

Quelques réactifs en mycologie.

Partie 1 : Introduction, notions de chimie et généralités.

Didier Baar¹

Table des matières.

PARTIE 1 : Introduction, notions de chimie et généralités.

1. NOTIONS ELEMENTAIRES DE CHIMIE.
 - 1.1. *La matière : atomes, isotopes, molécules et ions.*
 - 1.2. *La chimie minérale et la chimie organique.*
 - 1.3. *La nomenclature et l'écriture des formules chimiques ; notion de fonction.*
 - 1.4. *La mole ; la réaction chimique et son équation ; notion d'équilibre.*
 - 1.5. *Acides et bases ; notion de pH.*
2. GENERALITES.
 - 2.1. *Réactifs macrochimiques.*
 - 2.2. *Réactifs pour la microscopie.*
 - 2.3. *Réactifs mixtes.*

Remarque.

PARTIE 2 : Réactifs pour la macrochimie et réactifs mixtes.

3. REACTIFS POUR LA MACROCHIMIE.
 - 3.1. *Formol pur.*
 - 3.2. *Phénol à 3% dans l'eau bidistillée.*
 - 3.3. *Résine de gaïac à 10% dans l'alcool à 80°.*
 - 3.4. *Soude à 10% dans l'eau bidistillée.*
 - 3.5. *Sulfate de fer, cristal.*
 - 3.6. *Sulfoformol.*
4. REACTIFS MIXTES.
 - 4.1. *Acide sulfurique dilué 2x.*
 - 4.2. *Ammoniaque concentrée.*
 - 4.3. *Potasse à 10% dans l'eau bidistillée.*
 - 4.4. *Vanilline.*

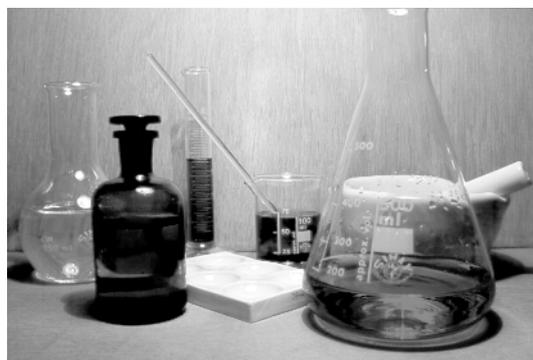
PARTIE 3 : Réactifs pour la microscopie et bibliographie.

5. REACTIFS POUR LA MICROSCOPIE.
 - 5.1. *Acide lactique concentré.*
 - 5.2. *Ammoniaque diluée 2x.*
 - 5.3. *Bleu coton au lactophénol.*
 - 5.4. *Chloral-lactophénol.*
 - 5.5. *Eau bidistillée.*
 - 5.6. *Lactophénol.*
 - 5.7. *Potasse à 5% dans l'eau bidistillée.*
 - 5.8. *Potasse à 2% dans l'eau bidistillée.*
 - 5.9. *Réactif de Melzer.*
 - 5.10. *Rouge Congo ammoniacal.*
6. BIBLIOGRAPHIE.
7. REMERCIEMENTS.

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

L'éventail des méthodes mises en œuvre lors de l'étude des champignons est chaque jour plus étendu. Continuellement, de nouvelles techniques, découvertes généralement dans d'autres disciplines, sont adaptées à la mycologie. C'est le cas, notamment, de la génétique (séquençage des gènes, par exemple), de l'immunologie (étude des maladies cryptogamiques), de la paléontologie (établissement de l'arbre phylogénétique des mycètes¹) et de la biochimie (analyse des protéines et autres métabolites des champignons).

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



C'est dans cette optique que la microchimie et la microscopie ont pris place dans l'éventail des techniques mycologiques. Ces deux grandes méthodes ont maintenant fait leurs preuves dans une large mesure. Toutes deux ont recours – pour ne pas dire qu'elles sont basées dessus – à une large panoplie de réactifs chimiques. Nous nous proposons, après un rappel sommaire des notions élémentaires (mais combien indispensables) de la chimie, d'étudier les plus importants d'entre eux.

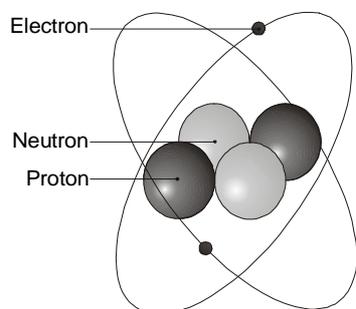
1. Notions élémentaires de chimie.

Dans ce chapitre, la nécessité d'être succinct nous a quelquefois contraint à sacrifier un soupçon (!) de rigueur scientifique et à généraliser quelque peu les faits (c'est toujours le cas lorsqu'il s'agit de vulgarisation, et nous espérons que le lecteur, compréhensif, voudra bien se reporter aux ouvrages de chimie qui seront renseignés dans la bibliographie - voir le fascicule 1/2000 de *Myco* - s'il désire des informations complémentaires). Certains concepts, tels que ceux d'écriture des formules et d'équilibrage des équations chimiques, ou de calcul du pKa des acides et des bases resteront dès lors probablement un peu vagues et devront être admis tels qu'ils sont proposés. Toutefois, pour que le soupçon n'atteigne pas l'ampleur du tantinet, nous nous sommes obstinément refusé à réduire ces notions de chimie à la portion congrue...

Quoi qu'il en soit, il est bien évident que la compréhension de toutes ces notions n'est pas du tout indispensable à une utilisation efficace des réactifs chimiques en mycologie (un bon esprit d'observation suffit). Il est néanmoins intéressant d'appréhender ce que sont les réactifs que tout mycologue utilise quotidiennement, et la manière dont ils agissent. C'est la raison d'être de ce premier chapitre et des introductions qui accompagneront la description de chacun des réactifs, dans les deux parties suivantes de cet article. Les lecteurs que ce premier volet aurait tant soit peu rebutés sont malgré cela invités à découvrir les parties suivantes, qui leur paraîtront certainement moins théoriques...

1.1. La matière : atomes, isotopes, molécules et ions.

La matière est, comme chacun sait, constituée d'atomes et/ou de molécules. Les atomes (voir figure à la page suivante) sont les unités élémentaires des corps simples (ou éléments chimiques) tels que le fer, le néon ou le sodium. On les croyait indivisibles², jusqu'à ce qu'on découvre qu'ils sont tous constitués des mêmes particules fondamentales : les protons (p^+), les neutrons (n^0) et les électrons (e^-). On pourrait pousser plus loin encore le raisonnement, en disant que les protons et les neutrons sont eux-mêmes composés de différents types de quarks...



Cette représentation de l'atome est un peu schématique et désuète, puisque l'on a établi, par la théorie quantique, que les électrons ne circulent pas autour du noyau (ensemble formé par les protons et les neutrons, au centre de l'atome) dans des orbites bien définies telles qu'elles sont tracées ici. L'atome illustré ci-contre compte deux protons et deux électrons : il s'agit de l'hélium (He).

On connaît actuellement plus de cent dix éléments chimiques différents, mais les derniers ont tous été créés artificiellement, et leur durée de vie est très courte. A chacun de ces éléments correspond un type d'atomes, qui diffère de

¹ Voir l'article de J.-M. PIRLOT sur les champignons fossiles (*Myco*, fascicule 2, 1999, pages 35-38).

² Le nom « atome » vient du grec « atomos » : qu'on ne peut pas couper.

ses congénères par le nombre de protons et d'électrons qu'il contient ⁽¹⁾. Ainsi, par exemple, l'atome de soufre, dont le numéro atomique ⁽²⁾ est le seize, contient seize électrons et seize protons, tandis que l'atome de calcium, dont le numéro atomique est le vingt, contient vingt protons et vingt électrons. On peut retourner le problème et dire qu'on reconnaît les atomes au nombre d'électrons et de protons qu'ils contiennent. Deux atomes qui comptent le même nombre de ces particules élémentaires ne sont pourtant pas nécessairement identiques (comme nous allons l'expliquer), mais appartiennent en tout cas au même élément. Ainsi, tous les atomes qui comptent seize protons sont des atomes de soufre, et tous ceux qui en possèdent vingt sont des atomes de calcium.

