

Les préparations microscopiques par dissociation.

Didier Baar ⁽¹⁾

1. Principes de la dissociation.

Les préparations extemporanées sont, de beaucoup, les plus utilisées en mycologie générale. Ces préparations sont destinées à des observations de courte durée, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas, dans l'ensemble, être conservées. Les applications mycologiques les plus répandues de préparations extemporanées sont les techniques de dissociation. Ces techniques sont principalement utiles lors de la détermination d'une récolte (en suivant une clé dichotomique, par exemple). Elles ont l'avantage d'être relativement simples et rapides à réaliser.

Dissocier un tissu, c'est l'écraser progressivement de manière à en isoler les cellules afin de pouvoir les observer plus aisément. Pratiquement, cette technique ne conserve ni la structure des tissus traités, ni les rapports des articles ⁽²⁾ entre eux. Elle permet donc uniquement l'étude d'articles isolés, tels les basides ⁽³⁾, les cystides ⁽⁴⁾ ou les asques ⁽⁵⁾. La dissociation est de ce fait réservée à un usage exclusivement cytologique et ne pourra en aucun cas être utilisée à des fins histologiques.

2. La technique de dissociation.

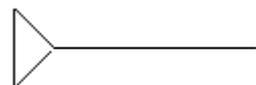
2.1. Observation de matériel frais.

- Déposer une goutte de rouge Congo ammoniacal sur une lame porte-objets.
- Prélever sur le carpophore un fragment aussi réduit que possible en s'aidant pour ce faire des instruments usuels : ciseaux, scalpel, pincettes et aiguilles à dissection.
- Transférer cet échantillon sur la lame, dans la goutte de colorant.
- Couvrir délicatement la préparation avec la lamelle.
- Chauffer l'angle d'un fer à luter dans la flamme non fumeuse d'un brûleur à gaz ou à alcool puis l'amener au contact d'un bloc de paraffine.
- Déposer à l'aide de cet instrument une goutte de paraffine en fusion sur deux coins adjacents de la lamelle, de manière à la maintenir en place sur la lame. La paraffine doit fumer mais ne peut grésiller pour bien s'étaler.
- Appliquer délicatement sur la lamelle, au-dessus de l'objet, de petits coups répétés avec le manche d'un scalpel, jusqu'à obtention de la dissociation désirée.
- Observer au microscope et, au besoin, retirer la préparation afin de poursuivre la dissociation.

Il est préférable de réaliser toute préparation microscopique sur un carré de bristol noir. Cette précaution évite la perte des lames et des lamelles, amortit les chocs lors de la dissociation, et maintient la propreté du verre. Le prélèvement se fera très facilement sur une plaque de verre propre, plutôt que sur tout autre support.

D'autres réactifs que le rouge Congo ammoniacal peuvent évidemment être employés, mais on s'expose alors généralement soit à des résultats moins satisfaisants, soit à une dissociation difficile. L'ammoniaque présente dans le colorant ramollit et regonfle les tissus, tandis que le rouge Congo est un colorant qui se fixe bien sur les champignons. Il faut toujours déposer la goutte de réactif avant l'échantillon afin d'éviter la contamination du réactif par les spores.

Le fer à luter utilisé est en fait un agitateur à extrémité triangulaire, vendu sous le nom de triangle Drigalski, et composé d'une tige de métal courbée trois fois.



Le fait de maintenir la lamelle sur la lame à l'aide de paraffine a plusieurs effets intéressants. Cette technique empêche le couvre-objets de se déplacer et limite l'écoulement du réactif pendant la dissociation, ainsi que les mouvements gênants du liquide durant l'observation. Le colorant ne peut pas dépasser les limites de la lamelle avant utilisation de la paraffine car celle-ci n'adhère pas correctement sur les surfaces humides.

⁽¹⁾ Didier Baar, décédé accidentellement le 14 octobre 2001, à l'âge de 23 ans.

⁽²⁾ **Articles.** Les champignons, comme les plantes, présentent deux types principaux de cellules: des cellules constitutives et des cellules reproductrices. Chez les champignons, on a donné aux premières le nom d'hyphes et aux dernières le nom de spores.

⁽³⁾ **Basides.** Ce terme désigne les articles fertiles caractéristiques des Basidiomycètes. Les spores (généralement par quatre) se forment à l'extérieur de la baside à laquelle elles sont reliées par une sorte de petit pédoncule appelé stérigmate. Les basides, avec les cystides, forment l'hyménium du champignon.

