Inocybe*, mais aussi *Galerina*).

▼ Pigment extra et intracellulaire chez *Tricholoma ustale* (cuticule)



Pigments intracellulaires : les pigments sont concentrés à l'intérieur de la cellule.

++ Pigment vacuolaire : le pigment est concentré dans la vacuole, qui est uniformément colorée. Il n'est observable que sur des cellules vivantes²⁰ ; on l'observe plus facilement en provoquant une plasmolyse²¹ des cellules (observation dans de l'eau fortement salée ou sucrée). Ce pigment est fréquent dans les revêtements, et très rare dans la trame.

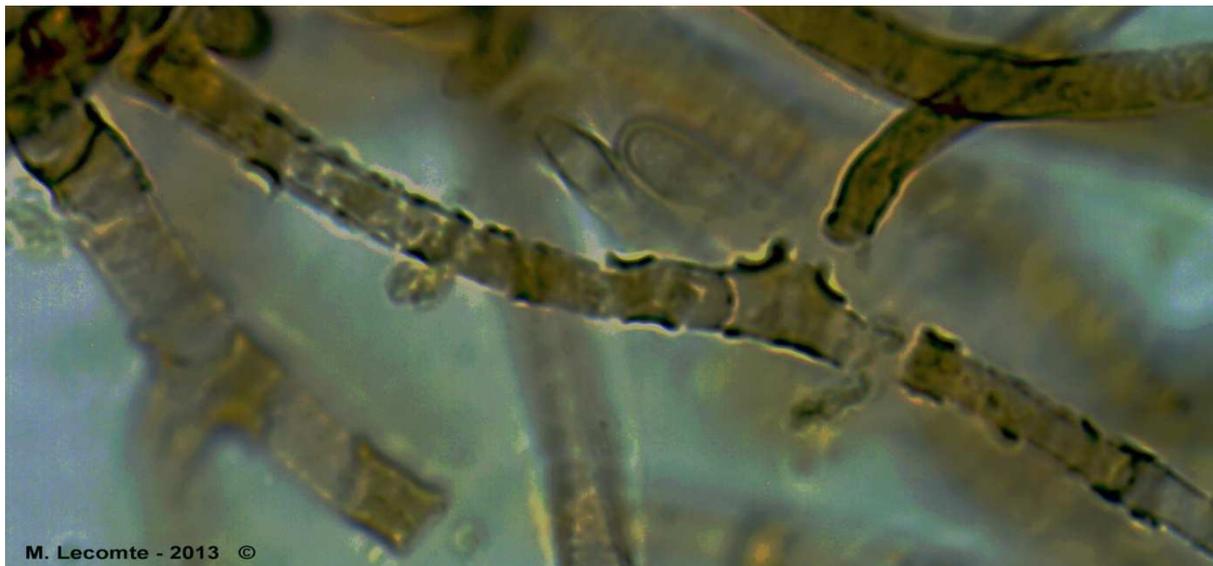
++ Pigment cytoplasmique : le pigment est dissous dans le cytoplasme, qui n'occupe qu'un faible volume autour de la vacuole, et qui apparaît légèrement plus coloré que celle-ci. La plasmolyse est indispensable pour le repérer (impossible à mettre en évidence sur du matériel sec).

¹⁸ Voir LECOMTE M., 2012 - *Manuel de microscopie*, tome 1, p. 112-113.

¹⁹ Les métabolites primaires sont ceux qui sont essentiels à la vie d'un organisme : acides aminés et nucléiques, glucides, lipides. Les secondaires sont des composés azotés, phénolés, terpéniques notamment ; c'est un métabolite secondaire qui génère l'amertume, l'âcreté, l'odeur p. ex.

²⁰ On pratique ce qu'on appelle une coloration vitale, c'est-à-dire une coloration qui n'altère pas les fonctions vitales de la cellule, du moins durant un certain temps. Le rouge neutre, l'éosine, le bleu de crésyl en solution aqueuse à 1/1000, voire 1/10.000 sont les colorants les plus utilisés. Les vacuoles sont capables d'absorber ce colorant, car leur membrane se comporte comme un tissu semi-perméable : l'eau colorée pénètre dans la vacuole mais ne peut en ressortir, ce qui la met en évidence.

²¹ La plasmolyse provoque une contraction du cytoplasme vacuolaire par sortie d'eau vers l'extérieur (on parle alors d'exosmose), sous l'action d'une solution hypertonique (solution aqueuse à 20-30 % de saccharose ou de chlorure de sodium). Cette action est létale.



▲ Pigment pariétal des poils du chevelu chez *Tricholoma ustale* (cuticule) ▲

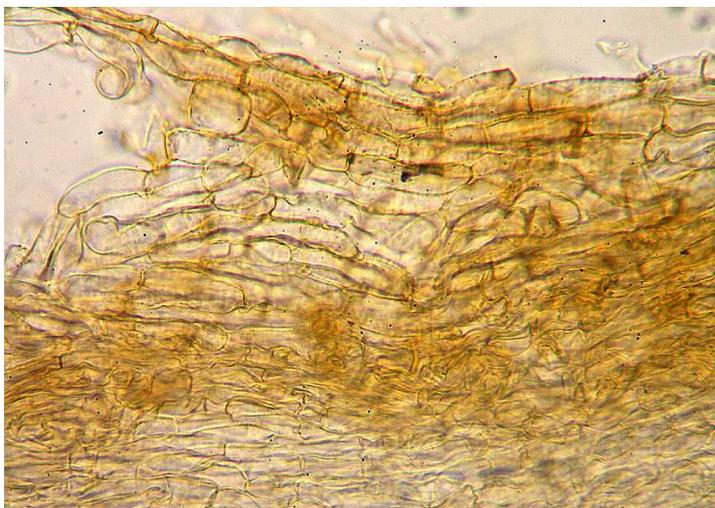
Pigments extracellulaires : les pigments sont situés à l'extérieur de la cellule.

++ Pigment intrapariétal (ou pariétal lisse) : le pigment est dissous dans la paroi, qui apparaît colorée.

++ Pigment épipariétal (ou incrustant) : le pigment s'accumule à la surface extérieure de la paroi et apparaît sous forme de manchon, de zébrures, de granules ou de dépôts amorphes. Il est souvent de même nature que le précédent, mais plus abondant.

++ Pigment matriciel (ou intercellulaire) : le pigment est dissout dans la matrice (espace séparant les hyphes) ; bien que parfois très coloré (comme le pigment rouge d'*Amanita muscaria*), il est quasiment impossible à observer au microscope, en raison de sa grande solubilité dans les liquides de montage.

++ Pigment « mixte » : expression ambiguë, s'appliquant généralement à la présence, sur une même hyphe, d'un pigment vacuolaire et d'un pigment incrustant (typique d'*Hydropus trichoderma*, mais rare en général).



◀ Hyphes incrustées d'un pigment brun-jaunâtre fortement incrustant zébrant (photo A. Ferville)

PRINCIPE DE BASE

→ Chaque fois que c'est possible, travailler sur du matériel vivant.

→ Utiliser une solution hypertonique de chlorure de sodium ou de glucose, à 20 ou 30 % ; les pièces montées dans ces milieux perdent l'eau de leurs vacuoles, et les pigments vacuolaires sont condensés dans un volume plus petit, ce qui intensifie la coloration des vacuoles et permet éventuellement de localiser un pigment (qui n'est pas toujours cytoplasmique, membranaire ou

incrusté dans les parois).

→ Les pigments sont reconnaissables à leur couleur déclinée en tonalités +/- jaunâtres à ocre.

DES CONSIDÉRATIONS PRATIQUES

Selon les spécialistes, les pigments incrustants sont résistants et s'observent très bien sur des exsiccata, dans l'importe quel regonflant (ammoniaque, ramollisseur de Clémenton, de Carnot, de Dean). La pratique démontre également qu'ils semblent insolubles dans les bases fortes (soude et potasse à 5 ou 10 %).

Les autres pigments ne sont pas visibles sur exsiccatum ; on peut en déduire raisonnablement que, si ce n'est pas incrustant, c'est intracellulaire ; il s'avère impossible de différencier les pigments cyto-

plasmiques des vacuolaires sur le sec (raisonnement tenu par M. Noordeloos dans ses publications sur les Entolomes).

Pour les pigments dissous, comme celui d'*Amanita muscaria*, il est quasi impossible de les observer ; on peut juste constater, dans l'eau ou la glycérine, que le rouge est en dehors des cellules.



Hyphes incrustées sur le pied de *Xerocomus ferrugineus* ▶

◀ Hyphes incrustées dans la chair du pied de *Russula pseudointegra*

Généralement, on observe une franche similitude entre le pied et le chapeau en général ; mais dans certains cas, on peut rencontrer des incrustations sur les hyphes du pied et pas sur le chapeau p.ex.



Toutes les espèces à pied brunissant ou noircissant présentent, avec l'âge, soit une forte accumulation de pigment incrustant, soit (plus souvent) des hyphes thromboplères ou glioplères à contenu jaune, très abondantes dans la trame du pied.

Chez les russules, les incrustations acidorésistantes ne sont pas responsables de la couleur ; les pigments sont vacuolaires. Lorsque le pied est coloré, Il faut chercher le pigment dans les vacuoles des piléocystides.



Pigment zébrant chez *Hymenoscyphus lutescens* (photo C. Mertens)

Galerina marginata possède une trame lamellaire formée d'hyphes parallèles ou légèrement emmêlées en vieillissant, avec un pigment incrustant jaunâtre à jaune, dans la potasse à 5 ou 10%.

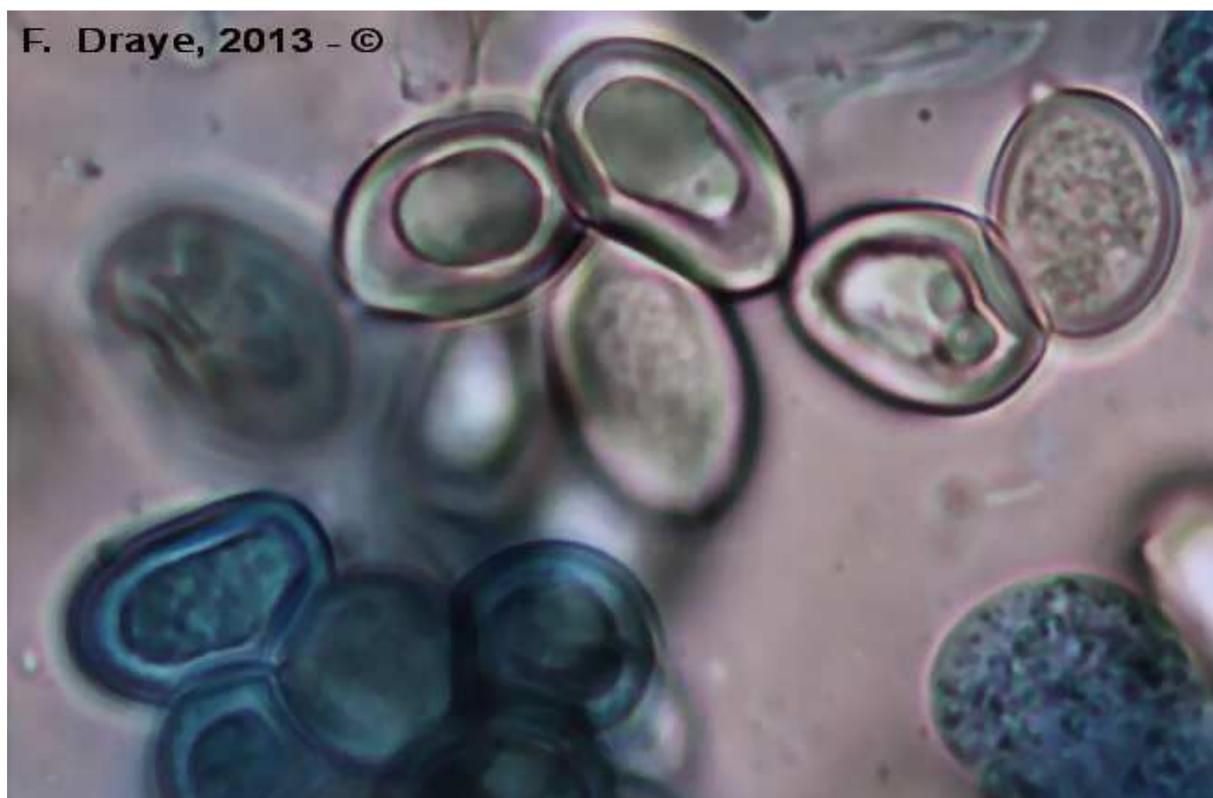


◀ Pigment zébrant sur les hyphes cuticulaires de *Gymnopilus penetrans*

Un colorant trop peu utilisé : le bleu de crésyl²² (BDC)

Cet article complète celui qui est paru dans « 2012, Microscopie », M. Lecomte, p.109.

Au départ, c'est un colorant orthochromatique (le bleu colore en bleu), mais lors d'applications particulières, et notamment sous l'action de la chaleur, il devient **métachromatique**, c'est-à-dire qu'il colore différents éléments de la cellule en nuances différentes (le préfixe méta- implique une idée de changement) → rouge pourpre p. ex. pour les spores de certaines lépiotes.



ETUDE DES SPORES DE LÉPIOTES

Cela permet de mettre remarquablement en évidence l'endospore de la paroi sporique des *Macrolepiota* et *Leucocoprinia*, qui se colore de manière élective en rouge pourpre.

Une règle valable dans tous les cas de figure énoncés : nous allons travailler sur un morceau d'hyménium, car il est nécessaire de passer par des bains différents, ce qui s'avère impossible sur une sporée.

Cependant, il serait intéressant de réaliser un travail comparatif au départ d'un frottis de spores collées à l'eau albumineuse.

TRAVAIL SUR DU MATÉRIEL FRAIS

1^{er} MO : « le secouage selon le Dr. Boiffard²³ »

- + Sur une LPO, déposer une goutte de BDC au 1/3 gauche ou droit, et une goutte d'eau bidistillée au milieu.
- + Prélever un fragment de lame (5 x 5 mm) sur le champignon.
- + Immerger soigneusement dans la goutte de BDC, durant 10'.
- + Couvrir la lame avec un récipient adapté, afin de limiter au maximum l'évaporation.
- + Récupérer le sujet à l'aide d'une pince à pointes fines.
- + Poser recto/verso sur du papier absorbant.
- + Secouer longuement et très vivement la pièce dans la goutte d'eau afin de libérer un maximum de spores.
- + Couvrir d'une LCO et observer à x1000, à l'immersion.

²² Voir également à ce sujet l'article paru dans le bulletin de l'AMFB (Association des Mycologues Francophones de Belgique), 2013/06, pp. 46-48, où sont développés les éléments de chimie théorique, ainsi que les diverses méthodes de préparation possibles.

²³ **BOIFFARD J.**, 1973 - « *Etude microscopique du genre Lepiota* », Documents Mycologiques, fasc. 8.



F. Draye, 2013 - ©

2^{ème} MO : « la technique de R. Kühner »

- + Ecraser un fragment de tissu dans une grosse goutte de BDC entre deux LPO.
- + Enlever une des lames et verser sur le fragment dissocié une nouvelle goutte de BDC.
- + Laisser agir 10'.
- + Couvrir d'une LCO et observer à x100, à la lumière du jour (afin de bien saisir les nuances de violet qui paraissent plus rouges avec une lumière artificielle) ; à la loupe, il est déjà possible de reconnaître une réaction métagénomique, mais le contrôle microscopique est indispensable, à cause de la superposition des teintes.

3^{ème} MO : « la méthode ammoniac-acétique de Locquin »

PRÉAMBULE

Préparer 3 verres de montre, avec respectivement de l'ammoniaque pure (1), de l'acide acétique glacial (2) et de l'eau bidistillée (3), ainsi que 3 verres de montre qui serviront de couvercle, afin de limiter l'évaporation → nous conseillons vivement de travailler sous hotte ou dans un local très bien ventilé car (1) & (2) sont très agressifs pour les yeux et les poumons.

- + Prélever un fragment de lame (5 x 5 mm) sur le champignon.
- + Immerger soigneusement dans (1) durant 5' et couvrir.
- + Récupérer le sujet à l'aide d'une pince à pointes fines puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Immerger soigneusement dans (2) durant 5' et couvrir.
- + Récupérer le sujet à l'aide d'une pince à pointes fines puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Rincer longuement et délicatement dans (3), afin de ne pas détacher les spores, puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Appliquer ensuite in extenso le 1^{er} MO, selon Boiffard (voir page précédente).

TRAVAIL SUR DU MATÉRIEL SEC

1^{er} MO : « la technique ammoniacale à froid »

- + Prélever un fragment de lame (5 x 5 mm) sur le champignon.
- + Immerger soigneusement dans l'ammoniaque pure durant 5' et couvrir.
- + Récupérer le sujet à l'aide d'une pince à pointes fines puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Rincer longuement et délicatement dans l'eau bidistillée (verre de montre), afin de ne pas détacher les spores puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Appliquer ensuite in extenso le 1^{er} MO, selon Boiffard (voir page précédente), mais laisser 20 à 30' dans le BDC.

2^{ème} MO : « la technique aqueuse à froid »

- + Prélever un fragment de lame (5 x 5 mm) sur le champignon.
- + Le déposer dans un récipient hermétique contenant un bout d'éponge imbibé d'eau bidistillée.
- + Laisser agir durant une heure.
- + Récupérer le sujet à l'aide d'une pince à pointes fines puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Appliquer ensuite in extenso le 1^{er} MO, selon Boiffard (voir page précédente), mais laisser 20 à 30' dans le BDC.

3^{ème} MO : « la technique longue, ammoniacale, à chaud »

- + Prélever un fragment de lame (5 x 5 mm) sur le champignon.
- + Le déposer dans un verre de montre avec quelques gouttes d'ammoniaque pure.

- + Saisir à l'aide d'une pince adéquate ou d'une pince à linge et porter à la flamme.
- + Laisser agir 2 ou 3'' seulement (attention : vapeurs très agressives) : le regonflage est immédiat.
- + Récupérer le sujet à l'aide d'une pince à pointes fines puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Rincer longuement et délicatement dans l'eau bidistillée (verre de montre), afin de ne pas détacher les spores puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Appliquer ensuite in extenso le 1^{er} MO, selon Boiffard (voir page précédente), mais laisser 20 à 30' dans le BDC.

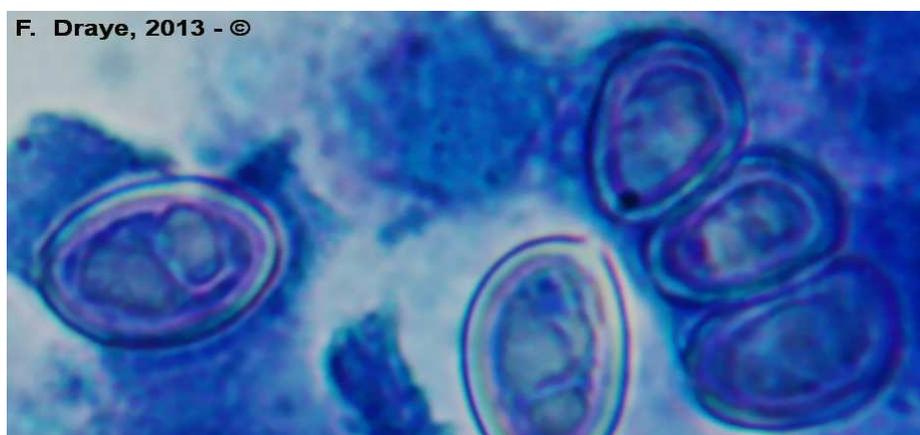
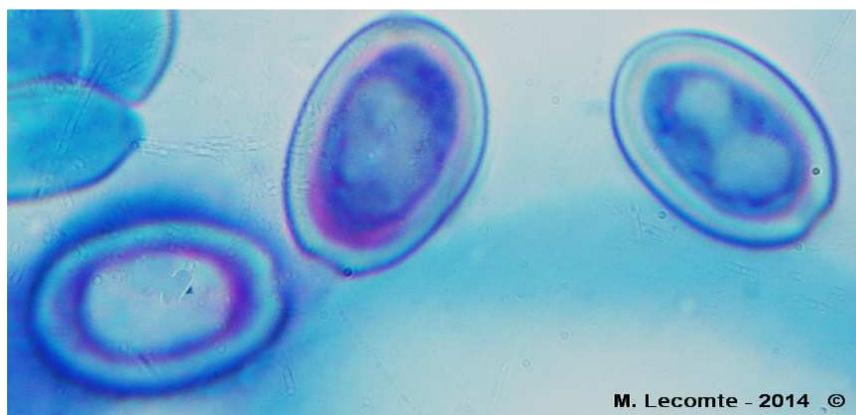
4^{ème} MO : « la technique courte, ammoniacale, à chaud »

- + Prélever un fragment de lame (5 x 5 mm) sur le champignon.
- + Déposer quelques gouttes d'ammoniaque pure sur une LPO.
- + Saisir à l'aide d'une pince adéquate ou d'une pince à linge et porter à la flamme durant 2 ou 3'' seulement (attention : vapeurs très agressives) : le regonflage est immédiat.
- + Récupérer le sujet à l'aide d'une pince à pointes fines puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Rincer longuement et délicatement dans l'eau bidistillée (verre de montre), afin de ne pas détacher les spores puis éponger recto/verso sur du papier absorbant.
- + Appliquer ensuite in extenso le 1^{er} MO, selon Boiffard (voir page précédente), mais laisser 20 à 30' dans le BDC.

5^{ème} MO : « la méthode ammoniac-acétique de Locquin , à chaud »

Le MO est exactement semblable que celui décrit précédemment, sinon qu'on chauffe l'ammoniaque durant quelques secondes, au lieu d'appliquer un bain froid de 5'.

Nous avons expérimenté tous les MO et les résultats peuvent être qualifiés de bons à excellents. Notre préférence va au MO 3 sur sporophore frais, au MO 2 à froid et au MO 3, à chaud sur exsiccatum. L'endospore est très bien colorée, et en outre, les enveloppes sporaes sont bien séparées. On peut aussi vérifier la présence d'un pore germinatif et d'un tractus²⁴ sporal.



²⁴ C'est l'endroit où l'endospore monte jusqu'à l'exospore.

La sidérophilie des basides

Des basides sont carminophiles (ou mieux, sidérophiles) lorsqu'elles sont littéralement bourrées de granulations +/- sphériques noires ou carmin foncé, qui apparaissent en présence du mélange à chaud de carmin acétique de Sémichon et de chlorure de fer III (ou d'oxyde de fer).

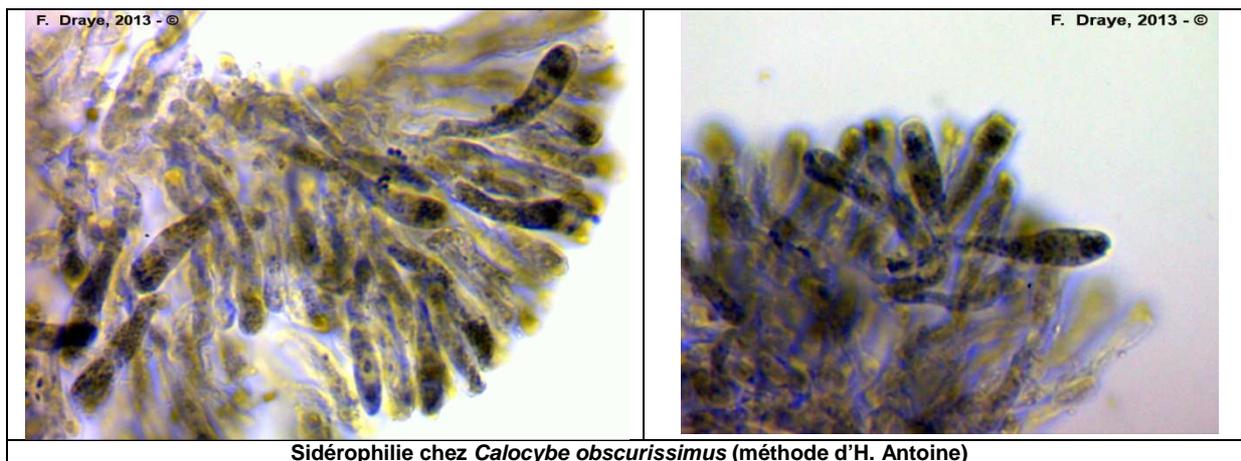
Cette technique de coloration va s'appliquer aux *Lyophyllum*, *Tephrocybe*, *Calocybe*. C'est également le cas des *Nyctalis*.

Les deux premiers MO sont à utiliser impérativement sur du matériel frais, ce que nous conseillons fortement.

On ne va utiliser le 3^{ème} MO que si on dispose uniquement de matériel sec : nous la considérons comme un pis-aller, assez efficace cependant.

Au niveau des résultats comparatifs, le 2^{ème} MO nous semble le meilleur car les résultats sont toujours bons à très bons, vu la facilité de manipulation.

Cela ne signifie pas que le 1^{er} MO soit mauvais, mais la mise en œuvre de ce dernier est délicate, plus compliquée et fastidieuse, ce qui génère des résultats inconstants et parfois décevants.



Sidérophilie chez *Calocybe obscurissimus* (méthode d'H. Antoine)



◀ Réaction acéto-ferrique des basides de *Lyophyllum decastes*

1^{ER} MODE OPÉRATOIRE, dit « classique » :

- + Placer une grosse goutte de carmin acétique sur une LPO et y placer le bout de lame du sporophore.
- + Saisir la LPO avec une pince à linge en bois, ou tout autre outil adapté, afin d'éviter les brûlures.
- + Chauffer à la flamme durant quelques secondes jusqu'aux premières bulles (attention : veiller à utiliser une LPO neuve, non fissurée, sinon elle risque d'éclater ... le même accident peut survenir si on approche la LPO trop près de la flamme).

- + Ajouter une gouttelette de chlorure de fer III (ou remuer avec un clou rouillé, ou tout autre bout de fer oxydé).
- + Compenser l'évaporation par un apport de carmin, goutte par goutte.
- + Dès que le carmin acétique vire au rouge bleuâtre puis noirâtre, et perd sa transparence, refroidir avant la formation d'une pellicule de surface (toute l'opération dure de 60 à 90 secondes).
- + Répéter l'opération jusqu'au moment où il est impossible de distinguer le bout de lame dans le liquide.
- + Récupérer le fragment de champignon et le rincer.
- + Changer de LPO et utiliser une neuve.
- + Dissocier éventuellement, mais le résultat est beaucoup meilleur si on réalise de fines coupes transversales.
- + Observer en plaçant la coupe dans une nouvelle goutte de carmin acétique ; cependant, une observation dans l'hydrate de chloral à 50 % (ou dans le chloral lactique) est nettement supérieure en qualité, car l'indice de réfraction est meilleur et ce milieu joue un rôle d'éclaircissant.
- + Il est impératif d'observer à x100, à l'immersion.

2^{ÈME} MODE OPÉRATOIRE, dit « méthode d'Hubert Antoine » :

Fabriquer un petit outil indispensable, à l'aide d'un morceau de fer doux.

- Prélever un fragment de 5 x 3 cm de long, et 1 mm d'épaisseur.
- A 2 cm du bout, former par emboutissage une cuvette de 1-2 mm de profondeur et 1 cm de Ø (il est encore plus simple d'utiliser une mèche à fer de 10, qui va creuser un cône).
- Y fixer ensuite un bout de lame de scie à métaux de 10 cm de long, ou mieux encore, un manche en bois (moins bon conducteur de la chaleur).



- + Remplir la cuvette aux 3/4 de carmin acétique et y placer le bout de lame du sporophore.
- + Bien mouiller le fragment et le noyer dans le colorant.
- + Chauffer à la flamme jusqu'aux premières bulles.
- + Laisser bouillir durant 4 à 5'', en remuant avec un outil inoxydable.
- + Compenser l'évaporation par un

apport de carmin, goutte par goutte.

- + Récupérer le fragment de lame et le rincer.
- + Le placer sur une LPO propre.
- + Réaliser de fines coupes transversales.
- + Observer dans l'hydrate de chloral.
- + Utiliser l'objectif x100 à immersion.

Cette méthode présente l'avantage de devoir moins utiliser de carmin acétique, qui est un colorant coûteux.

Réaction acéto-ferrique des basides de *Lyophyllum decastes* ▶



3^{ÈME} mode opératoire, dit « procédé de Kühner » :

- + Déposer 10 à 15 gouttes de picroformol de Bouin ou mieux encore, de fixateur de Hollande.
- + Y placer le bout de lame du sporophore.
- + Bien mouiller le fragment et le noyer dans le fixateur.
- + Laisser séjourner durant 3 à 5'.
- + Sortir le fragment de lame ; l'éponger, MAIS SURTOUT NE PAS RINCER.
- + Placer dans la cuvette métallique.
- + Déposer 3 ou 4 gouttes de carmin acétique de Sémichon.
- + Chauffer à la flamme jusqu'aux premières bulles.
- + Laisser bouillir durant 4 à 5'', en remuant avec un outil inoxydable.
- + Compenser l'évaporation par un apport de carmin, goutte par goutte.
- + Récupérer le fragment de lame et le rincer.
- + Le placer sur une LPO propre.
- + Réaliser de fines coupes transversales.
- + Observer obligatoirement dans l'hydrate de chloral.
- + Utiliser l'objectif x100 à immersion.

Le mélange de Giemsa

Appelé colorant de Giemsa, il a été inventé par Gustav Giemsa (1867-1948), chimiste et pharmacien. En 1902, il initie cette technique de coloration, afin de mettre en évidence le parasite de la malaria (*Plasmodium falciparum*) dans les frottis sanguins.

Il se présente comme un mélange rose violacé de deux produits (azur de méthylène et éosine).

La littérature nous apprend qu'il se vend tout préparé et existe sous 2 formes :

- le giemsa rapide qui donne des colorations intenses en peu de temps (10' - il convient pour les frottis séchés)
- le giemsa lent qui précipite moins rapidement que le précédent (20' - à utiliser avec des frottis humides ou des coupes).

Ce dernier existe aussi en poudre pour une préparation personnelle (avec alcool méthylique et glycérine). Cependant, nous ne le conseillons pas car c'est long, fastidieux et impose l'utilisation d'une étuve durant 2 à 14 jours.

Personnellement, nous utilisons le mélange « azur-éosine-bleu de méthylène », en solution dans l'alcool méthylique, préparé par les Laboratoires Merck.

CHAMPS D'APPLICATION

Dans la moelle osseuse, les noyaux sont bleu noir à violet, le cytoplasme bleu pâle et les érythrocytes rose pâle.

C'est un colorant spécifique des chromosomes ; il permet notamment de mettre en évidence les territoires chromosomiques.

Il colore en bleu les structures cytoplasmiques et en rouge pourpre les noyaux et tout autre organe contenant de l'ADN.

EN MÉDECINE

On va l'utiliser pour mettre en évidence les protozoaires parasites du sang ou des tissus (plasmodes, trypanosomes, filaires, *Leishmania*, *Toxoplasma*), de même que les mycoses humaines ou animales.

MODE OPÉRATOIRE

- + Réaliser un frottis.
- + Le fixer dans du méthanol durant 2', après l'avoir séché à l'air (en le secouant).
- + Rincer à l'eau de distribution (ESSENTIEL).
- + Dans une cuve à coloration, préparer un mélange de giemsa R à 10 % dans une solution tampon à pH 7 (on peut aussi couvrir la lame avec une pissette).
- + Laisser séjourner 20' dans la solution.
- + Rincer à l'eau du robinet.
- + Couvrir de Merckoglass.
- + Laisser sécher puis observer à l'immersion x100.

RÉSULTATS

- + Les noyaux sont colorés en rouge pourpre.
- + Le cytoplasme des cellules parasitaires ou fongiques est coloré en bleu +/- foncé.
- + Les parois des champignons et certains kystes ne prennent pas le colorant et apparaissent entourés d'un halo clair.

EN MYCOLOGIE

Robert Kühner l'utilise pour colorer les noyaux, selon une technique sophistiquée et assez longue, mais sans grande difficulté. Elle les met remarquablement en évidence.

- + Fixation à l'éthanol à 95°, ou mieux encore, au méthanol absolu (cette étape 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), chauffé 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 absolu.
- + 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 cc 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 LPO 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.
- + Poser une LCO avec de l'eau bidistillée, ou mieux encore de l'ammoniaque diluée 2x.
- + Dissocier éventuellement par percussion, si c'est nécessaire.

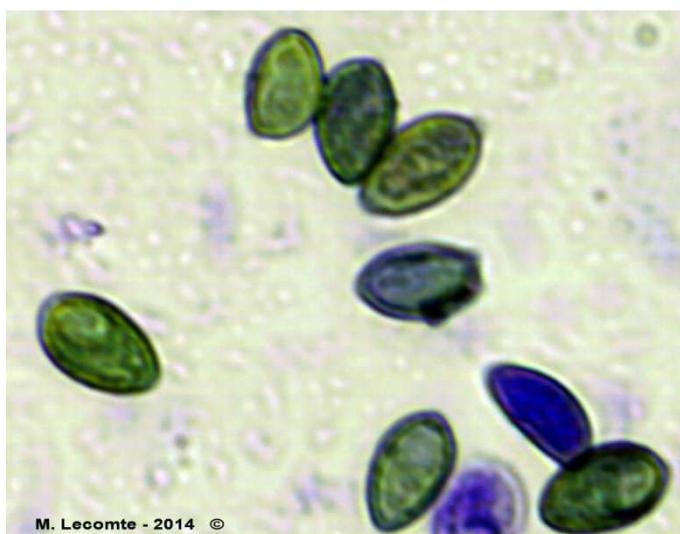
En 1972, R. Kühner l'utilise pour colorer de manière élective l'endospore (mince feuillet interne de la paroi sporique) des *Lepiota*. Il perfectionne une double coloration giemsa/iode qui permet de distinguer très nettement, en dehors de l'endospore, deux feuillets (couches) supplémentaires qui avaient déjà été proposés par Locquin ; l'endospore, qui a été colorée en rouge pourpre par le giemsa, noircit après traitement à l'eau iodo-acétifiée, ce qui met les deux couches en évidence.

Selon R. Kühner, en colorant des lames de *Galerina marginata* au giemsa, on remarque que la paroi des basides prend une coloration rouge vif au niveau de la partie ventrue ; nous avons tenté de répéter l'expérience, mais sans succès, sur les seuls exsiccata dont nous disposions ; il serait très intéressant de reconduire cette expérimentation sur du matériel frais.

Dans un article sur les *Hygrocybe*, Kühner insiste sur l'importance du nombre de noyaux dans les spores (travail sur sporée à maturité) mis en évidence avec le giemsa.



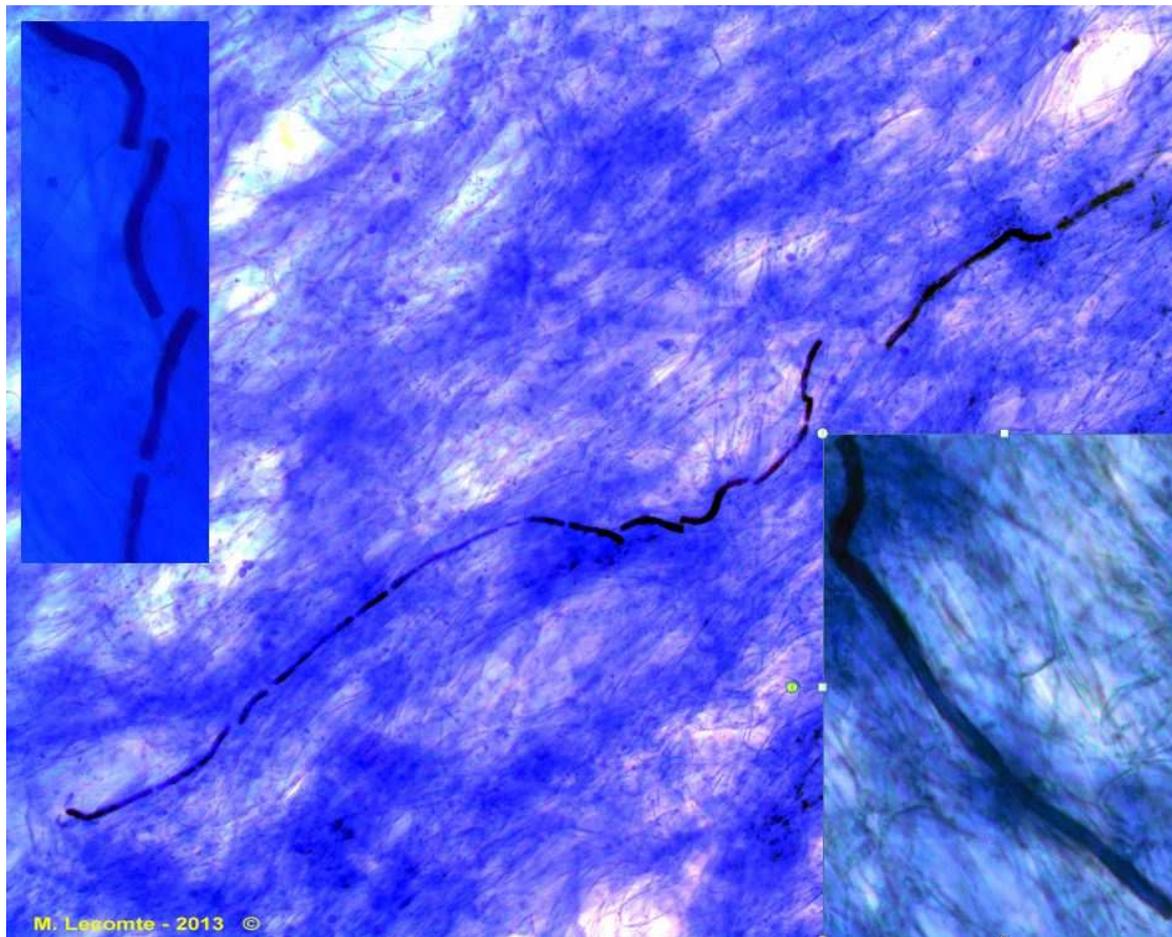
▲ Les spores de *Galerina marginata* après traitement au giemsa durant 15'



Les mêmes spores après 8 h de coloration ►
Les différentes parois sont visibles, mais difficile de parler de métachromasie.

Une observation intéressante chez *Armillaria* sp.

Selon H. Cléménçon²⁵, la trame du chapeau d'*Armillaria ostoyae* contient des hyphes thromboplères qu'on peut mettre en évidence avec du bleu coton, du bleu patent V ou de l'éosine G : elles deviennent alors bleu noirâtre.

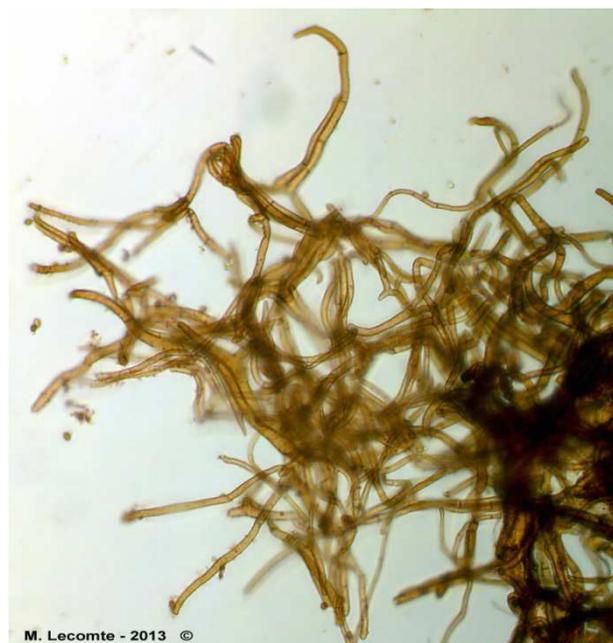


Nous avons tenté l'expérience, et il a fallu une dizaine de préparations pour trouver le sujet recherché.

MODE OPÉRATOIRE

- ++ Réaliser de fines coupes longitudinales et transversales dans la partie la plus charnue du chapeau d'*A. ostoyae* (travail à main levée ou au microtome de Ranvier).
- ++ Trier les coupes à la loupe stéréoscopique, afin de choisir les meilleures (critères de choix : finesse et régularité).
- ++ Placer les coupes dans un verre de montre et baigner avec du bleu coton lactique.
- ++ Laisser agir le colorant durant 15 à 45' (nous avons eu le sentiment que plus le spécimen est vieux et sec, plus il faut allonger le temps de coloration).
- ++ Rincer abondamment les coupes à l'eau.
- ++ Observer dans l'eau glycinée (50/50).
- ++ Repérer les thromboplères : ce sont des hyphes cylindriques, fortement colorés en bleu noirâtre.