Outre le nombre de protons et d'électrons, le nombre de neutrons peut aussi varier. Si deux atomes qui comportent le même nombre d'électrons et de protons possèdent un nombre différent de neutrons, ils sont appelés des isotopes. Ainsi, le ³⁵Cl (ou chlore trente-cinq, de numéro atomique 17) comprend 35-17 = 18 neutrons tandis que le chlore trente-sept (³⁷Cl) en possède 20. Pourtant, ces deux types d'atomes sont du chlore. Les différents isotopes d'un élément portent donc tous le même numéro atomique, mais on les caractérise par leur « nombre de masse », qui correspond à la somme du nombre de leurs protons et du nombre de leurs neutrons. Ainsi, le chlore trente-cinq, qui possède dix-sept protons et dix-huit neutrons, a justement trente-cinq pour nombre de masse (c'est là la signification du nombre qui accompagne toujours le symbole et le nom des isotopes). Seuls les isotopes de l'hydrogène possèdent des noms particuliers : on donne couramment à l'hydrogène deux (²H) le nom de deutérium (D), et à l'hydrogène trois (³H) celui de tritium (T). De nombreux isotopes sont radio-actifs (*). Quelques exemples sont repris dans le tableau ci-dessous.

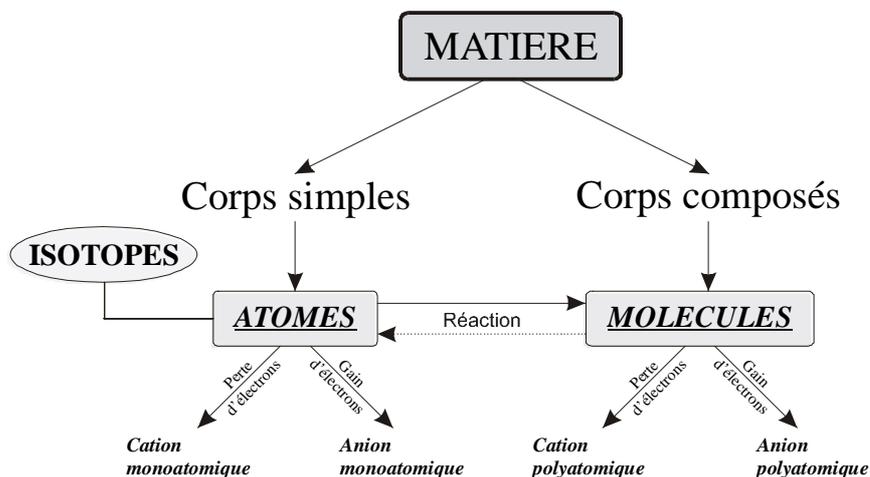
Elément	Symbole	Isotope	Numéro atomique	Nombre de masse	Protons	Neutrons	Electrons
Hydrogène	H	¹ H	1	1	1	0	1
Deutérium	D	² H	1	2	1	1	1
Tritium*	T	³ H	1	3	1	2	1
Molybdène* 93	Mo	⁹³ Mo	42	93	42	51	42
Molybdène 96	Mo	⁹⁶ Mo	42	96	42	54	42
Molybdène 98	Mo	⁹⁸ Mo	42	98	42	56	42
Osmium* 186	Os	¹⁸⁶ Os	76	186	76	110	76
Osmium 187	Os	¹⁸⁷ Os	76	187	76	111	76
Osmium 188	Os	¹⁸⁸ Os	76	188	76	112	76
Osmium 190	Os	¹⁹⁰ Os	76	190	76	114	76
Uranium* 238	U	²³⁸ U	92	238	92	146	92

Si des atomes, appartenant ou non au même élément, s'associent entre eux par l'intermédiaire de liaisons chimiques, ils forment des molécules. Les molécules sont donc les unités élémentaires des corps composés. Par exemple, le dioxyde de carbone (gaz carbonique) que nous rejetons n'est pas constitué d'atomes, mais bien de molécules ; chaque molécule de ce gaz (CO₂) comporte deux atomes d'oxygène (O) liés à un atome de carbone (C). L'eau est aussi composée de molécules. Sa formule est H₂O, ce qui veut dire que chaque molécule d'eau comporte deux atomes d'hydrogène (H) et un atome d'oxygène (O) liés entre eux.

Si, lors d'une réaction chimique, un atome ou une molécule vient à perdre ou à gagner des électrons, il ou elle se transforme en un ion. L'ion sera monoatomique s'il provient d'un atome, et polyatomique s'il dérive d'une molécule. Etant donné que la charge de l'électron est négative, un atome ou une molécule qui perd un ou plusieurs électrons forme un ion positif, ou cation. Si, au contraire, l'atome ou la molécule gagne des électrons, alors la charge de l'ion est négative : il s'agit d'un anion. Cr₂O₇²⁻ est l'anion polyatomique dichromate ; Tl³⁺ est le cation monoatomique thallium (III). Les ions, à la différence des atomes, ne possèdent plus le même nombre d'électrons que de protons, mais on peut quand même les reconnaître à leur nombre de protons qui lui, en dehors de la chimie nucléaire, est invariable.

¹ Un atome, tant qu'il n'est pas devenu un ion, est électriquement neutre. Etant donné que la charge de l'électron est négative mais équivaut, en valeur absolue, à celle du proton (qui est positive), et sachant que la charge du neutron (qui est neutre) est nulle, le nombre d'électrons que possède un atome doit nécessairement être égal au nombre de protons qu'il contient.

² C'est le numéro du célèbre tableau périodique des éléments de Mendeleev.

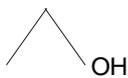
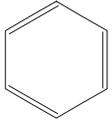
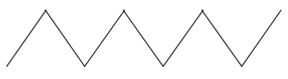
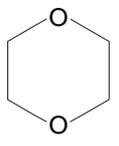
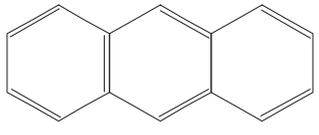


1.2. La chimie minérale et la chimie organique.

On a pris l'habitude de scinder la chimie en deux grandes disciplines : la chimie minérale et la chimie organique. La première étudie tous les éléments minéraux et leurs réactions ; elle est plus générale que la seconde. La chimie organique, quant à elle, ne considère que les molécules « organiques », c'est-à-dire toutes - ou presque ⁽¹⁾ les molécules qui contiennent du carbone. La chimie organique est à la base de la biochimie.

En fait, le carbone possède des propriétés ⁽²⁾ qui lui permettent une variété infinie de combinaisons. On compte en millions le nombre de molécules organiques différentes connues à ce jour. L'immense majorité des molécules (comme les protéines, les lipides, les glucides, les acides nucléiques et les vitamines) dont sont construits et grâce auxquelles fonctionnent les organismes vivants sont des molécules organiques.

On distingue encore deux domaines au sein de la chimie organique : la chimie aliphatique, et la chimie aromatique. La chimie aliphatique traite des molécules linéaires (comme l'acide formique, l'octane, l'acétone ou l'éthanol) et de certaines molécules cycliques (telles que le cyclopentane, le dioxane, l'adamantane ou le tétrahydrofurane), tandis que la chimie aromatique ne relève « que » des molécules cycliques (le type de ces molécules est le benzène, mais on peut citer aussi le toluène, l'anthracène ou le phénol) répondant à une série de critères bien déterminés, et notamment la présence de nombreuses liaisons doubles. Malgré cette restriction *a priori* importante, la chimie aromatique a un poids au moins aussi lourd que la chimie aliphatique.