⁽⁴⁾ **Cystides.** L'hyménium, qui est la couche fertile des champignons, présente chez les Basidiomycètes, intercalés entre les basides, des articles stériles souvent remarquables qui sont appelés les « cystides ».

⁽⁵⁾ **Asques.** Terme désignant les articles fertiles caractéristiques des Ascomycètes. Les spores, au contraire de celles des Basidiomycètes, se développent à l'intérieur des asques, généralement au nombre de huit.

Il est donc nécessaire de veiller à ne pas déposer une goutte trop importante de colorant sur la lame avant d'y placer l'échantillon à dissocier. La taille de la goutte est fonction de celle de l'échantillon. Plus celui-ci est épais, plus la goutte doit être importante.

Il est généralement conseillé dans la littérature, pour les dissociations, d'utiliser des objets relativement mous afin d'éviter le bris de la lamelle. Un morceau de polystyrène expansé tenu à la main ou un marteau à dissocier (gomme plantée à l'extrémité d'une aiguille à disséquer) sont les instruments les plus répandus. L'utilisation de tels ustensiles, bien que protégeant la lamelle, est à déconseiller, car la dissociation est alors très longue. Un objet dur manié avec délicatesse est beaucoup plus efficace. Il faut cependant éviter absolument d'observer avec un objectif à immersion une préparation dont la lamelle est altérée, car celle-ci risquerait de rayer la lentille frontale de l'objectif. De plus, le contact des réactifs est dangereux pour ces objectifs.

D'autres techniques de dissociation sont proposées dans la littérature : certains conseillent d'appuyer simplement sur la lamelle avec l'ongle, d'autres préconisent de procéder à une dilacération aux aiguilles avant la dissociation proprement dite. Ces techniques donnent généralement des résultats moins satisfaisants, ou sont plus difficiles et plus coûteuses (comme la dissociation ultrasonique) à mettre en œuvre.

2.2. Observation de matériel desséché.

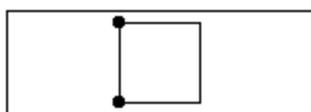
La dissociation d'un exsiccatum ⁽¹⁾ est légèrement plus complexe que celle d'un exemplaire frais, car il faut regonfler et ramollir le matériel sec avant de le dissocier. Elle est cependant tout aussi efficace.

- Réaliser le prélèvement de l'échantillon comme décrit plus haut, puis le déposer dans le mélange de Cendrier contenu dans une boîte de Pétri fermée. Laisser les tissus se regonfler durant 5 min.
- Transférer, au centre d'une lame porte-objets, le fragment régénéré et absorber le plus gros du liquide autour des tissus à l'aide du coin roulé en mèche d'un linge fin, propre et sec (mouchoir en papier blanc, non parfumé).
- Couvrir le fragment d'une goutte de rouge Congo ammoniacal, puis d'une lamelle. La suite des opérations se déroule exactement comme décrit plus haut.

Les constituants du mélange de Cendrier étant diversement volatiles, il est absolument indispensable de le remplacer régulièrement (toutes les heures au moins), et de refermer la boîte de Pétri directement après utilisation. Comme pour les dissociations de matériel frais, il peut être nécessaire d'utiliser un autre réactif que le rouge Congo ammoniacal. Une incompatibilité chimique (sans danger pour le manipulateur !) avec le mélange de Cendrier est alors possible. Il faudra dans un tel cas se contenter de dissocier le fragment sans le régénérer au préalable.

Il est d'usage, en mycologie, de dissocier directement le fragment à observer dans le rouge Congo ammoniacal, sans passer par le mélange de Cendrier. C'est certainement une erreur car, bien que les deux réactifs aient en commun un bon pouvoir regonflant, le mélange de Cendrier ramollit et éclaircit mieux les tissus que le rouge Congo ammoniacal. Celui-ci reste cependant indispensable pour la dissociation et l'observation car, en colorant les tissus, il augmente le contraste et améliore ainsi la netteté de l'image. Une observation dans le mélange de Cendrier est de toute façon exclue car celui-ci s'étale sur la lame porte-objets plutôt que de rester sous la lamelle. De plus, contenant de l'éther, il s'évapore très rapidement, ce qui contraint l'observateur à le remplacer continuellement.

Voici l'aspect final général d'une préparation extemporanée par dissociation. Les points noirs représentent les gouttes de paraffine.