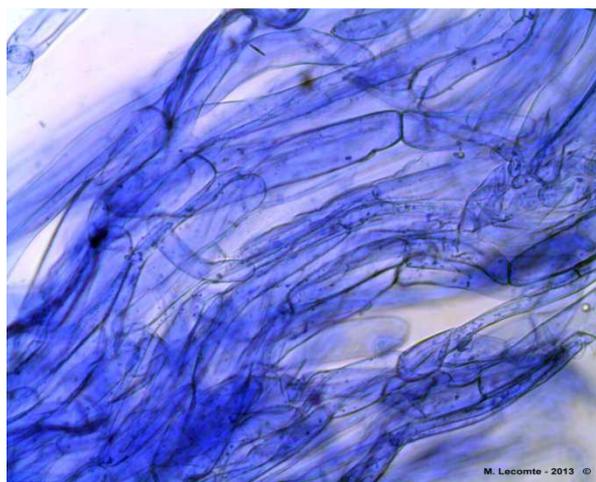
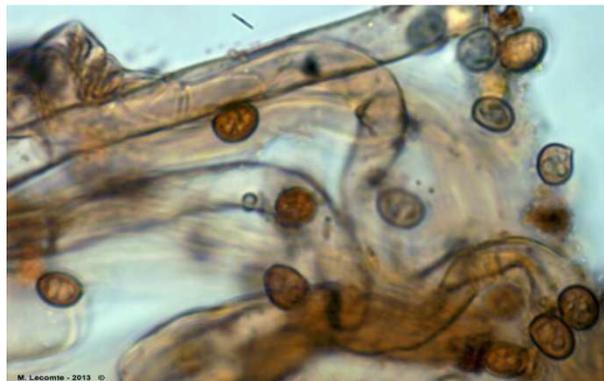
Voici les hyphes de l'armille du champignon ►



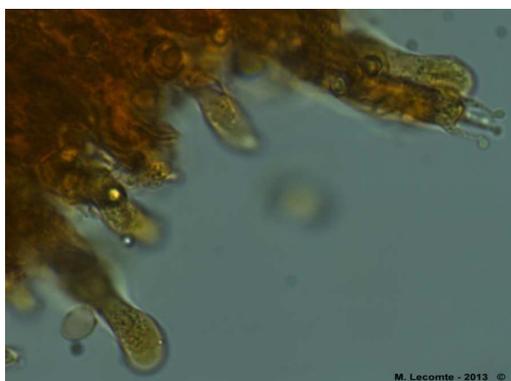
²⁵ CLEMENÇON H., « Grosspilze im Mikroskop, Ein Leitfaden für mikroskopierfreudige Pilzliebhaber ; Eine Anregung für pilzfremde Mikroskopie Liebhaber ». « Deutsche Gesellschaft für Mykologie, Beiheft zur Zeitschrift für Mykologie », Band 12, Deutschland, 2012.

C'est également l'occasion de réaliser une microscopie complète d'*A. ostoyae*.

▼ En y regardant de plus près, on se rend compte que les hyphes sont constellées de spores. ▼

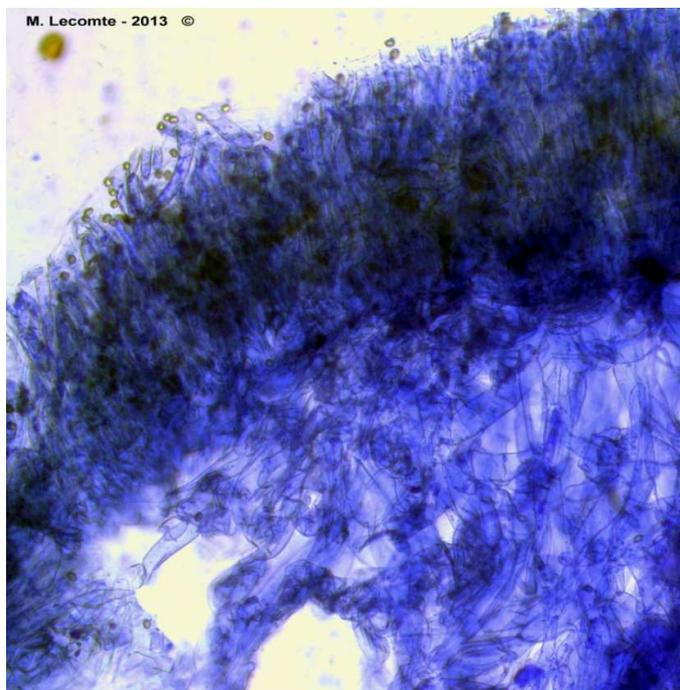


▲ Des hyphes de belle taille, qui constituent la chair du champignon.



Une coupe transversale dans la cuticule (coloration au bleu coton lactique) ►

3 couches sont nettement distinctes :
 + un épicutis constitué d'un chevelu très court, et assez serré,
 + une sous-couche d'hyphes verticales très serrées, dont certaines contiennent des pigments brun-jaune nettement visibles,
 + une couche profonde d'hyphes nettement plus volumineuses moins serrées et enchevêtrées.



Russula violeipes



Montage photographique réalisé par Patrice Tanchaud

LES SPORES



++ Les spores des *Russulaceae* (*Russula* et *Lactarius*) possèdent une ornementation particulière, qui peut être mise facilement en évidence, grâce à la réaction amyloïde classique, en présence d'une solution iodée (réactif de melzer, lugol, IKI ...).

++ On peut également colorer l'ornementation sporale en appliquant le processus carminoferrique (travailler sur un frottis fixé : voir le chapitre consacré à la sidérophilie).

On obtient également d'excellents résultats en colorant les spores avec du bleu coton lactique, en chauffant la préparation.

Quel que soit le moyen d'observation, il faut s'attacher à mettre en évidence les crêtes ou punctuations sporales, dont la disposition est très importante pour la détermination.

++ Pour mesurer les crêtes, il faut choisir des spores qui ont l'apicule de côté.

++ Les crêtes et les connectifs (réseau) s'observent sur la partie avant de la spore.

++ Les mesures de la spore se prennent avec l'apicule de côté, et sans compter la longueur des crêtes.

LA CUTICULE

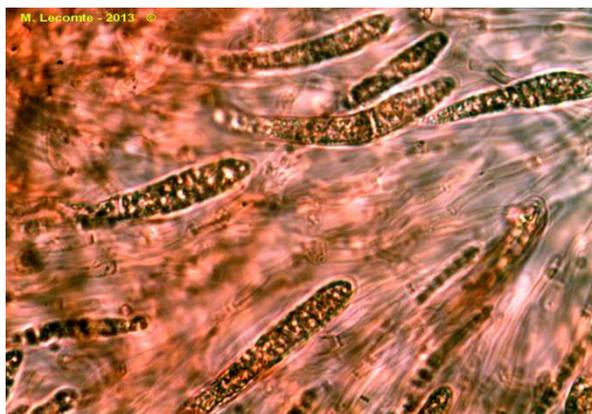
Il faut bien reconnaître que la détermination des russules à l'aide de clés qui utilisent des caractères microscopiques ne constitue pas une évidence et a découragé plus d'un mycophile.

Cuticule de *Russula atropurpurea*, traitée au RC SDS, montrant les piléocystides gorgées de pigments. ►

Nous allons tenter de vous familiariser avec une technique d'approche des russules qui permet d'entrer assez facilement dans les clés de détermination de Marcel Bon et par extension, dans quasi toutes les autres clés (Sarnari, Romagnesi), car elles sont basées sur la même démarche.

Il faut savoir que la partie du champignon la plus importante pour commencer la détermination d'une russule, va être le revêtement cuticulaire, et non les spores comme on serait tenté de le croire.

Une coupe radiale dans le chapeau d'un sporophore (ou dans le pied) laisse apparaître au microscope 3 zones ou couches importantes :



◀ Coupe radiale chez *Russula emetica*, avec les diverses couches de cellules.

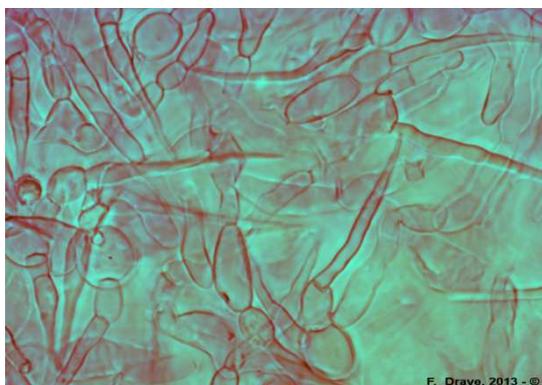
- **La couche profonde**, qui est la chair proprement dite et est composée de sphérocytes.
- **La couche médiane** est composée d'hyphes connectives entremêlées, dont les inférieures sont en contact avec les sphérocytes et dont les supérieures se redressent ; elle est appelée hypoderme (Schaeffer), médiocutis (Sarnari), cutis (Romagnesi), subpellis (P.A. Moreau).
- **La couche supérieure** prête à confusion car elle est parfois divisée en deux parties par certains auteurs, qui différencient le corps et les terminaisons des hyphes : appelons-la épicutis (Sarnari, Romagnesi) ou suprapellis (P.A. Moreau).

Le suprapellis nous intéresse tout particulièrement !

C'est pourquoi on étudiera le revêtement, non pas sur coupe radiale, mais sur scalp (coupe tangentielle mince), pour pouvoir observer une surface importante de suprapellis.

Un examen au microscope va permettre d'y reconnaître 3 éléments essentiels :

a/ **Des hyphes terminales** constituant la « base » de la structure piléique, qui sont des poils non diffé-



renciés, avec de rares cellules vides, et qui sont de petite taille (poils du chevelu).



▲ Piléocystides chez *R. violeipes* : ce sont des cystides cuticulaires, acuminées, avec des cellules basales ovoïdes à subglobuleuses. ▲

b/ **Des éléments très grands** (souvent 100 μ) à nombre de cloisons variable, souvent renflées à l'extrémité, et remplies d'une substance huileuse dense (noircissant dans les réactifs sulfo-aldéhydiques) : ce sont **les dermatocystides, ou piléocystides**.

c/ **Des hyphes primordiales**, de grande taille, cylindracées, à nombreuses cloisons et paroi souvent épaissie, mais à contenu peu visible et inerte dans les réactifs sulfo-aldéhydiques.

LA RECHERCHE DES INCRUSTATIONS ACIDO-RÉSISTANTES

Préalable

La FZ s'utilise dans le cadre d'une technique opératoire appelée **coloration régressive** et nécessite des coupes très minces et bien uniformes. En pratique, on surcolore l'objet à examiner et on le décolore ensuite petit à petit à l'aide d'un décolorant approprié, appelé différenciateur.

Le but final à atteindre est d'obtenir une préparation où les parties qu'on désire mettre en évidence s'affichent nettement colorées sur un fond uniformément décoloré. La différenciation s'effectue généralement avec de l'alcool très titré, voire absolu, ou une solution d'acide chlorhydrique ; la grosse difficulté de cette régression réside dans le dosage de la décoloration qui, si elle n'est pas arrêtée à temps, se termine par une décoloration totale.

Préparation du matériel

Comment procéder ?

Cette technique demande du soin et de la méticulosité, si on souhaite obtenir des préparations spectaculaires ; elle est rarement réussie au 1^{er} essai ... surtout, pas de découragement !

→ Réaliser un scalp assez épais à la lame de rasoir ; il nous apparaît plus facile de "peler" le champignon en enlevant une "épluchure" d' 1/2 cm de large ; il en résulte un fragment de scalp qui va en s'amenuisant et l'extrémité est quasi prête à l'emploi.

→ Le retourner sur l'ongle et gratter délicatement toute la chair avec la lame de rasoir (en cuisine, "émincer" ! → c'est une manipulation délicate qui demande du soin) ; diviser le scalp obtenu en deux parties (la seconde partie sera utilisée pour la recherche des dermatocystides SB+).

→ ATTENTION ! ne pas oublier de replacer le fragment préparé à l'endroit.

La recherche des incrustations peut s'effectuer selon trois techniques

Ce chapitre avait déjà été développé dans le tome 1 de notre travail, mais durant ces deux dernières années, nous avons eu l'occasion de réexaminer tout cela à la lumière d'exposés nouveaux, et nous vous livrons cette fois ce qui nous semble être la version la plus actuelle.

1. La méthode différentielle de MELZER

MODE OPÉRATOIRE

+ Déposer sur la partie gauche d'une LPO une goutte de FZ ; préparer au centre une goutte d'eau de rinçage et à droite une goutte d'HCl dilué à 5 %.

+ Déposer le morceau résultant du grattage dans la FZ et y laisser le scalp durant 1 à 2 minutes.

+ Faire glisser le scalp dans l'eau et rincer.

+ Éliminer la goutte de FZ et la goutte d'eau souillée (papier absorbant) et déposer au centre de la lame une goutte d'eau propre.

+ Faire glisser le scalp dans HCl, durant 30 à 60" (cette opération provoque la régression de la coloration). On peut observer directement dans la solution acide, avec certaines réserves (*1).

+ Faire glisser dans la goutte d'eau centrale (*2), afin de bloquer la régression ; placer la LCO et observer :

→ **Les incrustations apparaissent comme des petites masses bleu mauve réparties autour de la dermatocystide. Sur une préparation bien faite, les incrustations sont les seuls éléments non décolorés par l'acide.**

(*1) → Si on observe dans l'acide, on ne bloque pas la régression et la décoloration continue, ce qui nécessite une observation rapide, valable pour la routine ou un contrôle rapide.

(*2) → S'il s'agit de réaliser de plus longues observations et de prendre des photos, il vaut mieux passer de l'acide à la goutte d'eau, avant de poser la LCO.

2. La méthode directe de Blum

MODE OPÉRATOIRE

- + Déposer sur la partie gauche d'une lame porte-objet une goutte de FZ et la diluer avec une goutte d'eau (= FZ à 50 %).
- + Déposer le morceau résultant du grattage dans la solution de FZ et y laisser le scalp durant 5 à 10 minutes.
- + Faire glisser la scalp dans l'eau ; placer la LCO et observer.
 → **les incrustations apparaissent comme des petites masses bleu mauve réparties comme une chaussette autour de la dermatocystide, mais non contrastées avec le fond, qui est seulement plus clair. Méthode valable uniquement sur du matériel frais, et avec des résultats très mitigés, voire peu convaincants.**

3. La méthode différentielle de Cléménçon

MODE OPÉRATOIRE

- + Pour du matériel sec, laisser macérer d'abord dans de l'ammoniaque à 5 % durant 5 minutes, puis aspirer le liquide.
- + Immerger le bout de scalp dans une grosse goutte de carbolfuchsin, durant 3 à 5 minutes (l'idéal est de travailler dans une lame avec une dépression, si on réalise des séries d'observations), mais un dépassement de temps de coloration, même important (30'), n'est pas dommageable.
- + Rincer 2x à l'eau.
- + Transférer la pièce dans une goutte de lactoglycérol, durant 1 minute.
- + Répéter l'opération 2 ou 3 fois, jusqu'à ce que plus aucune trace de colorant ne se manifeste dans la goutte : c'est ici que se produit la régression de coloration !
- + Bloquer la régression en passant dans une goutte d'eau.
- + Couvrir d'une LCO et observer à l'immersion 100x.

Quelques REMARQUES

- ++ Les incrustations acido-résistantes peuvent se trouver sur les dermatocystides et sur les hyphes primordiales.
- ++ ATTENTION de ne pas confondre les incrustations acido résistantes qui se trouvent **à l'extérieur** des cystides, avec des granulations internes des cystides qui sont parfois aussi vivement colorées (il s'agit alors de contenus vacuolaires).
- ++ Selon B. Buyck, il serait possible d'observer des incrustations métachromatiques sur les poils du chevelu (observer dans le bleu de crésyl) → notamment sur *cyanoxantha* – *cutefracta* – *langei*.
Il n'y a pas de métachromasie chez *insignis* & *ochroleuca*.

Quelques ASTUCES

- ++ Quand une russule est âcre, elle n'a pas d'incrustations (sauf *R. rubra* qui est rouge à odeur de miel, *R. rutila* qui est rouge à sporée foncée et *R. ochroleuca*)
- ++ Les russules "incrustées" ont une cuticule généralement mate et souvent une marge pruineuse ; cependant, *R. badia* est pruineuse et non incrustée tandis que *R. integra* est incrustée et non pruineuse (c'est assez amusant, du fait qu'elles sont quasi des sosies).

Observation des dermatocystides

Henri Romagnesi a montré, en son temps, toute l'importance qu'il faut attacher, dans le genre *Russula*, à l'observation de trois éléments du revêtement cuticulaire : les dermatocystides, les hyphes primordiales et les poils du chevelu. Il ne voyait pas de difficultés majeures dans l'observation de ces poils ; en revanche, il a souligné le fait que « *des mycologues expérimentés n'ont pas perçu des dermatocystides épicuticulaires, là où elles existaient pourtant* ». Ces dermatocystides, selon lui, sont « *essentiellement caractérisées par la présence de corps noircissant dans les réactifs sulfoaldéhydiques* ».

Personnellement, nous nous demandons si les amateurs de russules ne se sont pas trop focalisés sur la prétendue difficulté d'observation des dermatocystides et du coup n'ont pas osé les observer dans un milieu autre que les réactifs sulfoaldéhydiques.

Nous vous proposons ci-après un mode opératoire relativement simple d'application, et qui donne généralement des résultats d'une excellente lisibilité. Dans un premier temps, il ne nous paraît pas indispensable d'utiliser ces réactifs sulfoaldéhydiques, qui sont d'un maniement délicat, voire dange-

reux, car ils impliquent la mise en œuvre d'acide sulfurique à haute concentration, avec les risques de manipulation que cela comporte : brûlures graves ou dégradation de l'objectif du microscope. Notre expérience personnelle nous conduit à penser que ces derniers réactifs sont à réserver à de rares cas "récalcitrants".

Les conditions à remplir pour arriver à une bonne mise en évidence des dermatocystides sont :

- + travailler sur des sujets frais, comme le souligne quasi impérativement Romagnesi,
- + réaliser un scalp bien en biais, dans une partie du revêtement cuticulaire médian (entre le centre du chapeau et la marge),
- + utiliser un colorant adéquat.

Le RC SDS, selon la formule de Cléménçon, révèle en général extrêmement bien les dermatocystides, mais aussi les poils de la cuticule (il est important de le souligner).

Comme l'a très bien exposé Bart Buyck (2007), **le bleu de crésyl de Cléménçon** aboutit souvent à un aussi bon résultat, à condition que l'échantillon observé soit suffisamment petit.

Il présente en outre deux grands avantages :

- + Quoique moins lumineux que le RC, ce colorant révèle aussi, et très bien, les laticifères et les incrustations notamment des hyphes primordiales, ... sans parler de ses propriétés métachromatiques.
- + La réaction est indifférente à l'état du champignon (frais, exsiccatum, jeune, vieux, conditions climatiques dommageables).

En suivant minutieusement la méthode décrite ci-dessous, il est rare de rencontrer un échec ; si c'est le cas, il faut alors s'interroger sur la cause du problème et chercher l'erreur de manipulation ; nous conseillons vivement d'effectuer quelques préparations à titre d'entraînement sur des espèces bien connues, où la présence de poils cuticulaires et de dermatocystides est évidente ; et surtout, plus pragmatiquement, ne pas craindre d'effectuer une nouvelle préparation. Éventuellement, utiliser un autre colorant.

1. La méthode de Jean LACHAPPELLE

MODE OPÉRATOIRE

- + Prélever un scalp de quelques millimètres sur une zone +/- proéminente (pincer si nécessaire) située près du centre du chapeau, approximativement au 1/3 du rayon, en prenant soin de biaiser aussi finement que possible.
- + Déposer le scalp dans l'eau, le retourner et éponger.
- + Sous la loupe stéréoscopique (à défaut, sous une loupe quelconque et sous un bon éclairage), découper l'étroit pourtour biaisé (le bord du bord !) ; le débiter en quelques très petits morceaux qui doivent ressembler à des lambeaux de dentelle ; les transporter "par voie d'eau" dans le bleu de crésyl.
- + Laisser agir le colorant durant 2 à 3 minutes ; poser la LCO ; écraser doucement d'un mouvement vertical (et non de translation) de manière à avoir une dispersion centrifuge (en bouquet) qui révèle mieux le « chevelu ».
- + Si l'observation à sec (40 ou 60x) suffit généralement, elle est tout de même meilleure sous les objectifs à immersion (63x ou 100x). Ne pas oublier de retirer l'éventuel filtre bleu du microscope.
- + Si le manque de résultats se confirme et qu'après cela, vous n'arrivez pas à mettre en évidence les dermatocystides, il est temps maintenant d'avoir recours aux réactifs sulfoaldéhydiques.

2. La méthode préconisée par Pierre-Arthur MOREAU



◀ Piléocystides sur la cuticule de *Russula emetica*, après traitement à la SV.

MODE OPÉRATOIRE

Il est basé sur une méthode de grattage, qui est une trouvaille de Christian Dagron

→ Déposer sur la partie gauche d'une LPO une goutte d'acide sulfurique (H_2SO_4) dilué au maximum à 50 % ainsi qu'une goutte de benzaldéhyde (plus généralement, n'importe quel aldéhyde) et mélanger les deux. Il est évident que la réaction est beaucoup plus vive et plus nette avec de l'acide sulfurique à 80 %.

→ Réaliser un scalp à la lame de rasoir.

→ Le retourner sur l'ongle et gratter délicatement toute la chair avec la lame de rasoir. 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 LPO.

→ Y faire glisser le scalp, placer la LCO et observer : les dermatocystides apparaissent comme des « têtards » dont la couleur varie du gris bleu au noir. On dit alors qu'elles sont SBA+.

Quelques REMARQUES

++ Il faut savoir que les *Compactae* (*R. nigricans*), les *Delicineae* (*R. delicata*) et les *Foetentineae* (*R. foetens*) ont des dermatocystides grêles, parfois difficiles à observer, ainsi que quelques ochrospores douces : *R. romellii*, *R. curtipes*, *R. rubroalba*, qui peuvent paraître acystidiées en première observation (elles sont seulement beaucoup moins abondantes chez ces espèces).

++ Après application du réactif SBA, 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.

++ 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.

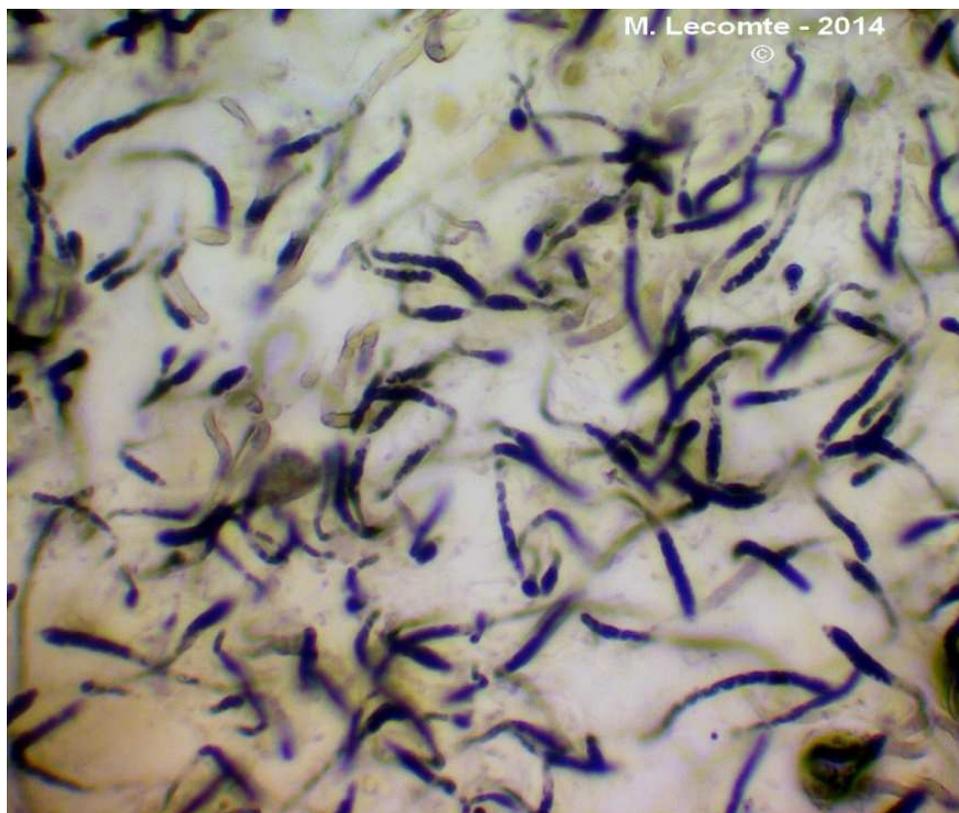
++ Il est fortement conseillé d'utiliser ces réactifs en préparation extemporanée, car les solutions acides s'avèrent instables, polymérisent et ne se conservent pas.

++ 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.

++ 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 .

++ Pour l'observation du scalp après réaction, nous conseillons fortement d'utiliser de l'eau bidistillée, et non de l'eau du robinet. Lorsqu'on passe à l'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 la glycérine.

++ **Si on observe dans l'acide**, 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 !



Dermatocystides SBA+ chez *Russula sanguinaria*

Le genre *Lactarius*

OBSERVATION DE LA CHAIR



Hyphes laticifères chez *Lactarius fluens*, observées dans le RC SDS ▶

OBSERVATION DE L'ORNEMENTATION D'UNE LAME

- + Prélever un fragment de lame.
- + Colorer au RC SDS.
- + Rincer soigneusement et observer à 63 ou 100x, à l'immersion.
- + Résultat : on distingue nettement les cystides, les basides et basidioles (il s'avère difficile de faire la différence entre une cystide banale et une basidiole).

◀ Hyphes laticifères chez *Lactarius deterrimus*, révélées par la SV.

- + Prélever un morceau de lame et pratiquer une dissociation légère.
- + Déposer une goutte de sulfovanilline (50/50 avec acide sulfurique à 80 %).
- + Laisser agir le colorant durant 2-3 minutes.
- + Pratiquer une seconde dissociation plus sévère.
- + Observer à 100x dans le réactif ; attention : pratiquer avec beaucoup de soin afin d'éviter tout débordement d'acide, susceptible d'endommager les optiques.
- + Repérer les laticifères (◀) : ce sont des hyphes non cloisonnées, contenant un latex ; ils se colorent en bleu noirâtre sous l'action de la SV.



Attention ! Il est impératif de faire varier la profondeur de champ afin de vérifier si on est en présence d'une baside bi- ou tétrasporique.

Lactarius deterrimus ▲



F. Draye, 2013 - ©

◀ Belles basides 4-sporiques chez *Lactarius fluens* ▼



F. Draye, 2013 - ©



M. Lecomte - 2013 ©

OBSERVATION DES SPORES

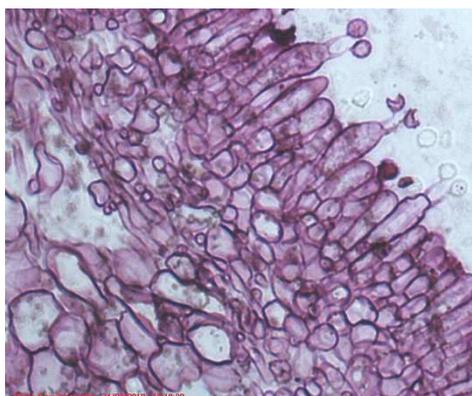


M. Lecomte - 2013 ©

▲ Spores très ailées de *Lactarius pterosporus* ►

- + Travailler de préférence sur une sporée.
- + Révéler les ornements avec le réactif de Melzer.
- + Lorsque les spores sont bien noircies, évacuer l'excédent de melzer à l'aide d'un papier absorbant.
- + Observer à 100x, à l'immersion.

+ Résultat : sur la photo de gauche, nous avons trop pressé la LCO et le cytoplasme de la spore est sorti de l'enveloppe sporale, formant ces deux masses ivoirines ; ces deux photos résultent chacune d'un empilage de 3 images, réalisé à l'aide de Combine Z, afin de contrer la problématique de la faible profondeur de champ.



OBSERVATION DE LA TRAME D'UNE LAME

- + Prélever un morceau de lame.
- + Réaliser une coupe transversale très fine, permettant de voir les cheilocystides et les pleurocystides.
- + Colorer au bleu azur.
- + Rincer et observer à 100x, à l'immersion.
- + Résultat : on voit nettement la trame bilatérale, ainsi que les cystides, macrocystides, basides et basidioles.

◀ Coupe de Russulale réalisée au microtome automatique, après inclusion dans de la résine synthétique, selon la technique de Cléménçon.

Sordaria macrospora : reproduction et génétique

Position dans la classification

Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Sordariales, Sordariaceae, *Sordaria*

Le genre *Sordaria*

Il contient près de 250 espèces de par le monde ; dans nos régions, nous allons en rencontrer quelques-unes, qui sont toujours de très petite taille (les périthèces²⁶ mesurent généralement entre 0,4 et 0,7 mm de Ø) et qui se développent sur des déjections animales diverses : vache, cheval, lapin, écureuil, chevreuil, lièvre, chien...



Ici, les périthèces de *Leptosphaeria acuta* (*Leptosphaeriaceae*), qui poussent sur des tiges d'ortie séchées ; cela donne une idée de la forme générale ; ils sont cependant un peu plus grands que ceux de *Sordaria macrospora*

Les périthèces poussent en groupe, et sont partiellement immergés dans leur support ; sphériques à pyriformes, ils sont de couleur brun noirâtre, à surface glabre ou légèrement poilue.

Sur le plan de la microscopie, les asques sont cylindriques, octosporés (sauf chez *S. polyspora*, qui compte 128 ascospores par asque), et non septés ; l'anneau apical ne réagit pas à l'iode ; les ascospores sont brunes à brun noirâtre, avec un pore germinal basal ; la plupart sont entourées d'une gaine gélatineuse.



Les implants, déposés sur le milieu gélosé et placés dans des conditions propices, vont générer du mycélium qui va envahir toute la BP ; à la ligne de confrontation entre les deux souches (+/- la ligne médiane de la BP), des brins de mycélium de polarités différentes, portant des gamètes provenant des deux souches, vont fusionner pour donner des périthèces hybrides, dans lesquels la caryogamie concernera des noyaux de génotypes différents.

Nous portons notre choix sur *Sordaria macrospora*²⁷, qui est commercialisé par une firme française spécialisée en matériel biologique destiné aux écoles (*Sordalab*²⁸), et dont la culture en série présente (en principe...) peu de difficultés.

²⁶ Chez certains Ascomycètes, la rencontre de deux filaments mycéliens de polarité différente va générer la formation d'un organe, d'une fructification, généralement en forme de bouteille ou de poire, dans lequel vont se développer les asques : c'est le périthèce.

²⁷ *Sordaria macrospora* Auersw., *Hedwigia* 5(12) : 192 (1866) → Synonyme : *Hypocopra macrospora* (Auersw.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 1 : 241 (1882).

²⁸ SORDALAB - 15 Avenue des Grenots, F-91150 ETAMPES - Téléphone : 00.33.(0)1.69.92.26.72

info@sordalab.com <http://sordalab.com>

Cette espèce a été beaucoup étudiée, et est considérée comme un organisme modèle pour étudier le développement cellulaire fongique. Depuis plus de 70 ans, ce champignon homothallique a servi de modèle génétique pour déchiffrer les mécanismes de base qui sous-tendent le développement et la différenciation des cellules eucaryotes. Durant son cycle de reproduction sexuelle, *S. macrospora* forme des fructifications particulières, impliquant la formation de différents types de cellules. Nous allons tenter de les différencier et de les étudier ci-dessous.



▲ Gros-plan sur la ligne de confrontation entre les deux souches

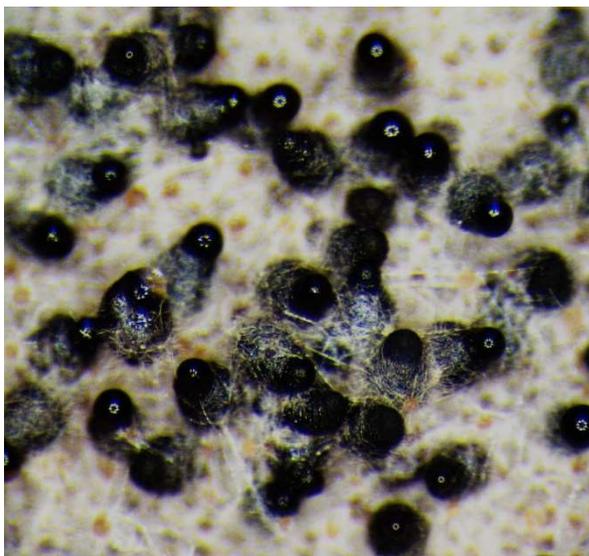
S. macrospora présente un mycélium haploïde²⁹ et son génome comporte 7 chromosomes. Il est capable (comme les autres *Sordaria*) de produire des zygotes par fusion de gamètes génétiquement identiques, pouvant provenir du même mycélium. Cette caractéristique se nomme l'homomixie. Ceci signifie qu'une colonie haploïde peut réaliser un cycle cellulaire complet :

- production de gamètes (par différenciation de certains articles du mycélium),
- fusion de ces gamètes,
- fécondation,
- méiose et mitose,
- formation d'ascospores.



▲ Auto fructification de la souche

²⁹ Une cellule est dite haploïde lorsque les chromosomes qu'elle contient existent chacun en un seul exemplaire (n chromosomes). On oppose cela à une cellule diploïde, qui contient des chromosomes en double exemplaire ($2n$ chromosomes).



tions complètement stériles.

▲ Les périthèces sont bien formés et sortent du substrat, sous l'action de la lumière (phototropisme +).

BPensemencée avec 2 fragments d'une culture de *Sordaria*, et commercialisée pour les TP dans l'enseignement. ▶

TRAVAIL PRÉPARATOIRE

++ Les BP sont stockées entre 20 & 27° C (ne pas les placer près d'une source directe de chaleur), 25° étant la température par excellence ; s'il s'avérait nécessaire d'accélérer la maturation, on peut porter la température à 29° ; moins de 20° empêche le développement du mycélium et plus de 30° tue l'organisme ; l'utilisation d'une étuve à contrôle électronique facilite grandement cette opération très importante.

++ La phase de maturation va durer de 7 à 10 jours et se fera dans une enceinte en permanence humide (personnellement, nous plaçons les petites BP (Ø 5 cm) sur un lit de papier absorbant imbibé d'eau (à contrôler tous les jours) dans une BP en verre de 20 cm de Ø → cela permet à la gélose de ne pas se dessécher trop rapidement.

++ Placer les petites BP avec le couvercle vers le haut, et exposées à la lumière (mais pas trop près d'une source directe) ; c'est obligatoire, car les périthèces subissent l'action d'un phototropisme positif, qui va leur permettre de bien sortir de leur milieu nutritif : le col des fructifications sera ainsi bien visible. Nous utilisons un éclairage par led.

++ Conserver les BP dans ces conditions jusqu'à apparition des premières projections sur les couvercles des boîtes (en effet, les ascospores sont projetées en dehors de périthèces) : elles sont visibles sous forme de petits points noirâtres.

++ Au microscope, vérifier la maturation générale des asques en prélevant 2 ou 3 périthèces (« boules » noires au centre de la boîte).

++ Lorsque les périthèces sont matures, placer les BP au réfrigérateur (4°C) avec le couvercle tourné vers le bas. Dans ces conditions, elles vont se conserver durant environ deux semaines, à basse température.

EXPÉRIMENTATIONS

++ une BPensemencée avec une souche sauvage de *S. macrospora* va donner des périthèces contenant des asques à ascospores brun foncé à noires : c'est leur couleur « naturelle ».

++ une BPensemencée avec une souche de *S. macrospora* ayant subi une manipulation génétique, va donner des périthèces contenant des asques à ascospores jaunes.

++ une BPensemencée avec une souche de *S. macrospora* ayant subi une autre manipulation génétique, va donner des périthèces contenant des asques à ascospores blanches (dans ce dernier cas, il faudra veiller à ne pas les confondre avec des ascospores qui ne sont pas encore arrivées à maturité).

++ Il s'avère possible de croiser deux souches génétiquement différentes. Pour cela, les deux souches dites A (celle-ci possède des ascospores noires) et B (avec des ascospores jaunes) ont été ensemencées aux deux pôles d'une BP.

PRÉALABLE

Si vous souhaitez étudier la reproduction de cette espèce, nous vous conseillons vivement de faire directement l'acquisition de BPensemencées avec diverses souches. Cela vous évitera de devoir affronter des problèmes majeurs de préparation de milieux nutritifs (gélose dans le cas présent), de stérilisation et d'ensemencement dans des conditions correctes, qui ne peuvent se régler qu'avec du matériel de laboratoire.

Toutes les manipulations doivent être réalisées avec beaucoup de soin et de propreté, afin d'éviter au maximum le risque de contamination par des bactéries, des moisissures, des spores ou des conidies d'autres champignons ; en effet, le milieu gélosé ne contient aucun antibiotique : il a simplement été passé à l'autoclave avant insémination ; il n'est pas nécessaire de travailler dans des condi-





L'utilisation d'un incubateur permettant de maintenir les BP à une température constante de 25°C est nécessaire, afin de favoriser le développement du mycélium dans des conditions optimales ; il est également nécessaire de maintenir un taux d'humidité élevé, ce qui explique l'usage d'une seconde BP, à titre de double protection.

Au lieu de rencontre entre les deux mycéliums, des gamètes provenant des deux souches vont fusionner pour donner des périthèces dits « hybrides » dans lesquels la caryogamie va mettre en cause des noyaux de génotypes différents. En outre, sur une boîte de ce type, il y aura également auto fructification des souches A et B.



En tout, il y aura trois types de caryogamies dans la boîte :

- A x A → auto fructification de la souche A → les asques contiendront 8 ascospores noires,
- B x B → auto fructification de la souche B → les asques contiendront 8 ascospores jaunes,
- A x B → croisement entre les souches A et B → les asques contiendront des ascospores noires et des ascospores jaunes (souvent 4 et 4) ; mais on peut obtenir nombre d'autres combinaisons.

MODE OPÉRATOIRE

- ++ Prélever 2 ou 3 périthèces avec une pince à bouts très fins (il est beaucoup plus facile de travailler sous la loupe binoculaire).
- ++ Déposer le prélèvement sur une LPO, dans une goutte d'eau bidistillée ou glycinée.
- ++ Poser une LCO.
- ++ Tapoter délicatement le centre de la LCO avec un outil non métallique, afin de faire éclater les périthèces prélevés et en faire sortir le bouquet d'asques (si on dilacère trop énergiquement, les asques vont s'éparpiller et éclater, libérant les ascospores).
- ++ Observer : l'objectif 40x convient très bien, voire même le 20x.

Cycle de développement

Les asques de *Sordaria macrospora* contiennent 8 cellules appelées ascospores. Ces dernières sont éjectées à maturité et disséminées.

Si des spores se posent sur un substrat approprié, elle vont germer et générer chacune, par mitose)³⁰, un filament mycélien (FM) à croissance apicale, constitué d'une file de cellules dont les noyaux contiennent n chromosomes.

Selon la nature des spores et leur contenu chromosomique, le FM possèdera une polarité positive ou négative (nous préférons utiliser ces termes plutôt que ceux de mâle et femelle).

Le FM « femelle » va former un ascogone en crochet tandis que le FM « mâle » forme de simples prolongements : les anthéridies.

Dans certaines conditions, ces 2 FM vont fusionner pour former une cellule à 2 noyaux haploïdes.

Cette cellule va se diviser par mitoses successives et est à l'origine d'un organe en forme de coupe fermée (piriforme), le périthèce.

Dans certaines cellules du périthèce, les 2 noyaux fusionnent, ce qui correspond à une fécondation. Cette fusion aboutit à la formation d'une cellule diploïde, enfermée dans un sac, qu'on peut assimiler à une cellule « œuf », un zygote.

Dès sa formation, cette cellule fait l'objet d'une méiose³¹ qui va donner 4 cellules haploïdes.

Chacune de ces cellules se divise ensuite par mitose.

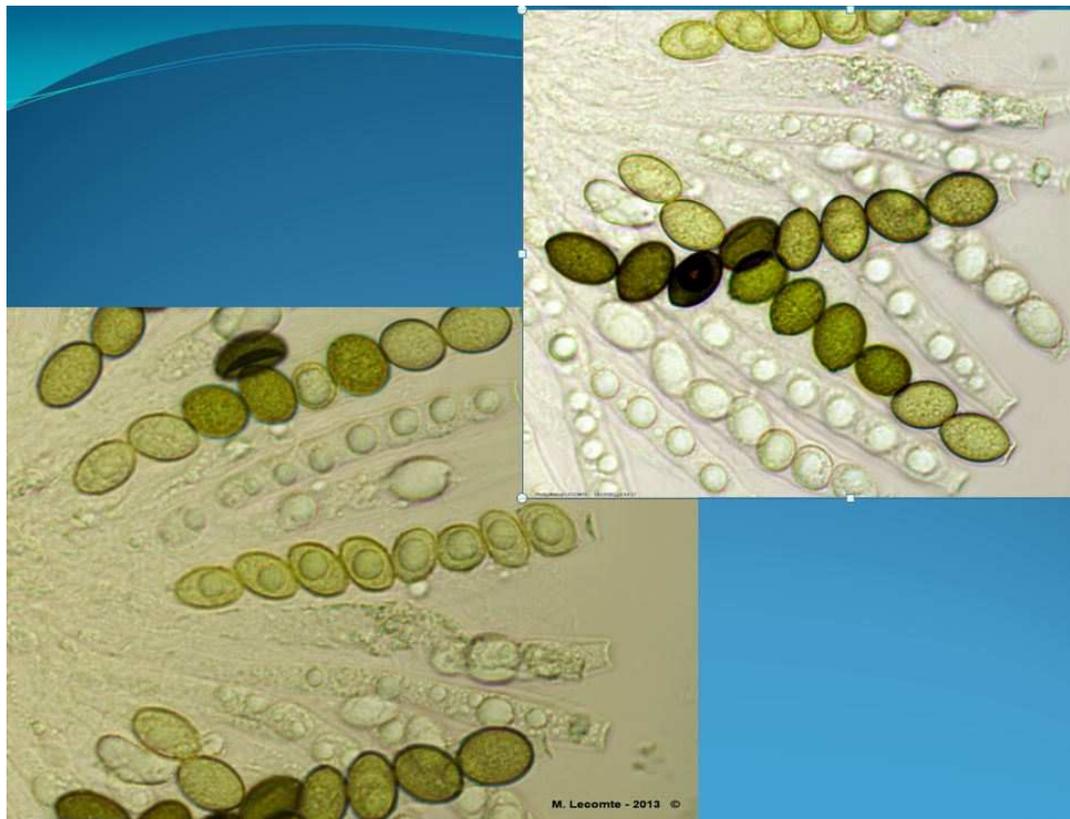
On obtient alors 8 cellules, qui sont les ascospores.