Composés aliphatiques		Composés aromatiques
<i>LINÉAIRES</i>	<i>CYCLIQUES</i>	
 Ethanol	 Cyclopentane	 Benzène
 Octane	 Dioxane	 Anthracène

Pour comprendre cette figure, il faut savoir que, dans le type de représentation choisi pour les molécules-exemples, à chaque angle ou extrémité des molécules se trouve un atome de carbone (C), sauf si un autre atome ou groupe d'atomes (que l'on appelle « fonction ») y est indiqué. Les traits correspondent, quant à eux, aux liaisons chimiques (les traits doubles signalent les liaisons doubles). D'autre part, on ne dessine les atomes d'hydrogène (H) que s'ils font partie d'une fonction chimique (les fonctions chimiques seront définies dans la section suivante). Ces schémas montrent bien la différence entre molécules linéaires et molécules cycliques, dont les atomes (au moins dans une partie de la molécule), sont enchaînés les uns aux autres et forment un anneau.

¹ Quelques rares composés du carbone (les plus simples, en fait), ne sont généralement pas considérés comme des molécules organiques. Tel est le cas du CO (monoxyde de carbone), du CO₂ (dioxyde de carbone), des carbonates (ion CO₃²⁻) et hydrogénocarbonates (ion HCO₃⁻), du graphite et du diamant, etc.

² La plus remarquable propriété du carbone est de pouvoir former quatre liaisons semblables ou différentes, avec lui-même ou avec d'autres éléments.

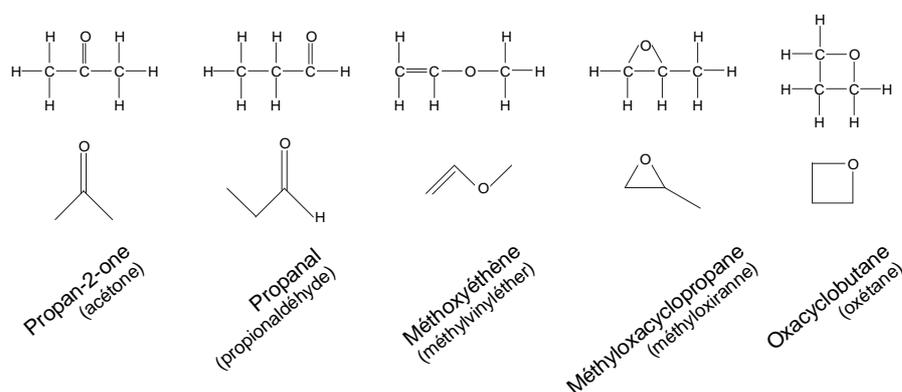
Nous l'avons déjà souligné, l'élément central de la chimie organique est le carbone (C). Toutefois, d'autres atomes ont un rôle capital en chimie organique : l'hydrogène (H), l'oxygène (O) et l'azote (N), principalement, mais aussi le soufre (S) et le phosphore (P), et, accessoirement, le chlore (Cl), le brome (Br), l'iode (I), etc.

1.3. La nomenclature et l'écriture des formules chimiques ; notion de fonction.

Tout comme les champignons, les corps chimiques sont soumis à des règles de nomenclature très strictes. Cela permet de ne pas attribuer deux noms différents au même composé, et, à l'inverse, de ne pas donner le même nom à deux substances différentes. D'autre part, l'énorme avantage du système actuel de nomenclature ⁽¹⁾ est qu'il permet, à partir du nom d'un composé, d'en retrouver la formule et vice-versa. En effet, l'ancienne nomenclature était fondée sur des noms enchanteurs (formol, vanilline, thymol, etc.) mais peu évocateurs de la composition de la molécule qu'ils nommaient.

Outre par des noms, les produits chimiques sont donc, comme chacun sait, désignés par des formules, qui peuvent être plus ou moins détaillées. Les formules dites « brutes » indiquent la composition de la molécule en atomes, mais ne livrent aucune indication sur la disposition spatiale et relative de ces atomes. Au contraire, les formules développées donnent une idée de la géométrie de la molécule considérée. Cela permet de distinguer entre eux les isomères. Deux isomères sont deux molécules qui possèdent la même formule brute, et donc la même composition en atomes, mais dont la disposition spatiale (donc la formule développée) est différente. En règle générale, plus les molécules sont compliquées, plus elles possèdent d'isomères.

Isomères de formule brute C_3H_6O



Cette figure illustre cinq (il en existe d'autres) des isomères de l'acétone, une molécule très simple qui répond à la formule brute C_3H_6O . Chaque molécule est représentée de deux manières différentes et est identifiée par deux noms : le premier est le nom correct (en accord avec les règles de l'IUPAC), tandis que le second est l'un des noms les plus courants (il existe, comme en mycologie, de nombreux synonymes). Toutes ces molécules, bien que leur formule brute soit la même, possèdent des propriétés physico-chimiques complètement différentes !

L'écriture des formules chimiques répond elle aussi à une série de règles bien précises. Prenons l'exemple de l'acide sulfurique, H_2SO_4 . Les lettres correspondent aux symboles des atomes : dans notre formule, H indique la présence d'hydrogène, S celle de soufre et O celle d'oxygène. Les chiffres en indice se rapportent au symbole qui les précède, et indiquent le nombre d'atomes de cet élément que contient chaque molécule. Toute molécule d'acide sulfurique compte donc deux atomes d'hydrogène, quatre atomes d'oxygène et un atome de soufre (lorsqu'un élément n'est représenté, comme le soufre dans notre exemple, que par un seul atome, il n'est pas nécessaire de le préciser ; c'est pour cela que la formule est H_2SO_4 et non pas $H_2S_1O_4$).

Lorsqu'une seconde formule suit la première et qu'un point les sépare, il s'agit de molécules d'« accompagnement ». Par exemple, le sulfate de fer (II) heptahydraté s'écrit $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ parce que chaque molécule de sulfate de fer (II) est accompagnée de sept (ce qu'indique le nombre qui suit le point) molécules d'eau : on parle de l'eau d'hydratation.

On est parvenu à identifier une série de fonctions chimiques, qui sont à la base de la nomenclature actuelle. En chimie organique, on parle de fonctions pour désigner des groupements caractéristiques d'atomes, qui font partie de nombreuses molécules, et qui donnent à toutes les molécules qui les portent une série de propriétés communes. Par exemple, un alcool est une molécule qui comporte une fonction alcool (c'est-à-dire un groupement -OH) ; une amine est une substance qui présente une fonction amine (-NH₂). Le tableau qui suit reprend les principales fonctions de la chimie organique qui seront rencontrées dans la suite de cet exposé. Il existe une multitude d'autres fonctions que celles qui

¹ L'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) est l'organisme responsable de la nomenclature des corps chimiques.

sont reprises dans ce tableau : des courantes (amine, ester, amide, nitrile, cétone, etc.) et de moins courantes (imide, thioester, imine, etc.).

Nom de la fonction :	Groupement :	Exemple :
Halogénure	C-X (X = F, Cl, Br ou I)	Chloral
Alcool	C-OH	Ethanol
Ether	C-O-C	Méthoxyéthène
Aldéhyde	-CHO	Propanal
Acide carboxylique	-COOH	Acide lactique

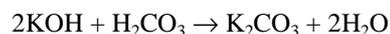
Les fonctions, en chimie minérale, sont nettement moins variées, puisqu'on se limite généralement à quatre : acide, base, oxyde et sel. Nous détaillerons par la suite les acides et les bases, qui sont les plus importants. Tous deux dérivent des oxydes, et le produit de la réaction entre une base et un acide est un sel.

1.4. La mole ; la réaction chimique et son équation ; notion d'équilibre.

La taille des atomes et des molécules étant extrêmement réduite - pour les atomes, elle se mesure en picomètres (¹) -, la moindre réaction chimique ne s'exerce pas entre dix, mille, ni même un milliard d'atomes ou de molécules, mais le plus souvent au moins entre des milliers de milliards de milliards (un avec vingt et un zéros derrière). Pour ne pas avoir à travailler avec des nombres aussi encombrants, une unité très importante a été définie en chimie : la mole. Une mole correspond à $6,02252 \cdot 10^{23}$ (602 252 avec dix-huit zéros derrière) molécules ou atomes, selon la substance. Ce nombre est la constante d'Avogadro.