3. Préparation des réactifs.

Ces produits doivent être stockés dans des flacons hermétiques en verre brun, avec ou sans compte-gouttes, à la température du laboratoire.

3.1. Le rouge Congo ammoniacal.

Mélanger dans un erlenmeyer:

- . Rouge Congo (C.I. ⁽²⁾ 22 120) 0,1g
- . Ammoniaque ⁽³⁾ concentrée (25% NH₃) 9,9g

Chauffer le mélange au bain marie à 80° C jusqu'à ce qu'il atteigne la température de 35° C, en agitant continuellement avec un thermomètre. Ne jamais dépasser 40° C, sous peine de voir bouillir l'ammoniaque dont la concentration diminuerait alors sensiblement. Une fois les 35° C atteints, retirer l'erlenmeyer du bain marie et le refroidir rapidement sous

⁽¹⁾ **Exsiccatum.** Le séchage des champignons est le moyen de conservation le plus employé en mycologie. Les caractères macroscopiques ne sont pas respectés, mais les particularités microscopiques, elles, le sont parfaitement. Un exemplaire sec est appelé un « exsiccatum ».

⁽²⁾ **C.I.** Numéro du Color Index. En règle générale, on ne doit jamais utiliser un colorant pour lequel on ne connaît pas cette référence.

⁽³⁾ **Ammoniaque.** C'est une solution d'ammoniac (qui est gazeux à la température ambiante) dans l'eau. L'ammoniaque concentrée du commerce correspond généralement à des teneurs de 20 à 30% de NH₃ (g).

un courant d'eau très froide, jusqu'à ce que sa température redescende aux environs de 20° C. Filtrer le mélange dans un entonnoir couvert d'un verre de montre et passé au travers d'un bouchon percé obturant un erlenmeyer propre, de manière à ce que le moins possible de vapeurs s'échappent du liquide, qui sera ensuite transféré dans un flacon hermétique de verre brun dont la capacité est comprise entre 50 et 100ml. Il est très important de bien respecter ces conditions de stockage !

La préparation de ce produit est très pénible en raison de l'ammoniac qui se dégage du liquide lors du chauffage. Ce gaz n'est ni toxique ni inflammable mais seulement irritant. Opérer sous hotte aspirante dans la mesure du possible, sinon au moins dans un local bien aéré.

Ce produit se conserve relativement peu de temps car le colorant retourne vite à l'état de poudre à l'intérieur du flacon. Si tel est le cas au moment de l'emploi, il est indispensable de « régénérer » le colorant. Pour ce faire, desserrer légèrement le capuchon, qui doit néanmoins rester bien fixé sur le flacon (il doit y avoir une légère odeur d'ammoniac aux alentours du bouchon). Plonger ensuite le flacon dans un bain marie à 50° (l'eau du bain doit arriver un peu plus haut que le niveau du liquide intérieur), en agitant continuellement, jusqu'à ce que le colorant commence à peine à bouillir. Le retirer aussitôt du bain et le refroidir rapidement sous un courant d'eau très froide jusqu'à ce que sa température redescende à 20° C environ.

Le liquide devrait être redevenu à peu près limpide. Contrôler régulièrement sa qualité en inspirant prudemment les vapeurs 20 cm au-dessus du goulot. L'odeur d'ammoniac doit être insupportable... Si ce n'est pas le cas, alors il faut remplacer le colorant.

3.2. Le mélange de Cendrier.

Mélanger dans un erlenmeyer en ajoutant dans l'ordre les réactifs:

. Ethanol à 95°	55ml
. Eau distillée	50ml
. Acétate d'éthyle	25ml
. Ether diéthylique	25ml
. Acide acétique	0,25ml

Tenir compte du fait que l'éther s'évapore très rapidement !

4. Bibliographie ⁽¹⁾.

DE IZARRA, Z.: Introduction à l'étude microscopique des champignons. Société mycologique du Poitou.
LOCQUIN, M. ET LANGERON, M.: Manuel de microscopie. Masson, 1978.
MARCHAL, N.: Initiation à la microbiologie. Dunod, 1992.

⁽¹⁾ Cet article, revu et augmenté, a été tiré d'un travail beaucoup plus important qui m'a permis de remporter le prix Jacques Kets 1996 de la Société Royale de Zoologie d'Anvers: « *Observation microscopique des Macromycètes.* »