Et ainsi, le cycle est bouclé.

Mycélium et noyaux

En plus des asques, les boîtes permettent d'observer les différentes parties du cycle : le mycélium, les ascogones (coloration du type giemsa pour voir les noyaux) et tous les stades de formation des périthèces.

Cela nécessite cependant une bonne maîtrise de la technique des préparations microscopiques.



³⁰ Il s'agit d'une duplication non sexuée des chromosomes, une forme de clonage ; chaque cellule « mère » se divise en 2 cellules « filles » : chaque nouveau noyau reçoit une copie complète du génome de la cellule originale. Il n'y a aucun échange de patrimoine et l'information génétique est conservée.

³¹ Chez les espèces haploïdes, comme notre *Sordaria*, la méiose intervient après la « fécondation » pour diviser la cellule-œuf (à $2n$ chromosomes). Mais en plus de ce rôle de division, la méiose joue un rôle important dans ce qu'on qualifie le brassage génétique, c'est-à-dire le mélange des gènes. Chaque cellule va séparer en deux son patrimoine génétique inscrit dans les chromosomes, afin de ne transmettre que la moitié de ses gènes aux cellules filles.

Arbres et champignons : les ectomycorhizes

Elles sont ainsi appelées pour deux raisons précises :

- les filaments mycéliens forment un manchon feutré (le **manteau**), qui recouvre toute la surface de la racine,
- le mycélium ne pénètre pas à l'intérieur des cellules racinaires, même s'il s'installe entre les cellules du cortex³².

Il est intéressant de noter la différence de taille ou de diamètre, entre les radicelles ou les racines, et les cordons mycéliens ou connectifs reliant les mycorhizes ou racines entre elles : ce qui explique l'efficacité trophique et celle de pénétration du réseau mycorhizien par rapport au système racinaire pris seul sans champignon.



Toutes les illustrations sont de Jacques Guimberteau, Ingénieur d'Etudes INRA, et ont été réalisées dans le cadre des laboratoires de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Bordeaux.

Même si elles sont très connues, les ectomycorhizes ne concernent au bout du compte que +/- 5 % des espèces végétales, et essentiellement ligneuses, comme les aulnes, bouleaux, cèdres, charmes, châtaigniers, chênes, épiceas, hêtres, mélèzes, noisetiers, noyers, peupliers, pins, sapins, saules, tilleuls ... ainsi que certaines espèces méditerranéennes ou tropicales.



³² Ensemble des cellules périphériques de la racine, une écorce en quelque sorte.

Les champignons ectomycorhiziens représentent de nombreuses espèces (plus de 6.000, par le monde), et appartiennent tous aux Ascomycètes et Basidiomycètes, qu'on appelle « champignons supérieurs ».

Les plus courants font partie notamment des genres *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Cortinarius*, *Hebeloma*, *Lactarius*, *Leccinum*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Tuber*, *Xerocomus* ...

Pour parler simplement, le champignon facilite la nutrition de la plante grâce à une large gamme d'enzymes qui contribuent à dégrader les molécules complexes présentes dans la matière organique du sol, solubilisant notamment l'azote et le phosphore.



Il faut réaliser que la seule source nutritionnelle d'une plante est générée par la photosynthèse, qui contribue à transformer du carbone minéral en carbone organique (chez les *Fabaceae*, il y a également l'apport d'azote apporté par des bactéries symbiotiques). Le champignon facilite l'absorption de l'eau contenue dans le sol qui, en percolant, s'est chargée d'éléments chimiques dissous et de minéraux.

Ces derniers sont très nombreux (calcium, cuivre, fer, magnésium, molybdène, phosphore, potassium, soufre, zinc, oligo-éléments...) et ils sont altérés grâce à 2 types de mécanismes : l'**acidolyse** (le champignon acidifie le sol et déstabilise la structure cristalline) et la **complexolyse** (le champignon secrète des acides organiques –citrique, -malique, -oxalique, qui contribuent à former des complexes solubles avec des corps qui le sont très peu dans leur état natif).

Entre autres rôles que nous ne développerons pas dans ce cadre, le champignon protège également les racines contre certaines substances toxiques (aluminium, cadmium, chrome, dioxines, hydrocarbu-

res chlorés, mercure, nickel, plomb...), ou des agressions biologiques (par la production d'antibiotiques naturels).

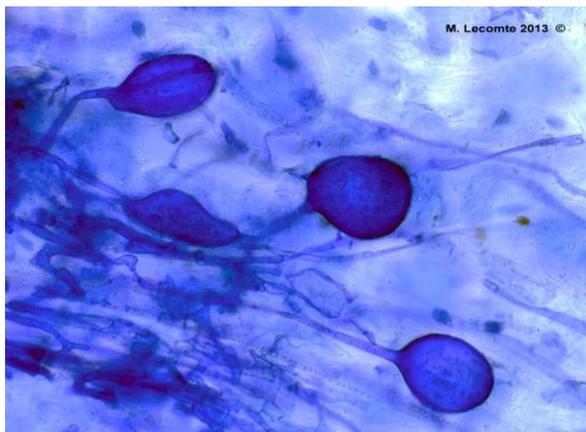


Mycorhizes de *Lactarius deliciosus* sur *Pinus pinaster*



Mycorhizes de *Lactarius sanguifluus* sur *Pinus sylvestris*

Plantes et Glomérormycètes : les endomycorhizes



◀ Endomycorhize arbusculaire à vésicules de *Glomus* sp. sur racines de grande pervenche (*Vinca major*).

PRÉALABLE

Nous vous conseillons fortement de consulter l'article publié dans le bulletin³³ de l'AMFB, qui développe largement la théorie consacrée à ce sujet.

Quelques PRECISIONS supplémentaires

Outre les endomycorhizes à **arbuscules et vésicules**, on peut également rencontrer :

+ Des endomycorhizes à **pelotes intracellulaires**, qu'on rencontre chez les *Orchidaceae*.

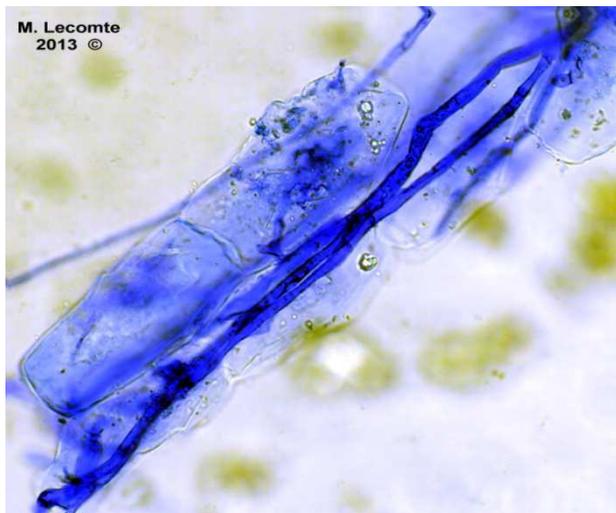
+ Des endomycorhizes **éricoides**, typiques de

l'ordre des Éricales.

+ Des ectendomycorhizes, ou mycorhizes **arbutoïdes**, trouvées également chez des Éricales. Le champignon forme des pelotes intracellulaires et un fourreau racinaire.

+ Des ectendomycorhizes **monotropoïdes**, typiques des Éricales non chlorophylliennes (comme le monotrope suce-pin : *Monotropa hypopitys*)

Quelques familles de Gymnospermes, comme les *Podocarpaceae* et les *Araucariaceae*, présentent des renflements racinaires (appelés myconodules ou pseudonodules) envahis par des champignons endomycorhiziens.



Mycélium intercellulaire chez *Vinca major* ▶ avec des pelotons importants à l'intérieur des cellules ; nous retrouvons ici la même configuration que dans les pelotons orchidoïdes, avec des filaments mycéliens de jonction et de pénétration nettement visibles. ▼



RÉCOLTE DE MATÉRIEL

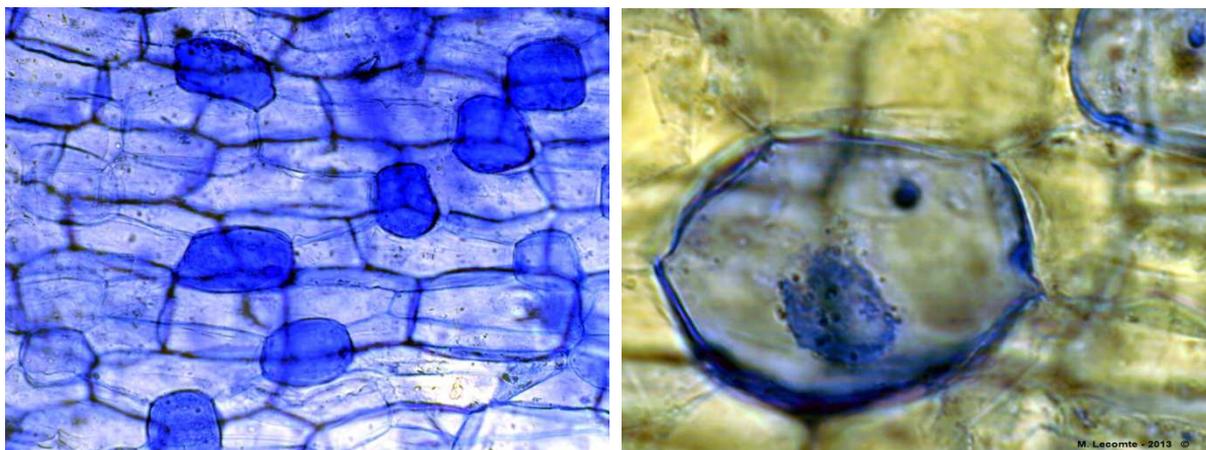
Comme nous avons entrepris une exploration systématique de toutes les plantes rencontrées, nous prélevons des radicelles d'arbres, d'arbustes ou de fleurs diverses, lors de travaux de jardinage.

→ Notez que les Brassicacées (anciennement appelées Crucifères) et les Chénopodiacées ne sont pas symbiotiques, et présentent seulement des poils absorbants.

- Éviter les sols très riches.

³³ LECOMTE M., 2013 - *Plantes et Glomérormycètes : les endomycorhizes*, bulletin n°6 de l'Association Des Mycologues Francophones De Belgique (AMFB), 29-34

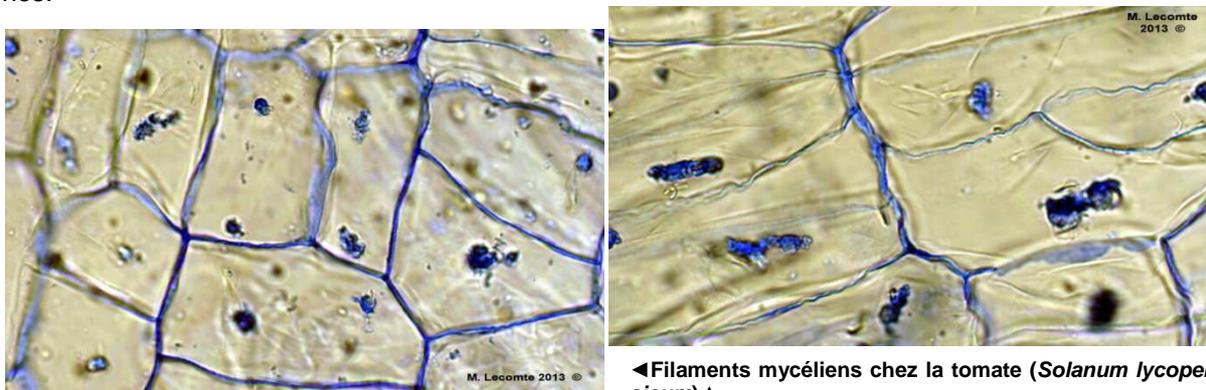
- En terrain compact, prélever une motte et laver soigneusement à l'eau courante. Il est intéressant de conserver l'eau de lavage afin de la filtrer par la suite pour récupérer d'éventuelles spores).
- Placer aussi vite que possible dans l'eau, afin d'éviter le dessèchement.



Observation chez *Vinca major* ▲ ▲. Comme nous progressons en terrain inconnu, nous rencontrons des formations que nous assimilons à une endomycorhize (vu leur grande affinité pour le bleu coton acétique) ; les formations étant différentes, nous avançons audacieusement l'idée qu'une même plante puisse abriter plus d'un hôte.

MODE OPÉRATOIRE, selon Alix Helme-Guizon & Marc-André Selosse³⁴ (2010)

- ++ A l'aide de ciseaux, tailler les racines en petits bouts (1 cm de long au maximum) et ne garder que les radicelles les plus fines.
- ++ Les placer dans un récipient en pyrex, avec de la potasse à 10 % et chauffer au bain-marie à 90°C durant 15 à 30 minutes, selon la fragilité du matériel → le contenu des cellules végétales est détruit et les tanins brunâtres sont éliminés.
- ++ Jeter la solution qui est devenue brun rougeâtre, en filtrant dans un tamis métallique à mailles fines.



◀ Filaments mycéliens chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) ▲

- ++ Rincer 2 fois de suite à l'eau acétifiée (solution d'acide acétique glacial à 2 %) ou acidifiée (solution d'acide chlorhydrique à 2 %).
- ++ Coloration : nous utilisons le bleu coton acétique (eau bidistillée 100 cc - bleu de méthyle 1 g - acide acétique glacial 1 g) ; remettre au bain-marie durant 10-15 minutes. Filtrer au tamis et rincer à l'eau bidistillée.
- ++ Dissocier et observer à 40x dans l'eau (pour une observation extemporanée) ou dans le lactoglycérol (acide lactique + glycérine + eau bidistillée, en parts égales).

Dans le second cas, on peut conserver la préparation durant des années ; il suffit de la luter au vernis à ongles, après avoir mis la préparation sous compression (avec une pince à linge par exemple).

MODE OPÉRATOIRE PERSONNEL SIMPLIFIÉ

- ++ Traiter à froid durant 3 à 5 jours avec la potasse à 10 %.
- ++ Rincer à l'eau acétifiée.
- ++ Colorer à froid au bleu coton acétique, durant 6 à 8 heures, puis rincer.
- ++ Conserver les échantillons, dans une éprouvette avec bouchon à visser hermétique, dans une solution aqueuse largement diluée de bleu coton acétique.

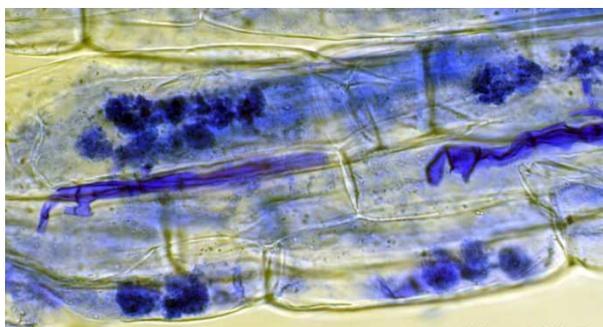
³⁴ HELME-GUIZON A. & SELOSSE M. A., 2010 – *Coloration des mycorhizes*, Biologie – Géologie n°4, 6 p.



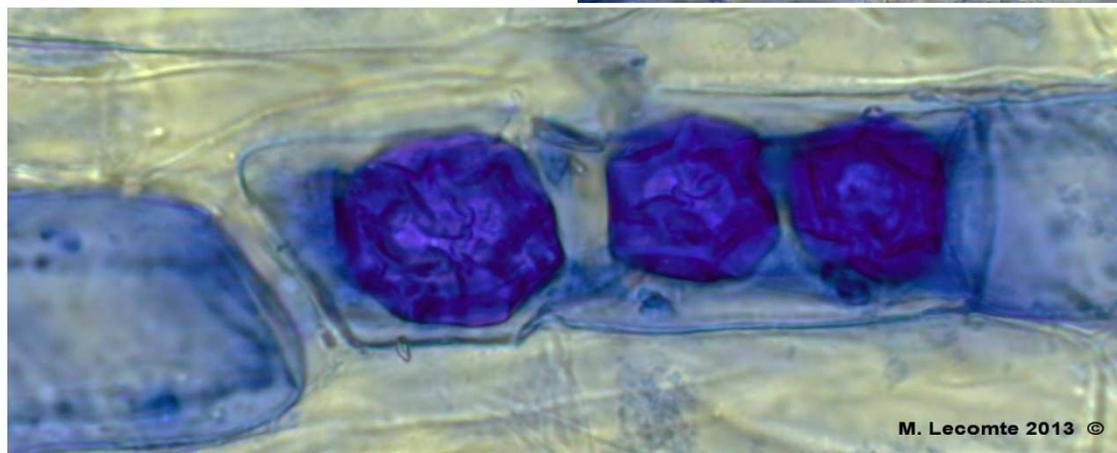
▲ Endomycorhize chez l'ortie commune, *Urtica dioica* ▲

MODE OPÉRATOIRE utilisé par J. Garbaye³⁵

- ++ Chauffer les racines au bain-marie, dans une solution de potasse à 10 %, durant ½ heure au minimum, et parfois plus longtemps, jusqu'à ce que les tissus végétaux soient bien éclaircis.
- ++ Rincer après refroidissement.
- ++ Terminer le blanchiment dans un bain d'eau oxygénée du commerce (traiter durant 1 à 2 heures, jusqu'à ce que les racines soient claires et transparentes).
- ++ Rincer.
- ++ Colorer à l'encre bleue pour stylo (5 cc d'encre dans 100 cc de vinaigre du commerce).
- ++ Rincer plusieurs fois à l'eau acétifiée à 2 %.
- ++ Pour améliorer le contraste, laisser dans l'eau vinaigrée durant plusieurs jours au réfrigérateur, et rincer une dernière fois, avant observation.



▲ Endomycorhize chez la grande marguerite (*Chrysanthemum leucanthemum*) ▼ ►



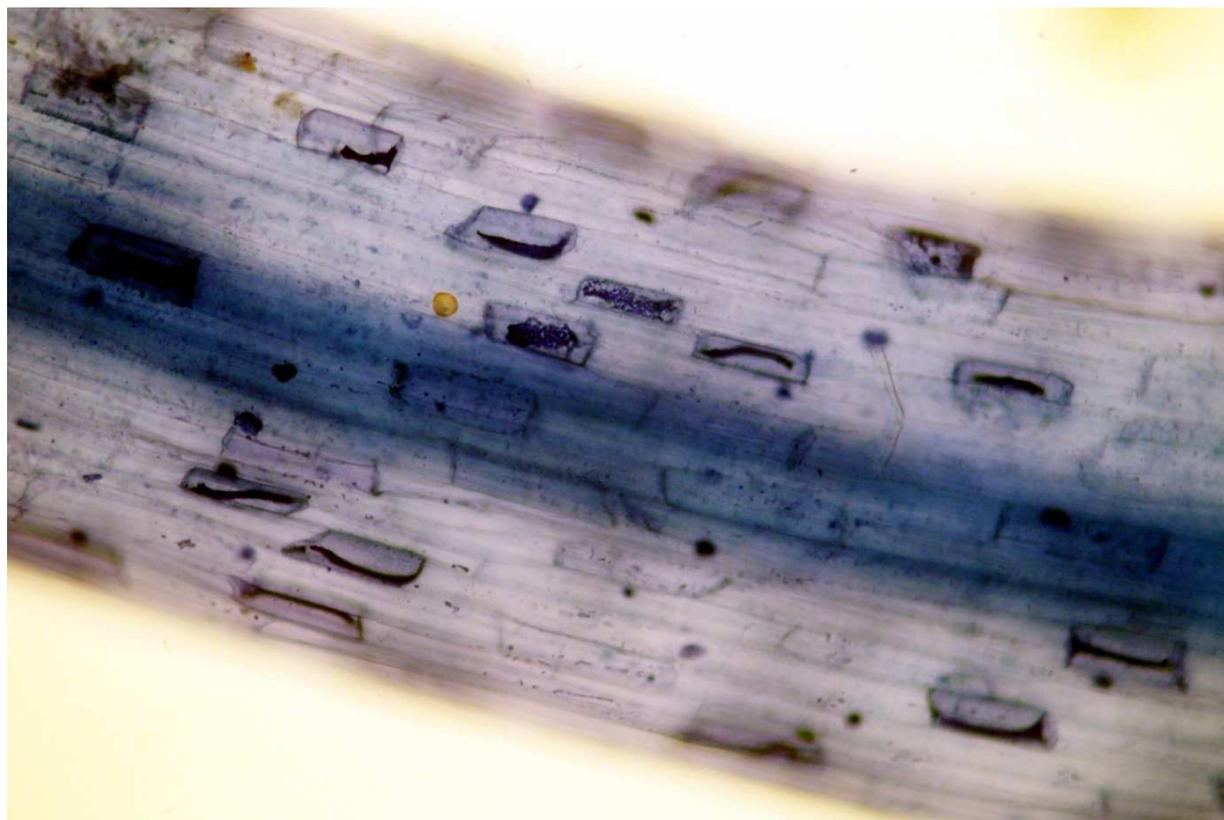
³⁵ GARBAYE J., chercheur à l'INRA de Nancy ; 2013 – *La symbiose mycorhizienne, une association entre les plantes et les champignons*, Ed. Quae, SYNthèses, 251 p.

MODE OPÉRATOIRE, selon Phillips & Hayman (1970), modifié et utilisé par J. Blaszkowski (2012).

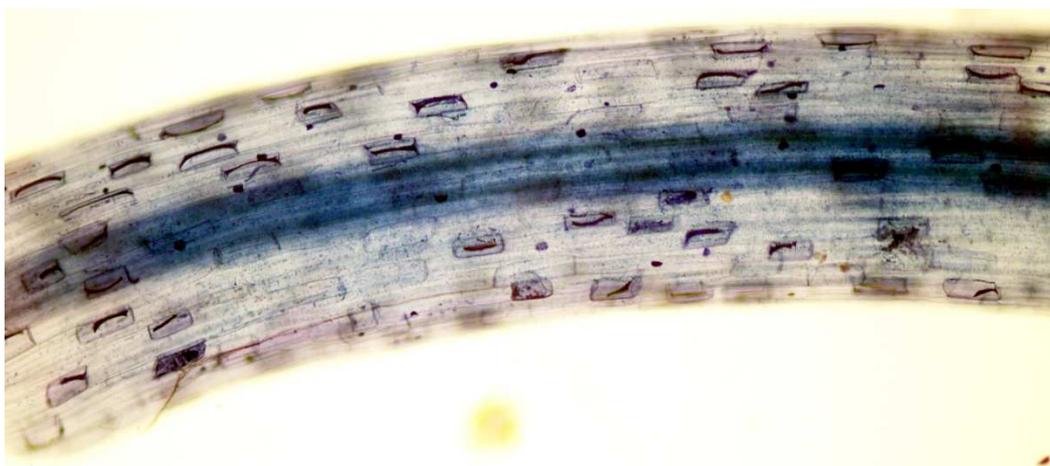
- ++ Prélever des morceaux de racine de 0,5 à 1,5 cm de long.
 - ++ Chauffer à 90° C. durant 1 à 2 h. dans une solution de potasse à 20 %.
 - ++ Rincer à l'eau courante durant 2-3'.
 - ++ Chauffer à 90° durant 1 h. dans de l'acide chlorhydrique à 20 %.
 - ++ Chauffer à 90° durant 1 à 2 h. dans une solution aqueuse de bleu trypan à 0,1 %.
- NOMBRE : les opérations de chauffage peuvent être supprimées si on remplace par des bains respectifs de KOH, HCL et bleu trypan de 12 h. chacun, à température ambiante.

MODE OPÉRATOIRE, selon Phillips & Hayman (1970), modifié et utilisé par N. Benmazari³⁶

- ++ Si on ne peut traiter tout de suite les prélèvements racinaires récoltés, bien les nettoyer à l'eau et les placer dans du fixateur AFA (10 cc d'acide acétique glacial, 10 cc de formol pur, 80 cc d'éthanol à 70°).
- ++ Rincer plusieurs fois à l'eau pour éliminer le fixateur.
- ++ Chauffer durant 1 heure à 90° dans une solution potassique à 10 % (remplacer la solution quand elle devient brune).
- ++ Chauffer durant 20' à 90° dans de l'eau oxygénée.
- ++ Rincer 2 fois.
- ++ Passer durant quelques minutes dans un bain d'acide lactique.
- ++ Rincer abondamment.
- ++ Chauffer à 90° durant 1 h. dans une solution aqueuse de bleu trypan à 0,1 %.
- ++ Rincer à l'eau courante.
- ++ Stocker dans une BP contenant de la glycérine.



³⁶ **BENMAZARI N.**, 2008 – Présentation du mémoire de magister : *Recherche des conditions adéquates pour la micropropagation du cyprès du Tassili (Cupressus dupreziana A. Camus), et étude préliminaire des mycorhizes*, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 96 p.



Ces deux photos m'ont aimablement été fournies par A. de Gervillier³⁷, dans le cadre des travaux d'une station d'expérimentation sur les noyers (*Juglans regia*). La racine du noyer s'avère très lignifiée, et difficile à prélever dans le substrat. Suite à cela, les chercheurs prélèvent des échantillons du sol concerné, et y sèment des poireaux (*Allium porrum*). Leur hypothèse est que les spores du Gloméromycète symbiotique du noyer colonisent ensuite les radicelles du poireau (souvent, il s'agit de *Glomus irregulare* Blas. & al.), ce qui permet d'observer les éventuelles vésicules ou arbuscules présents.

Ces études visent évidemment à améliorer la résistance des arbres aux diverses agressions, leur productivité, la taille (calibre) et la valeur nutritionnelle des noix. En 2012, 13.000 tonnes de noix de Grenoble ont été produites et quasi toutes commercialisées, en raison de leur valeur reconnue.

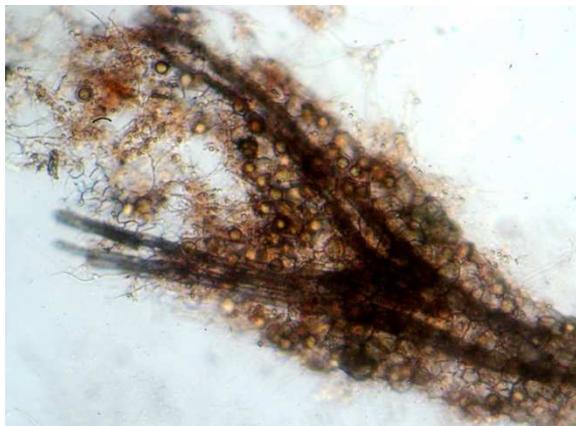
BIBLIOGRAPHIE

- BLASZKOWSKI J.**, 2012 – *Glomeromycota*, W. Szafer, Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Krakow, 303 p.
- DODELIN B. & SELOSSE M.A.**, 2011. *Orchidées et champignons : une porte vers les réseaux mycorhiziens*, Bulletin Fédération mycologique et botanique Dauphiné-Savoie, **202** 75-83.
- FORTIN A. & AL.**, 2008 - *Structures caractéristiques des mycorhizes arbusculaires*, Ed. Giasson.
- GARBAYE J.**, 2013 – *La symbiose mycorhizienne, une association entre les plantes et les champignons*, Ed. Quae, SYNthèses, 251 p.
- FORTIN A., PLANCHETTE C. & PICHE Y.**, 2008 - *Les mycorhizes, la nouvelle révolution verte*, Ed. Quae.
- GILBERT A.**, 2011. *Rôle des symbioses endophytes-graminées dans la dynamique et l'adaptation des graminées hôtes*, thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2011, document pdf.
- GILBERT A. & SELOSSE M.A.**, 2011. *Des champignons qui dopent les plantes*, La Recherche, **457** 72-75.
- HELME-GUIZON A. & SELOSSE M.A.**, 2010 - *Coloration des mycorhizes*, Biologie Géologie n°4-2010, document pdf.
- REDECKER D.**, 2008 - *Arbuscular mycorrhizal fungi and their relative(s)*, article sur internet.
- RICHARD F. & SELOSSE M.A.**, 2007. *Plantes et champignons : l'alliance vitale*, La Recherche, **411** 58-61.
- SELOSSE M.A.**, 2000 - *La symbiose : structures et fonctions, rôle écologique et évolutif*, Ed. Vuibert.
- SELOSSE M.A.**, 2001 - *La symbiose : ses rôles écologiques et évolutifs*, résumé de la conférence présentée le 3 mars 2001 à la Société des Amis du Muséum National d'Histoire Naturelle, document pdf.
- SIEVERDING E. & OEHL F.**, 2004 - *Pacispora, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes*, Journal of Applied Botany, **78**, 72 - 82.
- SIEVERDING E. & OEHL F.**, 2006 - *Revision of Entrophospora and description of Kuklospora and Intraspora, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes*, Journal of Applied Botany and Food Quality **80**, 69 - 81.

³⁷ Amélie de Gervillier, Station Expérimentale Nucicole en Rhône-Alpes, France - adegervillier@senura.com

Plantes et Gloméromycètes : les spores

Lorsqu'on se trouve en face d'endomycorhizes arbusculaires, il s'avère très intéressant de vérifier leur nombre et leur diversité au niveau du mycélium extra racinaire. Ces spores se trouvent directement dans le sol, c'est-à-dire mélangées à des débris animaux, végétaux et minéraux, et il va falloir pratiquer un tri au sein de tout cela.



La technique d'extraction préconisée par J. Garbaye³⁸ n'est pas trop compliquée (même si elle semble fastidieuse), mais elle nécessite du matériel de laboratoire, qui n'est pas à la portée des amateurs : une centrifugeuse et des tamis calibrés, à mailles de 710 et 45 μm (la taille des spores recherchées varie de 45 à 700 μm).

Il va donc falloir faire appel à l'ingéniosité des bricoleurs.

PRÉALABLE

FABRICATION D'UN TRIPLE FILTRE

+ Se procurer 2 manchons (2) et 1 bout de tuyau PVC (3) de 50 mm de diamètre, ainsi qu'une réduction 80/50 (1), qui servira de socle.

+ Un chinois de cuisine (6) (mailles de +/- 0,6 mm), un morceau d'étamine utilisée en cuisine (5) (mailles de +/- 0,3 mm) et un morceau de foulard de soie (4) (mailles de +/- 70 μm), à poser du plus fin au plus large, en commençant par le bas.

+ Poser le carré de tissu sur le manchon, et le tendre en emboîtant le bout de tuyau.

Nous sommes conscient qu'avec cette méthode simplifiée, des spores vont nous échapper (celles qui sont plus grandes que 600 μm et plus petites que 70 μm), mais c'est la rançon de nos moyens ; pour des tris plus précis, essayer de se procurer de la toile à bluter, à mailles diverses, chez des marchands spécialisés, ou des filtres spécialisés pour laboratoire (+/- 140 €).



FABRICATION D'UNE CENTRIFUGEUSE

+ Une tige filetée, 3 boulons, un bout de barre, modèle Mécano, 2 attaches trombone, 4 liens élastiques solides, à positionner selon le montage figuré.

+ Une foreuse avec variateur de vitesse (600 à 1.000 tours/minute).

+ Deux tubes à centrifuger de 20 cc.

MODE OPÉRATOIRE

FILTRATION DE LA TERRE

++ Prélever 25 à 50 g de terre dans les 10 premiers cm du sol à étudier, près des racines de la plante étudiée.

++ Poser 25 g de terre dans un petit récipient, ajouter 20 cc d'eau, et mélanger délicatement, puis laisser reposer durant quelques minutes.

++ Verser le mélange sur la gaze et placer l'ensemble sous un mince filet d'eau courante, jusqu'à ce que le liquide d'écoulement soit limpide (prendre beaucoup de précautions, sinon l'ensemble va déborder).

++ Jeter ce qui reste sur les 2 filtres supérieurs ; ce qui nous intéresse se trouve sur le carré de soie.

++ Séparer les spores des impuretés qui les accompagnent.

³⁸ **GARBAYE J.**, chercheur à l'INRA de Nancy ; 2013 – *La symbiose mycorhizienne, une association entre les plantes et les champignons*, Ed. Quae, SYNthèses, 251 p.

SÉPARATION DES SPORES : pour ce faire, nous allons jouer sur les différences de densité des divers éléments (le sable est lourd, les spores mortes sont légères, et les spores vivantes ont une densité intermédiaire).

- ++ Retourner le tissu de soie (face supérieure vers le bas) et le déposer dans une tasse ou un bécher large.
- ++ Arroser délicatement le tissu tendu avec une pissette afin de récupérer tous les éléments.
- ++ Faire tourner le liquide dans la tasse afin de placer tous les éléments en suspension puis remplir à demi les 2 tubes à centrifuger.
- ++ Les placer verticalement sur un support, jusqu'à formation d'un dépôt de sédimentation.

CENTRIFUGER LE MÉLANGE

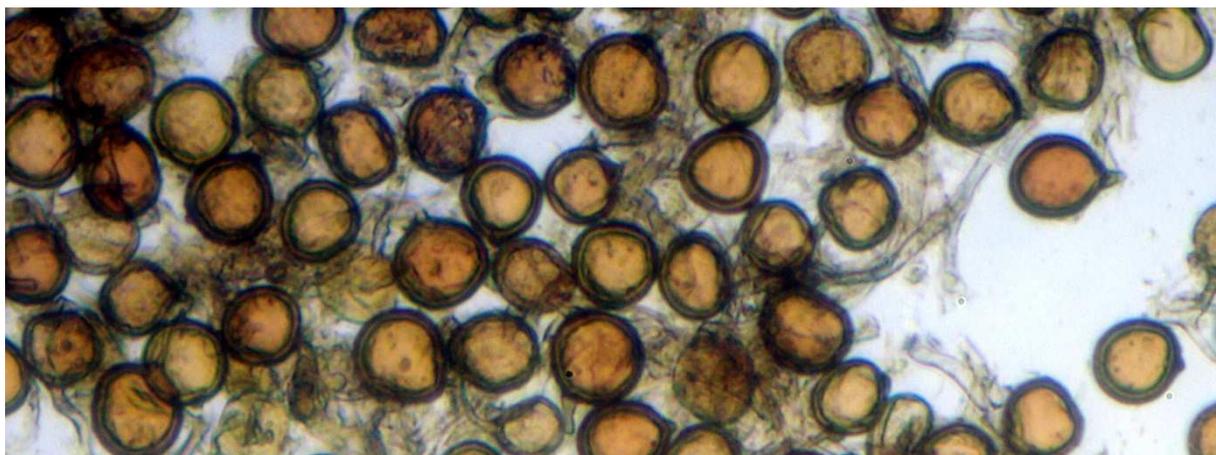
- ++ Préparer une solution sucrée à forte densité (60 g de sucre dans 100 cc d'eau).
 - ++ Utiliser une seringue avec une aiguille de 1 mm de diamètre intérieur.
 - ++ Remplir la seringue de la solution sucrée ; amener le bout de l'aiguille juste au-dessus du dépôt, et injecter très délicatement jusqu'à remplissage du tube.
- La solution sucrée est beaucoup plus dense que l'eau, et en outre son indice de réfraction est plus élevé, ce qui fait qu'on voit nettement une ligne de séparation horizontale entre les 2 liquides. La délicatesse est de mise à tous les stades, afin de ne pas mélanger les 2 phases.
- ++ Placer à la centrifugeuse (2 minutes à 3.000 tours), ou 6 à 8 minutes avec l'outil artisanal, placé sur une foreuse.

RÉCUPÉRATION DES SPORES : après cette opération, la majorité des spores présentes dans le mélange se concentre au niveau de la zone située entre l'eau sucrée (bas du tube) et l'eau pure (haut du tube).

- ++ Avec la seringue, aspirer les spores en un mouvement circulaire, juste au-dessus de la zone de séparation.
- ++ Vider le contenu de la seringue sur le filtre fin (bien nettoyé au préalable) ; rincer avec soin et délicatesse, puis transvaser dans une BP en verre, avec un peu d'eau (ou tout autre récipient en verre, à fond plat).
- ++ Observer à la loupe binoculaire, de préférence sur fond noir.

OBSERVATION AU MICROSCOPE

- ++ Prélever quelques spores à l'aide d'une pipette de Pasteur et les déposer sur une LPO.
- ++ Poser une LCO avec une délicatesse extrême afin, dans un 1^{er} temps, de voir les spores intactes, sans les « exploser ».
- ++ Observer dans l'eau du prélèvement.
- ++ Ensuite, presser sur la LCO, pour faire éclater les spores ; c'est indispensable, afin de pouvoir étudier la structure de la paroi, et leur contenu.



MODE OPÉRATOIRE SIMPLIFIÉ, préconisé par M.A. Sélosse, pour une simple observation

- ++ Prélever 100 g de sol ; le démarier et éliminer les gros déchets visibles.
- ++ Mélanger soigneusement avec ½ L d'eau.
- ++ Laisser décanter durant 1/4 h.
- ++ Tamiser le surnageant sur 3 tamis superposés (250, 150 et 50 µm).
- ++ Passer l'ensemble sous un filet d'eau courante.
- ++ Rincer le tamis à l'eau distillée) dans une BP.
- ++ Observer sans coloration à la loupe binoculaire.



Toutes les photos de cet article représentent des spores de *Glomus* sp. et ont été réalisées par Ph. Clowez (*). Le matériel a été récolté sur des racines de frêne ou d'épilobe, exposées à l'air libre, dans les galeries de la carrière de Bonneuil.

(* **CLOWEZ P., PETIT F., MAURICE J.P. ET LE TACON F.**, *La flore fongique d'une carrière souterraine de l'Oise, à Bonneuil-en-Valois : nouvelles perspectives de prospections, de récoltes et de recherches.*



Les mycorhizes orchidoïdes

On leur a attribué ce nom parce que ce genre de symbiose est strictement limité à la famille des *Orchidaceae* (plantes monocotylédones, de l'Ordre des Asparagales). Les orchidées se caractérisent par des graines de taille minuscule (sans réserve nutritive), contenant juste un embryon, dont la germination est impossible (dans la nature³⁹) sans l'intervention d'un champignon (voir le tome II).

La 1^{ère} phase de germination va donner naissance à un bulbe primordial (une masse de cellules), appelé **protocorme**. Pour que ce dernier grossisse et continue son développement, l'intervention du champignon est impérative maintenant. Tout cela a été brillamment expliqué et démontré par N. Bernard⁴⁰, un naturaliste français, du début du XX^{ème} siècle.

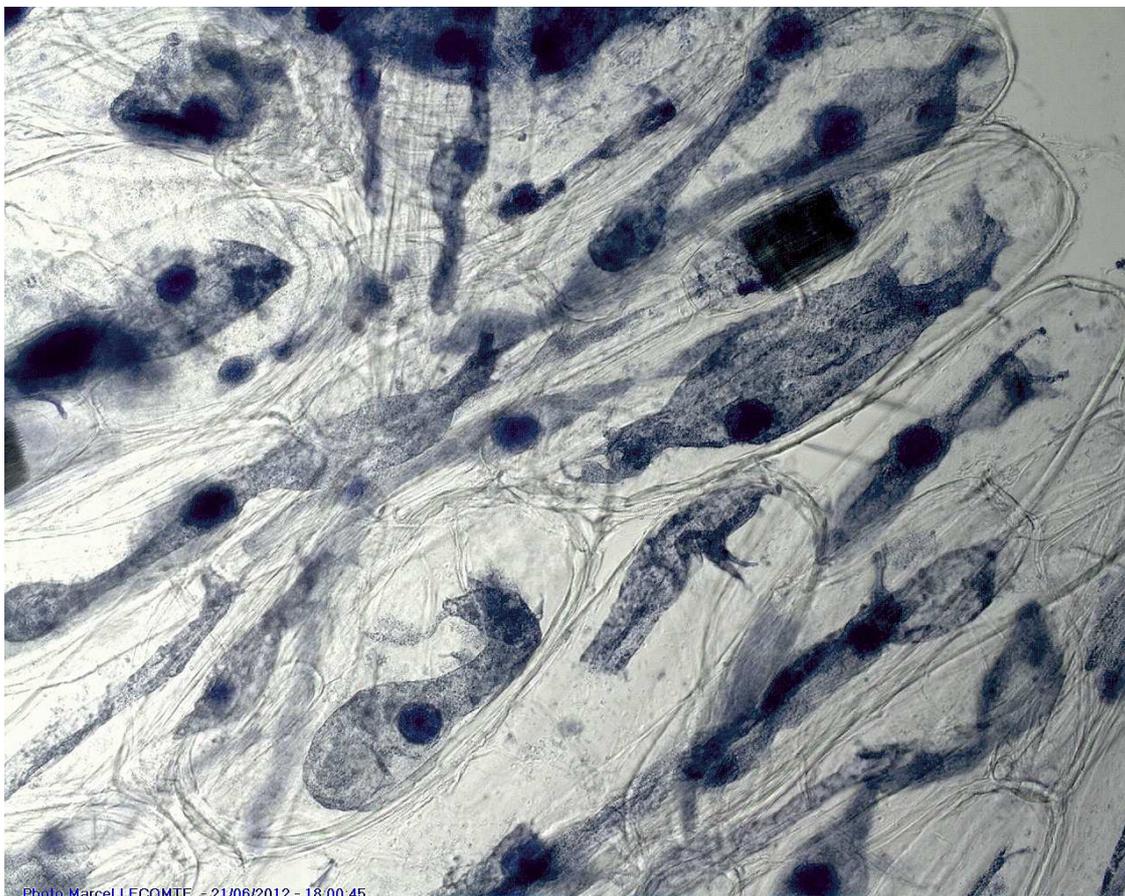


Photo Marcel LECOMTE - 21/06/2012 - 18:00:45

▼ ▲ Racine d'*Epipactis helleborine* colonisée par *Rhizoctonia*⁴¹ sp.