Nous venons de soulever l'idée que des substances chimiques pouvaient réagir entre elles pour donner naissance à d'autres corps. Toutefois, en dehors de la chimie nucléaire, il est impossible de transformer un élément chimique en un autre (eh non, la pierre philosophale n'a toujours pas été découverte !). Une réaction chimique ne fait que réarranger, redistribuer les atomes : elle peut transformer les molécules en d'autres molécules, les molécules en atomes ou les atomes en molécules, mais est totalement incapable de transformer les atomes en d'autres atomes, malgré qu'elle puisse provoquer la transformation d'ions en d'autres ions (²)...

Lors des réactions, on distingue les réactifs et les produits : les réactifs sont les substances que l'on met en présence en vue d'obtenir une réaction, et les produits sont les corps que l'on récupère au terme de la réaction (³). La réaction, en chimie, est représentée par une équation : les réactifs sont inscrits à gauche de la flèche, tandis que les produits sont inscrits à droite. Chaque substance est précédée d'un chiffre, que l'on appelle « coefficient stoechiométrique ». Il indique le nombre de moles de chaque réactif qui sont nécessaires pour que la réaction soit complète (en théorie !) et le nombre de moles de chaque produit qui seront récupérées en fin de réaction (si elle était complète). Illustrons ceci par un exemple :



Dans la réaction entre la potasse et l'acide carbonique (qui provient du « gaz carbonique » de l'atmosphère), deux moles de potasse (KOH) réagissent avec une mole d'acide carbonique (H₂CO₃) pour donner une mole de carbonate de potassium (K₂CO₃) et deux moles d'eau (H₂O).

Dans notre réaction, la flèche simple devrait être remplacée par une double flèche {↔ (⁴)}. Il n'existe en effet aucune réaction qui aille « jusqu'au bout », comme disent les chimistes, c'est-à-dire aucune réaction au terme de laquelle l'entière des réactifs a été transformée en produits. La simple flèche n'est acceptable que du point de vue théorique, sur papier, tandis que la flèche double exprime ce qui se passe véritablement lors de l'expérience. Elle symbolise l'équilibre auquel est limitée toute réaction chimique.

Cet équilibre peut être plus ou moins « déplacé vers la droite », selon le langage consacré. Plus l'équilibre est déplacé vers la droite et plus la réaction est complète, c'est-à-dire plus la quantité de produits récupérés sera proche du maximum prévu par l'équation théorique. Concrètement, l'équilibre est atteint au moment où la quantité de produits qui se forment à partir des réactifs est égale à la quantité de produits qui disparaissent pour reformer les réactifs. Les réactions chimiques peuvent en effet toujours s'effectuer dans les deux sens même si, généralement, l'un des deux sens est largement favorisé par rapport à l'autre. Pour bien comprendre cela, il faut se défaire de l'idée trop largement répandue qu'une réaction chimique est un phénomène statique. La réaction est un processus dynamique...

¹ Un picomètre (pm) correspond à un millième de milliardième de mètre : $1 \text{ pm} = 10^{-12} \text{ m}$. On pourrait dire aussi que le picomètre est la millionième partie du micromètre (μm), qui est lui-même la millionième partie du mètre (m).

² Une réaction peut, par exemple, transformer l'ion ferreux (Fe²⁺) en ion ferrique (Fe³⁺) : $\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$; ces deux ions, malgré que leur charge est différente, sont bel et bien des ions « fer ». D'ailleurs, tous deux peuvent se retransformer en fer métallique par les réactions suivantes : $\text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}$ et $\text{Fe}^{3+} + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}$.

³ Dans les réactions qui conduisent à un dégagement gazeux, on a coutume de démarquer le produit gazeux en faisant suivre sa formule, dans l'équation de la réaction, par une flèche verticale orientée vers le haut. Par exemple, l'action de l'acide chlorhydrique (HCl) sur le calcaire (CaCO₃) libère du gaz carbonique (CO₂), ce qui se traduit par : $\text{CaCO}_3 + 2\text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{CO}_2 \uparrow + \text{H}_2\text{O}$.

⁴ En vérité, la double flèche figurée ici est à l'envers, mais les voies de la typographie sont impénétrables...

1.5. Acides et bases ; notion de pH.

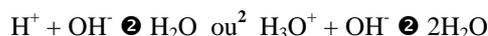
Il existe trois théories qui définissent les acides et les bases, et interprètent les réactions qui se produisent entre eux : la théorie d'Arrhenius, celle de Bronsted-Lowry et enfin celle de Lewis. Nous n'étudierons que la première, qui est la plus simple mais qui, malheureusement, comporte des lacunes. Arrhenius considère qu'une substance est un acide si, en solution dans l'eau, elle libère des ions hydrogène¹ (H^+) : HCl (l'acide chlorhydrique), H_2SO_4 (l'acide sulfurique), H_3PO_4 (l'acide phosphorique) et H_2CO_3 (l'acide carbonique) sont tous les quatre des exemples d'acides :



A l'opposé, une substance est une base si, en solution aqueuse, elle libère des ions hydroxyde (OH^-). La potasse (KOH) et la soude (NaOH) sont des bases dites d'Arrhenius :



L'acide et la base sont opposés en ce sens qu'ils peuvent se neutraliser l'un l'autre en libérant de l'eau et en formant un sel. En effet, H^+ et OH^- , qui sont les deux ions « constitutifs » de l'eau, peuvent réagir entre eux :



Prenons comme exemple la réaction entre l'acide chlorhydrique (HCl) et la potasse (KOH), qui conduit à la libération d'eau (H_2O) et à la formation d'un sel (KCl) qui, en l'occurrence, est le chlorure de potassium :



Nous avons souligné dans ce qui précède que les ions H_3O^+ sont responsables du caractère acide, et les ions OH^- du caractère basique. Une solution qui contient beaucoup d'ions H_3O^+ et peu d'ions OH^- est donc acide, tandis qu'à l'inverse, une solution qui contient beaucoup d'ions OH^- et peu d'ions H_3O^+ est basique. Mais une solution contient toujours les deux types d'ions, et le produit de leurs concentrations (on symbolise une concentration par des crochets) est constant :

$$[H^+] \times [OH^-] = 10^{-14} \text{ mol}^2\text{l}^{-2} = \text{constante}^3$$

Comme ce produit, que l'on appelle « produit ionique de l'eau », est constant, une solution qui contient beaucoup d'ions hydronium contiendra peu d'ions hydroxyde, et inversement. Cette relation permet de ramener l'acidité et la basicité à la concentration en ions hydronium : une solution acide contient beaucoup d'ions H_3O^+ , tandis qu'une solution basique en contient peu. Voilà donc la notion de basicité rapportée à celle d'acidité.

La mesure de la concentration en ions H_3O^+ permet, dès lors, une évaluation de l'acidité d'une solution. On dira d'une solution qu'elle est acide si elle contient plus de 10^{-7} moles d'ions hydronium par litre. Au contraire, elle est basique si sa concentration en ions H_3O^+ est inférieure à 10^{-7} moles par litre. La concentration de 10^{-7} moles par litre en ions hydronium correspond, on l'aura compris, à la neutralité ; une solution est neutre si elle n'est ni acide ni basique : c'est le cas de l'eau pure.

Les exposants négatifs, qui compliquent les calculs, sont éliminés par le calcul du pH, qui correspond à l'opposé du logarithme en base dix de la concentration en ions hydronium :

$$pH = -\log [H_3O^+]$$

Plus un nombre est grand, plus son logarithme est grand ; dès lors, d'après la relation qui précède, on voit que plus la concentration en ions hydronium d'une solution est élevée, moins son pH est grand. Ainsi donc, une solution dont le pH est de 1 est très acide, tandis qu'une solution dont le pH est de 13 est très basique. L'échelle de pH courante s'étend de 0 à 14, mais des valeurs négatives ou supérieures à 14 sont possibles.