Photo Marcel LECOMTE - 21/06/2012 - 18:01:36

Les filaments mycéliens s'insinuent entre les cellules puis les pénètrent pour former une masse compacte, appelée peloton, dans laquelle vont se réaliser tous les échanges symbiotiques. La plupart des champignons mis en cause appartiennent au genre *Rhizoctonia*, dont le plus connu est *R. solani* (responsable de la pourriture sur la pomme de terre, la salade et divers légumes à racine comestible).

PRÉALABLE

Notre ami Albert Marchal (AM) a longuement étudié la relation entre orchidées sauvages et champignons, et a réussi à faire pousser quasi toutes les espèces belges in vitro.

³⁹ En milieu stérile, il est possible de remplacer le champignon par un milieu nutritif très riche en sucre, qui apporte le carbone nécessaire.

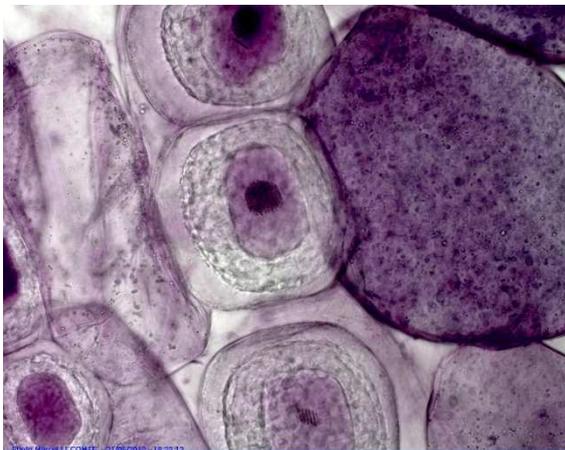
⁴⁰ BERNARD N., 1909- *L'évolution dans la symbiose, les Orchidées et leurs champignons commensaux*, Annales de Sciences Naturelles, IX^{ème} série, Masson Ed.

⁴¹ SNEH B., BURPEE L. & OGOSHI A., 1998 - *Identification of Rhizoctonia species*, 3ed Ed., APPS Press, USA

Voici le protocole d'étude qu'il nous a confié et que nous avons suivi strictement, pour le deux préparations ci-dessous.

RÉCOLTE DE MATÉRIEL

Nous avons récolté les racines d'un exemplaire d'*Epipactis helleborine*, particulièrement présente et envahissante dans nos parterres (plusieurs dizaines de spécimens), en terrain calcaire. C'est une plante vivace, à système racinaire épais et court. Sur l'exemplaire prélevé, nous n'avons pas trouvé de bulbe (prélèvement vraisemblablement mal réalisé).



◀ Pelotons de mycélium à différents stades de digestion dans les cellules corticales (éléments de l'écorce de la racine) → coloration au noir de chlorazol.

MODE OPÉRATOIRE

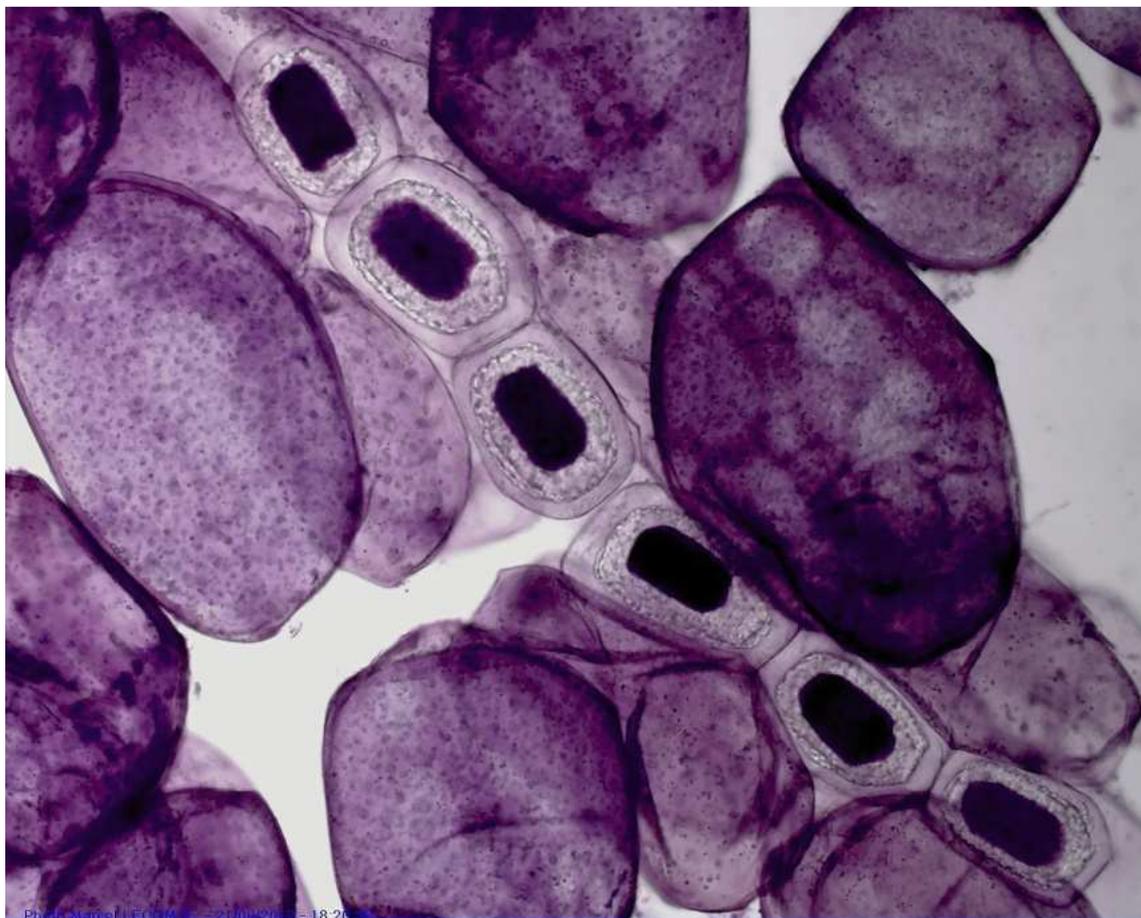
- ++ Placer les racines dans un récipient en pyrex, contenant de l'eau, et cuire durant 10 minutes à la casserole à pression.
- ++ Après refroidissement, et à l'aide de ciseaux, tailler les racines en petits bouts (1/4 cm de long au maximum).
- ++ Préparer une solution mère de noir de chlorazol à 0,1 % (0,1 g pour 100 cc d'eau bidistillée).
- ++ Coloration : nous utilisons 1 goutte de solution mère pour 20 gouttes d'eau (AM dit : 0,03 %....).

Laisser agir le colorant durant 10 minutes.

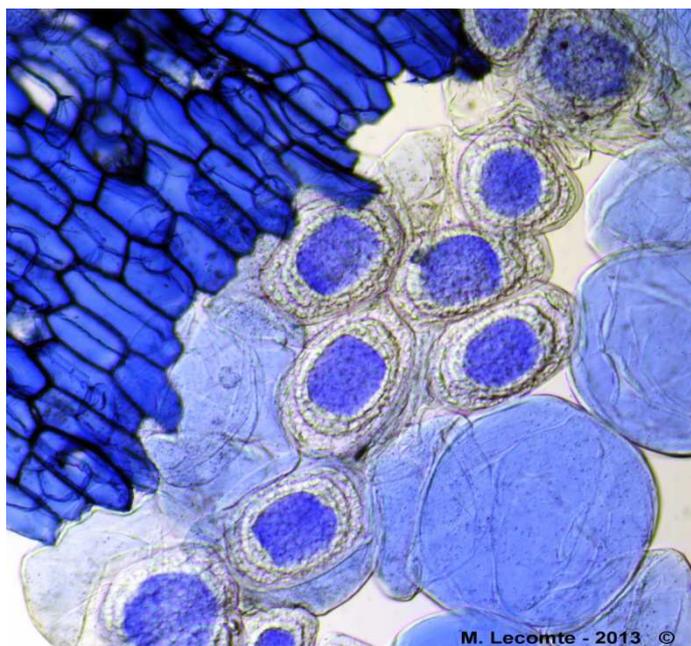
++ Rincer à l'eau bidistillée.

++ Dissocier et observer à 40x dans l'eau (pour une observation extemporanée) ou dans le lactoglycérol (acide lactique + glycérine + eau bidistillée, en parts égales).

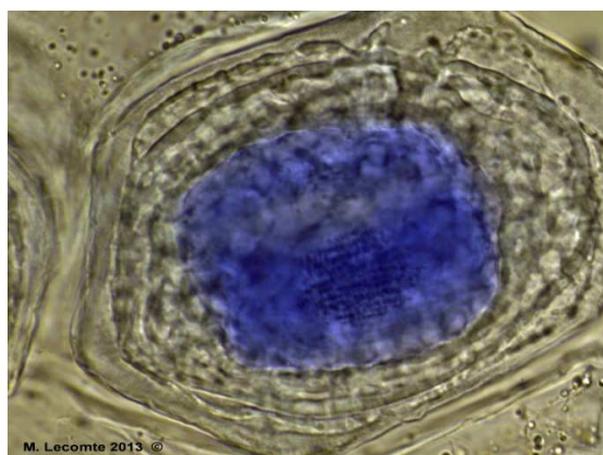
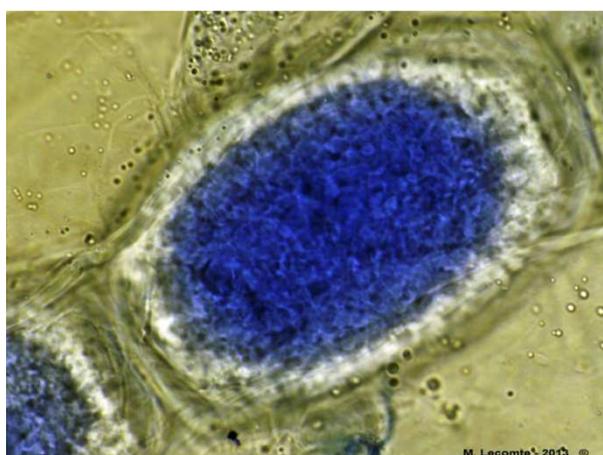
++ Dans le second cas, on peut conserver la préparation durant des années ; il suffit de la luter au vernis à ongles, après avoir mis la préparation sous compression (avec une pince à linge par exemple).



▲ Pelotons de mycélium lysés et en fin de vie, dans les cellules corticales.

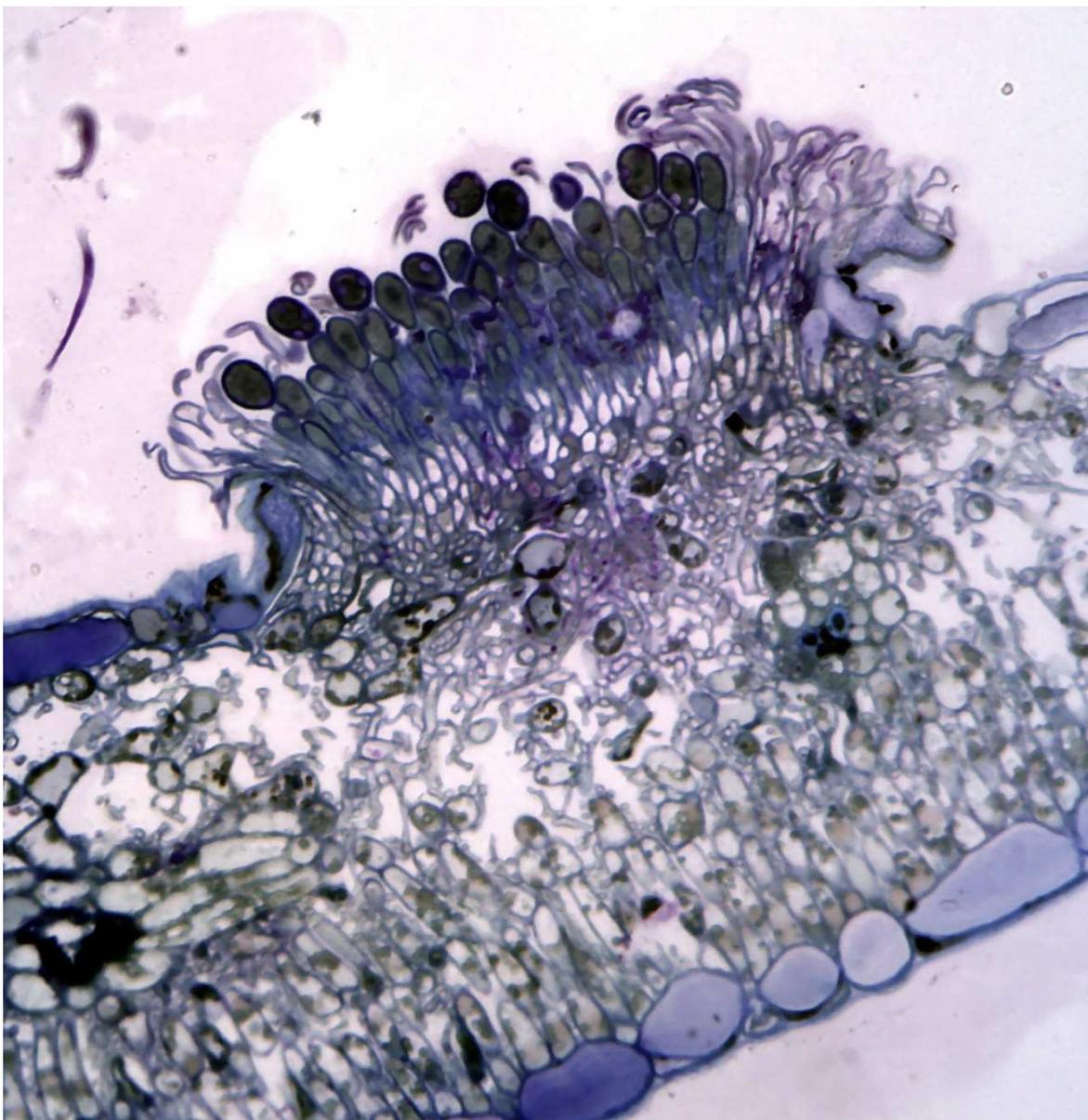


Etude du système racinaire d'*Epipactis helleborine*, après traitement à la potasse et coloration au bleu de méthyle acétique, ce qui met parfaitement en évidence les pelotons mycéliens, qui sont déjà fortement dégradés ; il n'y a plus trace de mycélium entre les cellules.



Les Rouilles ou Urédinomyètes, ou Pucciniomyètes

Notre propos n'est pas de présenter ici une étude détaillée des Urédinales, même si cela s'avère particulièrement intéressant. Des articles de fond ont été publiés sur ce sujet dans le bulletin annuel de l'Association des Mycologues Francophones de Belgique⁴². Nous allons simplement mettre en évidence l'aspect spectaculaire de leur microscopie, terrain d'étude idéal pour améliorer des tours de main et des techniques diverses, vu la taille souvent importante des éléments : des urédospores de 15 à 30 µm de diamètre sont courantes, de même que des téléospores de 25-35 x 55-100 µm ne sont pas rares.



Coupe longitudinale dans une urédosore de *Phragmidium tuberculatum* sur feuille de rosier, avec des urédospores en train d'être libérées ; inclusion dans la résine synthétique, coupe de 2 µm d'épaisseur, réalisée à l'ultramicrotome (avec couteau au diamant) ; coloration au bleu de toluidine (auteur coupe et photo : Guy Auderset)

DÉTAIL DE LA TECHNIQUE UTILISÉE PAR G. AUDERSET

FIXATION : glutaraldéhyde à 2,5% dans tampon phosphate 0,1 Molaire Ph 7.0 : 4 heures.

3 lavages dans le même tampon.

Tétroxyde d'osmium 1 % dans le même tampon : 2 heures.

DÉSHYDRATATION dans l'alcool éthylique (25%, 50%, 75 %, 95 %) 1h. dans chaque bain, puis 3x 1 h. dans l'alcool absolu.

⁴² VANDERWEYEN A., 2012 - Quelques notions sur les rouilles (1^{ère} partie), bulletin 2012/05, p. 13-15

VANDERWEYEN A., 2013 - Quelques notions sur les rouilles (2^{ème} partie), bulletin 2013/06, p. 24-27

INCLUSION : transfert dans la résine (la même que dans la technique de Cléménçon) durant une nuit ; les échantillons plongent progressivement. Le lendemain, faire au moins 3 changements de résine, puis disposer dans des moules, et passer à l'étuve à 70 °C, durant 8 heures.
Coloration : dans le cas présent, le bleu de toluidine a été utilisé, mais d'autres produits sont utilisables.

Cette fixation est prévue normalement pour la microscopie électronique. Il faut un couteau spécial pour le microtome (lame au widia), car les lames classiques ne peuvent couper cette résine très dure. La pénétration de la résine est moins bonne que dans l'autre technique.

Personnellement, je déconseille vivement de manipuler les deux produits cités ci-dessous, à l'état pur, si on ne dispose pas d'une hotte à flux laminaire, car **le glutaraldéhyde est un produit très toxique⁴³ ; le tétroxyde d'osmium est extrêmement toxique⁴⁴, même en très faible quantité, et doit être manipulé avec d'importantes précautions.**

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE PRÉPARATION EXTEMPORANÉE DE SPORES (urédo-, écidio- ou téléutospores).



1. Déposer une goutte de BCL + 1 goutte d'eau bidistillée sur une LPO et mélanger. Il est possible d'utiliser nombre d'autres colorants : fuchsine acide, violet de gentiane, bleu de toluidine, phloxine B ...
2. Effectuer le prélèvement avec une pointe d'aiguille.
3. Incorporer soigneusement dans le mélange bleu-eau.
4. Poser une LCO adaptée.

◀ Écidiospores de *Puccinia* sp. sur la ficaire fausse renoncule (*Ranunculus ficaria*) – montage dans l'eau bidistillée

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE PRÉPARATION DÉFINITIVE

1. Déposer une goutte de PVALph-BM sur une LPO.
2. Effectuer le prélèvement avec une pointe d'aiguille, et incorporer soigneusement dans le médium.
3. Poser une LCO ronde, de taille adaptée, et éliminer les éventuelles bulles d'air par la chaleur.

Téléutospores et écidiospores de *Puccinia asperulae-odorata* sur l'aspérule odorante (*Galium odoratum*) – montage dans le violet de gentiane ▶

Il n'est pas rare de rencontrer les 2 sortes de spores qui cohabitent sur le même substrat.

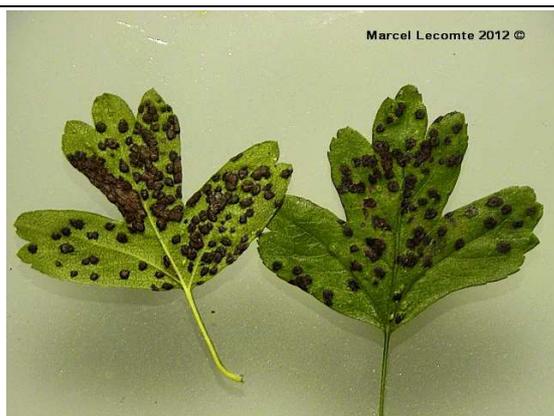


⁴³ C'est un liquide incolore et huileux, très odorant, très nocif par inhalation ; sévère irritation des poumons, du nez et de la gorge, ainsi que des yeux ; violentes migraines et troubles de la perception. Il est soluble dans l'eau, l'éthanol, le méthanol et le benzène. Il fixe les protéines des tissus avant coloration.

⁴⁴ Odeur âcre très particulière et indéfinissable ; l'inhalation peut générer des œdèmes pulmonaires mortels (même à des concentrations trop faibles pour en percevoir l'odeur).



Urédiospores et écidiospores de *Puccinia senecionis* sur tige et feuille de séneçon de Jacob (*Senecio jacobaea*)



Téliospores sur feuilles d'aubépine (*Crataegus oxyacantha*)



Ecdiospores de *Puccinia tuberculatum* sur feuille de rosier (*Rosa sp.* - cultivar)

Téliospores de *Puccinia malvacearum* sur feuille de rose trémière (*Althaea rosea*) - photo J. Leclercq



Uromyces ficariae sur la ficaire fausse renoncule (*Ranunculus ficaria*) - photo J. Leclercq

Nyssopsora echinata sur *Meum athamanticum* - photo A. Vanderweyen

Les Charbons ou Ustilaginomycètes



◀ *Ustilago maydis* sur un épi de maïs.

Ce sont des Basidiomycètes endoparasites, terrestres ou aquatiques, qui s'attaquent à nombre de végétaux, essentiellement des graminées. Les spores noires (qui justifient le nom de « charbon ») infectent les plants sains en se propageant par le sol.

Le mycélium interne est cloisonné, intercellulaire, (rarement intracellulaire : *U. maydis*) pourvu de suçoirs, annuel ou vivace, localisé au point d'infection ou ascendant dans toute la plante.

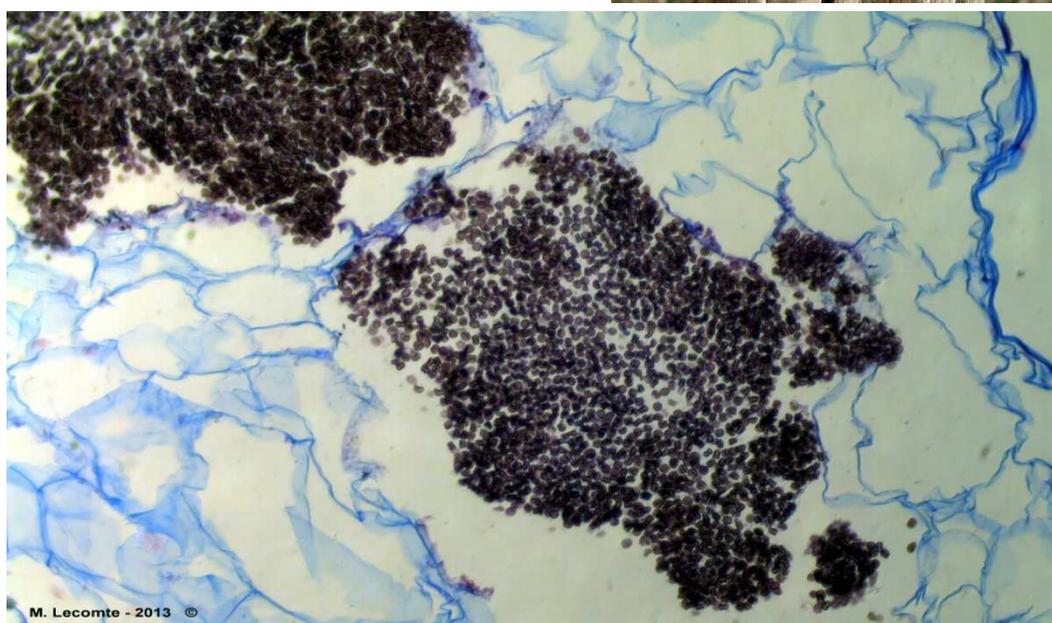
La reproduction, généralement sexuée, est précédée par la formation de spores durables diploïdes, à paroi ordinairement de

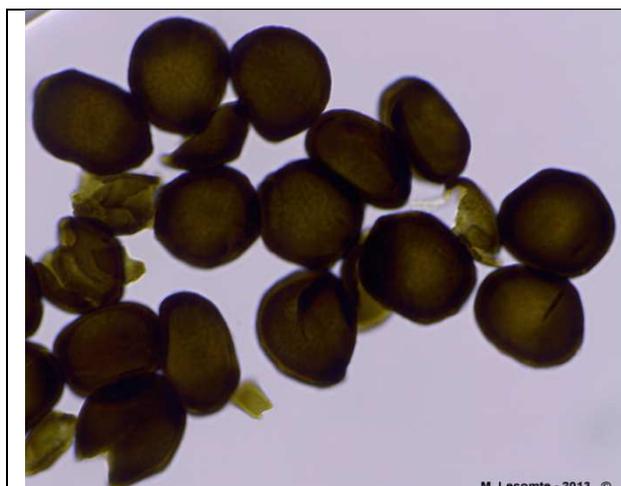
couleur foncée, disposées presque toujours dans un sore nu (ou enveloppé par une pseudo membrane constituée par des hyphes stériles), à la surface ou dans les tissus d'un organe défini, pour l'espèce considérée (racines, feuilles, fleurs, étamines, ovaires) ; on rencontre parfois une reproduction asexuée par des conidies à la surface de l'hôte (*Entyloma*, *Ginanniella*). La spore à maturité, possède une paroi épaisse, +/- ornée de verrues, d'aiguillons, de crêtes isolées ou en réseau.

Depuis, 2007, cette classe est divisée en 2 ordres : les Ustilaginales et les Urocystales. Le représentant sans doute le plus spectaculaire est le charbon du maïs (*Zea mays*). Il fut une époque où *Ustilago tritici* dévastait les cultures de blé et d'orge, mais l'utilisation de semences traitées aux fongicides a éradiqué ce véritable fléau agricole.

***Ustilago grandis* sur tige de Phragmite (*Phragmites australis*) ▶**
photo Jean-Paul Maurice.

▼ Coupe transversale dans un sore d'*Ustilago maydis*, après inclusion dans la paraffine et coloration au bleu azur.

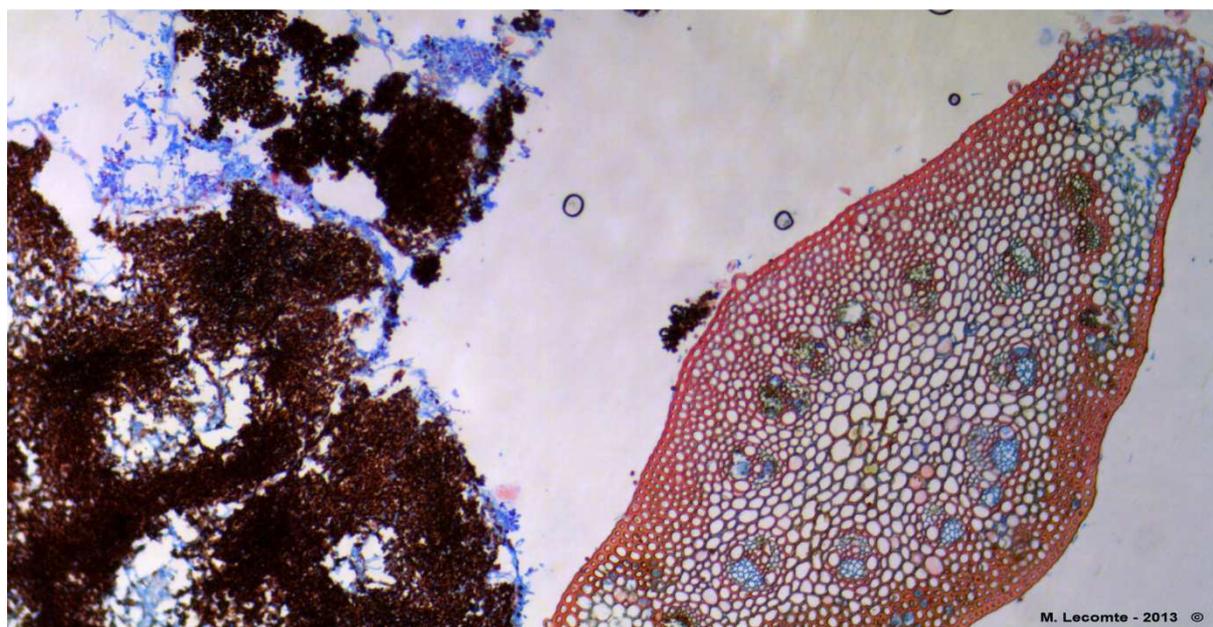




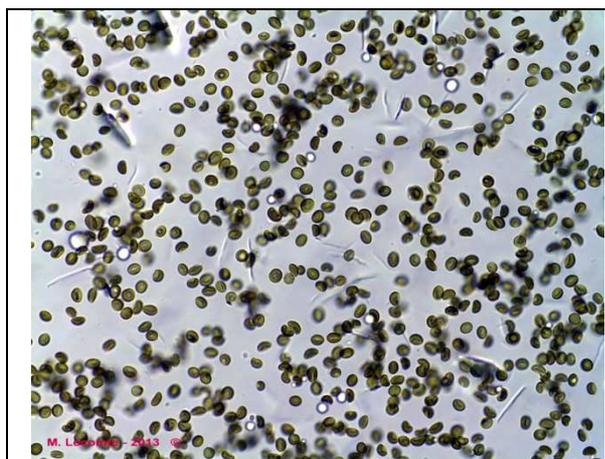
Spores de *Cintractia caricis* sur épi floral de *Carex* sp. - matériel non coloré, monté dans Aquatex



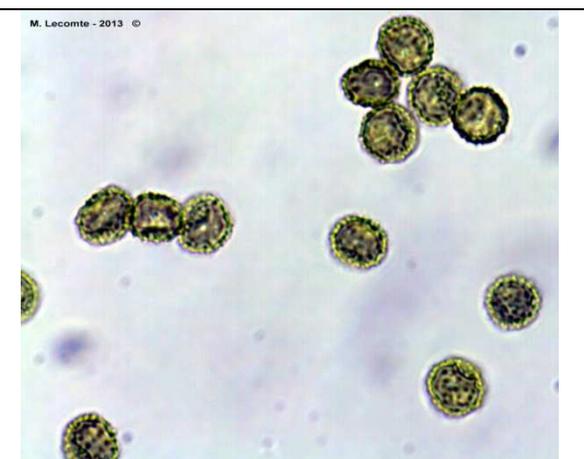
Spores d'*Ustilago violacea* sur les anthères de *Silene dioica* - matériel non coloré, monté dans BC.



▲ Coupe transversale dans une tige d'avoine (*Avena sativa*) et spore d'*Ustilago avenae*, après inclusion dans la paraffine et triple coloration au bleu azur, carmin aluné et vert d'iode.



Sporée d'*Ustilago avenae*



Spores d'*Ustilago maydis*

Le mycélium endogène des Ustilaginomycètes possède une particularité : chaque cellule du mycélium est susceptible de devenir une conidie, une chlamydo-spore, qui sera dispersée surtout par le vent. Certaines espèces du genre *Microbotryum* forment leurs spores dans les anthères de certaines Dianthacées (Caryophyllacées), comme les silènes ou les lychnis ; les spores du charbon prennent la place des grains de pollen et sont ainsi transportés par les insectes butineurs.

Les Oïdiums ou Erisyphales

Ce sont des Ascomycètes (à forme sexuée présentant des ascospores), qui ont la particularité d'être tous ectoparasites des végétaux, et peuvent causer des dommages très importants aux plantes cultivées.

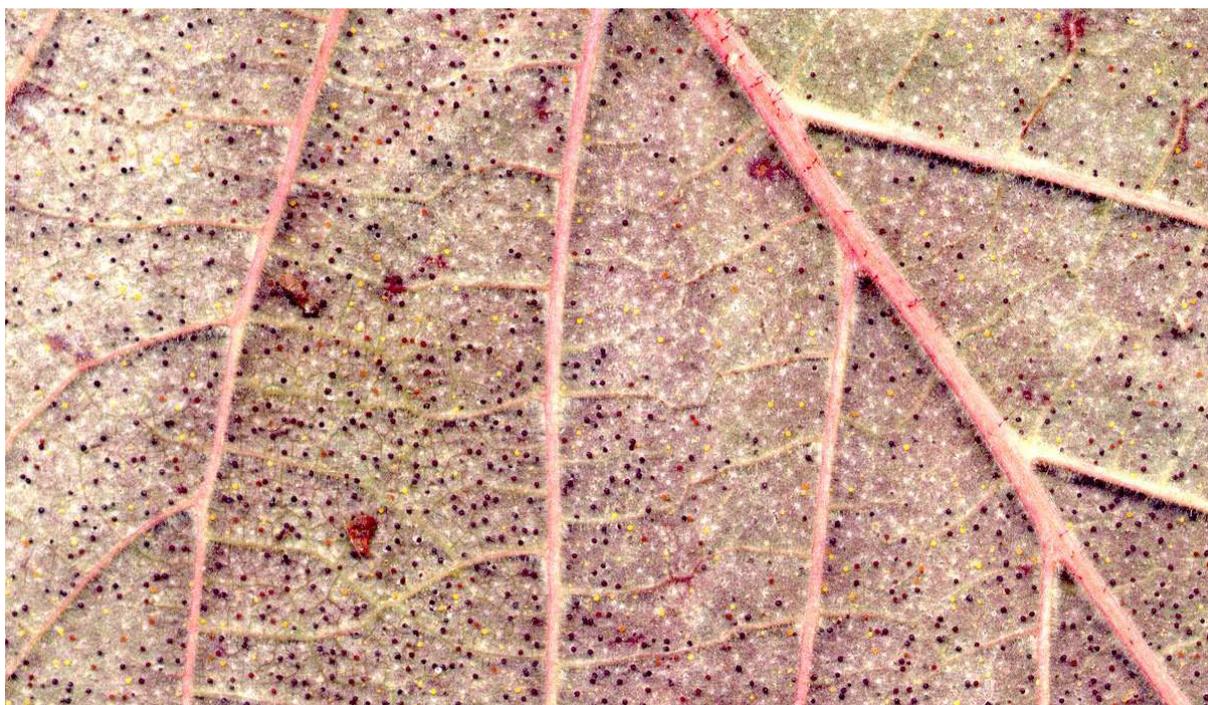


◀ *Microsphaeria alphitoides*, sur feuilles de chêne (ce sont les points noirs).

Ils provoquent ce qu'on appelle la maladie du blanc, car leur attaque se manifeste d'abord par un feutrage blanc grisâtre, farineux, abondant, qui apparaît surtout à la surface des 2 faces des feuilles (parfois sur bourgeons, tiges, fleurs ou fruits). Contrairement à d'autres parasites, ils peuvent se développer par temps relativement sec. Le terme « oïdium » qui leur est attribué recouvre en réalité plusieurs espèces bien distinctes.

Les plus connus sont les oïdiums de la vigne (*Uncinula* ou *Erysiphe necator*), du chêne (*Microsphaeria alphitoides*), du fraisier (*Podosphaera*

aphanis), du pommier (*Podosphaera leucotricha*), de la tomate (*Leveillula taurica*), du concombre (*Podosphaera fusca*), du pois (*Erysiphe polygoni*), des céréales (*Blumeria graminis*), du marronnier (*Uncinula flexuosa*), du rosier (*Sphaerotheca pannosa*), de l'érable (*Uncinula bicornis*).



Cléistothèces de *Phyllactinia guttata* sur feuille de *Corylus avellana* (noisetier) - Photo Luc Bailly

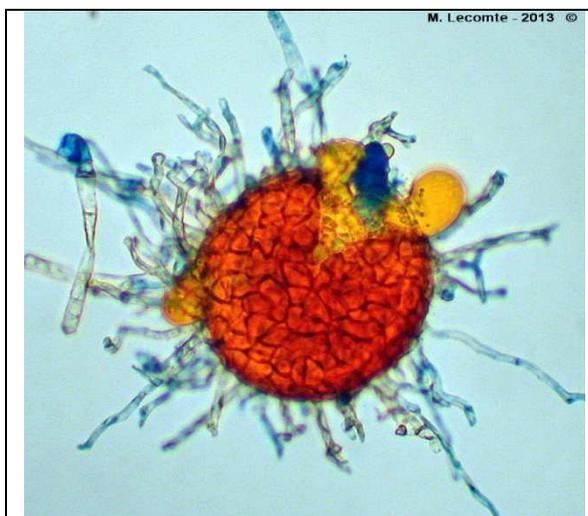
Dans une famille bien précise (*Erysiphaceae*, regroupant notamment les genres *Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Uncinula*), la pulvérulence blanchâtre révèle la présence de nombreuses conidies (appelées aussi oïdies), qui assurent la reproduction asexuée de l'espèce. Le mycélium génère des sporophores, au sommet desquels on trouve des chainettes d'oïdies.

En fin de saison, on voit apparaître des fructifications +/- globuleuses, des périthèces, appelées « cléistothèces » qui participent à la reproduction sexuée ; elles contiennent un nombre variable d'asques (de 1 à 20), avec pour chacun 2 à 8 ascospores ; elles sont ornées d'appendices parfois spectaculaires, étalés radialement et appelés « fulcres », qui vont jouer un rôle important pour la détermination (en raison de leurs formes très variées). A maturité, la cléistothèce va s'ouvrir par déchirure.

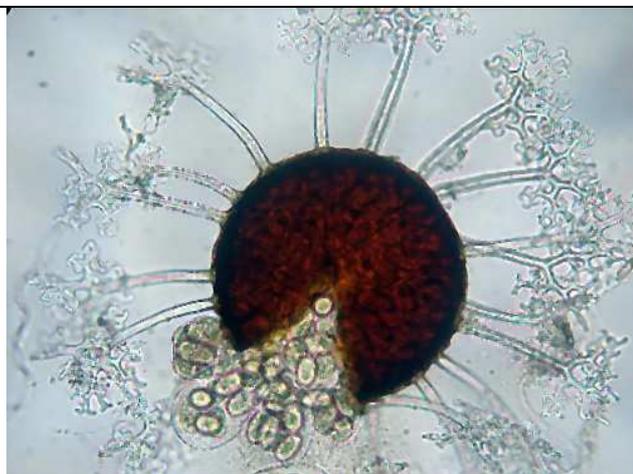


Les cléistothèces de *Phyllactinia guttata*, à divers stades de maturité (lorsqu'elles sont mûres, elles sont quasi noires). A ce grossissement, on distingue à peine les fulcres.

Ci-dessous, on distingue nettement la strate externe de l'enveloppe périthéciale, formée de cellules pigmentées, de grande taille, à parois épaisses, ce qui lui confère une allure de réseau.



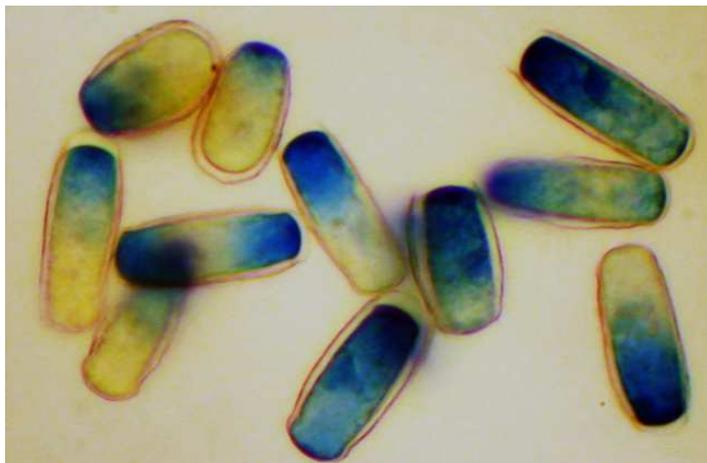
Cléistothèce avec fulcres simples chez *Erysiphe heraclei*, sur *Heracleum sphondylium* (Grande Berce)



Cléistothèce avec fulcres complexes chez *M. alphitoides*, sur chêne ; on distingue nettement les asques et ascospores, libérés par rupture de l'enveloppe - photo M. Vérollet



▲ Détail d'un fulcre chez *M. alphitoides*.



▲ **Conidies colorées au bleu coton** (photo André Février)

MODE OPÉRATOIRE 1 : LES CONIDIES

++ En début de saison, prélever une feuille infectée, sur laquelle on ne détecte pas la présence de cléistothèces.

++ Poser la feuille sur une LPO et la tapoter vigoureusement, durant 10-15" : les chocs répétés auront rompu les chaînes de conidies, qui se seront déposées sur la LPO.

++ Vérifier leur présence à sec, à faible grossissement, sans LCO (elles ont souvent la forme de tonnelets).

++ Déposer une goutte d'eau bidistillée

et une gouttelette (une pointe de pipette de Pasteur) de BCL, BDC ou FAL et laisser agir durant 30".

++ Etaler comme un frottis : cela va éclaircir la préparation.

++ Poser une LCO, et nettoyer tout ce qui l'entoure.

++ Observer à 60-63x ou 100x.

MODE OPÉRATOIRE 2 : LES CHAÎNES DE CONIDIES

++ Sous la loupe, prélever délicatement un peu de feutrage blanc, à l'aide d'une très fine aiguille.

++ Déposer le prélèvement dans un milieu d'observation épais.

→ Très souvent, le résultat sera nul ou peu convaincant, car le moindre choc brise la chaîne de conidies, et elles se retrouvent dispersées dans toute la préparation.



MODE OPÉRATOIRE 3 : LES CHAÎNES DE CONIDIES

++ Préparer un bout de papier collant cristal de 1 x 2 cm.

++ Presser la face collante sur le feutrage blanc.

++ Découper des carrés de 5 x 5 mm.

++ Placer chaque carré dans une goutte de colorant dilué (50/50), durant 15-30".

++ Passer dans une goutte d'eau pour rincer.

++ Déposer le prélèvement dans un milieu d'observation épais (le glisser en biais dans la goutte).

→ De cette manière, on va trouver des chaînes de conidies encore partiellement intactes.

MODE OPÉRATOIRE 4 : LES CLÉISTOTHÈCES

++ Sous la loupe, prélever délicatement 2 ou 3 fructifications, à l'aide d'une très fine aiguille, en veillant à la présence de fulcres bien développés.

++ Les déposer dans une goutte de colorant dilué (50/50) : BDC ou FAL.