Pour terminer, disons que tous les acides n'ont pas une force équivalente : on les classe habituellement en acides « forts » et en acides « faibles ». La force d'un acide correspond à la facilité avec laquelle il libère des ions hydronium, et donc plus un acide est fort, plus faible sera la quantité nécessaire de cet acide pour acidifier nettement une solution. De même, une base est d'autant plus forte qu'elle libère plus facilement des ions hydroxyde.

¹ En vérité, l'ion H^+ n'existe pas tel quel dans l'eau : il s'associe à une molécule d'eau pour former une sorte d'ion complexe H_3O^+ que l'on appelle ion hydronium : $H^+ + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+$. Toutefois, en pratique, que l'on parle d'ion hydronium ou que l'on se limite à l'ion hydrogène, cela change peu de choses. Seules les équations chimiques sont un peu différentes, puisque la dissolution d'un acide dans l'eau ne peut plus s'écrire, par exemple : $HCl \rightleftharpoons H^+ + Cl^-$, mais doit s'écrire $HCl + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + Cl^-$. Cette dernière équation est en fait la somme membre à membre des deux équations $HCl \rightleftharpoons H^+ + Cl^-$ et

$H^+ + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+$, en simplifiant H^+ , qui se retrouve dans les deux membres (dans une certaine mesure, l'équation chimique se traite comme une équation mathématique, et permet, par exemple, de changer des termes de membre et de réaliser grâce à cela des simplifications).

² Voir note au bas de la page précédente.

³ $\text{mol}^2\text{l}^{-2}$ est l'unité (définie mathématiquement) qui correspond à ce rapport, tout comme « m » est une unité de longueur. Toutes deux sont conformes au S.I. (Système International).

La force des acides et des bases est caractérisée par une constante : la Ka (ou constante d'acidité). Plus la Ka d'un acide est élevée, et plus cet acide est fort, c'est-à-dire plus grande est la facilité avec laquelle il libère ses ions H_3O^+ . Par une relation similaire à celle du calcul du pH d'après la concentration en ions hydrogène, on définit le pKa. Parallèlement au pH, plus petit est le pKa (dont les valeurs s'étalent principalement entre -10 et +35) d'un acide, plus cet acide est fort :

$$pKa = - \log Ka$$

Le tableau de la page suivante reprend quelques acides et bases courants, avec leur(s) pKa respectif(s). En effet, les acides qui présentent la possibilité de libérer plusieurs ions hydronium (ce qui se voit pour beaucoup d'entre eux au nombre en indice qui suit le symbole « H » de l'hydrogène dans leur formule) possèdent autant de pKa différents que d'ions H_3O^+ libérables.

Acide ou base :	Formule :	pKa 1	pKa 2	pKa 3
ACIDES FORTS				
Acide chlorhydrique	HCl	-7		
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	-3	2	
ACIDES FAIBLES				
Acide phosphorique	H ₃ PO ₄	2,1	7,2	11,9
Acide carbonique	H ₂ CO ₃	6,4	10,4	
Acide formique	H-COOH	3,8		
Acide lactique	CH ₃ -CHOH-COOH	3,86		
Acide acétique	CH ₃ -COOH	4,75		
BASES FAIBLES				
Ammoniac	NH ₃	9,2		
BASES FORTES				
Hydroxyde de sodium (soude)	NaOH	15,7		
Hydroxyde de potassium (potasse)	KOH	15,7		

2. Généralités.



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

Une autre manière de classer les innombrables produits utilisés est d'isoler les réactifs véritables du reste. On parlera de réactif lorsqu'un produit conduit à une réaction *a priori* inattendue. Tel est le cas du sulfate de fer, qui est vert mais donne souvent des réactions orange. Le rouge Congo ammoniacal, quant à lui, n'est pas un réactif parce qu'il colore en rouge les éléments qu'on y plonge. Quoi de plus normal ? Il y a cependant ici aussi des cas discutables, en ce sens que certains produits, qui ne sont en général pas des réactifs, peuvent à l'occasion se comporter comme tels. C'est justement le cas du rouge Congo ammoniacal, car on peut dire de certaines structures qu'elles sont congophiles si elles fixent le rouge Congo de manière spectaculaire. C'est la raison qui nous a poussé à utiliser indifféremment les termes « réactif » et « produit » dans la suite de cet exposé.



2.1. Réactifs macrochimiques.

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

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

entre la substance et le champignon : les vapeurs peuvent être suffisantes.

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

Plusieurs facteurs¹ doivent être pris en compte pour une utilisation rationnelle et optimale des réactifs macrochimiques : la partie du champignon sur laquelle le réactif a été appliqué, l'intensité de la réaction, le temps nécessaire à la réaction, et enfin la subjectivité de l'opérateur. En effet, les réactions seront souvent différentes selon que le réactif a été déposé sur la cuticule du chapeau ou sur la chair du stipe, par exemple. Au niveau de l'intensité de la réaction, on distingue souvent par - ou 0 une réaction négative, par + une réaction positive mais faible, par ++ une réaction plus nette, et par +++ une réaction forte. On se contente de ces quatre niveaux parce qu'il est difficile de quantifier précisément l'intensité de la réaction.

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

2.2. Réactifs pour la microscopie.

En microscopie, on utilise aussi bien des réactifs véritables, comme le liquide de Melzer, que des milieux d'observation inertes (ou qui peuvent être considérés comme tels). Le choix d'un milieu d'observation dépend essentiellement de trois facteurs : le groupe auquel appartient le champignon à observer, le type de cellules à mettre en évidence et la destination de la préparation.

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

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

Pour l'utilisation des milieux de montage en microscopie², on dépose une goutte du liquide choisi sur une lame porte-objet, on y transfère le fragment de champignon à observer et on retourne délicatement sur le tout une lamelle couvre-objet sur laquelle une toute petite goutte du milieu de montage aura été déposée, et ce pour éviter l'emprisonnement de bulles d'air. Le fragment à observer peut être une coupe fine, faite en général à la lame de rasoir, ou bien un petit morceau de champignon prélevé à l'aide de pincettes ou d'un scalpel. Dans ce dernier cas, il est nécessaire, pour voir quelque chose, de dissocier le prélèvement dans le liquide d'observation. Pour ce faire, on tapote la surface de la lamelle à l'aide de l'extrémité molle et arrondie d'un bic, par exemple. Dans tous les cas, l'objet destiné à l'observation doit être de très petites dimensions.

2.3. Réactifs mixtes.

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

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

Remarque.

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

¹ Voir l'article de P. OTJACQUES sur les réactions macrochimiques du genre *Russula* (*Bulletin du C.M.L.B.*, fascicule 2, 1995, pages 6-13).

² Voir l'article de D. BAAR sur les préparations par dissociation (*Mycos*, fascicule 3, 1996, pages 3-7).

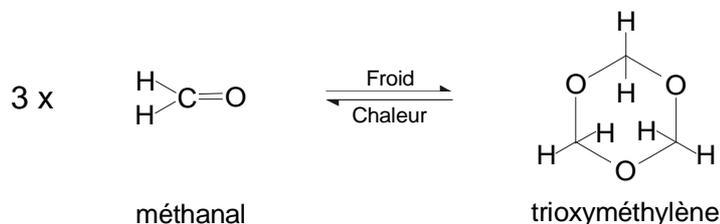
Partie 2 : Réactifs pour la macrochimie et réactifs mixtes.

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

3. Réactifs pour la macrochimie.

3.1. Formol pur.

Ce que l'on appelle communément « formol » est en réalité une solution concentrée d'un gaz : le méthanal, ou aldéhyde formique, ou encore formaldéhyde. Le méthanal (H-CHO) est le plus simple aldéhyde (fonction -CHO) possible, car il ne possède qu'un seul atome de carbone. Il a une odeur peu marquée, mais fortement irritante et a tendance, en solution aqueuse, à polymériser¹, ce qui se traduit par l'apparition de fines lamelles blanches au fond des vieilles solutions. Ces cristaux sont en grande partie constitués de trioxyméthylène - (CH₂O)₃ -, qui résulte de l'assemblage de trois molécules de méthanal en un cycle dont les angles, au nombre de six, sont alternativement occupés par un atome d'oxygène et un atome de carbone. Il est à noter que le trioxyméthylène se décompose en méthanal à la chaleur ; c'était anciennement le moyen employé dans les hôpitaux pour obtenir du méthanal gazeux afin de désinfecter un local, par exemple.



La solution commerciale contient généralement 35-40% de méthanal et est habituellement stabilisée par 10-15% de méthanol (CH₃OH). Le méthanal, au fil du temps, a tendance à s'oxyder en acide formique, ou méthanoïque :



L'acide formique (H-COOH) formé se dissocie suivant l'équilibre :



On voit que des ions hydronium (H₃O⁺), responsables du caractère acide, sont libérés. Le pKa (constante d'acidité) du couple H-COOH/H-COO⁻ est de 3,8 ; l'acide formique est un acide faible, mais suffisant cependant pour donner à la solution de méthanal un caractère sensiblement acide.

• UTILISATION :

Le formol est utilisé dans plusieurs groupes de champignons, et notamment dans la détermination des espèces au sein du genre *Leccinum*. Il provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration rougeâtre sur la chair de *Leccinum scabrum* (d'après BATAILLE, 1969). D'autre part, le formol entre dans la composition de différents réactifs, et, entre autres, du sulfoformol (voir paragraphe 3.6), qui est un réactif sulfoaldéhydique qu'on peut utiliser non seulement en macrochimie, mais aussi en microscopie, quoi que cette dernière application du sulfoformol soit tombée en désuétude depuis un certain nombre d'années.

• DANGERS :

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

¹ La polymérisation est une classe de réactions chimiques qui, d'une manière générale, conduisent à la formation de molécules immenses (les polymères) à partir d'un grand nombre (souvent des milliers) de petites molécules (les monomères), le plus souvent toutes semblables, ou alors de deux types différents. Il existe toutefois de petits polymères, que l'on appelle des oligomères s'ils résultent de l'association de moins d'une dizaine de monomères. Le trioxyméthylène, qui provient de trois molécules de méthanal seulement, est un oligomère.

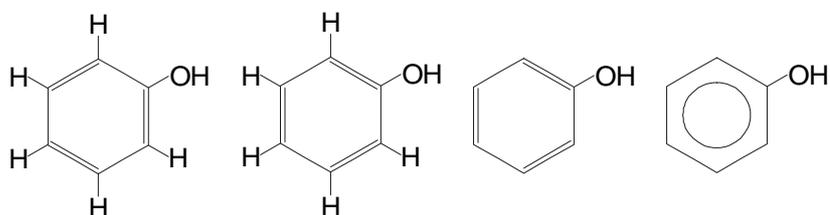
- CONSERVATION :

Le méthanal, cela a déjà été dit, polymérise à la longue en trioxyméthylène. Cette polymérisation est accélérée par le froid et, dès lors, il faut conserver le formol à température ordinaire, et non pas au réfrigérateur, comme il serait préférable de le faire pour de nombreux autres produits¹. Pour éviter au méthanal, qui est un gaz, de s'échapper de la solution (dont la concentration diminuerait si cela arrivait), il est important de garder le formol dans un flacon hermétiquement fermé. Cette précaution permet, de plus, de limiter l'oxydation du méthanal en acide formique par l'oxygène atmosphérique.

3.2. Phénol à 3% dans l'eau bidistillée.

Le phénol (C₆H₅OH) est un des premiers termes de la grande famille des composés aromatiques, qui sont des molécules organiques (c'est-à-dire contenant du carbone), cycliques, et dont l'odeur est souvent assez remarquable, d'où leur nom. Sa structure de base est en effet un cycle à six atomes de carbone liés entre eux alternativement par une liaison simple et par une liaison double : le phénol dérive du benzène. Chacun des atomes de carbone supporte, de plus, un atome d'hydrogène. Dans le phénol, l'atome d'hydrogène d'un des six carbones du cycle benzénique a été substitué par un groupement hydroxyle (-OH). Ce groupement caractérise, en chimie aliphatique (chimie des composés organiques linéaires), les alcools. Les phénols sont donc les pendants aromatiques des alcools ; ils ont des propriétés communes, mais différent néanmoins par de nombreux caractères physico-chimiques.

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



Différentes manières de représenter le phénol.

Anciennement, on désignait le phénol sous le nom d'acide phénique, parce que, mis en présence d'une base forte, il a un comportement semblable à celui des acides (les phénols ont un caractère acide plus marqué que les alcools). Il est en effet, dans ces conditions, capable de former des sels, que l'on appelle des phénolates (ou phénates). Par exemple, avec la soude (NaOH), qui est une base forte, le phénol donne du phénolate de sodium (C₆H₅ONa) :



Le pKa du couple C₆H₅OH/C₆H₅O⁻ est de 9,9 : le phénol est un acide très faible.

- UTILISATION :

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

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

La conservation du phénol, en solution ou non, exige certaines précautions. En effet, la présence de trois liaisons doubles dans la molécule de phénol la rend sensible aux radiations ultraviolettes. Il convient donc de conserver le

¹ Il est préférable, dans pratiquement tous les cas, de conserver les produits chimiques dans des flacons en verre brun, qui les protègent des rayons ultraviolets. Ces derniers ont en effet la propriété de détruire les molécules organiques, et particulièrement celles qui comptent beaucoup de liaisons doubles (comme les colorants, par exemple). Le verre est l'un des matériaux les plus résistants qui soient au point de vue chimique. Les flacons seront, à quelques exceptions près, conservés à l'abri de la lumière, et dans un endroit frais.

phénol à l'abri de la lumière. D'autre part, l'exposition à l'air doit être évitée pour deux raisons : d'abord le phénol est hygroscopique (mais cela n'est vrai que pour les cristaux), et ensuite l'oxygène de l'air le détruit. Aussi, veiller à ce que le flacon soit bien fermé.

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

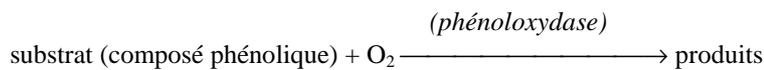
La base de ce réactif est une résine extraite d'arbres d'origine américaine : le *Guajacum officinale* et le *Guajacum sanctum*. Ces deux espèces font partie de la famille des *Zygophyllaceae*. La résine est un mélange complexe contenant principalement (à raison d'environ 70%) les acides α - et β -guaïaconique,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

La résine de gaïac du commerce peut être plus ou moins pure et se présenter sous différentes formes : poudre brune homogène, masses vitreuses rouge-noires ou blocs brunâtres. Elle contient même souvent des restes de bois (fibres, morceaux d'écorce, etc.), qui ne nuisent en rien à la qualité du réactif. Il est d'ailleurs possible d'utiliser le bois de gaïac lui-même, mais l'inconvénient est alors relatif au dosage. La nomenclature pharmaceutique voudrait qu'on appelle soluté le réactif obtenu à partir de la résine pure, et teinture celui qu'on obtient par macération du bois dans l'alcool.

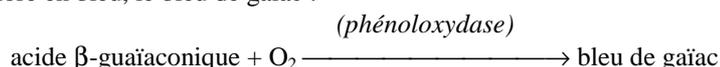
- UTILISATION :

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

D'un point de vue biochimique, la résine de gaïac met en évidence les phénoloxydases. Celles-ci sont des enzymes qui ont la propriété d'oxyder les composés phénoliques grâce à l'oxygène de l'air (O_2). Si on soumet à l'action d'une phénoloxydase (d'origine fongique) un composé phénolique (dit substrat vis-à-vis de l'enzyme) qui lui est adapté, alors on obtient toujours des produits, qui peuvent être colorés ou non :



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



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

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

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

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

3.4. Soude à 10% dans l'eau bidistillée.

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

En solution aqueuse, l'hydroxyde de sodium se dissocie selon l'équilibre suivant :



On voit que des ions hydroxyde (OH⁻), responsables du caractère basique, sont libérés. Le pKa du couple H₂O/OH⁻ est de 15,7 : la soude est une base forte.