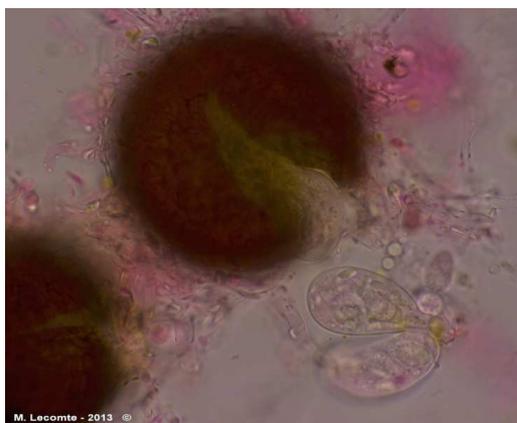
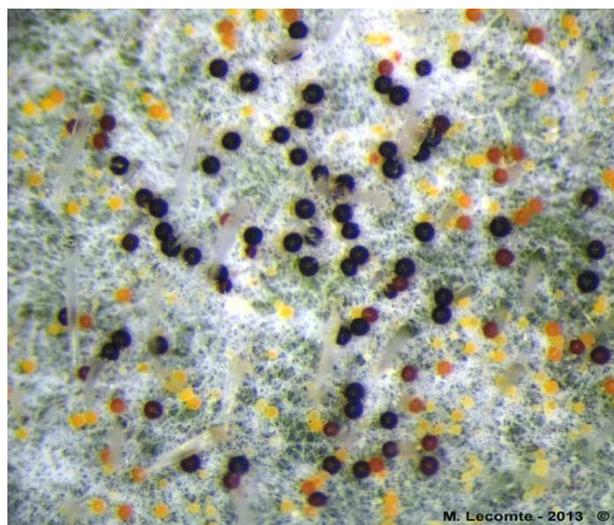
++ Absorber le colorant avec du papier adéquat.

++ Poser une goutte d'un milieu d'observation épais.

++ Poser délicatement une LCO.

→ Si on presse trop fort sur une cléistothèce non mûre, elle se rompt et laisse échapper un liquide jaunâtre, huileux, qui pollue la préparation.

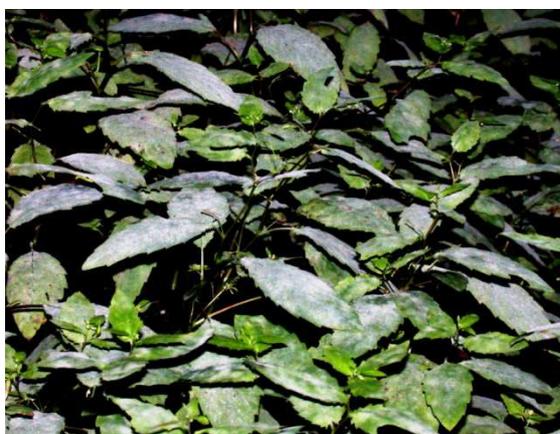
→ Si on presse sur une cléistothèce mûre, on va voir apparaître les asques et les ascospores.



Etude réalisée sur une feuille de grande Berce (*Heracleum spondylium*) : *Erysiphe heraclei* a proliféré jusqu'à envahir toutes les feuilles.

A l'œil nu, les cléistothèces se présentent comme de minuscules points noirs. A la loupe, on distingue les différents stades de maturité, du jaune clair au brun noirâtre ▲.

◀ Si on observe des cléistothèces matures au microscope, une légère pression exercée sur la LCO va faire exploser la sphère et libérer les asques (dans le cas présent, les ascospores ne sont pas encore bien formées, et il est impossible de distinguer leur forme).

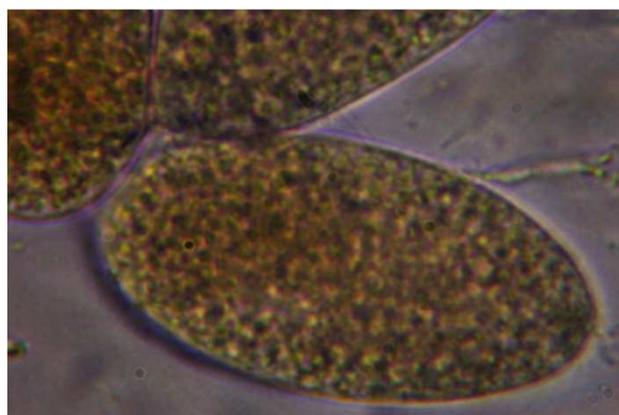
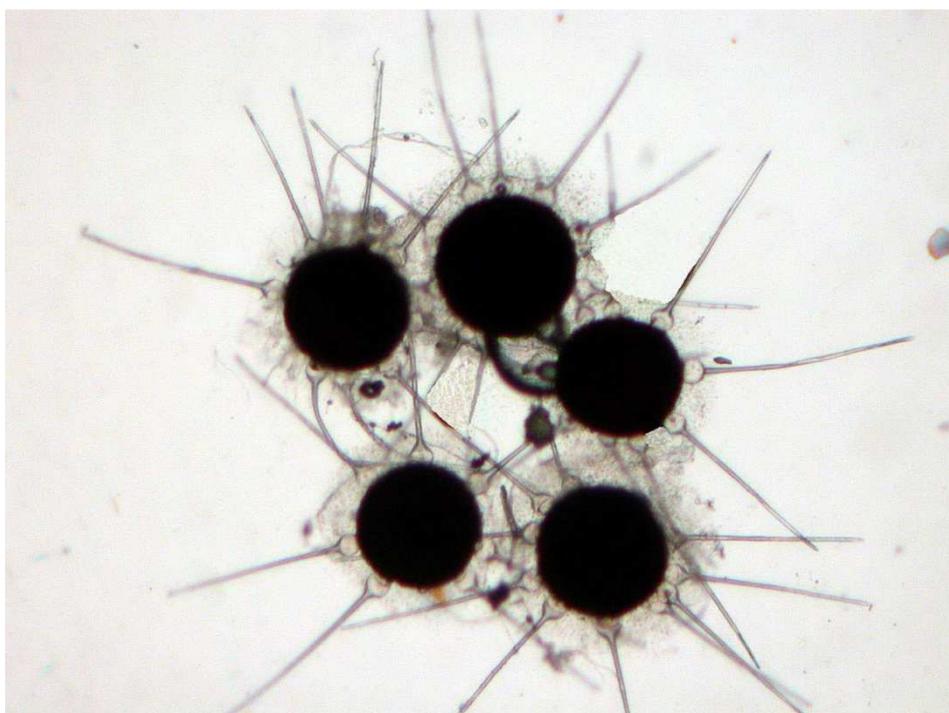


minae.

Etude réalisée par L. Bailly sur feuilles d'une *Balsaminaceae* (*Impatiens noli-tangere*), infectées par *Sphaerotheca balsaminae*.



Étude réalisée par L. Bailly sur feuilles de frêne (*Fraxinus excelsior*), infectées par *Phyllactinia fraxini*.



La vigne a beaucoup d'ennemis



Feuilles de vigne (*Vitis vinifera*) infectées par *Colomerus vitis*, un acarien, avec boursoufflures caractéristiques.

UN ACARIEN : ce feutrage blanc est une hypertrophie des poils du limbe ; au départ, ils sont blanc pur puis vont virer au rouge marron en vieillissant. L'acarien est invisible à l'œil nu ; cette « maladie » est appelée érinose. On peut traiter à titre préventif, au printemps, par pulvérisation de soufre, afin d'empêcher un envahissement généralisé, qui risquerait d'affaiblir la plante et de diminuer le rendement.



UN OÏDIUM : un feutrage blanchâtre apparaît à la face supère et infère des feuilles, ainsi que sur les fruits. Il est d'ailleurs souvent confondu par un néophyte avec le mildiou de la vigne.



M. Lecomte - 2013 ©

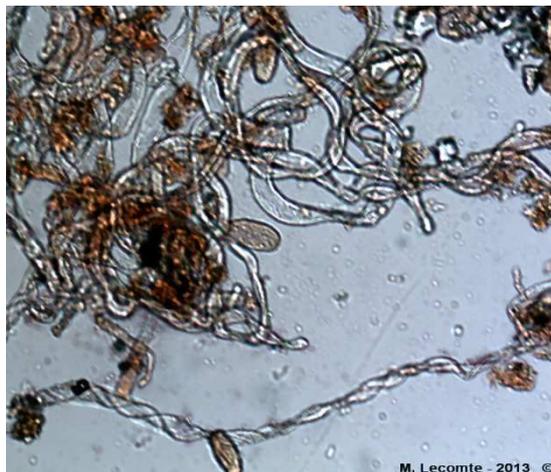


M. Lecomte - 2013 ©



M. Lecomte - 2013 ©

Nous avons eu la possibilité d'étudier ce champignon grâce à l'aide de Guy Moussy, viticulteur en Champagne, qui nous a procuré le matériel nécessaire. Mais le champignon n'en était encore qu'au stade conidien, et il nous a été impossible de trouver des cléistothèces.



M. Lecomte - 2013 ©

Un prélèvement à l'aiguille ou à la pince n'est guère efficace, car les conidies sont éparées dans le mycélium. Il faut avoir recours au papier collant, afin d'espérer trouver des conidies encore attachées au bout des filaments mycéliens qui les produisent par génération apicale.



M. Lecomte - 2013 ©

UN MILDIU : voir pages suivantes.

LES MILDIOUS

Autrefois classés parmi les champignons inférieurs (Oomycètes), les mildious sont classés maintenant dans le règne des *Chromista*. Ils ont des caractères communs avec les Fungi : hyphes, mycélium, sporulation ... mais ont des spores mobiles (2 flagelles) et une paroi cellulosique (non chitineuse). On peut dire, en quelque sorte, que ce sont des algues qui ont perdu leurs chloroplastes et deviennent donc des parasites obligés des végétaux.



M. Lecomte - 2013 ©



M. Lecomte - 2013 ©

▲ ▲ Feuilles de vigne (*Vitis vinifera*) et grappe ▼ infectées par *Plasmopara viticola*



M. Lecomte - 2013 ©

Ils sont responsables de maladies épidémiques très dommageables chez de nombreuses plantes : vigne (*Plasmopara viticola*), tomate, aubergine et pomme de terre (*Phytophthora infestans*), poireau (*P. porri*), chou, radis, roquette (*Peronospora brassicae* = *P. parasitica*), tabac (*P. tabacina*), pois (*P. viciae*), épinard (*P. farinosa* f. *spinaciae*), mâche (*P. valerianellae*), laitue (*Bremia lactucae*).



Conidies de *Plasmopara viticola* sur feuille de vigne infectée ▲ ▲ - photos A. Advocaat

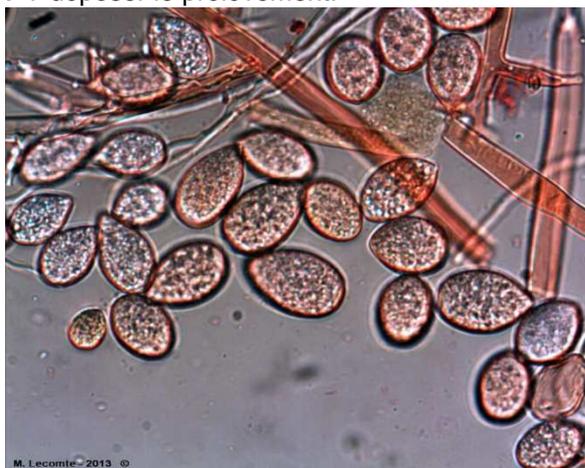
Extrémités mycéliennes montrant les points d'insertion des conidies. ▶

OBSERVATION DU FEUTRAGE MYCÉLIEN

+ Prélever à l'aide d'un papier collant. Même en utilisant cette technique, nous n'avons pu effectuer un prélèvement montrant les conidies encore attachées à l'extrémité de l'hyphe fertile. Le point d'attache est d'une fragilité extrême et se brise au moindre contact.

+ Couper un carré de 5 mm de côté. Préparer une LPO avec une petite goutte d'eau centrale.

+ Y déposer le prélèvement.



+ Coloration au RC SDS, durant une minute, puis éponger le surplus de liquide.

+ Poser délicatement une LCO, afin d'éviter les bulles d'air.

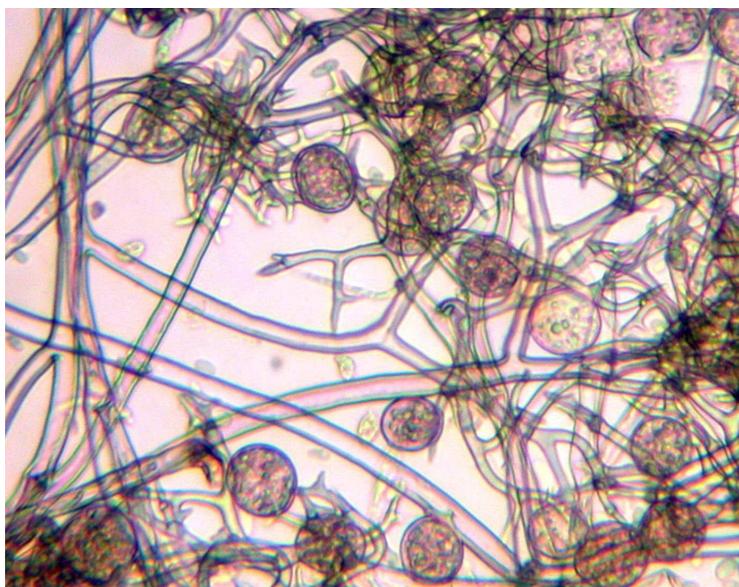
+ Éponger le débordement de liquide et observer d'abord à 40x.



La vesce des haies (*Vicia sepium*) est infestée par *Peronospora sepium*.



Photos ◀ ▲ ▼ L. Bailly



LES LICHENS

Jean-Pierre Gavériaux⁴⁵

Pour la détermination des espèces, une petite loupe (x10) et quelques réactifs chimiques suffisent pour identifier les principaux lichens corticoles foliacés ou fruticuleux présents sur les arbres de nos villes ; par contre, si vous désirez faire un inventaire précis des espèces présentes sur un site, il vous faudra obligatoirement prélever des fragments de thalle, au couteau (opinel avec virole de sécurité recommandée) pour les terricoles et les corticoles, au burin pour les saxicoles, sans oublier de noter sur le terrain toutes les indications utiles [date de la récolte, lieu (données GPS vivement souhaitées), altitude, nature et orientation du substrat, etc.] ; chez vous il faudra ensuite faire une étude à l'aide d'un matériel optique souvent onéreux, utiliser des réactifs, des colorants, et même pour certaines espèces, réaliser des chromatographies (CCM).

I. LE MATÉRIEL INDISPENSABLE AU LABORATOIRE

1) Petit matériel

Pinces fines normales, pincettes à pointes très fines, type Dumont de précision pour travail sous la binoculaire, aiguilles montées, lames de rasoir, lames et lamelles, etc.

2) Matériel optique

- ++ Petite **loupe de poche** (à un grossissement x10 ou à trois grossissements x3, x6 et x9).
- ++ **Loupe binoculaire** (grossissement x20 minimum, x60 souhaitable), indispensable pour les crustacés, les détails des foliacés et des fruticuleux, très utile pour la réalisation des coupes microscopiques ; c'est très certainement l'instrument le plus important pour l'observation de fins détails (soralies, isidies, pseudocyphelles, etc.) et la détermination des espèces.
- ++ **Microscope optique** avec objectifs x10, x40 et x100 à immersion, et oculaire (x10) micrométrique pour faire les mesures ; un jeu de polaroïds est nécessaire pour l'observation en lumière polarisée afin de préciser la localisation de certains cristaux (ex. chez les *Lecanora*).

3) Produits chimiques

► Les 5 réactifs pour les tests colorés :

- ++ **C** : l'eau de javel ou hypochlorite de sodium.
- ++ **K** : la potasse ou hydroxyde de potassium en solution aqueuse (10 à 35 %).
- ++ **P** : la paraphénylènediamine (para 1-4 phénylènediamine), en solution stabilisée qui se conserve une année ou solution alcoolique préparée extemporanément.
- ++ **N** : l'acide nitrique (noté N) : solution aqueuse à 50 %.
- ++ **I** : le réactif iodé (Iugol)

► Les produits de base pour la microscopie :

- ++ L'**eau** normale ou additionnée de SDS (sodium dodécyl sulfate = agent mouillant).
- ++ **KOH** à 3% et 10% pour dissociation des structures compactes des coupes.
- ++ **Lugol** (solution d'iode dans l'iodure de potassium) : mise en évidence de l'amyloïdie, la dextrinoïdie, le tholus, etc.
- ++ **Bleu coton lactique** aqueux ou lactophénolé pour les préparations semi-définitives.
- ++ Le **Rouge Congo SDS** (coloration de matériel fongique frais) et ammoniacal (pour la coloration de matériel fongique sec, issu d'herbier).
- ++ **Lactophénol au chloral**, milieu de montage ayant un indice de réfraction proche de celui du verre, permettant d'obtenir des images plus nettes en photomicrographie.
- ++ **Phloxine B**, excellent colorant cytoplasmique (cellules mortes uniquement).
- ++ **Bleu de crésyl**, indispensable pour l'étude des conidies, des champignons lichénicoles.

II. INFORMATIONS APPORTÉES PAR LE THALLE ET LES ORGANES NON SPOROGÈNES QU'IL PORTE

La couleur du thalle doit toujours être notée mais elle ne représente pas le critère essentiel pour la détermination ; il faut regarder le type de thalle, parfois sa structure, rechercher les organes non sporogènes qu'il porte, préciser dans certains cas la nature du photosymbiote, mais surtout, réaliser des tests colorés pour pouvoir progresser dans les clés de détermination.

⁴⁵ 14, résidence les Hirsons - 62800 LIEVIN - jean-pierre.gaveriaux@wanadoo.fr

1. Le type de thalle et sa structure

Selon leur morphologie, les thalles lichéniques sont classés en 7 types fondamentaux. Leur structure s'observe simplement sur une coupe microscopique faite à main levée (coupe mince indispensable) observée dans l'eau au petit grossissement du microscope.

THALLES LÉPREUX : association \pm cohérente de granules (0,1-0,2 mm) constitués chacun d'un peloton d'hyphes associées à quelques cellules algales. Les thalles lépreux, considérés comme primitifs, parviennent à constituer de grandes surfaces farineuses, surtout sur des substrats protégés des eaux de ruissellement et ombragés. Ex : les thalles des *Lepraria* (Planche 1 - photo 1).

THALLES CRUSTACÉS : ils forment une croûte fortement adhérente au substrat dans lequel pénètrent les hyphes de la médulle (pas de cortex inférieur). Plus de 4/5 des lichens ont des thalles crustacés. Parfois, sous la médulle, un hypothalle visible à la périphérie du thalle où il peut former des zones concentriques \pm colorées (Planche 1 - photo 2).



1. phorophyte ; 2. lichen corticole épiphléode ; 3. cellules du liège ; 4. cortex supérieur ; 5. couche algale ; 6. médulle ; 7. hypothalle ; 8. cellules du liège désorganisées (d'après des Abbayes - Traité de Lichénologie 1951)

Ex : les *Lecanora Ochrolechia*, *Pertusaria*... plus de 4/5 des lichens ont des thalles crustacés, la plupart d'entre eux sont souvent appelés les microlichens.

En fonction de sa position vis-à-vis du substrat, le thalle crustacé peut être endosubstratique ou épisubstratique (épi- ou endolithique dans le cas d'une roche, épi- ou endophléode dans le cas d'un lichen corticole, épi- ou endogé pour un lichen terricole).

Il est important d'observer la périphérie, lobée (thalle placôïde) ou non lobée ; délimitée ou non ; l'aspect de la surface (thalle continu, fendillé, aréolé, verruqueux, glébuleux, granuleux).

THALLES SQUAMULEUX : formés de petites écailles qui se chevauchent partiellement. La partie de l'écaille décollée du substrat commence à différencier un cortex inférieur. Ces thalles sont intermédiaires entre les thalles crustacés et les thalles foliacés. Ex : *Normandina pulchella* (Planche 1 - photo 3).

THALLES FOLIACÉS : formés de lames ayant \pm l'apparence de feuilles constituées de lobes diversement orientés ; ces thalles sont facilement détachables du substrat auquel ils sont fixés par des rhizines, rarement présentes sur toute la face inférieure et même parfois absentes.

Planche 1 : principaux types de thalles
(sauf photo 8)

Photos J.P. Gavériaux



▲ Thalle lépreux de *Chrysothrix candelaris*



▲ Thalle crustacé de *Caloplaca flavescens*



▲ Thalle squamuleux de *Normandina pulchella*



▲ Thalle foliacé de *Parmelia sulcata*



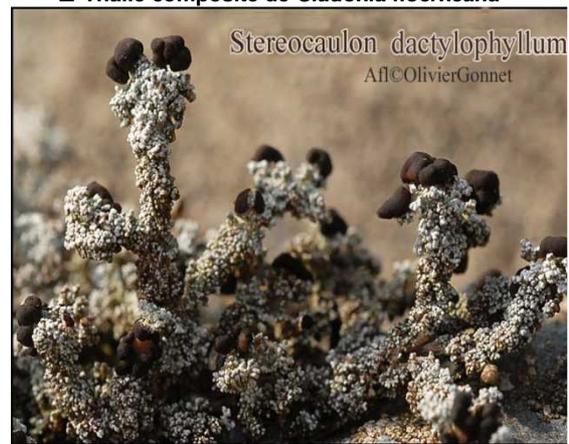
▲ Thalle fruticuleux de *Ramalina farinacea*



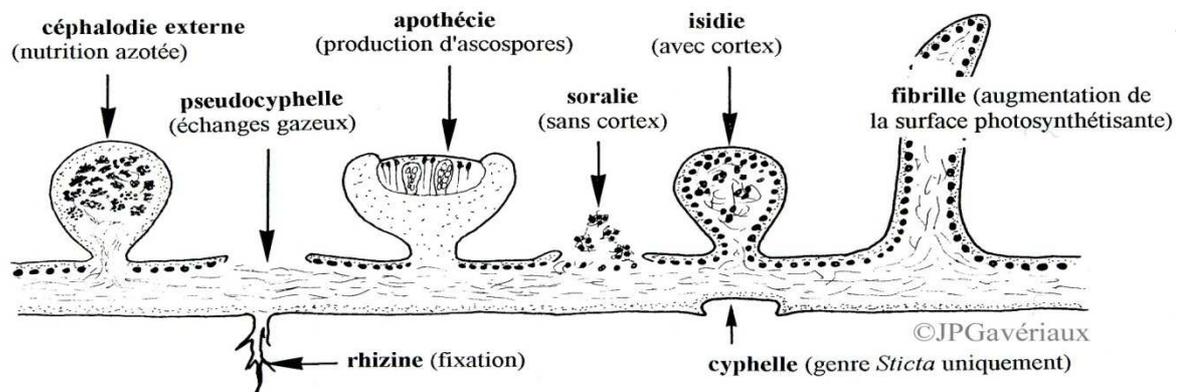
▲ Thalle composite de *Cladonia floerkeana*



▲ Thalle gélatineux (sec) de *Collema flaccidum*



▲ Thalle secondaire de *Stereocaulon* (Ph. O. Gonnet)



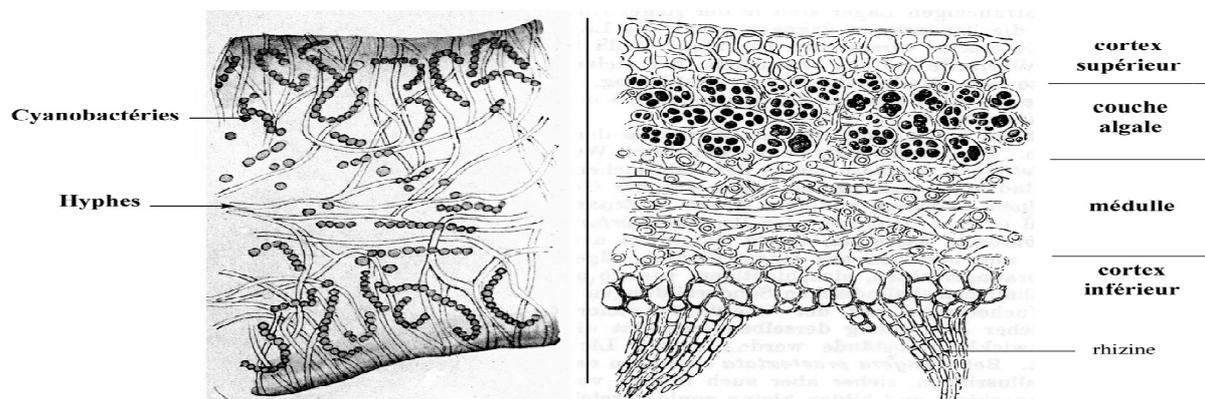
Organisation générale d'un thalle foliacé (structure dorsi-ventrale)

La plupart des thalles foliacés présentent une structure hétéromère avec une disposition dorsi-ventrale où l'on peut distinguer :

- ++ un cortex supérieur : hyphes serrées souvent structurées ;
- ++ une couche algale : les photobiontes (algues vertes ou cyanobactéries) ;
- ++ une médulle : hyphes lâches ;

++ un cortex inférieur : hyphes serrées donnant naissance à des rhizines* jouant un rôle dans la fixation du thalle.

Ex : les *Parmelia* (Planche 1 - photo 4), *Physia*, *Xanthoria*...



Structure homéomère d'un cyanolichen (<i>Collema</i>) (d'après l'abbé Harmand – Lichens de France – 1905)	Structure hétéromère d'un lichen foliacé (<i>Sticta</i>) (d'après Zahlbruckner et Sachs - Flechten - 1926)
--	---

Certains thalles foliacés n'adhèrent au substrat que par une petite zone (crampon) souvent située au centre de la face inférieure, et la face supérieure présente une légère dépression (ombilic) ; ce sont les thalles foliacés ombiliqués. Ex : les *Umbilicaria*.

THALLES FRUTICULEUX : non appliqués sur le substrat auquel ils n'adhèrent que par une surface très réduite, ils sont ± buissonnants, dressés, pendants ou prostrés, ± ramifiés (parfois non ramifiés comme chez les *Thamnolia*). On peut souvent discerner un tronc principal et des rameaux (primaires et secondaires) ainsi qu'une structure hétéromère à symétrie ± radiale avec un cortex périphérique, une couche algale autour de la médulle centrale.

Chez certains lichens fruticuleux (*Evernia*, *Ramalina* par exemple) les ramifications sont ± aplaties, parfois cannelées ou canaliculées ; chez les usnées, la partie centrale de la médulle est occupée par un cordon axial ; certaines espèces (*Pseudevernia furfuracea* par ex.) présentent une organisation dorsi-ventrale comme chez les lichens foliacés (Planche 1 - photo 5).

THALLES COMPOSITES : comportant plusieurs composantes distinctes :

++ au niveau du substrat, un thalle ± foliacé-squamuleux (thalle primaire),

++ un thalle dressé, ± ramifié (thalle secondaire), qui se développe secondairement à partir du thalle primaire, le thalle secondaire produisant les structures sporogènes. Ex. : le thalle composite des *Cladonia*, des *Stereocaulon* (Planche 1 - photos 6 et 8).

THALLES GÉLATINEUX : ayant la consistance et l'apparence de la gélatine, ce qui est le cas, à l'état humide, des thalles homéomères à cyanobactéries, uniformément réparties dans toute l'épaisseur du thalle (pas de stratification dorsi-ventrale). À l'état sec, ces thalles sont noirâtres, rigides, cassants et friables. Ex. : les thalles d'*Ephebe*, *Collema*, *Leptogium*, *Lichina*... Pour les enlever sans dommage de leur substrat, il est nécessaire de les réhydrater. Cette consistance gélatineuse est due à l'existence d'une gaine mucilagineuse (Planche 1 - photo 7).

2. Modalités d'agencement des hyphes dans les plectenchymes

Chez les champignons, les assemblages d'hyphes font penser aux tissus trouvés chez les végétaux ; toutefois, dans les tissus des végétaux, la croissance est due au fonctionnement d'une assise génératrice, ce qui n'est pas le cas chez les champignons où toutes les hyphes ont une croissance apicale. Les assemblages d'hyphes sont des "faux tissus" appelés plectenchymes.

En fonction des modalités d'agencement des hyphes, on distingue 2 grands types de plectenchyme.

++ Le **prosoplectenchyme** dans lequel les cellules sont ± allongées, avec une orientation décelable, les hyphes étant ± parallèles entre elles. Les cellules ± parallèles peuvent être serrées (dans un cortex) ou lâches (dans une médulle).

Les hyphes du prosoplectenchyme sont dites anticlinales lorsqu'elles sont disposées ± perpendiculairement par rapport à la surface, périclinales lorsqu'elles sont ± parallèles à la surface.

++ Le **paraplectenchyme** dans lequel les cellules sont ± isodiamétriques, sans orientation particulière (le paraplectenchyme est parfois appelé pseudoparenchyme, étant donné sa similitude d'aspect avec un parenchyme végétal).

Le paraplectenchyme peut présenter plusieurs textures différentes parmi lesquelles on peut citer :

++ textura prismatica : les hyphes à orientation anticlinale (perpendiculaires à la surface) sont assez serrées les unes contre les autres (espaces intercellulaires très réduits), ± légèrement entremêlées et à structure leptodermateuse (parois minces et lumen important),

++ textura porrecta : les hyphes à orientation anticlinale, sont ± légèrement entremêlées, peu serrées les unes contre les autres (espaces intercellulaires importants),

++ textura oblita : les hyphes à orientation anticlinale sont assez serrées les unes contre les autres (espaces intercellulaires très réduits), ± légèrement entremêlées et à structure mésodermateuse (parois épaisses et lumen important),

++ textura intricata : les hyphes allongées n'ont pas d'orientation préférentielle, sont ± sinueuses et entremêlées en tous sens.

3. Organes non sporogènes portés par le thalle

a) Au niveau de la face supérieure

Poil : visible à la loupe, il correspond au prolongement libre d'une hyphe du cortex. Parfois nombreux et serrés, les poils constituent un tomentum.

Cil (Planche 2 – Photo 1) : formation filiforme, de teinte habituellement sombre, visible à l'œil nu, constituée par les prolongements de plusieurs hyphes accolées ; se trouve généralement sur les bords du thalle ; lorsque les cils sont bien visibles à l'œil nu, épais et rigides, on les nomme **spinules** (ex. chez *Cetraria islandica*).

Poils, **tomentum** et cils sont de nature fongique, ils protègent contre les radiations, limitent l'évapotranspiration, retiennent l'eau, la rosée, l'humidité ; dépourvus de photosymbiote, ils n'ont aucune fonction assimilatrice.

Fibrille : courte ramification filamenteuse, concolore au thalle, contenant des hyphes et des algues et augmentant de façon significative la surface photosynthétisante (Planche 2 – Photo 3).

Papille : petite protubérance, uniquement constituée de cortex, visible à la loupe, plus haute que large, située entre les fibrilles sur le thalle des usnées.

Planche 2 : quelques observations thallines

Photos J.P. Gavériaux



▲ Lobes cucullés et cils de *Physcia adscendens*



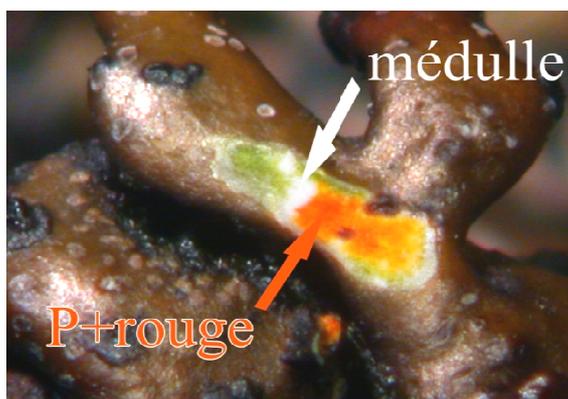
▲ Lobes couverts de pruine de *Physconia distorta*



▲ Rebord thallin avec fibrilles d'*Usnea florida*



▲ Veines de *Peltigera praetextata*

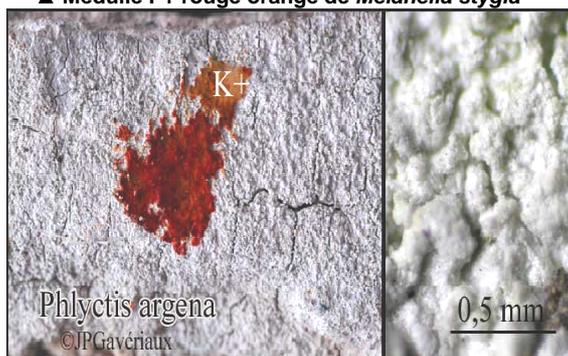


▲ Médulle P+ rouge orangé de *Melanelia stygia*



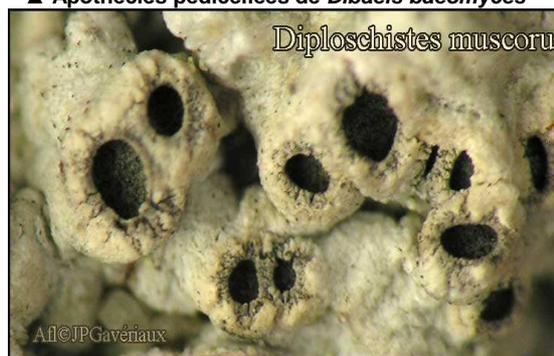
Dibaeis baeomyces
Afl©JPGavériaux

▲ Apothécies pédicellées de *Dibaeis baeomyces*



Phlyctis argena
©JPGavériaux

▲ Thalle K+ rouge de *Phlyctis argena*



Diploschistes muscorum

Afl©JPGavériaux

▲ Apothécies cryptolécatorines de *Diploschistes*

Chez les usnées, on peut observer des **nodules**, petites saillies situées sur le thalle entre les fibrilles, visibles à l'œil nu, ± tronconiques (leur hauteur est plus petite que le \varnothing de la base), constituées d'hyphes médullaires et souvent génératrices de soralies ; elles ne doivent pas être confondues avec les papilles uniquement visibles à la loupe, dont la hauteur est plus grande que le \varnothing de la base, et présentant une structure corticale ; ni avec les **tubercules** dont l'épaisseur dépasse le millimètre.

Pores respiratoires : petites verrues munies d'un pore sommital permettant le passage des divers gaz.

Pseudocyphelles : ouvertures des cortex supérieur et inférieur laissant apparaître la médulle. Rôle important dans les échanges gazeux avec l'atmosphère (les **cyphelles** sont des dépressions, à contour arrondi, du cortex inférieur, rencontrées uniquement dans le genre *Sticta*).

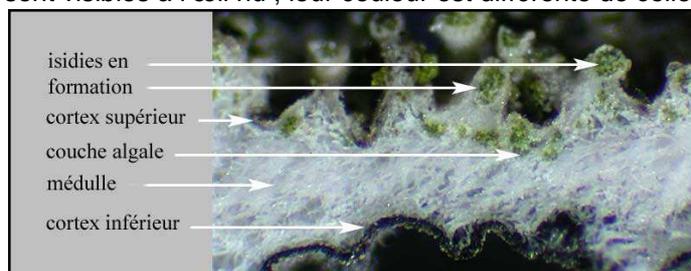
b) Au niveau de la face inférieure

Rhizines : organes de fixation des thalles foliacés, simples ou ramifiées, groupées ou dispersées, parfois colorées, formées d'un faisceau d'hyphes ± soudées et recouvertes d'une gaine gélatineuse facilitant l'adhésion au substrat. Certaines rhizines, en particulier les rhizines périphériques, ne jouent aucun rôle dans la fixation des thalles ; elles sont dans ce cas souvent appelées **rhizomorphes**.

Veines : réseau plus ou moins saillant, situé à la face inférieure du thalle des *Peltigera* et *Solorina* ; leur répartition, la couleur, la forme, les rhizines ou tomentum qu'elles portent, interviennent souvent pour différencier les espèces (Planche 2 – Photo 4).

c) Les céphalodies

Certains lichens à algues vertes (*Lobaria*, *Nephroma*, *Peltigera*, *Solorina*, *Stereocaulon*, etc.) contiennent également des cyanobactéries. Celles-ci, réunies par des hyphes, donnent des petites formations bien délimitées, en forme de galles à l'intérieur du thalle, d'excroissances ou de verrues à sa surface. Les céphalodies internes ne sont décelables qu'au microscope mais les céphalodies externes sont visibles à l'œil nu ; leur couleur est différente de celle du thalle.



d) Les isidies et les soralies

(voir les photos de la planche 3)

Les isidies sont des petites excroissances cortiquées, de quelques dixièmes de millimètre, élaborées par le thalle lichénique. Elles contiennent des cellules du photosymbiote principal, des cellules du

mycosymbiote, et sont entourées d'une couche serrée d'hyphes, prolongement du cortex supérieur, ce qui explique qu'elles sont généralement concolores au thalle. Elles jouent 2 rôles essentiels :

1. **permettre la reproduction végétative** du thalle, l'isidie contenant les 2 partenaires de la symbiose lichénique et ayant tendance à se détacher à l'état sec ;
2. **augmenter** de façon significative la **surface photosynthétisante** du thalle en développant les échanges gazeux et aqueux.

→ Leur forme (sphériques, cylindriques, clavées, coralloïdes, ramifiées...), leur localisation (faciales, marginales...) et leur modalité de groupement, sont des caractères souvent pris en compte pour la détermination des espèces.

Les soralies sont des groupements de sorédies (granulations non cortiquées, de très petite taille, formées d'un enchevêtrement d'algues et d'hyphes) engendrées au niveau d'ouvertures du thalle. Ces sorédies permettent une dispersion aisée du complexe lichénique, assurant ainsi une multiplication végétative efficace de l'espèce en disséminant simultanément les deux partenaires de la symbiose.

→ L'étude des soralies (nécessitant parfois le plus fort grossissement de la bino) est souvent très importante pour la détermination des espèces. Il faut noter leur couleur et étudier :

++ leur localisation, faciales (ou superficielles) quand elles sont à la face supérieure du thalle, terminales ou marginales en fonction de leur position à l'extrémité ou sur les bords des lobes des lichens foliacés ;

++ leur forme, maculiformes, globuleuses, hémisphériques, plates, capitiformes, rimiformes (en forme de fente), labriformes, linguiformes, forniciformes (cachées dans l'extrémité du lobe qui se recourbe comme c'est le cas chez *Physcia adscendens*), etc.

Lorsqu'un thalle présente des soralies (ensemble de sorédies) il est qualifié de **sorédié**.



Ramalina farinacea

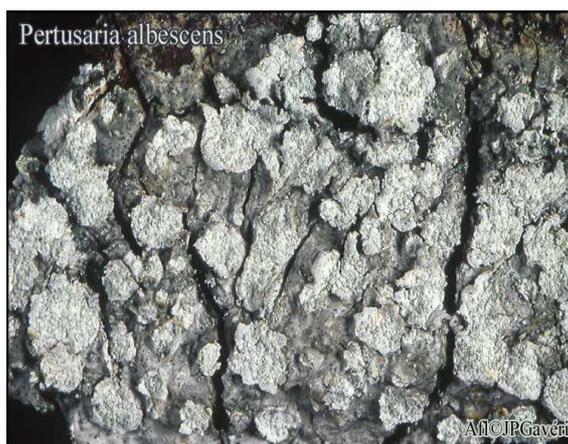
▲ Situées sur les bords des lanières et pratiquement invisibles à l'œil nu (photo 1 à gauche), leur observation nécessite l'utilisation d'une petite loupe x10 (photo du centre) ou d'une loupe binoculaire x40 (photo 3).

Les Soralies isidifères sont des soralies sur lesquelles prennent naissance des isidies ; ces isidies, d'origine sorédiales, se forment par coalescence de sorédies, autour desquelles se développe un cortex. Les soralies isidifères se rencontrent dans le genre *Usnea* (bino x60).

Les Isidies soralifères sont des isidies à l'extrémité desquelles prennent naissance de petites soralies ; ces soralies d'origine isidiale se rencontrent chez certains *Pertusaria* (bino x60).

4. La nature du photosymbiote

La détermination précise du photosymbiote n'est jamais indispensable, mais il est parfois utile de savoir s'il s'agit d'une **algue verte**, *Trebouxiophyceae* (le genre *Trebouxia* incapable de vivre librement étant le plus commun parmi les *Lecanorales*) ou *Chlorophyceae* (avec le genre *Trentepohlia* à cellules riches en carotènes) ou d'une **cyanobactérie** (le genre *Nostoc* étant le plus commun). Un simple examen microscopique suffit et sur le terrain la trace rouge laissée par l'ongle qui frotte un thalle crustacé fait déjà penser à une algue du genre *Trentepohlia*.

▲ Soralies plates de *Pertusaria albescens*▲ Soralies globuleuses de *Pertusaria amara*▲ Soralies faciales de *Punctelia subrudecta*▲ Soralies marginales de *Pseudocyphellaria aurata*▲ *Xanthoparmelia conspersa* 1. à l'œil nu – 2. loupe binoculaire x10 - 3. loupe binoculaire x60▲ Face supérieure isidiée de *Pseudevernia furfuracea* – 1. loupe x10 – 2. loupe x 60

5. Les réactions colorées [K, C, KC, P, N, I] (planche 2 - photos 5 et 7)

++ L'association algue-champignon permet la synthèse de métabolites secondaires (acides lichéniques et pigments) qui donnent souvent des réactions colorées en présence de certains réactifs macrochimiques spécifiques. Ces réactions, connues depuis les travaux du finlandais Nylander (1822-1899) apportent des informations très utiles pour la détermination.

++ Ces produits (voir la liste à la première page de cet article) sont dans de petits flacons munis d'une fine languette facilitant leur application sur la partie du thalle à tester ; si cette partie change de couleur, la réaction est positive ; par exemple la médulle devient rouge en présence de potasse, elle est dite K+ rouge, bleue en présence d'iode elle est I+ bleue ; dans le cas inverse, réaction négative, elle est dite K- ou I-. Ces réactions colorées sont utiles aussi bien en laboratoire que sur le terrain.

++ Les tests sont souvent réalisés sur le cortex, la médulle (qu'il faut mettre à nu en faisant une petite section oblique dans le thalle), parfois sur les soralies ou le rebord de l'apothécie ; l'utilisation de la loupe binoculaire facilite beaucoup l'observation de la réaction colorée ; certaines colorations ne se développent qu'au bout de quelques dizaines de secondes ; d'autres sont très fugaces et la coloration disparaît en moins d'une seconde.

++ Lorsque le thalle est de couleur sombre, on ne voit pas toujours très bien la réaction colorée ; il est conseillé dans ce cas, de poser le fragment de thalle sur un petit morceau de papier-filtre blanc préalablement imprégné de réactif.

III. L'ÉTUDE DES ASCOMES [APOTHÉCIES ET PÉRITHÈCES]

L'étude des apothécies et des périthèces est rarement nécessaire pour la détermination des lichens foliacés et fruticuleux différenciables par les caractères morphologiques de leur thalle ; elle est par contre indispensable pour l'étude des « crustacés ».

1. L'apothécie (photos 6 et 8 planche 2 et photos 1 et 2 planche 4)

C'est la structure de reproduction sexuée élaborée par le mycosymbiote des discolichens, en forme de coupe, de couleur variable, de quelques dixièmes de millimètres à quelques centimètres de Ø, sessile à stipitée, parfois enfoncée dans le thalle et constituée par :

++ l'**hyménium** formé par l'ensemble des asques (ou **thécium**), accompagné de filaments stériles, les paraphyses ;

++ l'**épithécium** correspondant aux parties supérieures renflées des paraphyses dépassant le sommet des asques ; il est généralement coloré, les pigments étant localisés au sommet des paraphyses ;

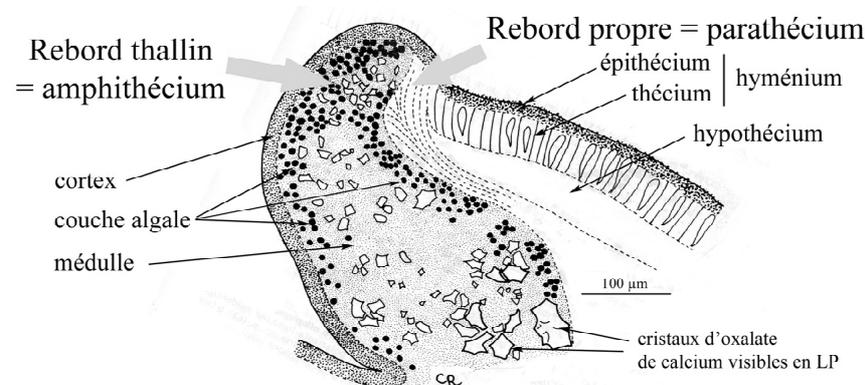
++ l'**hypothécium** correspond à la couche d'hyphes située sous l'hyménium ; il donne parfois naissance à un stipe qui porte l'apothécie au-dessus de la surface du thalle ;

Remarque : La couche d'hyphes située juste sous l'hyménium et donnant naissance aux asques (hyphes ascogènes) est parfois appelée sushyménium.

++ le **rebord** (ou **excipulum**) entourant latéralement les 3 structures précédentes et qui peut contenir des cellules du photosymbiote.

+ 1^{er} cas : il ne contient pas d'algues (ni de cyanobactéries) ; il a alors la même couleur que le disque de l'apothécie ; il prend le nom de parathécium (autour du thécium) ou **rebord propre**.

+ 2^e cas : il contient des algues (ou des cyanobactéries), et a la même couleur que le thalle ; il prend le nom de **rebord thallin** ou amphithécium ou excipulum externe.



◀ **Bord de l'apothécie lécanorine de *Lecanora chlorotera*** (d'après Claude Roux - Likenoj - figure 276b p. 413)

La particularité anatomique du rebord permet de distinguer plusieurs types d'apothécies :

+ apothécies **lécidéines** ayant un seul rebord, le rebord propre (= parathécium = excipulum interne) concolore au disque ;

+ apothécies **lécanorines** munies d'un rebord thallin (= amphithécium = excipulum externe) concolore au thalle (à l'intérieur duquel on peut parfois ± nettement distinguer un rebord propre) ;

+ apothécies **zéorines** à double rebord : rebord propre doublé vers l'extérieur d'un rebord thallin ;

+ apothécies **pseudolécánorines** ayant un aspect lécidéin, mais dont le rebord contient quelques cellules algales.

Remarques : certaines apothécies qualifiées de **cryptolécánorines** (ex. chez les *Aspicilia*, certains *Diploschistes* – voir photo 8 planche 2) sont ± enfoncées dans une verrue ou une aréole du thalle ; leur rebord thallin est peu ou pas visible. Chez les Graphidales et les Opégraphales, les disques apothéciaux sont longuement étirés ; ils ressemblent à des petites fentes ± sinueuses simulant une « écriture chinoise » ou un hiéroglyphique ; ces apothécies dont l'excipulum est souvent carbonacé sont appelées **lirelles**.

Plusieurs caractéristiques apothéciales doivent être observées

La taille des apothécies, leur répartition, la présence d'un pied (apothécie stipitée comme chez les Caliciales), la couleur du disque, l'aspect de sa surface, sa forme générale (plat, convexe, concave, umboné...), la présence de pruine, de plis enroulés d'une façon ± compliquée (chez certaines espèces du genre *Umbilicaria*), le type d'apothécie (lécánorine, lécidéine, zéorine...) avec toujours de nombreux cas particuliers, intermédiaires entre les types présentés, et il n'est pas toujours facile de trancher [d'où l'intérêt de travailler en groupes].

Le microscope est souvent utile pour rechercher la hauteur de l'épithécium, de l'hyménium, parfois de l'hypothécium, la présence d'inclusions lipidiques, de cristaux (en lumière polarisée) ; dans quelques cas les réactions colorées avec K, C, N, I et P sont demandées.

La confection des coupes minces se fait à la main, avec une lame de rasoir, sous la loupe binoculaire. Actuellement, l'éclairage par LED permet de travailler confortablement sans risque de se brûler.

2. Le périthèce

C'est la structure de reproduction sexuée élaborée par le mycosymbiote des pyrénolichens, en forme de poire ± enfoncée dans le thalle, la partie renflée contenant l'hyménium, la partie supérieure présentant un orifice, l'ostiole, visible à la loupe (x10), qui s'ouvre à maturité pour libérer les spores.

Le périthèce comprend :

++ une enveloppe externe dure, protectrice, le **pyrénium** ou excipulum, en général de couleur sombre (sauf à la base où il est parfois incolore) ;

++ à la partie supérieure du pyrénium, on trouve dans certains cas une sorte de couvercle, plus dur et plus sombre, l'**involucrellum** ;

++ à l'intérieur du pyrénium, la cavité est tapissée par l'**hyménium** qui contient les **asques** et les **paraphyses** ; les pseudoparaphyses et paraphysoides ne se rencontrent que chez quelques espèces (contrairement aux pyrénomycètes non lichénisés), mais il est fréquent de trouver des **périphyses** au niveau du canal ostiolaire ;

++ l'hypothécium (**subhyménium**), qui contient les hyphes ascogènes, est parfois décelable entre l'hyménium et le pyrénium.

Il est plus difficile de faire des coupes de périthèces que des coupes d'apothécies, surtout chez les saxicoles ; la lame de rasoir ne pourra pas servir plusieurs fois et il est recommandé de couper la lame neuve en plusieurs morceaux (les lames se coupent facilement avec de gros ciseaux). Il faudra principalement noter les caractéristiques du pyrénium et distinguer 4 cas principaux :

- + pyrénium entier lorsqu'il est entièrement noir ou de couleur sombre ;
- + pyrénium dimidié lorsqu'il est coloré au sommet et présente une partie basale incolore ;
- + pyrénium entièrement ou presque entièrement incolore (cas chez les *Dermatocarpon*) ;
- + pyrénium surmonté d'un involucrellum.

Pour les lichens endolithiques calcicoles, il est conseillé de détruire le calcaire avec de l'acide chlorhydrique dilué (ou du vinaigre).

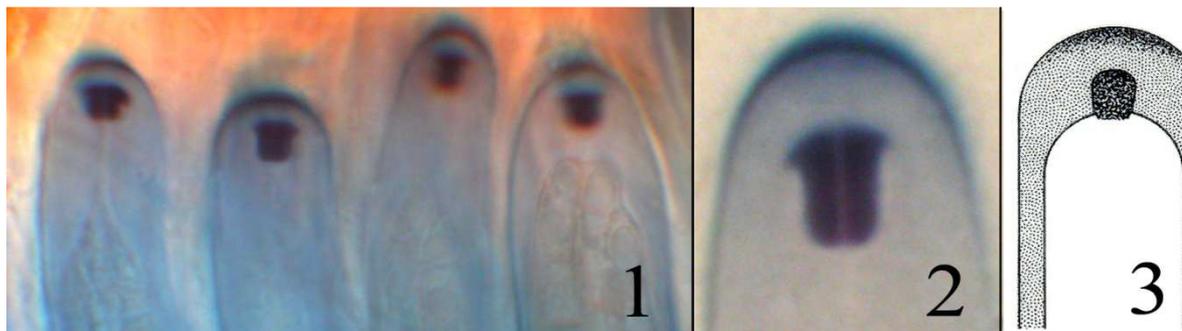
Remarque : bien que n'étant pas un organe constitutif du thalle, un critère de détermination doit être ajouté, il s'agit de la **pruine** (à ne pas confondre avec le tomentum). Elle forme une fine pellicule, ayant un aspect poudré, constituée de minuscules cristaux blanchâtres d'oxalate ; cette pruine disparaît au moindre frottement. On la rencontre sur certains thalles [p. ex. les lobes des *Physconia* (photo 2 planche 2), certaines apothécies (photo 1 planche 4)].

IV. ASQUES, THOLUS, SPORES ET CONIDIES (Planche 4 - photos 3 à 11)

1. Les asques : ce sont les cellules hyméniales dans lesquelles se forment les spores permettant la reproduction sexuée du champignon. Leur étude n'est pas toujours indispensable pour la détermination des espèces, mais dans certains cas il faut noter :

- + leur forme, généralement en massue, plus rarement cylindrique (ex. chez les Caliciales), piriforme (ex. chez les *Arthonia*) ou lagéniforme (ex. chez les *Theleocarpaceae*) ;
- + leur taille, le plus souvent entre 40 et 100 μm mais pouvant dépasser 300 μm chez les Pertusariales ;
- + leur enveloppe, qui peut présenter sous le microscope optique une (asque unituniqué) ou deux parois (asque bituniqué).

2. Le tholus : chez les fissituniqués et semi-fissituniqués, autrefois regroupés sous le terme de bituniqués, le sommet de l'asque présente un ensemble de structures qui accompagneront ultérieurement l'expulsion des spores. Certaines parties de ces structures, en particulier la partie fortement épaissie de l'endoascus (paroi interne de l'asque) prennent une coloration bleu-nuit en présence d'iode (parfois rouge en présence de rouge Congo) ; cette partie épaissie, appelée tholus, montre très souvent une structure spécifique qui permet, surtout aux débutants, de distinguer des genres macroscopiquement très proches (ex. les *Porpidia* et les *Lecidea*).



1. Tholus de *Peltigera rufescens* dans le lugol (K/I) ; 2. après dilution à l'eau pour deviner le canal axial ;
3. ex. de schéma de tholus (Galloway - une certaine de tholus sont représentés dans *New Zealand Lichens*).

La structure du tholus n'est visible qu'au microscope après traitement par K/I. Il faut laisser séjourner la coupe très fine d'apothécies dans KOH à 3 % pendant quelques dizaines de secondes (ou plus si la dissociation n'est pas suffisante : plusieurs essais sont parfois nécessaires) ; rincer la coupe à l'eau ; faire le montage dans du lugol (qu'on doit parfois diluer à l'eau si la coloration est trop intense).

Planche 4 : apothécies et observations microscopiques

Photos J.P. Gavériaux



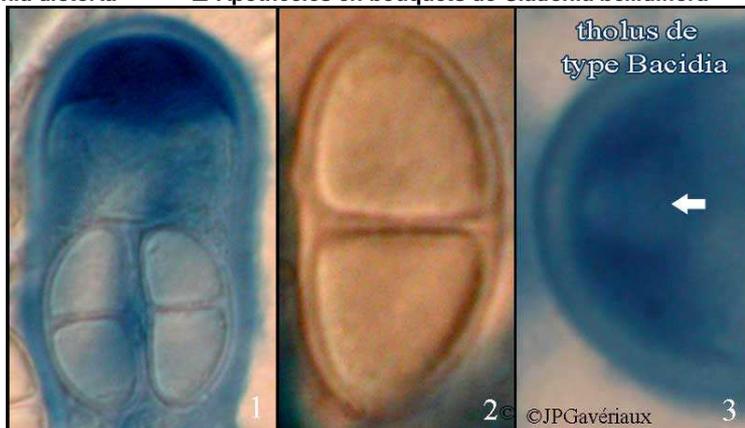
▲ Coupe d'apothécie lécanorine de *Physconia distorta*



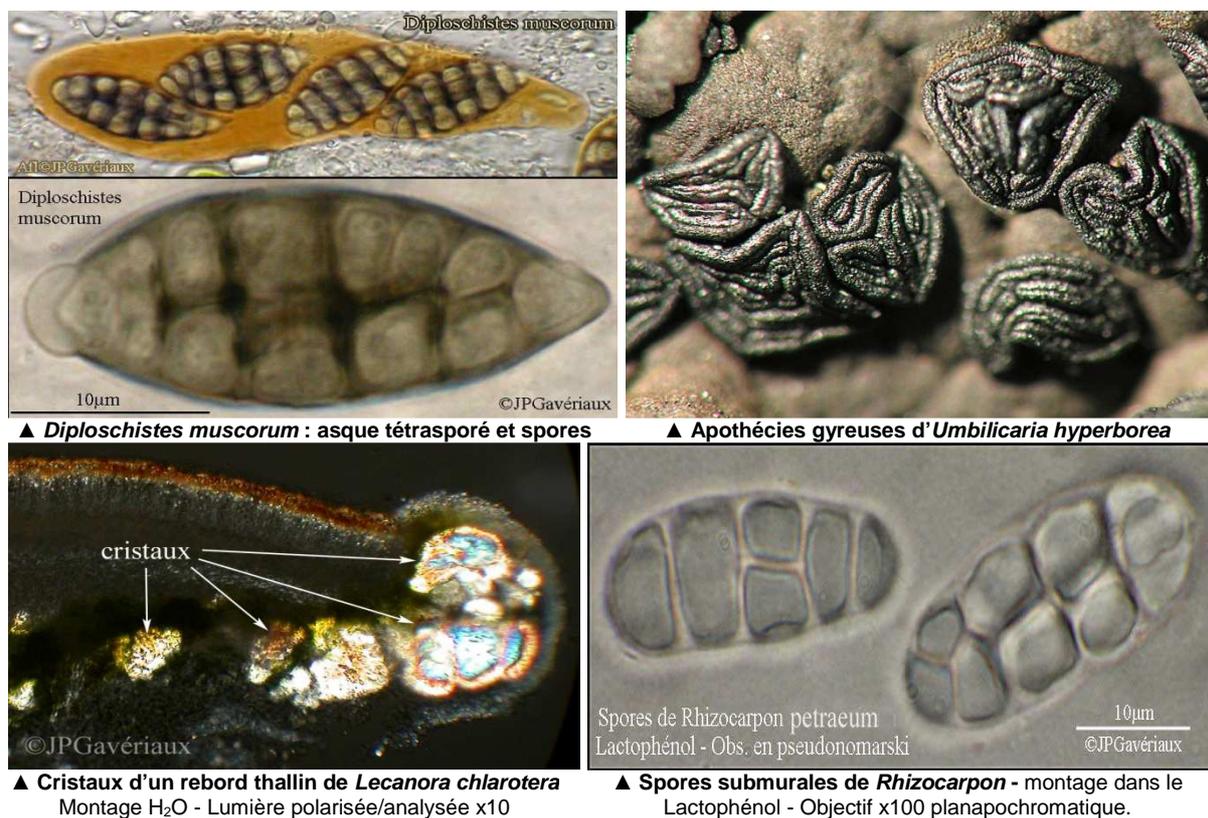
▲ Apothécies en bouquets de *Cladonia bellidiflora*



▲ Gaine mucilagineuse (halo) d'ascospore. Montage dans l'encre de Chine diluée.



Ramalina fastigiata : 1. Sommet de l'asque à maturité (K/I)
2. Didymospore (spore bicellulaire) 3. Tholus de type *Bacidia*.



▲ *Diploschistes muscorum* : asque tétrasporée et spores

▲ Apothécies gyreuses d'*Umbilicaria hyperborea*

▲ Cristaux d'un rebord thallin de *Lecanora chlorotera*
Montage H₂O - Lumière polarisée/analysée x10

▲ Spores submurales de *Rhizocarpon* - montage dans le Lactophénol - Objectif x100 planapochromatique.

3. Les paraphyses : cellules stériles situées entre les asques, elles sont toujours pluriseptées et nécessitent souvent une coloration ; le bleu coton lactophénolé convient parfaitement, pour révéler leurs cloisons, leurs ramifications et leurs anastomoses.

D'après Claude Roux, on distingue plusieurs type de paraphyses :

- + sans ramifications, sans anastomoses (*Lecanora*, *Lecidella*...) ;
- + avec peu de ramifications (quelques-unes vers le sommet) et peu d'anastomoses (*Caloplaca*) ;
- + avec peu de ramifications et de nombreuses anastomoses (*Farnoldia*) ;
- + avec de nombreuses ramifications et peu d'anastomoses (*Trapelia*) ;
- + avec de nombreuses ramifications et de nombreuses anastomoses (*Opegrapha*, *Rhizocarpon*).

Lorsque l'on écrase la coupe dans l'eau, deux cas se présentent :

- + les paraphyses sont cohérentes : elles adhèrent les unes aux autres par leurs anastomoses ou par une substance ± gluante (*Tephromela*) ;
- + les paraphyses ne sont pas cohérentes : elles se séparent facilement.

Dans quelques cas, la forme des cellules peut intervenir ; la dernière cellule peut être renflée (paraphyse capitée) ou toutes les cellules renflées dans leur milieu sont séparées par des étranglements : elles ressemblent à un chapelet (paraphyses moniliformes de *Caloplaca lactea*).

4. Les spores : l'observation des ascospores est très certainement l'aspect le plus important de l'étude microscopique. Le montage dans l'eau permet d'apprécier la couleur, de faire les mesures ; mais le plus souvent pour voir le détail des structures, il faut faire un montage dans KOH à 3-5 % ou utiliser des colorants.

++ La **couleur** : à maturité les spores peuvent être hyalines (= incolores), jaunâtres, verdâtres, rougeâtres, ± brunâtres et même noirâtres. Toutefois, les pigments ne sont formés que pendant la phase de maturation et il faut bien prendre la précaution d'observer des spores mûres, si possible sorties des asques.

++ Le **nombre par asque** est en principe de 8 mais il peut être plus petit (1 à 4) ou être de plusieurs centaines (ex. chez les *Acarospora*).

++ La **taille** : la longueur est souvent comprise entre 8 et 15 µm, mais certaines spores peuvent atteindre des tailles impressionnantes ; p. ex. les spores de *Pertusaria* qui atteignent facilement 200 ou 300 µm (les asques dans ce cas ne possèdent qu'une ou deux spores) ; chez certaines espèces à asques contenant un très grand nombre de spores, celles-ci ne dépassent pas 3-4 µm de longueur.

++ La **forme** est très variable : souvent elliptique, subglobuleuse, cylindrique, fusiforme, réniforme... Les spores bacilliformes peuvent être droites, arquées, sinueuses...

++ La septation : toutes les spores ne sont pas simples (= unicellulaires = non cloisonnées = amétopores). Dans de nombreux genres elles sont cloisonnées et on peut distinguer :

► Les spores **unicloisonnées** (= didymospores = spores bicellulaires) présentent dans la majorité des genres une cloison mince ; il y a toutefois 2 genres qui font exception.

➔ Chez les *Caloplaca*, pendant la sporogénèse, un épaississement se forme à l'équateur de la cellule, puis un petit canal se creuse au centre de cet épaississement ; finalement une cloison (très fine, qui est longtemps passée inaperçue) se forme au centre du canal ; on a donc une spore bicellulaire, mais les 2 cellules apicales ne sont pas séparées par l'épaississement, mais par la cloison du canal.

➔ Chez les *Physcia*, *Physconia*, *Rinodina*, la cloison est épaisse, et chez certains *Rinodina*, on a en plus un tore (anneau noir ± développé entourant l'équateur de la spore).

► Les spores **pluricloisonnées** (= phragmospores) présentent des cloisons transversales, et dans certains cas, en supplément, des cloisons longitudinales (spores dites murales ou submurales lorsqu'il n'y a qu'une ou deux cloisons longitudinales).

++ La guttulation, étude de la taille et de la répartition des gouttelettes d'huile (réserve lipidique) trouvées dans le cytoplasme de spores vivantes (également dans celui des paraphyses, algues...) ; elle peut être étudiée sur des spores mûres à l'aide d'un colorant vital comme le bleu de crétyl brillant (BCB) en solution aqueuse à très faible concentration, entre 0,1 à 1 %.

Lorsqu'il y a 2 grosses guttules, on peut penser à une cloison équatoriale; le montage dans KOH (5-10%) élimine les gouttelettes d'huile et permet de lever le doute.

Selon H.O. Baral (Vital taxonomy - 2001), ce caractère « guttulation » pourrait apporter de nombreuses informations et être utilisé comme critère de détermination en lichénologie, mais les observations sur matériel vivant sont très difficiles à réaliser et nécessitent l'emploi de matériel optique de très grande qualité.

++ L'ornementation, produite généralement par l'exospore, est souvent très importante chez les champignons non lichénisés ; elle est par contre très peu utilisée pour les spores du mycosymbiote qui, dans la plupart des cas, présente des spores lisses, pratiquement jamais verruqueuses ou ornementées (sauf exception, p. ex. la spore de *Pertusaria heterochroa* ornée d'un réseau de veines saillantes).

- Le **halo** : certaines spores sont expulsées de l'asque, accompagnées d'un peu de cytoplasme, qui forme autour de la spore une enveloppe ± gélatineuse, la périspore ; cette gangue muqueuse (ou halo) peut être mise en évidence avec de l'encre de Chine. Les fines particules noires ne pénètrent pas dans la gaine mucilagineuse mais permettent de rendre visible son contour en microscopie optique, cette zone périphérique paraissant translucide sur un fond beaucoup plus sombre (Planche 4 – photo 3).

5. Les conidies et la gelée conidiale

Chez de nombreux lichens existent de très petites cavités, les conidiomes (ou pycnides), ± enfoncés dans le thalle, colorés ou non, munis d'un orifice (l'ostiole) décelable le plus souvent à la loupe binoculaire sur thalle préalablement humidifié. À l'intérieur, on trouve une gelée contenant de minuscules cellules, les conidies (ou pycnidiospores), produites au niveau de conidiophores qui tapissent l'intérieur du conidiome.

Ces conidies permettent la multiplication végétative du mycosymbiote et dans quelques cas, jouent le rôle de spermatie (permettant la dicaryotisation après rencontre avec un trichogyne).

La forme des conidies, leur mode de formation et la structure des conidiomes sont souvent utilisés pour caractériser les genres et les espèces lichéniques.

Dans certains cas, pour la détermination des espèces, il est important de noter :

+ la couleur de la gelée conidiale (ex. rosée à rougeâtre chez *Cladonia stygia*, incolore chez *Cladonia rangiferina*) ;

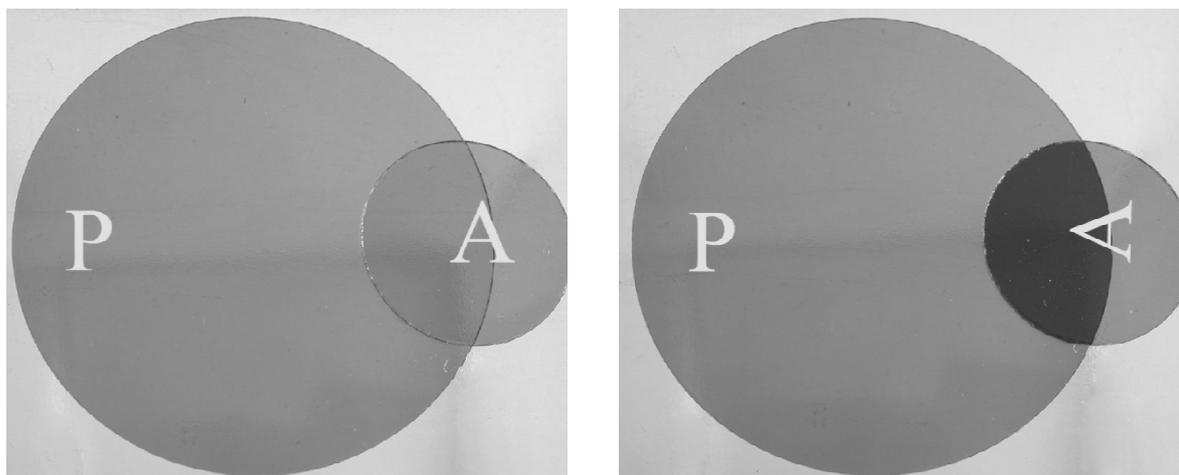
+ la taille des conidies ; p. ex. chez les *Aspicilia* du groupe *cinerea/epiglypta/intermutans*, c'est cette taille qui permet la distinction des 3 espèces.

Espèce	Spores	Pycnidiospores
<i>Aspicilia cinerea</i>	11-22 µm	11-16 x 1 µm
<i>Aspicilia epiglypta</i>	20-30 µm	15-28 x 1 µm
<i>Aspicilia intermutans</i>	20-30 µm	07-12 x 1 µm

V. L'EXAMEN EN LUMIÈRE POLARISÉE

Quelques espèces lichéniques (exemple : certains *Lecanora*) possèdent des cristaux dans la marge de l'apothécie, le sous-hyménium et parfois aussi au niveau de l'épilhyménium entre les extrémités des paraphyses. Difficiles à distinguer en lumière normale, ils deviennent facilement visibles en lumière polarisée, ce qui permet l'identification de l'espèce (Planche 4 - photo 10).

Plusieurs possibilités sont offertes pour la réalisation technique, mais le dispositif le plus simple et suffisant pour une observation de contrôle en lichénologie, consiste à placer un premier morceau de polaroïd sous la lame ou dans le porte-filtre du condenseur, et le deuxième est tenu à la main à la sortie de l'oculaire. Le jeu de 2 plaques de polaroïd est disponible auprès de l'AFL. Il suffit de tourner l'un des deux filtres pour obtenir l'extinction de la lumière (lorsque polariseur et analyseur sont croisés à 90°) et voir apparaître les cristaux brillants sur un fond noir.



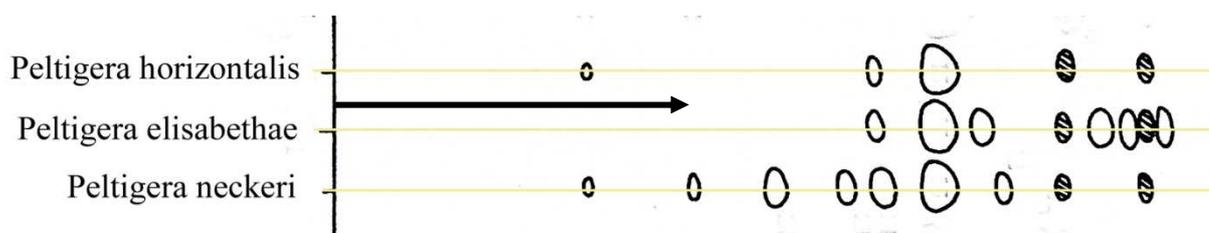
À gauche : P = le polariseur, est le morceau de polaroïd que l'on place sous la lame ;
 A = l'analyseur est un morceau de polaroïd plus petit que l'on place sur l'oculaire ;
 P et A sont orientés dans le même sens, la lumière polarisée par le 1^{er} filtre traverse le second.
 A droite : P et A sont croisés, le 2^{ème} filtre arrête la lumière, il y a extinction.

VI. LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE (CCM) EN PHASE VAPEUR

La chromatographie est une technique qui permet de mettre en évidence certains métabolites secondaires contenus dans les lichens en faisant passer un solvant par ascension. Plus les pigments et acides lichéniques sont solubles dans la phase mobile, plus ils sont déplacés. Cette technique permet, après observation aux UV ou révélation chimique, de mettre en évidence un certain nombre de constituants caractéristiques de certaines espèces qu'il est alors possible d'identifier avec précision. Dans certains groupes, p. ex. de *Cladonia*, *Peltigera*, *Lepraria*..., l'identification des espèces est impossible sans cette technique de chromatographie en couche mince (CCM) en phase vapeur.

L'extraction des substances lichéniques se fait à l'acétone ; les microgouttes d'acétone contenant les substances lichéniques sont déposées sur des plaques au gel de silice sur support en aluminium rigide. De chaque côté de la plaque, deux témoins sont déposés, l'acide norstictique (Rf 4) et l'atano-rine (Rf 7), obtenus à partir d'un mélange de 2 lichens : *Parmelia acetabulum* et *Physcia tenella* dont les Rf sont connus pour les éluants utilisés.

Ces éluants contiennent des produits toxiques que l'on doit manipuler sous une hotte, filtrée et reliée à l'extérieur (**toluène, dioxane, acide acétique, hexane, éther éthylique, acide formique**).



Le nombre et la position des taches dans le chromatogramme permettent d'identifier l'espèce lorsque l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques ne suffit pas ; le flèche schématise le sens de migration de l'éluant (d'après A. Orange - Microchemical methods for the identification of lichens).

Au terme de l'ascension, la plaque est retirée de la cuve à chromatographie, séchée sous la hotte pour éliminer les solvants précédents, plongée pendant 2 secondes dans une solution d'acide sulfurique à 10 % puis placée dans une étuve à 100-110°C. Au bout de dix à quinze minutes, les taches apparaissent.

Leur identification se fait à l'aide de la brochure de Orange, James et White, 2001, 101 p. éditée par la BLS « *Microchemical methods for the identification of lichens* » et le livre de Purvis & al. *The lichen flora of Great Britain and Ireland*.

VII. QUELQUES LIVRES ACTUELLEMENT DISPONIBLES POUR LA DÉTERMINATION DES LICHENS

CLAUZADE G. ET ROUX C., 1985 - *Likenoj de Okcidenta Europo : Ilustrita determinlibro*, Soc. Bot. du Centre-Ouest, Royan, (892 p. et 3 suppléments).

CLAUZADE G. & ROUX C., 1986 - *Likenoj de okcidenta Eùropo*. Supplément 2a, Soc. Bot. du Centre-Ouest, 18:177-214.

CLAUZADE G. & ROUX C., 1989 - *Likenoj de okcidenta Eùropo*. Supplément 3a, Soc. Linn. Provence, 40:73-110.

▷▷▷ Traduction - *Cette flore en espéranto comprend les clés de détermination de tous les genres présents en Europe ; de nombreux schémas macro- et microscopiques en font un ouvrage de référence pour la détermination précise des espèces (2300 taxons). La traduction de l'ensemble des textes, réalisée par Madame Paulette Ravel, la flore et les 3 suppléments est disponible auprès de l'AFL (un peu plus de 1100 p. au format A4).*

GAVÉRIAUX J.P., 2012-2014. - *Classification phylogénétique actuelle des lichens*, et plus de 1.000 photos-fiches Lichens de France, disponible sur le site Web de l'association française de lichénologie à l'adresse suivante : <http://www2.ac-lille.fr/myconord/afl.htm>

SÉRUSIAUX E., DIEDERICH P. & LAMBINON J., 2004 - *Les macrolichens de Belgique, du Luxembourg et du nord de la France* - Clés de détermination, le Muséum national d'histoire naturelle de Luxembourg (Ferrantia 40), 188 p.

SMITH C.W., APTROOT A., COPPINS B.J., FLECHTER A., GILBERT O.L., JAMES P.W. & WOLSELEY P.A., 2009. - *The lichens of Great Britain and Ireland*, Natural History Museum et la British Lichen Society, London, 1046 p.

VAN HALUWYN C., 2010. - *La sociologie des lichens corticoles en Europe*, bulletin 35-2 de l'Association française de lichénologie, 120 p.

VAN HALUWYN C., ASTA J. avec la collaboration de **GAVÉRIAUX P.P.**, Lichens de France : Livre 1, 2009. - *Lichens des arbres*, éditions Belin, 246 p.

VAN HALUWYN C., ASTA J., CLERC P. avec la collaboration de **GAVÉRIAUX P.P.**, Lichens de France : Livre 2, 2012. - *Lichens des sols*, éditions Belin, 224 p.

VOLKMAR W., 2013. - *Die Flechten Deutschlands*, Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart. Tome 1 : 572 pages. Tome 2 : 672 p.

VOLKMAR W. & KIRSCHBAUM U., 2013. - *Flechten, einfach bestimmen*, Quelle & Meyer Verlag, Wiebelsheim, 416 p.

BIBLIOGRAPHIE (limitée aux livres utilisés pour écrire ou illustrer cet article)

ABBAYES H. DES, 1951 - *Traité de Lichénologie*, Lechevalier, 217 p.

GALUN M. PH. D., 1988 - *Handbook of lichenology*, en 3 volumes, vol. 1 - 297 p. ; vol. 2 - 181 p. ; vol. 3 - 147 p.

GAVÉRIAUX J.-P., 2003 - *Principaux produits chimiques utilisés en lichénologie*, bull. AFL 2003-1, vol. 28, 16 p.

GAVÉRIAUX J.-P., 2003 / 2004 / 2005 - *Le microscope et son utilisation en lichénologie*, 1^{er} partie, bull. AFL 2003-2, vol. 28, 20 p. / 2^e partie 2004-1, vol. 29, 10 p. / 3^e partie, 2005-1, vol. 30, 10 p.

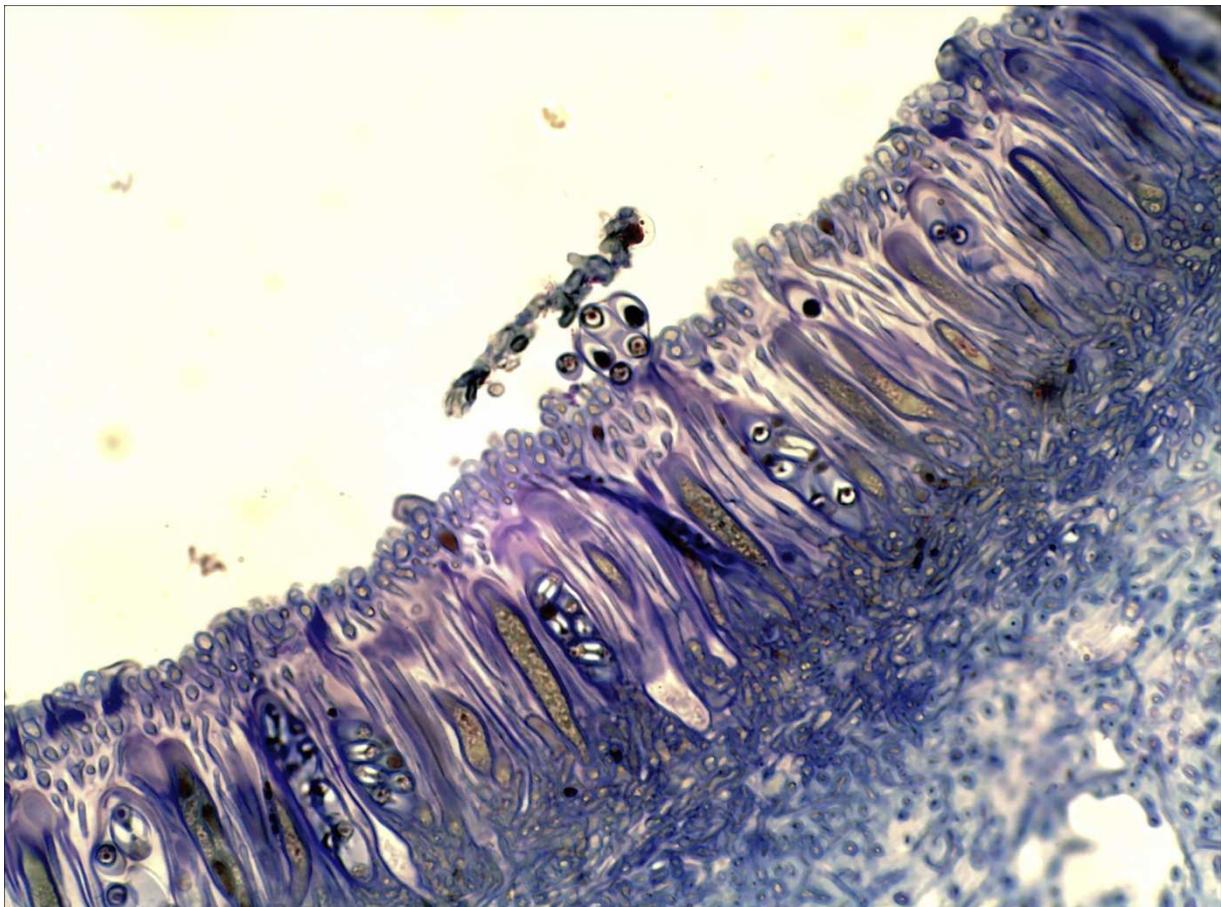
GAVÉRIAUX J.-P., 2008 - *Lexique des principaux termes de lichénologie*, Lettres A,B,C, bull. AFL 33-1, 28 p. / lettres D,E, bull. AFL 33-2, 20 p.

MALCOLM W.M. & GALLOWAY D.J., 1997 - *New Zealand Lichens, checklist, key and glossary*, museum of New Zealand, 192 p.

NASH III T. H., 2008 - *Lichen Biology*, second edition, Cambridge University Press, 486 p.

ORANGE A., JAMES P.W. & WHITE F.J., 2001 - *Microchemical methods for the identification of lichens*, British Lichen Society, 101 p.

OZENDA P., 1963 - *Handbuch der Pflanzenanatomie*, Lichens, traité d'anatomie végétale, 199 p., Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Addendum au texte précédent : un lichen courant dans le Nord

CLT dans une apothécie de *Xanthoria parietina* sur tronc de lilas, avec asques et ascospores en formation ; même technique que celle expliquée en pages 84 & 85 (auteur coupes et photos : Guy Auderset)



Thalle élevé en boîte de Pétri à l'ombre ▲ (pas de trace apparente de jaune).

Thalle qui a poussé pleine lumière ▲ (photo E. Charles).



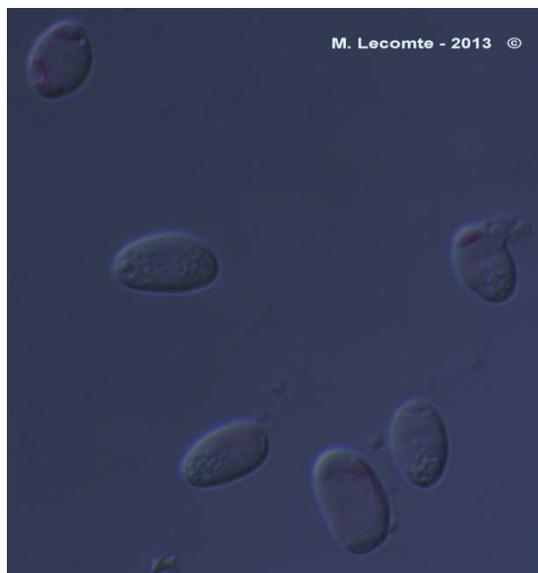
◀ Les apothécies figurées ici mesurent 1,5 mm de Ø ; la photo a été réalisée avec l'objectif Canon Macro MP-E 65 mm, f/2.8 1-5x, sans flash, avec éclairage par anneau led, sur pied, avec glissière de mise au point micrométrique.

Ce lichen est vraisemblablement le plus courant qui se rencontre sur les troncs d'arbres (surtout feuillus) de nos régions. La plupart du temps, les apothécies de l'ascomycète sont bien visibles grâce à leur teinte jaunâtre orangé qui tranche sur le vert chlorophyllien. Cette couleur est due à la présence d'un anthraquinone appelé « pariétine », qui explique le nom de l'espèce.

Même s'ils ne sont jamais de grande taille (8 à 10 cm de Ø), les thalles couvrent quasi complètement

les branches et le tronc de 2 vieux saules pleureurs de notre jardin. Un exemplaire a été prélevé sur la partie très ombrée d'une branche, puis placé en BP de verre, à 18°, à la lumière diffuse du jour, avec un arrosage conséquent, afin de conserver un niveau d'humidité élevé. Grande fut notre surprise de constater, après quelques jours, que l'intérieur du couvercle était constellé de taches blanches.

Pressentant la présence de spores, un petit prélèvement fut soumis à l'examen microscopique, ce qui confirma la chose. Nous pouvons donc affirmer, sans restriction, que les ascospores ont été projetées avec puissance hors des asques, pour venir se coller, 1 cm plus haut, sur le couvercle de la BP.



▲ Les ascospores observées dans un mélange congo + phloxine B en lumière transmise ; les mêmes en DIC ►

Les moisissures

EXERCICE 1 – PRÉALABLE



Placer une tranche de pain humidifiée dans un cristalliseur, et couvrir d'une plaque de verre pour éviter la dessiccation (cela peut se faire aussi avec une assiette et une cloche à fromage). Progressivement, le pain se recouvre d'un feutrage de filaments : c'est du mycélium (filaments constituant les champignons). Ils n'ont pas d'organisation particulière et ne sont pas cloisonnés : ce sont des moisissures⁴⁶. Il s'agit (entre autres) de la mucorale du pain, *Rhizopus nigricans*. Cette moisissure utilise facilement les sucres et l'amidon, ce qui explique son développement rapide sur le pain. C'est un saprophyte.