- UTILISATION :

La soude (NaOH) à 10% et la potasse (KOH) à 10% (voir paragraphe 4.3) sont des réactifs très proches, et les réactions qu'ils provoquent sont souvent assez similaires. Il est néanmoins des cas où l'une doit être utilisée et pas l'autre. La soude est employée dans plusieurs genres de champignons, mais c'est sans doute lors de la détermination des impénétrables cortinaires qu'on y a le plus souvent recours. La soude provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration noire sur le stipe de *Cortinarius semisanguineus* (d'après BATAILLE, 1969). Certains auteurs conseillent d'employer la soude à une concentration de 40% plutôt que de 10%. C'est pourtant la solution à 10% qui donne les résultats les plus nets, car la solution à 40%, lors des réactions, digère autant la chair des champignons qu'elle ne la colore. Enfin, la soude est utilisée à différentes concentrations (généralement 10%, 5% ou 2%) en microscopie, en tant que succédané de la potasse. C'est un assez bon milieu de montage.

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

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

3.5. Sulfate de fer, cristal.

Il existe deux « variétés » de sulfate de fer : le sulfate ferreux, ou sulfate de fer (II), dont la formule est FeSO₄, et le sulfate de fer (III), ou sulfate ferrique, qui répond à la formule Fe₂(SO₄)₃. C'est l'état d'oxydation¹ de l'atome de fer qui est responsable des différentes variétés. Dans le FeSO₄, le fer est à l'état +2 (Fe²⁺ ; ion ferreux), c'est-à-dire qu'il a perdu deux électrons, tandis que dans le Fe₂(SO₄)₃, il en a perdu trois ; le fer est alors à l'état +3 (Fe³⁺ ; ion ferrique).

C'est le sulfate ferreux que l'on utilise en mycologie. Celui-ci peut être soit anhydre (libre de toute molécule d'eau), soit hydraté. C'est la forme hydratée, que l'on appelle aussi cristallisée, qui est la plus employée. En effet chaque molécule de sulfate de fer (II), en cristallisant, capture sept molécules d'eau : on parle de sulfate ferreux heptahydraté (FeSO₄.7H₂O). Ce corps est susceptible, avec le temps, de perdre ses molécules d'eau, et donc de se déshydrater : c'est l'efflorescence des cristaux.

Le sulfate ferreux se présente sous forme de petits cristaux verts à l'état hydraté, et d'une poudre blanchâtre à l'état anhydre. Le sulfate ferrique, quant à lui, a une couleur rouille. Le sulfate ferreux s'ionise en solution aqueuse selon l'équilibre suivant :



Et le Fe²⁺ (ion ferreux) s'oxyde très facilement en ion ferrique :



C'est pour cela que les solutions de sulfate ferreux virent en quelques temps du vert au rouille. C'est pour cela également que l'on préfère utiliser le cristal de sulfate ferreux, qui s'oxyde beaucoup moins rapidement que la solution.

- UTILISATION :

Pour l'utilisation, il suffit de frotter le cristal sur la partie du champignon à tester. Certains auteurs conseillent l'utilisation de la solution à 10% de sulfate de fer. Les réactions que provoque cette solution sont généralement beaucoup plus rapides et plus vives que celles que provoque le cristal, mais la solution ne se conserve que peu de temps ;

¹ L'état (ou étage, ou nombre) d'oxydation d'un atome correspond, *grosso modo*, au nombre d'électrons qu'il a perdus ou gagnés lors de sa transformation (réversible !) en ion. L'atome neutre a toujours un état d'oxydation égal à zéro.

c'est pourquoi, d'une manière générale, le cristal lui est préféré. Le sulfate de fer est surtout employé lors de la détermination des russules, chez lesquelles il provoque des réactions variées ; par exemple chez *Russula nigricans*, dont la chair vire au vert sombre suite à l'application du sulfate de fer (réaction assez lente).

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

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

3.6. Sulfoformol.

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

L'acide sulfurique (H₂SO₄ ; voir paragraphe 4.2) est un acide fort : le pKa du couple H₂SO₄/HSO₄⁻ est de -3. Le formol (voir paragraphe 3.1), quant à lui, est en réalité une solution aqueuse concentrée de méthanal, qui est un gaz à température ordinaire. A la longue, le méthanal a tendance à polymériser en trioxyméthylène - (CH₂O)₃ -, ce qui se traduit par l'apparition de fines lamelles blanches au fond des solutions anciennes.

- UTILISATION :

On utilise le sulfoformol pour l'étude de différents genres, et notamment *Lactarius*, *Russula* et *Tricholoma*. Le sulfoformol provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration bleue sur la chair de *Lactarius pergamenus* (d'après MARCHAND, 1980). C'est le plus utilisé des sulfoaldéhydiques pour la macrochimie. Il a aussi eu quelques applications microscopiques, mais la tendance actuelle, à ce niveau, est en faveur de la sulfovanilline (voir paragraphe 4.1).

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

L'acide sulfurique, même dilué par le formol, reste hygroscopique, c'est-à-dire qu'il a tendance à absorber la vapeur d'eau contenue dans l'atmosphère. Il convient donc de conserver le flacon bien fermé, et à température ambiante (non pas au réfrigérateur), car la polymérisation du formol est favorisée par le froid. Il est préférable de tenir le sulfoformol à l'écart de toutes vapeurs ammoniacales, avec lesquelles l'acide sulfurique réagit pour donner de l'hydrogénosulfate d'ammonium (NH₄HSO₄), puis du sulfate d'ammonium - (NH₄)₂SO₄ -, ce qui pollue le réactif. Dans tous les cas, il est conseillé de renouveler chaque année ce réactif.

4. Réactifs mixtes.

4.1. Acide sulfurique dilué 2x.

L'acide sulfurique (H₂SO₄) est un liquide dense et épais à température ambiante. C'est un acide biprotique, c'est-à-dire qu'en solution aqueuse, il conduit à la formation de deux ions hydronium (H₃O⁺), responsables du caractère acide :



L'acide sulfurique du commerce contient généralement 95-98% de H_2SO_4 . Dilué deux fois, il en contient donc un peu moins de 50%. L'acide sulfurique est un acide fort : le pKa du couple $H_2SO_4/H_2SO_4^-$ est de -3, tandis que l'ion hydrogénéosulfate (HSO_4^-) est un acide plus faible : le pKa du couple HSO_4^-/SO_4^{2-} est de 2.

• UTILISATION :

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

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



Cette photographie, prise au microscope, montre une gléocystide de *Russula aeruginea* qui a été montée dans la sulfovanilline. Le contenu (d'aspect granuleux) de cette cystide a bien été mis en évidence par le réactif, alors que la paroi de la cellule demeure incolore, et donc quasiment invisible.

Pour la microscopie, on n'utilise l'acide sulfurique que sous forme de réactifs sulfoaldéhydiques. La sulfovanilline colore en gris ardoise le contenu des laticifères et des cystides (on parle alors de gléocystides) de nombreux lactaires et russules, ce qui permet de les déceler et de les étudier. Ce réactif est très précieux, notamment, pour la recherche des dermatocystides, qui passent facilement inaperçues dans les autres liquides d'observation. On observe également des gléocystides chez certains cortices, tels que *Peniophora* (d'après Jean-Marie PIRLOT, communication orale). On n'utilise pas l'acide sulfurique seul comme milieu de montage parce qu'il détruit les hyphes et donne de très mauvaises préparations.