Vous pouvez répéter l'expérience avec des tas d'autres supports : fruits, cuir humide, haricots (gonflés dans l'eau durant 24h.), bois, liège, carton et plâtre enrobé humides ; les déjections animales vont s'avérer particulièrement intéressantes car outre les moisissures, vont s'y développer de nombreux ascomycètes coprophiles (*Ascobolus*, *Saccobolus*, *Pilobolus* p. ex.).

Sur le crottin de cheval va pousser une espèce très commune : *Mucor mucedo* ; sur le pain, les fruits, la confiture, on va rencontrer *Penicillium glaucum*.

Chez *Mucor mucedo*, on va parfois trouver dans les préparations des éléments appelés zygospores. ►

++ Prélever une petite touffe de moisissure, avec beaucoup de précaution.

++ 1^{ère} observation à sec, entre LPO & LCO. On distingue les sporanges : une « tige » ou sporangiophore et une « boule » ou sporocyste, dans lequel se trouvent les conidies.

++ Observer ensuite dans l'eau ; ce n'est pas le meilleur milieu à nos yeux, car les filaments sont difficilement mouillable et on rencontre de nombreuses bulles d'air.

++ Nous préférons l'acide lactique ou le lactoglycérol.



◀ *Mucor* sp., sur pomme de terre.

++ Si on ajoute une goutte d'eau glycinée ou salée à 7/1.000, on va voir les sporanges gonfler, se déchirer et libérer les conidies (on appelle cela la dissémination), ce qui prouve l'importance du facteur humidité.

RM : plus tard, ces spores vont germer et donner de nouveaux filaments de mycélium. Certains, de polarité différente, se rencontrent, fusionnent et forment, par reproduction sexuée, des **zygospores** qui produisent du mycélium et d'autres sporanges. C'est ce qui explique l'envahissement rapide du récipient par cette mucorale.

⁴⁶ D'autres, comme *Aspergillus* et *Penicillium*, possèdent un mycélium cloisonné.

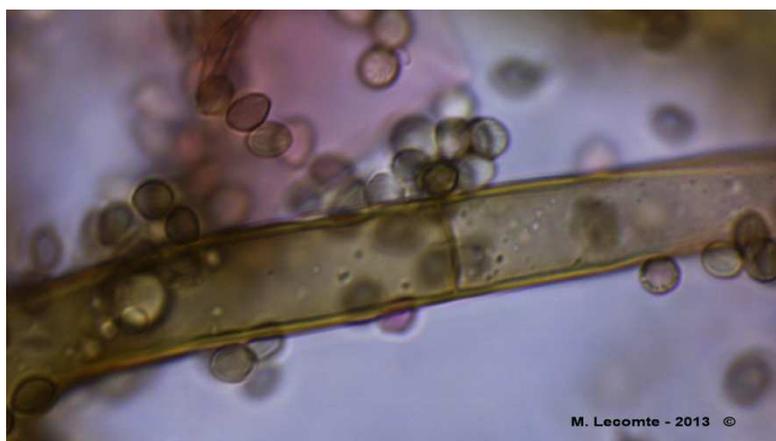


Aspergillus sp. sur morceau de pain ▲

MODE OPÉRATOIRE - Observation extemporanée : MO 01

- ++ Prélever un petit échantillon, et poser sur une LPO.
- ++ Sur une autre LPO, poser une goutte de bleu de méthylène et 5 gouttes d'eau et bien mélanger.
- ++ Déposer une goutte de ce mélange sur le spécimen.
- ++ Poser une LCO, sans appuyer.
- ++ Observer à différents grossissements.

Au microscope, l'extrémité d'un filament apparaît constitué de ramifications en pinneau. Inconvénient MAJEUR de cette technique : il est quasi impossible de transférer les conidiophores complets et on n'observe que des fragments noyés sous une multitude de conidies.



- ++ Poser la LCO.

++ Observer avec un 40x au maximum, car ce type de préparation s'avère relativement épaisse. Il est toujours possible d'éliminer les inévitables bulles d'air par la chaleur, avec refroidissement rapide, mais cela va briser les chaînes de conidies : n'utiliser donc qu'en cas de force majeure. Avantage essentiel de ce MO : les conidiophores restent complets ; ils sont indispensables à la détermination.

Montage définitif : MO 01

- ++ Prélever des fragments de moisissure à l'aide d'une aiguille lancéolée; les déposer sur une LPO.
- ++ Recouvrir de 2 gouttes d'alcool à 95° ; laisser évaporer : les moisissures adhéreront au verre.
- ++ Déposer 2 gouttes de bleu coton lactique dilué 2 à 3x.
- ++ Éponger l'excédent du produit avec du papier absorbant.
- ++ Monter directement dans la gélatine glycinée fondante, et luter après ½ heure.

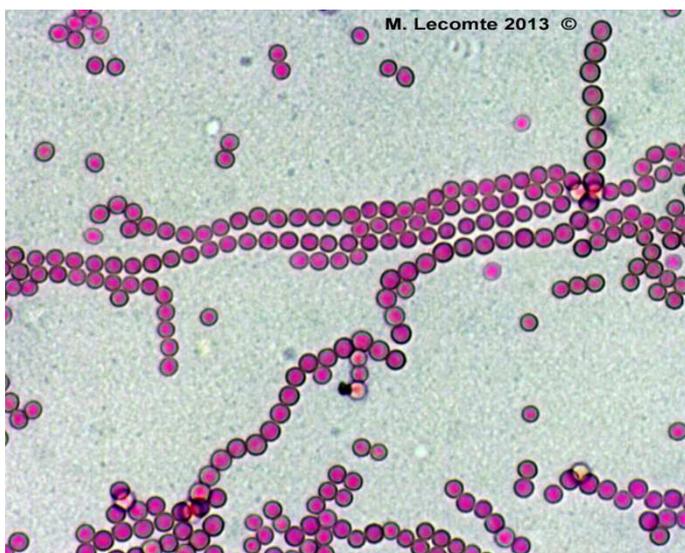
EXERCICE 2 – PRÉALABLE

- ++ Utiliser des boîtes de Pétri contenant du milieu de Sabouraud.
- ++ Flamber une aiguille ou utiliser une anse à prélèvement stérile.
- ++ 1^{ère} boîte : déposer un petit morceau prélevé sur une croûte de camembert (*Penicillium caseicolum*)
- ++ 2^{ème} boîte : déposer un petit morceau prélevé dans une cavité de roquefort (*P. glaucum* ou *P. roquefortii*).
- ++ Incuber durant 36 à 48 h. à 30°.

A partir du point d'inoculation, un feutrage important de filaments rampants s'est développé ; à la loupe, on peut voir d'autres hyphes, dressées, présentant une extrémité verdâtre.

Observation extemporanée : MO 02

- ++ Prélever un morceau de papier collant cristal de 2 x 1 cm.
- ++ L'appliquer légèrement sur la moisissure.
- ++ Découper avec précaution la partie centrale (5-7 x 5-7 mm).
- ++ Déposer une goutte d'eau sur une LPO.
- ++ Poser le prélèvement sur la goutte d'eau, face collante vers le haut.
- ++ Déposer une goutte de fuchsine acide, lactique.



◀ Conidies d'*Aspergillus* sp.

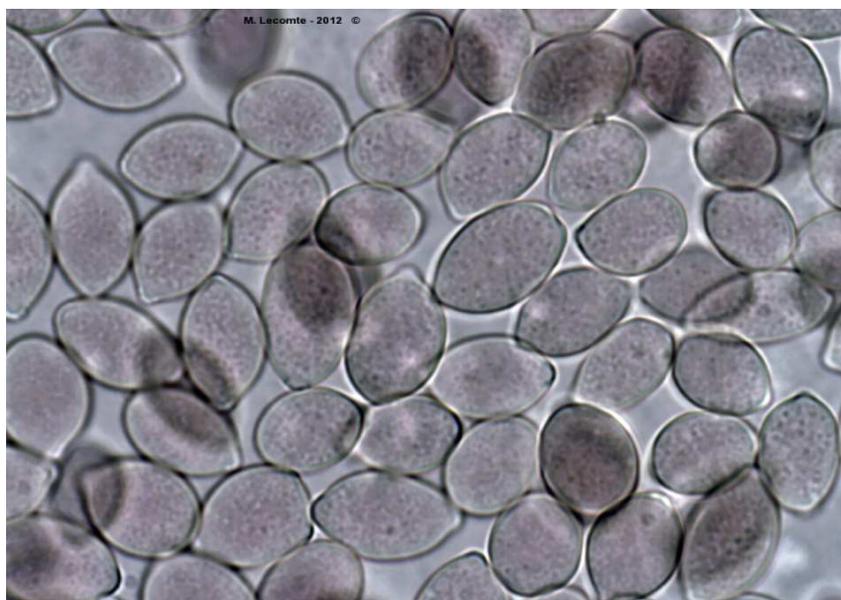
Montage définitif : MO 02

- ++ Déposer sur une LPO une goutte de PVALPh-FA.
- ++ utiliser la technique du papier collant (voir MO 02 ci-dessus).
- ++ Utiliser uniquement de la fuchsine acide (sous et sur le spécimen).
- ++ Laisser sécher durant 48 heures.
- ++ Luter au vernis à ongle incolore.

Extrait d'un document publié par le service des Relations Publiques de ROQUEFORT SOCIÉTÉ :

« ... C'est dans les fromageries, avant le caillage, que les maîtres-fromagers ensemencent le lait de brebis avec des spores de *Penicillium roqueforti*. Au préalable, ces spores ont été recueillies à l'aide de miches de pain au levain, fabriquées avec un mélange de farines de seigle et de blé. Les miches sont placées dans l'une des grandes crevasses qui assurent la respiration des caves. Bien vite, le *P. roqueforti* va se développer et envahir toute la masse intérieure du pain. Il ne reste plus alors qu'à broyer et tamiser la mie pour obtenir une précieuse poudre verte. Le nombre de spores contenu dans un seul gramme est énorme : il est évalué à 25 milliards ... »

« ... C'est dans les fromageries, avant le caillage, que les maîtres-fromagers ensemencent le lait de brebis avec des spores de *Penicillium roqueforti*. Au préalable, ces spores ont été recueillies à l'aide de miches de pain au levain, fabriquées avec un mélange de farines de seigle et de blé. Les miches sont placées dans l'une des grandes crevasses qui assurent la respiration des caves. Bien vite, le *P. roqueforti* va se développer et envahir toute la masse intérieure du pain. Il ne reste plus alors qu'à broyer et tamiser la mie pour obtenir une précieuse poudre verte. Le nombre de spores contenu dans un seul gramme est énorme : il est évalué à 25 milliards ... »



◀ Les conidies d'une moisissure non identifiée sur abricot (prélevement sur papier collant, donnant une idée de la densité).

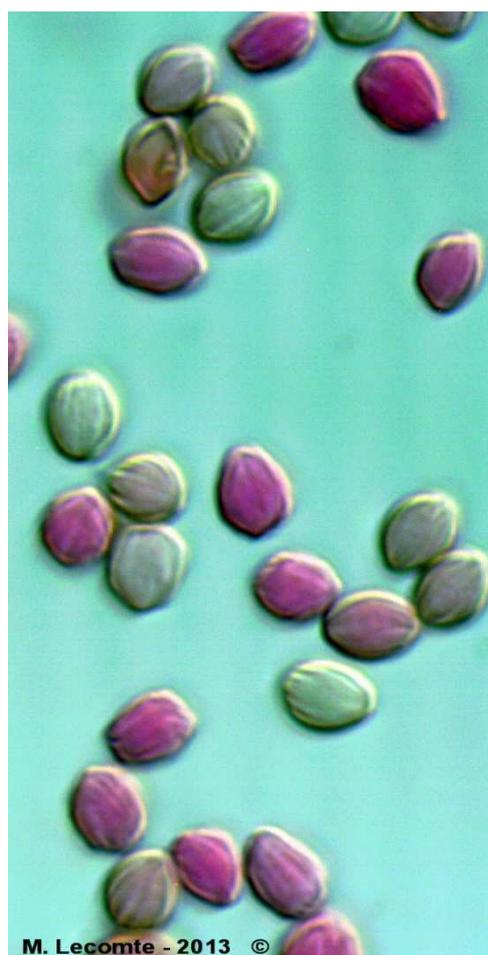
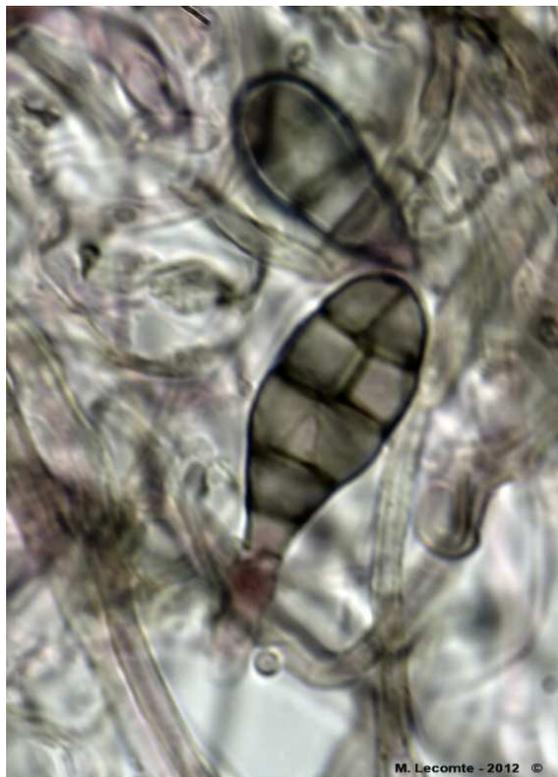
Moisissure prélevée sur groseille à maquereau (*Ribes uva-crispa*).



Ici, on se trouve en face de deux espèces différentes ; un 1^{er} mycélium à parois épaisses et nettement cloisonné, qui est celui d'un *Alternaria* (voir fructification naissante et 2 conidies caractéristiques, en forme de grenade à manche).

Le second mycélium génère des conidies allongées, légèrement appointies d'un côté.

Les parois sont nettement plus fines et le cytoplasme se colore vivement à la fuchsine acide.



M. Lecomte - 2013 ©

res qui ne sont pas à maturité.

◀ *Aspergillus* en train de libérer ses conidies.

▲ Une double coloration des conidies du même *Aspergillus* permet de mettre en évidence les spo-

Les levures

GENERALITES

Une **levure** est un champignon unicellulaire capable de provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales. Elles sont utilisées pour la fabrication du vin, de la bière, des alcools industriels, de pâtes levées (pain) et d'antibiotiques. Leur existence fut démontrée par Pasteur au XIX^{ème} siècle.

Ces micro-organismes, de forme variable selon l'espèce (sphériques, ovoïdes, en bouteille, triangulaires ou apiculées, c'est-à-dire renflées à chaque bout comme un citron) mais généralement ovales, d'environ 6-10 à 50 µm, se multiplient par bourgeonnement ou par scissiparité. Cette appellation « levure » découle de l'observation des fermentations, et tout particulièrement celle qui a lieu durant la fabrication du pain : on dit communément et depuis longtemps que le pain « lève ». Mais ce n'est pas une dénomination scientifique. Lorsqu'on parle de « levure » sans précision, on désigne la levure de bière (ou de boulanger), *Saccharomyces cerevisiae*. Il ne faut pas la confondre avec la levure chimique, qui peut générer des déboires culinaires.

Il existe beaucoup d'autres genres de levures ; parmi les plus connues, le genre *Candida* possède un pouvoir pathogène chez l'homme, responsable des mycoses de type « candidose ».

La plupart s'apparentent aux Ascomycètes, quelques-unes aux Basidiomycètes, et d'autres sont des formes imparfaites non rattachables actuellement à un groupe défini.

MODES DE MULTIPLICATION

Pour la majorité des levures, la multiplication asexuée (par mitose) est la forme prioritaire de multiplication. Il existe deux types de division mitotique chez les levures : par bourgeonnement (cas des *Saccharomyces*), ou par scission (cas des *Schizosaccharomyces*).

Toutefois dans certaines circonstances de milieu, une reproduction sexuée peut avoir lieu, avec asques et ascospores, ou basides et basidiospores. Certaines levures ne présentent pas de mode connu de reproduction sexuée.

La température optimale de culture de ces organismes se situe en général entre 25 °C et 30 °C.

MODE OPERATOIRE

Ensemencer 20 g de levure à pâtisserie fraîche, dans de l'eau tiède (20 cc) sucrée (1 c. à café rase). On mélange pour obtenir une solution homogène, d'aspect laiteux ; après quelques minutes, du gaz carbonique commence à se libérer, signe d'intense activité cellulaire.

DIVERS TYPES D'OBSERVATION

Observation vitale, sans coloration :

Prélever une goutte de colonie et la dissocier dans une goutte d'eau bidistillée. Poser une LCO et observer à 100x.

On distingue des cellules immobiles, plus ou moins sphériques, de 6 à 8 microns, pourvues d'un noyau. Le cytoplasme est entouré d'une membrane épaisse, caractéristique des cellules végétales. Il n'y a pas de chlorophylle, ce sont donc des champignons unicellulaires. On voit particulièrement la réfringence (brillance de la paroi squelettique et parfois des vacuoles).

Observation dans la nigrosine (pour mise en évidence de la structure externe)

Coloration au rouge neutre⁴⁷ : dissocier le prélèvement dans une goutte de rouge neutre et observer à 100x. Si l'observation ne dure pas trop longtemps, les vacuoles seront colorées en rouge rose. Ensuite, la coloration diffuse dans le cytoplasme.

Coloration au Lugol⁴⁸ : préparer un frottis avec une goutte de levure dans une goutte de tampon phosphate (pH 6,2). Laisser sécher à l'air. Déposer une goutte d'eau iodée, une LCO et observer à 100x.

Après 2 à 3 minutes, le cytoplasme des levures prend une couleur jaune, car ces champignons synthétisent du glycogène (polyholoside - substances de réserve que les levures élaborent à partir du glucose) qui précipite sous forme de granules brun acajou.

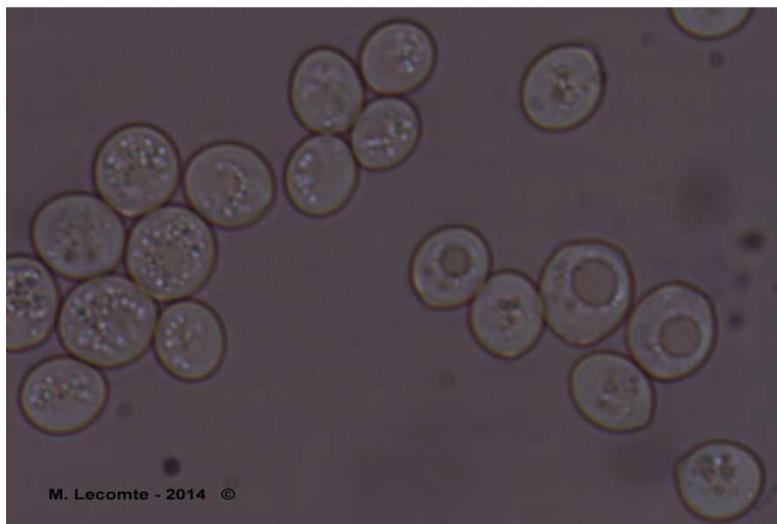
Coloration au bleu de méthylène⁴⁹ : préparer un frottis selon le MO précédent. Le recouvrir de bleu de méthylène alcoolique et laisser agir **30 minutes**. Tremper la lame dans une solution d'acide chlor-

⁴⁷ Dissoudre 1 g de rouge neutre dans 100 cc de tampon phosphate à pH 6,2 ; agitateur magnétique durant 1 heure ; filtrer.

⁴⁸ Dissoudre 1 g d'iode et 2 g d'iodure de potassium dans 100 cc d'eau bidistillée ; agitateur magnétique durant ½ heure.

hydrique à 5 % pendant une à deux minutes. Rincer à l'eau bidistillée, poser une LCO et observer à 100x. Une coloration des réserves de phosphate est observable dans les vacuoles et les noyaux.

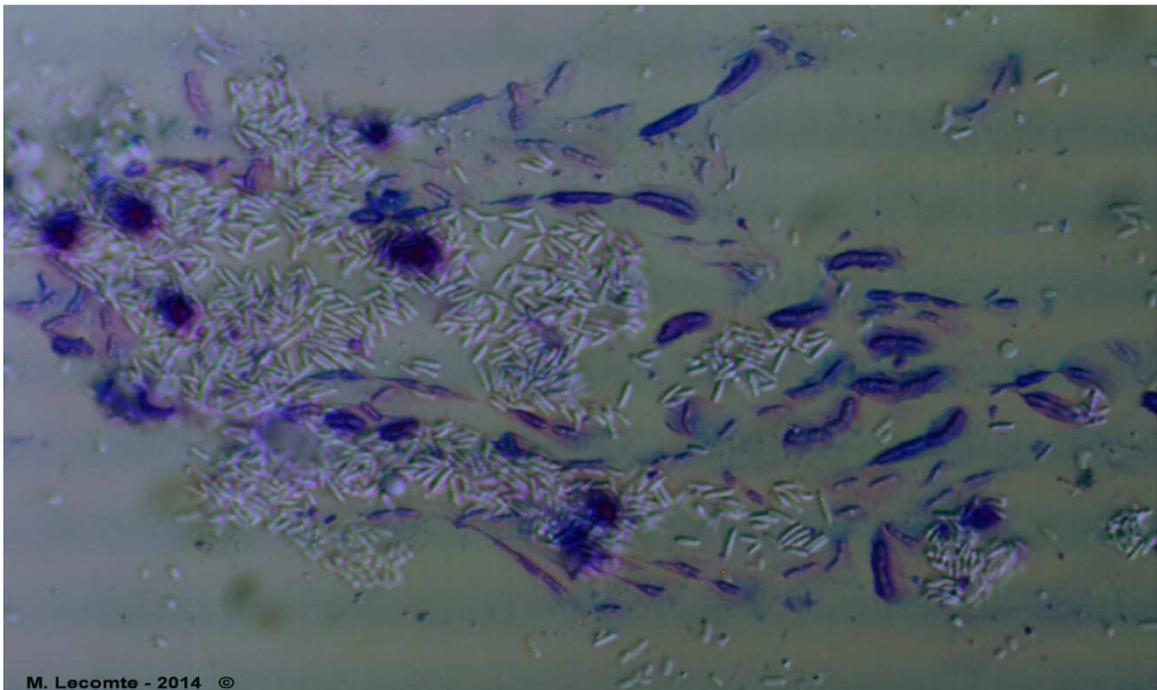
Coloration au bleu de Nille⁵⁰ : préparer un frottis avec une goutte de levure dans une goutte de tampon phosphate (pH 6,2). Recouvrir de colorant et laisser agir 20 minutes. Rincer à l'eau bidistillée. Eclaircir avec une solution d'acide acétique à 1 % pendant 15 minutes (apprécier la coloration visuellement). Rincer à nouveau, poser une LCO et observer à 100x. Les noyaux sont colorés en bleu foncé et certains lipides en rose.



⁴⁹ Dissoudre 10 g de bleu de méthylène dans 100 cc d'eau bidistillée. Ajouter 1 cc de potasse à 10 % et 30 cc d'éthanol à 95 %.

⁵⁰ Dissoudre le bleu de Nille dans de l'eau bidistillée jusqu'à saturation.

LES BACTERIES



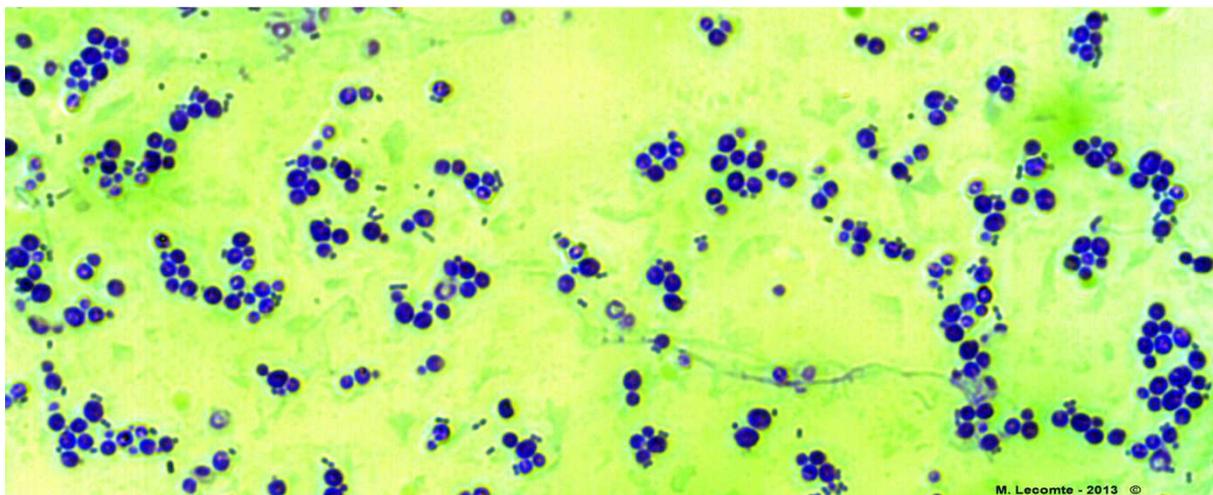
M. Lecomte - 2014 ©

Frottis de bactéries, avec une colonie qui n'a pas réagi au bleu de méthylène.

Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants, unicellulaires, ne possédant ni noyau (procaryotes), ni mitochondries, ni chloroplastes. Elles forment le règne des *Bacteria* et sont présentes dans tous les milieux, même les plus hostiles. Plusieurs milliers d'espèces ont été identifiées.

Elles présentent des formes très variées : sphères (coques), chaînettes de sphères (streptocoques), grappes de raisin (staphylocoques) bâtonnets (bacilles), spirales (spirochètes, spirilles), bâtons courbés (vibrions) et leur taille est très variable : de 0,3-0,5 à 2-5 μm . certaines sont mobiles, grâce à la présence de flagelles.



▲ Une colonie de microcoques, colorées au violet de gentiane ; elles mesurent de 0,5 à 2 μm max. et sont rarement pathogènes ; on les rencontre en très grand nombre dans le sol et certaines contribuent à la fermentation du lait, du yaourt, de fromages ; elles sont fréquentes sur la peau humaine.



◀ *Spirillum volutans* est une grande bactérie (30 à 50 μm), qu'on rencontre notamment dans les boues des stations d'épuration (bassins de décantation) et dans les eaux stagnantes ; elle possède une touffe de flagelles à ses extrémités, mais ces derniers disparaissent à la coloration.

On distingue nettement les granulations de volutine, qui justifient son nom (cette substance est constituée de phosphates polymérisés, qui servent à la construction de l'organisme).

Nombre d'entre elles sont inoffensives, voire bénéfiques pour notre organisme (flore commensale de la bouche, de l'intestin) ; d'autres sont très utiles dans l'industrie (pharmaceutique notamment), le milieu agroalimentaire, souvent en association avec des levures (fermentation des fromages et yaourts) et dans le recyclage des eaux usées, ou la dégradation des hydrocarbures.

Certaines, cependant, sont très pathogènes et sont responsables de maladies infectieuses très graves, soit par contamination de plaies ou alors surtout par voie respiratoire, pouvant provoquer des épidémies dévastatrices : peste, choléra, anthrax, tuberculose,

méningite, syphilis. Heureusement, la découverte des antibiotiques a permis de les combattre efficacement, et elles ne sont plus considérées comme des fléaux.

Selon leur mode de vie, elles sont classées en aérobies (besoin impératif d' O_2) ou en anaérobies (impossibilité de survivre en présence d' O_2).

En fonction de la réaction de leur paroi à un colorant précis, elles sont divisées en Gram + et Gram - (ceci fera l'objet d'un article dans les pages qui suivent).

Notre objectif n'étant pas de vous donner un cours de bactériologie, nous en resterons là, malgré l'aspect passionnant et complexe de ces organismes : cela demanderait des dizaines de pages.

1^{ère} prise de contact : une COLORATION SIMPLE au bleu de méthylèneMODE OPÉRATOIRE

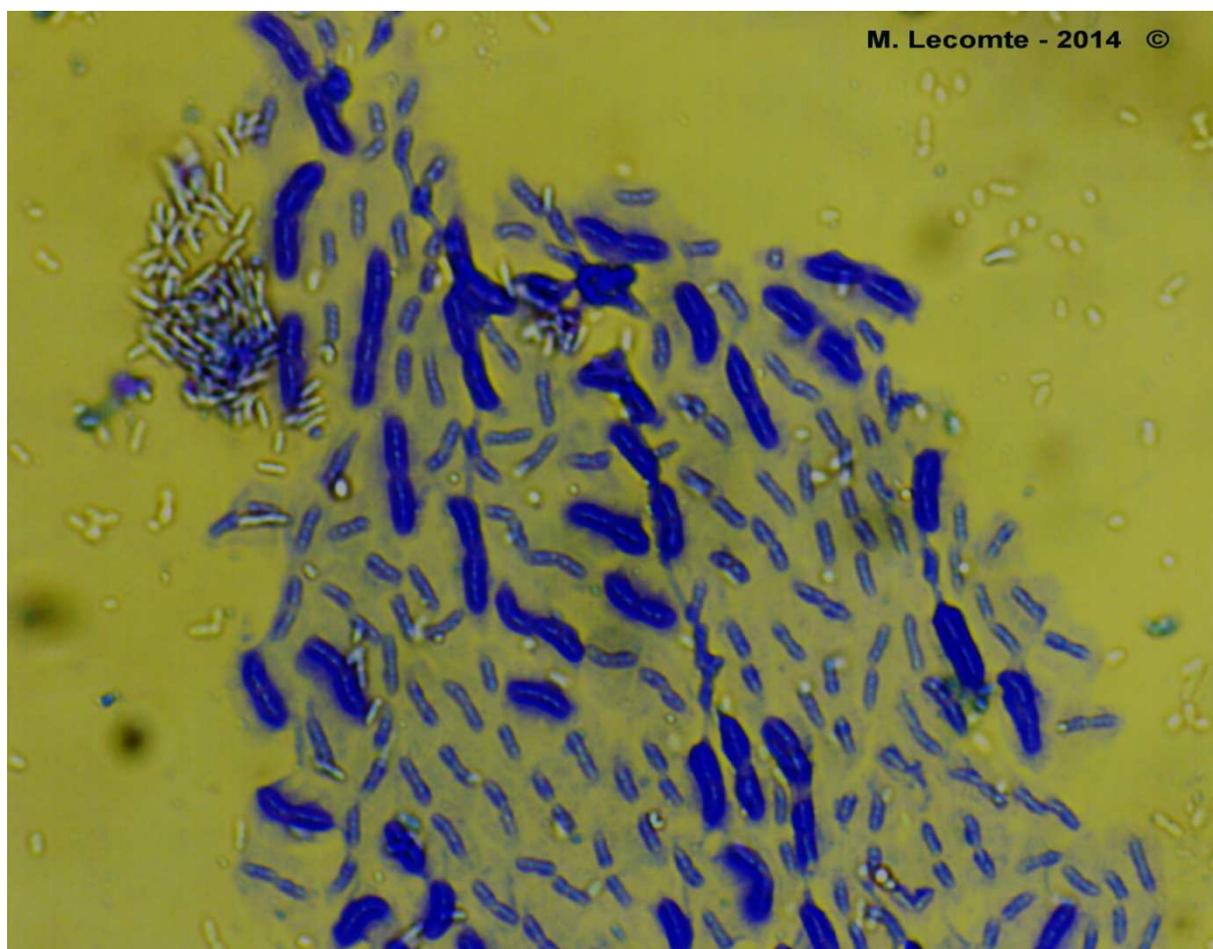
- + Déposer l'échantillon dans une goutte d'eau bidistillée, bien dissocier, puis réaliser un frottis.
- + Laisser sécher à l'air.
- + Fixer en passant lentement la lame 2 ou 3x au-dessus d'une source de chaleur.

Sur le frottis fixé et refroidi :

- + Faire couler la solution de bleu de méthylène phéniqué jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte.
- + Laisser agir 1 minute.
- + Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès.
- + Sécher à l'air ou sur une platine chauffante, ou encore sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans frotter.
- + Observer à x100, à immersion.

RÉSULTATS

Cette coloration facile s'avère très intéressante pour l'observation rapide des frottis, mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries, qui sont colorées en bleu sombre.



Frottis de bactéries, réalisé au départ du voile bactérien qui s'est formé sur une culture de paramécies, avec coloration au bleu de méthylène..

Pseudomonas & entérobactéries

PRÉALABLE

Dans le courant du mois de juin 2013, nous avons été sollicité par une étudiante algérienne finalisant un master en microbiologie, avec comme thème de mémoire : « *L'étude de pureté microbiologique des produits considérés à tort comme des antiseptiques, et qui sont utilisés notamment en dermatologie pour leurs activités desséchantes* ».

L'examen microscopique de 50 différents lots de solutions aqueuses d'éosine à 2% (60 cc) a démontré que plus de 80 % des produits étaient contaminés. Il en était de même pour du bleu de méthylène et de l'eau oxygénée.

Une 1^{ère} étude réalisée en 2010 a montré que les solutions étaient envahies par des *Pseudomonas* et des entérobactéries, avec en outre un taux très élevé de germes de levures et de conidies de moisissures. Une seconde étude menée en 2013 révèle le même problème, avec une amélioration (absence d'entérobactéries pathogènes) mais encore abondance de *Pseudomonas*.

Nous posons immédiatement une question évidente : « S'agit-il de préparations artisanales, de flacons préparés en officine ou par des professionnels de la santé ? ».

La réponse est assez interpellante, voire inquiétante, car il apparaîtrait que ces divers échantillons ont été prélevés dans différents lots préparés par des laboratoires spécialisés.

Mais, de quoi s'agit-il exactement ?

Les bactéries du genre *Pseudomonas* comptent quelques dizaines d'espèces ; elles vivent dans le sol et l'eau, sur les plantes, dans les matières organiques non vivantes, telles les denrées alimentaires. Elles se trouvent couramment dans les siphons d'évier de nos habitations, et dans les citernes à eau de pluie. On les rencontre aussi chez les animaux à sang chaud et chez l'être humain, notamment au niveau des fosses nasales, des muqueuses ou de la peau. Certaines sont considérées comme commensales⁵¹, d'autres contribuent notamment à la biodégradation des hydrocarbures, tandis que quelques-unes sont résolument pathogènes.

La plus connue est *P. aeruginosa* (bacille pyocyanique), qu'on qualifie de pathogène opportuniste, car elle profite de conditions d'implantation anormales provoquées par un affaiblissement de l'organisme, ou une introduction mécanique accidentelle (sonde, aiguille ...). Elle est présente dans les infections nosocomiales et résiste à certains antibiotiques courants.

Les entérobactéries comptent plusieurs centaines d'espèces. Leur nom vient du fait que certaines vivent dans l'intestin humain et des mammifères (la plus connue est vraisemblablement *Escherichia coli*). Leur éventail d'activité va du meilleur au pire, depuis la fermentation de certains fromages jusqu'à des maladies mortelles.

On peut les grouper en plusieurs catégories :

- **Les espèces commensales** : essentiellement intestinales, en situation normale, et chez un individu en bonne santé, elles participent à la dégradation du bol alimentaire et à la production de gaz intestinaux ; on parle d'une flore de fermentation.
- **Les espèces saprophytes** : elles vivent dans le sol, diverses eaux, sur les végétaux, toujours dans un environnement humide. Elles contribuent à la dégradation des matières organiques.
- **Les espèces pathogènes opportunistes** : elles sont inoffensives chez un hôte sain, mais peuvent déclencher une infection chez des personnes affaiblies, et notamment en milieu hospitalier.
- **Les espèces pathogènes** : elles sont directement agressives pour n'importe quel organisme et peuvent être véhiculées par des aliments contaminés, générant diarrhée et déshydratation. Certaines provoquent des pathologies spécifiques, connues et redoutables :
 - La fièvre typhoïde (*Salmonella typhi*)
 - La peste (*Yersinia pestis*)
 - La dysenterie bacillaire (*Shigella dysenteriae*)

La microscopie

Une des techniques les plus utilisées est la **coloration de Gram**, qui va permettre de les classer en 2 groupes : Gram positif (Gram +) ou Gram négatif (Gram -).

Les bactéries à Gram + sont colorées en violet (la réf. est *Staphylococcus* sp.), les bactéries à Gram - sont colorées en rose (la réf. est *Escherichia coli*).

Voir le chapitre consacré à ce sujet.

⁵¹ Le **commensalisme** est une forme d'interaction biologique entre deux êtres vivants : l'hôte fournit une partie de sa propre nourriture au commensal, mais il ne reçoit rien en échange, sinon une forme d'équilibre biologique. Cependant, dans ce cas particulier, on ne parlera pas de parasitisme.

La coloration différentielle de Gram

En 1884, le bactériologiste danois Hans Christian Gram met au point un protocole qui portera ensuite son nom : la **coloration de Gram**.

C'est la coloration de base en bactériologie ; elle permet de séparer les bactéries en « Gram + » et « Gram - » ; cette distinction est fondamentale pour leur identification.

C'est une technique de travail qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après un temps précis de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme en rose alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool, et le cytoplasme demeure coloré en violet.

Son grand avantage est de donner très rapidement une information qualitative sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu, tant sur le type que sur la forme.

Nous allons travailler sur un frottis classique fixé.

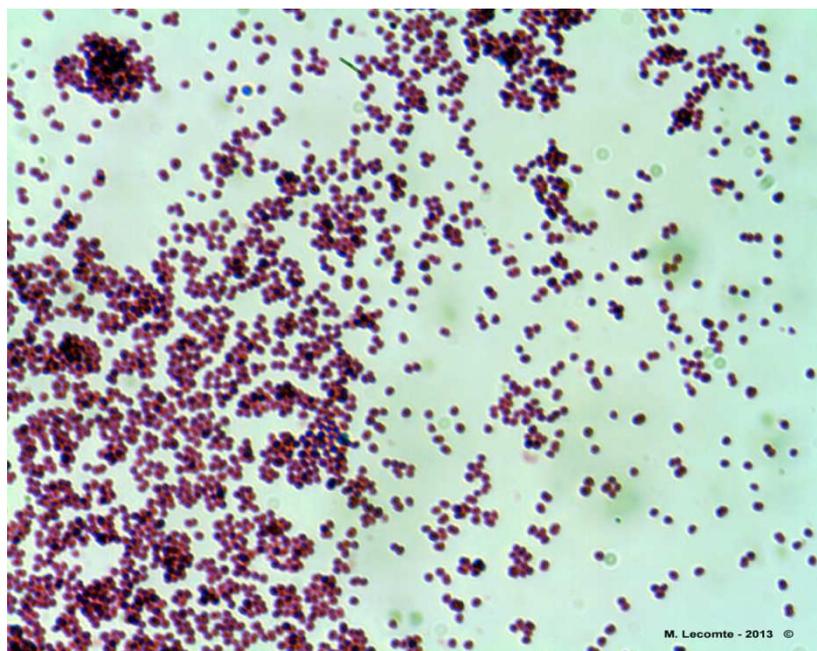
Dans le cas présent, nous pouvons expérimenter sur deux milieux : du yaourt et une infusion de fu-mier.

RÉALISATION DU FROTTIS

Deux méthodes de fixation sont possibles :

++ par l'alcool durant 5 minutes (et rinçage à l'eau)

++ par la chaleur : sur une lame, déposer une goutte d'eau déminéralisée. Ajouter à l'anse d'insé-mination une goutte du milieu bactérien. Étaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15 minutes.



◀ Des microcoques colorés en rose, après contre coloration à la safranine : elles sont donc Gram-.

LES COLORANTS

Violet phéniqué : violet de gentiane (ou Kristal violet), 1 gr - alcool à 95° ; 10 cc - eau phéniquée à 1%, 90 cc.

Liquide de Lugol (IKI) : iode, 1 g - iodure de potassium, 2 g - eau distillée, 100 cc.

Fuchsine basique en solution saturée dans l'alcool, 10 cc - eau bidistillée, 90 cc, ou safranine.

Alcool à 95° ou bien alcool acétoné : alcool absolu (5x) + acétone (1x).

La préparation de ces produits demande des connaissances certaines en manipulations

chimiques et une infrastructure adaptée (hotte) ; nous vous conseillons vivement de les acheter « prêts à l'emploi ».

Le violet colore le contenu cellulaire : il se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne.

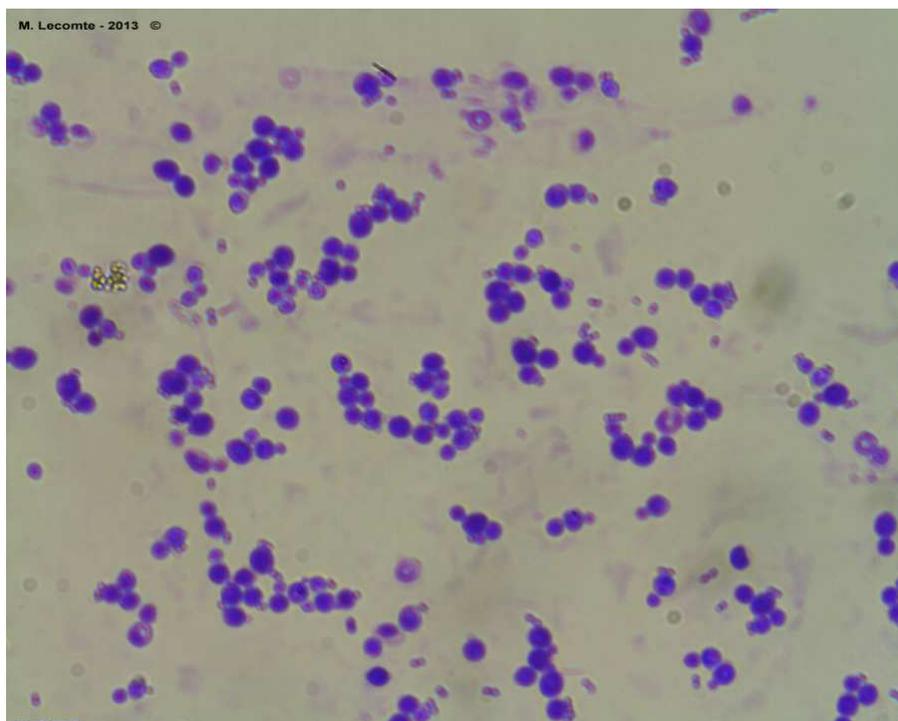
L'alcool sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram - ». En effet, celles ci ont une paroi riche en lipides (phospholipides, LPS) qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile), et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram + » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car trop épaisse et gluco-protéique. Elles resteront alors violettes.

On utilise la fuchsine ou la safranine en contre-coloration, pour rendre aux bactéries Gram - précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram + restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme. Ces différences de coloration et les différences de formes (bacille ou cocci) sont à l'origine de la classification des bactéries.

Il faut savoir que certains germes restent insensibles à cette coloration ; c'est le cas, entre autres, des mycobactéries (famille à laquelle appartiennent les agents de la tuberculose et de la lèpre).

RÉALISATION DE LA COLORATION : (1^{ÈRE} TECHNIQUE)

- ++ Déposer quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis : laisser agir durant 4 à 6 secondes.
- ++ Égoutter sans rincer.
- ++ Déposer quelques gouttes de Lugol : laisser agir durant 4 à 6 secondes.
- ++ Égoutter et recommencer avec le Lugol.
- ++ Égoutter.
- ++ Faire couler sur la lame (pas directement sur le frottis) l'alcool à 95°, Jusqu'à disparition du violet.
- ++ Déposer quelques gouttes de fuchsine : laisser agir pendant 25 secondes.
- ++ Laver.
- ++ Sécher par agitation (ne pas chauffer).
- ++ Observer à l'immersion 100x.



◀ Des microcoques colorés en violet : elles sont donc Gram+

RÉALISATION DE LA COLORATION : (2^{ÈME} TECHNIQUE)

- ++ Colorer au violet de gentiane. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.
- ++ Mordancer au lugol : étaler le IKI et laisser agir 20 secondes. Rincer à l'eau déminéralisée. Réaliser une seconde fois l'opération à l'identique pour plus de sécurité.
- ++ Décoloration à l'alcool à 95° ; verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée oblique-

ment, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée.

- ++ Recoloration à la fuchsine (ou à la safranine). Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, durant 10 à 15 minutes.
- ++ Observer à l'immersion 100x.

Les renseignements repris ci-dessus sont issus en partie de l'encyclopédie libre Wikipédia publiée sous licence CC-BY-SA 3.0, et en partie du site « Microscopie », avec des considérations personnelles supplémentaires.

AUTRE MODE OPÉRATOIRE

1. Réaliser un frottis et le fixer à la flamme.
2. Verser le violet de gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute.
3. Jeter le colorant et finir de laver la préparation avec la solution de lugol ; le laisser agir durant +/- 1 minute.
4. Jeter le lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau.
5. Recouvrir la préparation de safranine ; laisser agir environ 1 minute, puis laver abondamment.
6. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

Un raccourci intéressant : la potasse

Cette méthode permet de déterminer rapidement si une bactérie est « Gram + ou – », sans passer par les étapes de coloration habituelles, et sans utiliser un microscope.

MODE OPÉRATOIRE

++ Sur une LPO, mettre en contact une colonie isolée avec une goutte d'une solution de KOH à 3 %.

++ Mélanger à l'aide d'une pipette de Pasteur.

++ Après quelques secondes, « tirer » le mélange vers le haut ; si un filament se forme entre la pipette et la lame, alors la colonie isolée est constituée de bactéries Gram -. Si rien n'est entraîné par la pipette, on a à faire à des bactéries Gram +.

Les études de John Buck, en 1982, montrent que tous les résultats obtenus par cette méthode sont confirmés par la coloration de Gram.

Bactéries buccales

PRÉALABLE

Prélever un peu du dépôt qui se trouve dans le sillon entre dents et gencive (prélèvement de plaque dentaire) ; pour avoir une idée de la nocivité de la flore buccale, il est préférable de faire un prélèvement sous la gencive au niveau molaire côté interne avec un petit instrument doux. Si on localise de nombreux spirochètes en forme de tire-bouchons, on a une flore pouvant entraîner une maladie parodontale. Les vibrions (bactérie de forme arquée) sont généralement présents. Une flore motile caractérise une flore pathogène au niveau parodontal.



Chaînes de bacilles colorés au bleu de méthylène (Photo Olivier Barth).

MODE OPÉRATOIRE

++ Dilacérer dans une goutte d'eau bidistillée, puis réaliser un frottis.

++ Laisser sécher à l'air.

++ Fixer : passer lentement la lame 2 ou 3x au-dessus d'une source de chaleur.

++ Colorer à la fuchsine de Ziehl, au carbolfuchsin, au violet phéniqué, ou au violet aniliné de Sterling.

++ Laver et sécher.

++ Monter dans Aquatex.

++ Observer à 100x.

NB : si on réalise une observation dans l'eau, en contraste de phase, on peut détecter la présence des bactéries, spirochètes ou autres, mais surtout leur motilité (capacité physiologique de mouvement). Celle-ci disparaît évidemment à la fixation ou à la coloration.

RÉSULTATS

++ On distingue nettement la forme en bâtonnet des bactéries, mais leur structure interne n'est pas visible.

++ On peut observer des chapelets de bâtonnets ; il s'agit de bacilles qui se divisent par scissiparité (une division a lieu toutes les 20 à 25 minutes lorsque les conditions sont favorables).

++ Un bon prélèvement montrera généralement des macrophages (cellules d'origine sanguine, qui proviennent de la transformation de monocytes, qui sont assez semblables à des globules blancs). Ils sont localisés dans les tissus ou les organes (foie, rate, reins, ganglions lymphatiques, poumons ...) pouvant être soumis à des infections ou à une accumulation de débris à éliminer.

++ Chercher également vibrions et spirochètes.

Les bactéries du yaourt

Les bactéries sont des êtres unicellulaires procaryotes (pas de noyau), possédant une paroi généralement glucidique ; les organites tels mitochondries, chloroplastes ou appareil de Golgi sont absents. Beaucoup d'entre elles sont finement uniflagellées. Les plus grandes atteignent quelques microns. Dans des conditions favorables, elles sont capables de se diviser en deux toutes les 20 minutes.



◀ Chaîne de *Streptococcus thermophilus* colorée au bleu de méthylène (x 1.250)

Les deux bactéries les plus utilisées pour la fabrication du yaourt sont *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

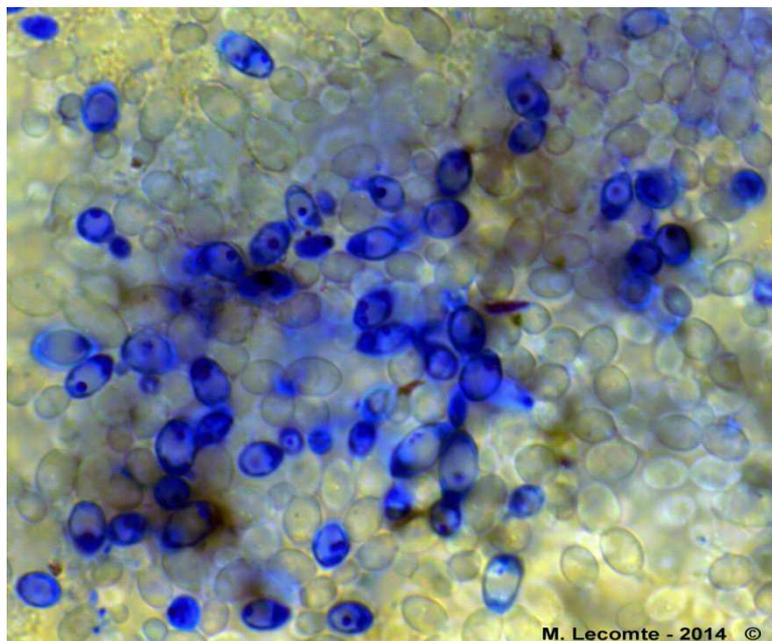
MODE OPÉRATOIRE

- ++ Décapsuler un yaourt nature du commerce.
- ++ A l'aide d'une anse d'insémination, prélever une goutte du liquide qui recouvre le yaourt (petit lait), ou directement un peu de yaourt, et la déposer à 1 cm du bord d'une lame dégraissée.
- ++ Ajouter une goutte d'eau bidistillée, bien mélanger et réaliser un frottis.

- ++ Fixer le frottis en le passant à la flamme (ne pas le brûler).
- ++ Colorer au bleu de méthylène.
- ++ Laisser agir durant 2 à 3 minutes.
- ++ Rincer à l'eau du robinet.
- ++ Sécher par agitation dans l'air.
- ++ Placer une LCO de grande taille (24x45) ou couvrir de Merckoglass.
- ++ Observer à 100x.

RÉSULTATS

- La préparation est parsemée d'amas de caséine.
- Les bacilles ont la forme de bâtonnets, isolés ou en file. Il s'agit de *Lactobacillus bulgaricus* ; ils sont immobiles, ne possédant pas de cils.
- Les streptocoques sont en forme de petites boules (des coques) agencées en chaînettes plus ou moins longues. On se trouve en présence de *Streptococcus thermophilus*.
- Dans la préparation, nous avons remarqué ces organismes curieux, possédant manifestement un noyau, que nous avons été incapables d'identifier (des levures ?).



M. Lecomte - 2014 ©

REMARQUES

Ces 2 bactéries sont utilisées industriellement pour la fabrication du yaourt. Elles transforment le lactose (sucre du lait) en acide lactique.

Quand le pH du lait atteint une valeur proche de 5, il y a floculation des caséines (protéines du lait) et formation d'un gel homogène : le yaourt.

Dans certains produits commercialisés, et vantés à grand renfort de publicité, on rencontre une troisième espèce : *Bifido bacterium*, dit Bifidus actif. C'est une petite bactérie en forme de Y, qui fait partie de la flore intestinale de l'homme.

Voile bactérien et bacille subtil

PRÉALABLE

- + Faire bouillir du foin haché (bien sec) dans de l'eau, durant 10 minutes.
- + Laisser refroidir.
- + Filtrer sur de la gaze en double couche : obtention d'un liquide jaune-brunâtre.
- + Laisser macérer le filtrat durant 3 jours dans un cristalliseur, à température de la pièce (il semble intéressant de couvrir, afin d'éviter une évaporation trop importante, et surtout de prévenir une pollution par des conidies de moisissures en suspension dans l'air).
- + Le liquide va se troubler peu à peu et une pellicule se développe à la surface de l'infusion : c'est ce qu'on appelle **le voile bactérien**, où on va trouver la bactérie du foin (cela signifie qu'il s'agit d'une bactérie aérobie, puisqu'elle a besoin d'oxygène pour proliférer).

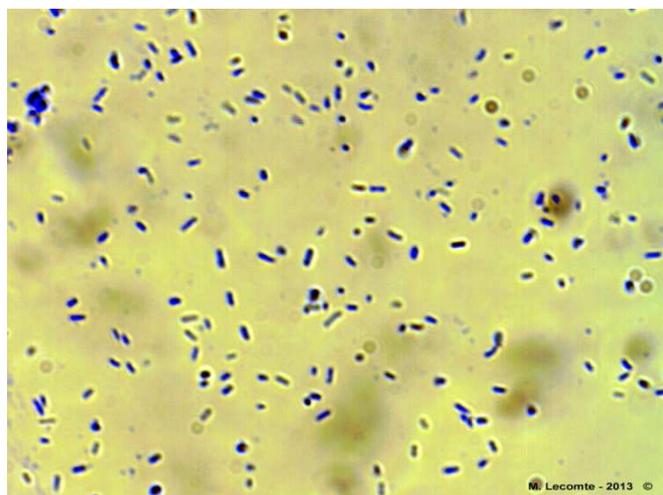


MODE OPÉRATOIRE

- + Prélever une goutte de liquide au niveau du voile, avec une baguette de verre.
- + Déposer au centre d'une LPO.
- + À l'aide d'une aiguille de seringue, colorer avec une trace de bleu de méthylène (une surcoloration empâterait la préparation).
- + Mélanger avec la pointe de l'aiguille.
- + Utiliser l'objectif 100x, à l'immersion.
- + Une coloration au rouge neutre s'avère également intéressante (coloration vitale).



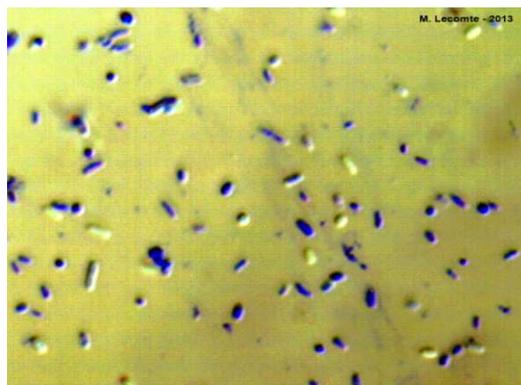
Le voile bactérien est nettement visible ici : il s'agit de cette croûte grisâtre envahissant la surface de l'eau (qui semble noire ici) ; on remarquera qu'ici, après 4 jours, des filaments mycéliens de moisissures commencent à se développer en surface.



RÉSULTATS

- ++ On distingue nettement la forme en bâtonnet des bactéries, mais leur structure interne n'est pas visible, vu leur petite taille (1,5 à 2 μm).
- ++ On peut parfois observer des chapelets de bâtonnets ; il s'agit de bacilles qui se divisent par scissiparité (une division a lieu toutes les 20 à 25 minutes lorsque les conditions sont favorables).
- ++ En cas de coloration vitale au rouge neutre, il est possible de voir des bactéries en mouvement, et notamment un bacille qui possède un cil vibratile lui permettant de se déplacer. Le bacille est appelé subtil : *Bacillus subtilis*. Il fut découvert et utilisé large-

ment pour combattre la dysenterie qui exerçait des ravages au sein des troupes allemandes durant la campagne africaine en 1941.



◀ La même photo, réalisée en DIC x100 : on distingue nettement d'autres organismes hyalins, plus volumineux, qui n'ont pas pris le colorant.



► Du mycélium de moisissure s'est déjà développé en surface, et la préparation est polluée par des conidies globuleuses, beaucoup plus volumineuses (6 à 9 µm de Ø).

Il nous paraît intéressant d'en encore rappeler la différence essentielle de terminologie, qui est souvent mal employée par nombre de personnes, en mycologie :

++ **UNE SPORE** résulte d'une reproduction sexuée entre deux organismes de polarité différente, avec échange de patrimoine génétique.

++ **UNE CONIDIE** est une forme de reproduction très rapide, assimilée à du clonage naturel, avec reproduction à l'identique de l'organisme incriminé.

Coloration des mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae* ; ce sont des bacilles allongés, fins, quelquefois incurvés, non flagellés, ne se décolorant pas sous l'action de l'alcool ou des acides forts. C'est leur signe distinctif : on les définit comme des « bacilles acido-alcool-résistants », et sont plus simplement appelées B.A.A.R.

Elles sont intracellulaires obligatoires et peuvent survivre un an dans les fèces des bovins et sur le sol. Elles se rencontrent dans la nature (dans la terre, les eaux, les aliments, à la surface de nombreuses plantes, dans les bâtiments et plus spécifiquement dans les conduites d'eau), où elle vivent en saprophytes. On les trouve également chez l'être humain et les animaux : elles sont alors commensales ou pathogènes.

Certaines sont responsables de maladies spécifiques : la lèpre (*Mycobacterium leprae*), la tuberculose humaine (*M. tuberculosis*), celle des bovins (*M. bovis*) et des poulets (*M. avium*)

La coloration de Ziehl-Neelsen (ZN)

C'est une méthode de coloration permettant l'identification des mycobactéries au microscope. Elle fait partie des techniques qui mettent en évidence l'acido-alcool-résistance, caractère fondamental des mycobactéries, et prennent en compte la difficulté de pénétration des colorants.

Ce type de coloration comporte trois étapes :

++ L'application d'un colorant énergétique à chaud ou à froid.

++ Des décolorations successives par un acide fort puis à l'alcool à 90°.

++ Une recoloration de contraste.

Le premier colorant utilisé dans les techniques classiques est la fuchsine concentrée.

MODE OPÉRATOIRE

La technique décrite ci-dessous est la technique classique de référence. Cependant, elle est de moins en moins utilisée en raison des risques qu'elle fait prendre au manipulateur. En effet, les colorants tels

que la fuchsine sont hautement toxiques et cancérigènes, tout particulièrement lorsqu'ils sont utilisés à chaud (à cause des vapeurs).

Préparation d'un frottis classique

1. La phase à chaud.

++ Couvrir le frottis avec un papier filtre bien imprégné de fuchsine phéniquée de Ziehl (préparation classique⁵²).

++ Travailler sous hotte aspirante.

++ Poser la lame sur une plaque chauffante durant 10 minutes, jusqu'à émission de vapeurs.

++ Veiller à ne pas laisser sécher le papier : alimenter à la FZ à l'aide d'une pipette.

++ Rincer à l'eau distillée stérile (bouillie).

2. La décoloration.

++ Tremper la lame durant 2 minutes dans une solution d'eau acidifiée (acide nitrique à 20 %).

++ Rinçage.

++ Tremper de la lame 5 minutes dans l'alcool éthylique à 95°.

++ Rinçage.

3. La recoloration.

++ Couvrir la lame pendant 2 min. avec une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 %⁵³.

++ Rinçage.

++ Observation à 100x.

RESULTAT

++ Les mycobactéries apparaissent alors comme des bacilles rouges sur fond bleu-gris.

REMARQUES

++ La coloration de ZN peut être réalisée à froid. Les lames sont immergées pendant au moins 3 heures dans la solution de fuchsine.

++ On peut utiliser l'acide sulfurique dilué au 1/4 à la place de l'acide nitrique.

Techniques de coloration alternatives

Elles sont inspirées de la technique de ZN, mais présentent des risques moindres pour les manipulateurs.

La coloration à froid de Kinyoun

Kinyoun a décrit sa méthode en 1915. C'est une technique de coloration bactériologique utilisant la fuchsine basique.

Avantages

++ Ici, on ne chauffe pas : on utilise un colorant comprenant une concentration élevée de fuchsine basique (3 %) et de phénol (6 %), ce qui permet de colorer seulement pendant 5 minutes, sans source de chaleur.

++ Rapidité d'exécution.

Inconvénients

++ Les bacilles sont pâles et la préparation manque de contraste.

++ Elle est déconseillée pour le travail de routine en laboratoire médical ; il est alors préférable d'utiliser la coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.

Technique (mêmes composants que pour la ZN)

++ Filtrer la fuchsine avant de la déposer sur la lame et laisser agir à température ambiante pendant 5 minutes

++ Rincer (filet d'eau du robinet).

⁵² Formule de préparation classique de la fuchsine de Ziehl : fuchsine basique (10 g) ; alcool éthylique ou méthylique à 90° (100 cc) ; eau bidistillée (25 cc) ; phénol cristallisé (50 g). Triturer dans un mortier. Mélanger longuement et filtrer. Le matériel destiné à la préparation est difficile à nettoyer car ce colorant est très actif ; aussi, nous conseillons de le garder en réserve et ne le destiner qu'à cet usage !

⁵³ Bleu de méthylène : eau distillée (130 cc) - bleu de méthylène (1 g) - éthanol à 95° (370 cc). Boucher le flacon et placer sur agitateur magnétique durant 12 heures.

- ++ Appliquer le mélange acide - alcool (2 minutes).
- ++ Rincer.
- ++ Recouvrir la lame avec le bleu de méthylène pendant 2 minutes.
- ++ Rincer.
- ++ Laisser sécher les lames à l'air ou dans une étuve.
- ++ Observer à 100x.

La coloration de Ziehl-Armand

C'est une variante de la technique de Ziehl-Neelsen. Elle s'applique à froid et utilise décolorants et bleu mélangés, pour ne plus avoir qu'un temps pour la décoloration et la contre coloration.

Elle est basée sur la capacité des mycobactéries à fixer un colorant, malgré l'action combinée d'un acide fort et d'un alcool : il s'agit de l'acido-alcool-résistance. L'utilisation du colorant d'Armand permet de réaliser simultanément la décoloration de toutes les bactéries (autres que les mycobactéries) et la coloration du fond de la préparation.

Mode opératoire (technique classique)

- ++ Fixer le frottis, soit par flambage à l'alcool ou passage à la plaque chauffante, à température moyenne (40-50°).
- ++ Laisser refroidir la LPO.
- ++ Remettre la LPO sur la platine chauffante ; couvrir le frottis avec la fuchsine de Ziehl.
- ++ Chauffer durant 10 minutes.
- ++ Ajouter de temps en temps du colorant pour éviter la dessiccation.
- ++ Éliminer le colorant.
- ++ Laver immédiatement à l'eau ordinaire.
- ++ Recouvrir le frottis avec le colorant d'Armand (mélange de l'alcool, de la solution acidifiée et du bleu de méthylène) pendant 1 à 2 minutes.
- ++ Laver et sécher le frottis.
- ++ Observer à 100x.

Mode opératoire (variante utilisant le four à micro-ondes)

- ++ Placer le frottis dans une boîte en plastique à couvercle.
- ++ Couvrir le frottis avec la fuchsine de Ziehl.
- ++ Placer le tout au micro-ondes, à température maximale, durant 1 minute.
- ++ Laver immédiatement à l'eau ordinaire.
- ++ Couvrir le frottis avec le colorant d'Armand pendant 30 secondes à 1 minute.
- ++ Laver et sécher le frottis.
- ++ Observer à 100x.

La coloration à l'auramine

L'auramine est essentiellement utilisée en microscopie à fluorescence.

Elle permet par exemple de colorer et mettre en évidence le bacille de Koch, ou bacille de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) ainsi que celui de la lèpre : mise en évidence des mycobactéries aussi appelées B.A.A.R. (Bacilles Acido-Alcool-Résistants) par une technique de coloration par fluorescence selon Dugommier. L'auramine phéniquée colore les mycobactéries en jaune-vert fluorescent.

L'avantage de la coloration à l'auramine est que l'œil humain est beaucoup plus sensible à la fluorescence ; cela nous permet de rechercher les mycobactéries à un faible grossissement et de balayer de nombreux champs (elles sont souvent rares dans les prélèvements), puis de confirmer au grossissement 1000x par la coloration de Ziehl.

L'auramine était autrefois employée comme agent antiseptique notamment sous le nom de « glauramine », classée comme « agent pouvant être cancérigène pour l'homme » ; son chlorhydrate a été très utilisé pour la teinture du papier, du cuir et des textiles.

Compte tenu de la réglementation, ces colorants ne sont plus employés en France pour teindre des textiles. La norme NF Environnement proscrit l'utilisation de produits (encres, papier...) contenant de l'auramine. Par contre, les colorants à base d'auramine (SY34 ou BY2) sont toujours fabriqués à l'étranger, notamment en Inde et en Chine. Le colorant SY34 est employé pour la fabrication du papier carbone et la coloration des encres de stylo à bille, des huiles, des graisses et des laques à l'alcool. Le colorant BY2 est utilisé pour la teinture des textiles : laine, coton, soie, nylon...

La coloration de Dugommier

Mode opératoire

- ++ Couvrir la lame d'acide trichloracétique à 1% pendant 30 minutes.
- ++ Rincer à l'eau.
- ++ Couvrir la lame avec la solution d'auramine phéniquée (auramine alcoolique 95° à 1 % + solution aqueuse de phénol à 3 %) pendant 15 mn.
- ++ Rincer.
- ++ Couvrir la lame avec la solution décolorante (100 cc d'éthanol à 70° + 0,5 cc d'acide chlorhydrique) pendant 2 mn.
- ++ Rincer.
- ++ Couvrir le frottis avec la solution de rouge thiazine (100 cc eau bidistillée + 0,1 g phosphate disodique + 0,1 g de colorant) pendant 1,5 mn.
- ++ Rincer.
- ++ Décolorer à nouveau pendant 3 mn.
- ++ Rincer et sécher à l'air.

RÉSULTAT

Les mycobactéries, étant acido-alcool-résistantes, restent jaune fluorescent alors que le fond est rouge.

Méthode de Smithwick

- ++ Fixer le frottis à chaud (éthanol + chaleur)
- ++ Exposer à l'auramine phéniquée durant 15 minutes
- ++ Rincer à l'eau bidistillée
- ++ Décolorer pendant 2 à 5 minutes avec une solution acido-alcoolique (acide sulfurique à 25 % dans éthanol à 95°)
- ++ Rincer à l'eau bidistillée
- ++ Contre-colorer au rouge de thiazine durant 2 minutes
- ++ Rincer à l'eau bidistillée
- ++ Laisser sécher à l'air

Méthode de Kubica

Elle est très semblable à la précédente, mais fait appel à une solution décontaminante à base de citrate de sodium.

Le mécanisme de la coloration fluorescente est comparable à la coloration classique Ziehl-Neelsen. La résistance à l'acide des mycobactéries repose sur le fait qu'une enveloppe cireuse de la membrane chez ces germes empêche par traitement acide la restitution de colorants une fois absorbés.

La coloration des mycobactéries selon Hagemann-Hermann

Matériel

Prélèvements de matériel bactériologique séchés à l'air et fixés par la chaleur, comme crachats, ponctions-biopsies à l'aiguille fine, liquides de lavage, empreintes, liquides d'épanchement, pus, exsudats, cultures liquides et solides, coupes histologiques.

Fixation

La fixation s'effectue au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen (2 à 3 fois en évitant une trop grande chaleur). Le matériel peut aussi être fixé pendant 20 min à 100-110 °C dans une étuve ou sur une plaque chauffante.

Préparation

Solution d'auramine phéniquée (voir page précédente).

Solution de permanganate de potassium à 0,1 % (dissoudre 0,1 g de permanganate de potassium dans 100 cc d'eau distillée).

Réalisation

1. Recouvrir les préparations avec une solution d'auramine phéniquée ; faire bouillir les préparations et laisser agir pendant 5 min ; secouer la solution et répéter la coloration.
2. Rincer soigneusement à l'eau.
3. Différencier dans l'acide chlorhydrique-alcool jusqu'à la décoloration pendant env. 15-20 sec.
4. Rincer à l'eau et éventuellement contre-coloration.
5. Plonger 5 sec. dans la solution de permanganate de potassium.
6. Rincer à l'eau.
7. Plonger 1 sec. dans la solution de bleu de méthylène de Löffler.
8. Rincer à l'eau.

Résultat

Bactéries : jaune ou fluorescent.
Cellules et mucus violet foncé.

Interprétation

Le résultat est "bacilles acido-résistants mis ou non en évidence". Il n'est pas possible de distinguer s'il s'agit de mycobactéries tuberculeuses ou d'autres mycobactéries, et on ne peut pas non plus constater si les bactéries sont activées ou inactivées. Si des mycobactéries sont trouvées, effectuer d'autres analyses dans des laboratoires spécialisés. Un résultat positif à la coloration par l'auramine doit être confirmé par une coloration de Ziehl-Neelsen (qui peut être réalisée sur la même lame).

La coloration à l'orange d'acridineTechnique

- Couvrir la lame avec la solution d'acridine orange à 1% pendant 15 mn.
- Rincer à l'eau.
- Couvrir la lame avec la solution de décoloration pendant 1 mn.
- Rincer à l'eau.
- Couvrir le frottis de bleu de méthylène pendant 1 mn.
- Rincer à l'eau.
- Décolorer avec la solution décolorante pendant 3 mn.
- Rincer à l'eau.
- Sécher à l'air.

Les mycobactéries présentent une fluorescence rouge à orange.

Préparation de l'orange acridine

Mélanger dans l'ordre, et dans un grand flacon (le couvrir de papier aluminium pour le rendre opaque : glycérol (125 cc) + éthanol (125 cc) + eau distillée (250 cc) ; ajouter ensuite 25 g de phénol. Mélanger 0,5 g d'orange d'acridine en poudre dans 10 cc d'éthanol et ajouter au mélange précédent. Boucher et laisser sur l'agitateur magnétique durant 12 heures. Filtrer ensuite et conserver en flacon opaque.

Décolorant

Ethanol (370 cc) - eau distillée (130 cc) – 2,5 cc d'acide chlorhydrique à 35 % (2,5 cc)

MA BIBLIOTHÈQUE PERSONNELLE POUR LA MICROSCOPIE

- ANOFEL**, 1998 - *Parasitologie Mycologie*, France, Format Utile, 480 p.
- AUDERSET G.**, 1987 - *Biologie végétale*, Genève, Florimontaines, 268 p.
- AYEL A. & MOINARD A.**, 2007 - *Microscope. Constitution, fonctionnement, emploi en mycologie*, Bull. spécial n° 3a, S. M. du Poitou, 125 p.
- BAAR D.**, 1996 - *Observation microscopique des Macromycètes*, 43 p.
- BAILENGER J.**, 1973 - *Coprologie parasitaire et fonctionnelle*, Bordeaux, Drouillard, 373 p.
- BAILENGER J.**, 1952 - *Atlas de travaux pratiques de parasitologie humaine*, Bordeaux, 75 p.
- BASSO M.T.**, 2005 - *Manuale di Microscopia dei Funghi*, vol. 1, Mykoflora, Alassio, 302 p.
- BASSO M.T.**, 2012 - *Manuale di Microscopia dei Funghi*, vol. 2, Mykoflora, Alassio, 586 p.
- BATAILLE F.**, 1948 - *Les réactions macrochimiques chez les champignons*, supplément au tome LXIII de la Soc. Myc. De France, 172 p. (seconde édition en 1969)
- BETTON G.**, 1969 - *Photographie au microscope*, Paris, De Francia, 174 p.
- BEUGNIES A.**, 1969 - *Microscopie des milieux cristallins*, Paris, Dunod, 190 p.
- BLASZKOWSKI J.**, 2012 - *Glomeromycota*, Institute of Botany, Krakow, 303 p.
- BONDU A.**, 2010 - *Le nettoyage des lames et lamelles de microscopie*, Bull. Soc. Mycol. Nord France, **88** – 2, 60 : 63.
- BOTTON B. & AL.**, 1990 - *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, Paris, Masson, 512 p.
- BRACEGIRDLE B. & MILES P.H.**, 1978 - *An atlas of plants structure*, (2 volumes), Londres, 253 p.
- BRUMPT E.**, 1936 - *Précis de parasitologie* (2 volumes), Paris, Masson, 2.138 p.
- BRUMPT E & NEVEU-LEMAIRE M.**, 1951 - *Travaux pratiques de parasitologie*, Paris, Masson, 317 p.
- BULLIARD & CHAMPY CH.**, 1947 - *Abrégé d'histologie*, Paris, Masson, 366 p.
- CARNOY J.B.**, 1880 - *Manuel de microscopie*, Louvain, 218 p.
- CAHAGNIER B. & AL.**, 1998 - *Moisissures des aliments peu hydratés*, Paris, Tec Doc, 225 p.
- CERCLE DE MYCOLOGIE DE BRUXELLES.**, 2004 - *La détermination des champignons par leurs caractères microscopiques*, D. Ghyselincq, Bruxelles, 72 p.
- CHABASSE D., GUIGUEN CL., & CONTET-AUDONNEAU N.**, 1999 - *Mycologie médicale*, Paris, Masson, 324 p.
- CHAMPY CH.**, 1947 & 1948 - *Précis d'histologie générale*, Paris, Baillière, 406 p.
- CHARBONNEL J.**, 2004 - *Les réactifs mycologiques. Tome 2 : Les réactifs microchimiques, aide pratique à l'étude microscopique des champignons*, David-Rogeat, 289 p.
- CLÉMENÇON H.**, 1997 - *Anatomie der Hymenomyceten*, Flück-Wirth, Teufen, xi, 996 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2004 - *Citology and Plectology of the Hymenomycetes*, Berlin, Cramer, 488 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2009 - *Methods for working with Macrofungi : laboratory cultivation and preparation of larger fungi for light microscopy*, IHW Verlag, Eching, 88 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2012 - *Citology and Plectology of the Hymenomycetes*, (2nd revised edition), J. Cramer, Stuttgart, 520 p.
- CLÉMENÇON H.**, 2012 - *Grosspilze im Mikroskop*. DGfM, München, 176 p.
- COLLIN A. & DEMANY J.M.**, 2002 - *Préparation aux oraux des concours de biologie cellulaire : colles biocell*, Ellipses, Presses Universitaires de France, 286 p.
- COUDERD J.**, 1955 - *Guide pratique de mycologie médicale*, Paris, Masson, 364 p.
- COUJARD & COUJARD**, 1941 - *Atlas de travaux pratiques d'histologie animale*, Paris, Vigot, 118 p.
- COUPIN H.**, 1964 - *Ce qu'on peut voir avec un petit microscope*, France, Photo Revue, 134 p.
- DAUFRESNE A.**, 1900 - *Guide pratique de microscopie agricole*, Paris, 604 p.
- DAVET P. & ROUXEL F.**, 1997 - *Détection et isolement des champignons du sol*, France, INRA, 203 p.
- DEFLANDRE G.**, 1947 - *Microscope pratique*, Paris, Lechevalier, 441 p.
- DE IZARRA Z.**, 2007 - *Introduction à l'étude microscopique des champignons*, Bulletin spécial n° 5 de la Société mycologique du Poitou, 81 p.
- DELARUE J., GAUTHIER-VILLARS P., BUSSE F & GOUYGOU CH.**, 1957 - *Microscopie : pratique d'anatomo-pathologie*, Masson, 337 p.
- DELBORG M.**, 1977 - *Microscopie : initiation et leçons*, France, Photo Revue, 128 p.
- DOORLY E.**, 1944 - *Un homme et les microbes (vie de Pasteur)*, Londres, 96 p.
- DOP & GAUTIE**, 1930 - *Manuel de technique botanique, histologique et microscopique*, Paris, Larousse, 594 p.
- EHRMANN E.**, 1922 - *Traité des matières organiques colorantes et de leurs diverses applications*, Dunod
- GANTER & JOLLES**, 1969 & 1970 - *Histochimie normale et pathologique*, (2 volumes), Paris, Gauthier Villars, 2.013 p.
- GARBAYE J.**, 2013 - *La symbiose mycorhizienne, une association entre les plantes et les champignons*, Ed. Quae, 253 p.

- GIROD P.**, 1895 - *Manipulations de botanique*, Paris, Baillière, 170 p.
- GUILLERMOND A.**, 1912 - *Les levures*, Paris, Doins, 565 p.
- GUILLERMOND A.**, 1928 - *Clé dichotomique pour la détermination des levures*, Paris, Lefrançois, 121 p.
- JAHIER J.**, 1992 - *Techniques de cytologie végétale*, Paris, INRA, 183 p.
- JOLY P.**, 1964 - *Le genre Alternaria*, Paris, Lechevalier, 250 p.
- KAYSER E.**, 1905 - *Les levures, caractères morphologiques et physiologiques*, Paris, Masson, 212 p.
- LANGERON M.**, 1942 - *Précis de microscopie*, Paris, Masson, 1.340 p.
- LAROCHE G. ET LAROCHE C.**, 1949 - *Examens de laboratoire du médecin praticien*, 5^{ème} édition, Masson
- LARPENT-GOURGAUD**, 1985 - *Manuel pratique de microbiologie*, Paris, Hermann, 230 p.
- LEITZ E.**, sans date - *Optique du microscope : objectifs, oculaires, condenseurs*, Allemagne, Leitz Wetzlar, 119 p.
- LOCQUIN M. ET LANGERON M.**, 1978 - *Manuel de microscopie*, Paris, Masson, 352 p.
- LOCQUIN, M.**, 1984 - *Mycologie générale et structurale*, Masson, 549 p.
- MAGA Y.A.**, 2003 - *150 exercices d'histologie*, France, Pradel, 78 p.
- MARSAN C.**, 2006 - *Précis de techniques cytologiques*, France, Bioformation, 117 p.
- MARTOJA & MARTOJA**, 1967 - *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Paris, Masson, 345 p.
- MEYBECK J.**, 1963 - *Les colorants*, 3^{ème} édition, Presses Universitaires de France
- MONTEL P.**, 1974 - *Toute la photographie*, Paris, Larousse, 365 p.
- MOREAU CL.**, 1968 - *Moisissures toxiques dans l'alimentation*, Paris, Lechevalier, 371 p.
- NAUMOV N.A.**, 1939 - *Clé des Mucorinées*, Paris, Lechevalier, 173 p.
- PASTAC I.A.**, 1942 - *Les matières colorantes chez les champignons*, Paris, Muséum, 88 p.
- PÉRÉ J.P.**, 1994 - *La microscopie, techniques d'étude en biologie*, Paris, Nathan, 128 p.
- PERELLI V.**, 1964 - *Macrophotographie et microphotographie*, Milan, P. Fotografico, 531 p.
- PICAUD J.L., BAEHR J.C., MAISSIAT J.**, 2004 - *Biologie animale, Vertébrés*, Dunod, 298 p.
- PICAUD J.L., BAEHR J.C., MAISSIAT J.**, 2005 - *Biologie animale, Invertébrés*, Dunod, 2^{ème} éd., 239 p.
- POIRIER & RIBADEAU**, 1979 - *Atlas d'histologie (travaux pratiques)*, Paris, Masson, 128 p.
- POLICARD A.**, 1934 - *Précis d'histologie physiologique*, Paris, Doin, 895 p.
- RAWN J. D.**, 1990 - *Traité de biochimie*, De Boek
- RICHARDS O.W.**, 1942 - *The effective use and proper care of microtome*, Nex-York, 84 p.
- ROLLAND M.**, 1937 - *La féerie du microscope*, Mercure de France, 266 p.
- SARTORY A.**, sans date, circa 1930 - *Guide pratique des manipulations de mycologie parasitaire, à l'usage des pharmaciens*, Paris, Le François, 341 p.
- SÉGUY E.**, 1923 - *Les moustiques de France*, Paris, Lechevalier, 225 p.
- SÉGUY E.**, 1924 - *Les insectes parasites de l'homme et des animaux domestiques*, Paris, Lechevalier, 422 p.
- SÉGUY E.**, 1949 & 1951 - *Le microscope. Emploi et applications (2 tomes)*, Paris, Lechevalier, 1.200 p.
- SÉGUY E.**, 1954 - *Initiation à la microscopie*, Paris, Masson, 251 p.
- SÉGUY E.**, 1954 - *Initiation à la microscopie*, Paris, Boubée, 253 p.
- SÉGUY E.**, 1979 - *Initiation à la microscopie*, Paris, Boubée, 4^{ème} éd., 253 p.
- SENEVET G.**, 1937 - *Ixodoidés*, Paris, Lechevalier, 101 p.
- STREET H.E.**, 1977 - *Plant tissue and cell culture*, London, Blackwell, 614 p.
- TERRIEN J.**, 1968 - *Le microscope*, Presses Univ. De France, 126 p.
- TROUSSERT E.**, 1885 - *Les microbes, les ferments et les moisissures*, Paris, Imprimeries Réunies, 282 p.
- ULRICH R.**, 1943 - *Les constituants de la membrane chez les champignons*, Paris, Muséum, 44 p.
- VOLLHARDT K. P. C. ET SCHORE N. E.**, 1995 - *Traité de chimie organique*, 2^{ème} édition, De Boek.
- WASTIAUX G.**, 1994 - *La microscopie optique moderne*, France, Paris, 269 p.
- WASTIAUX G.**, 2000 - *Initiation au microscope. Bases pratiques et utilisation*, France, Burillier, 51 p.
- WASTIAUX G.**, 2006 - *Précis de microscopie*, France, Bioformation, 67 p.

Association des Mycologues Francophones de Belgique

(A.M.F.B. asbl)

Créée le 16 mai 2007

Siège social : Allée des Ecureuils, 6, à 6280 - LOVERVAL

Arrondissement judiciaire de Charleroi

Numéro d'entreprise : 892.031.004

<http://www.amfb.eu>

Le site est géré par François CORHAY - francois@corhay.eu

Au sein du Conseil d'Administration, le bureau est composé de :

André FRAITURE, président

Jardin Botanique National de Belgique, Domaine de Bouchout

B-1860 MEISE fraiture@br.fgov.be

Paul PIROT, vice-président

rue des Peupliers, 10, B-6840 NEUFCHATEAU paul.pirot.mycology@skynet.be

Raymond NOTTE, secrétaire fb494497@skynet.be

Avenue du Champ des Monts, 6 - B-1300 WAVRE

Claude QUINTIN, trésorier

Rue du Pays Minier, 9 – 4400 FLEMALLE claudio.quintin@teledisnet.be

Marcel LECOMTE, rédacteur en chef

rue Basse Chaussée, 117 B-5022 COGNELEE/NAMUR mlecomte@skynet.be

Les autres membres du conseil d'administration sont :

Jacqueline BERNAUD

Françoise DRAYE

Jean-Pierre LEGROS

Alfred LOSS

Camille MERTENS

Joseph PELLICANI

Jean-Marie PIRLOT

David VALLEE

Nous publions un bulletin annuel de 72 pages en format A4.

Pour tout renseignement consulter Raymond Notte par mail, ou notre site.

Éditeur responsable : A.M.F.B. (Association des Mycologues Francophones de Belgique)
Rédacteur : Marcel Lecomte
Publié le 15 mars 2014

Les articles signés engagent uniquement la responsabilité de leurs auteurs.