• DANGERS :

L'acide sulfurique, même dilué, est un réactif extrêmement dangereux car, étant très corrosif, très oxydant et fortement déshydratant, il détruit la plupart des matières organiques. De nombreux plastiques sont attaqués par lui. Il faut donc absolument éviter tout contact avec la peau et, *a fortiori*, avec les yeux ou la bouche. Garder présent à l'esprit que la moindre goutte d'acide sulfurique, même sensiblement dilué, qui tombe sur un vêtement, provoque à coup sûr l'apparition d'un trou. En ce qui concerne la dilution, il faut savoir que le mélange de l'acide sulfurique avec l'eau s'accompagne d'un important dégagement de chaleur. Aussi, il existe une règle d'or qu'il faut observer lors de la dilution de l'acide sulfurique : verser l'acide dans l'eau (et par petites quantités, en agitant) et non pas l'inverse ; on risquerait de voir l'eau bouillir et l'acide jaillir de tous côtés. Enfin, il faut éviter de mélanger l'acide sulfurique avec des bases (ammoniaque, soude, potasse), car la réaction pourrait être assez violente.

• CONSERVATION :

L'acide sulfurique doit être conservé dans un flacon en verre, muni d'un bouchon en plastique résistant. Dilué, il reste hygroscopique. Il convient donc de garder le flacon bien fermé. D'autre part, il est préférable de tenir l'acide sulfurique éloigné des vapeurs ammoniacales, avec lesquelles il réagit pour donner de l'hydrogénéosulfate d'ammonium - NH_4HSO_4 -, puis du sulfate d'ammonium - $(NH_4)_2SO_4$ -, ce qui le pollue.

4.2. Ammoniaque concentrée.

L'ammoniaque est une solution aqueuse concentrée d'ammoniac (NH_3), qui est un gaz à l'odeur extrêmement irritante. Les solutions commerciales contiennent généralement entre 20 et 30% de ce gaz. L'ammoniac en solution réagit avec l'eau selon l'équilibre suivant :



Et l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) formé se dissocie comme suit :



On voit qu'il y a libération d'ions hydroxyde (OH⁻), qui confèrent à la solution d'ammoniac son caractère basique (au sens d'Arrhénius). Le pKa du couple NH₄⁺/NH₃ est de 9,2 seulement : l'ammoniaque est une base faible.

- UTILISATION :

On peut, pour son utilisation en macrochimie, déposer une petite goutte d'ammoniaque sur la partie du champignon à tester, ou bien exposer celle-ci aux vapeurs qui se dégagent du flacon, quoique cette dernière méthode soit moins efficace et moins couramment employée. L'ammoniaque donne, par exemple, une belle réaction rose violacé sur les tubes de *Daedaleopsis confragosa*. On l'utilise également pour l'étude des *Xerocomus*, ainsi que pour de nombreux autres genres.

Du côté de la microscopie, l'ammoniaque concentrée a le pouvoir de ramollir les hyphes de champignons frais et de regonfler les exsiccata. C'est, de plus, le solvant de colorants tels que le rouge Congo ou, anciennement, le vert d'anhracène. L'ammoniaque est très volatile, aussi faut-il en ajouter souvent lors de l'observation d'une préparation microscopique. C'est en général un très bon milieu de montage, mais il faut savoir qu'il dissout certains éléments comme les incrustations acido-résistantes de la cuticule des russules, et qu'il altère quelquefois la couleur des pigments. On l'utilise d'autre part pour l'étude des chrysocystides (cystides dont le contenu vire au jaune sous l'action des bases ; voir paragraphe 5.10 dans le prochain numéro de *Myc'*) dans des genres comme *Hypholoma* ou *Stropharia*, notamment. De même, les cystides de certains *Inocybe* jaunissent dans l'ammoniaque à des degrés divers, ce qui est intéressant pour leur identification (d'après Jean-Marie PIRLOT, communication orale). Enfin, certains auteurs préfèrent diluer deux fois l'ammoniaque, car son action sur les hyphes est alors moins drastique, et elle peut dès lors être appliquée au montage d'objets plus délicats.

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

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

4.3. Potasse à 10% dans l'eau bidistillée.

La potasse (KOH), en vérité hydroxyde de potassium, se présente sous forme de pastilles blanches, tout comme la soude. Les propriétés de ces deux corps sont d'ailleurs pratiquement identiques ; c'est pourquoi elles ne seront par reprises ici (se reporter au paragraphe 3.4). Quelques points toutefois différencient ces deux hydroxydes, notamment - c'est évident - l'équilibre de dissociation dans l'eau, qui est le suivant pour la potasse :



Même le pKa de la potasse est identique à celui de la soude. C'est logique puisque, en réalité, c'est le pKa d'un des deux couples de l'eau (couple H₂O/OH⁻) ; il vaut 15,7 : toutes deux sont des bases fortes.

- UTILISATION :

Les utilisations macrochimiques de la potasse sont elles aussi semblables à celles de la soude (voir paragraphe 3.4). La potasse fait par exemple virer au rouge violacé la chair de *Cortinarius violaceus* (d'après BATAILLE, 1969). Certains auteurs préfèrent la solution de potasse à 40% - avec l'inconvénient que l'on sait.

Du point de vue de la microscopie, la concentration en potasse la plus utilisée est, en fait, non pas de 10% mais de 5%. La solution à 5% (voir paragraphe 5.7 du numéro suivant de *Myc'*) convient bien pour la plupart des observations. A 10%, on utilise la potasse pour l'étude des champignons très durs, tels que les polypores et les croûtes, qui peuvent résister très longtemps à la dissociation dans la potasse à 5%. Plus concentrée, la solution à 10% exerce une action beaucoup plus rapide. Mais elle présente, d'un autre côté, le désavantage d'être très agressive et de dissoudre certains éléments, tels que l'ornementation des spores de certains ascomycètes. Il ne faut donc l'utiliser que pour les polypores et les croûtes, quoiqu'elle puisse être intéressante lors de l'observation des champignons gélatineux (*Auricularia*, *Tremella*), parce que la potasse concentrée liquéfie les mucilages, ce qui est d'un grand secours lors de la dissociation.

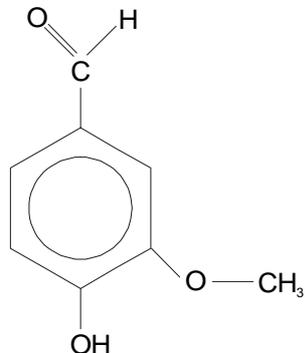
Globalement, la potasse offre les avantages de regonfler les exsiccata et de ramollir les tissus, mais elle altère souvent les cellules. C'est finalement un assez bon milieu d'observation, mais dont il faut se servir avec une certaine

circonspection. On utilise aussi, quelquefois, une solution à 2% (voir paragraphe 5.8 du prochain numéro) qui est encore plus douce que la solution à 5%.

- DANGERS ET CONSERVATION :

La potasse présente les mêmes dangers que la soude (voir paragraphe 3.4). Les recommandations relatives à la conservation de la potasse sont les mêmes que pour la soude. Le sel qui précipite suite à la réaction entre l'hydroxyde de potassium et le gaz carbonique est le carbonate de potassium (K_2CO_3).

4.4. Vanilline.



Vanilline

La vanilline est une poudre blanche à la forte odeur de vanille. Les chimistes organiciens la désignent sous le nom de 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde (formule brute : $C_8H_8O_3$). Elle fait partie de ce que l'on appelle les composés aromatiques parce que sa structure de base est une chaîne hydrocarbonée cyclique à six carbones : la vanilline dérive du benzène. C'est en réalité du benzaldéhyde (benzène pourvu d'une fonction aldéhyde : $-CHO$) dont l'hydrogène du carbone numéro 4 a été substitué par un groupement hydroxyle ($-OH$) tandis que celui du carbone numéro 3 a été substitué par une fonction éther ($-O-$) portant un groupement méthyle ($-CH_3$).

- UTILISATION :

La vanilline est essentiellement utilisée sous forme de sulfovanilline (qui a été traitée avec l'acide sulfurique - voir paragraphe 4.1 -). Si au lieu d'acide sulfurique, on dissout la vanilline dans l'acide chlorhydrique, on obtient de la chlorovanilline, qui est un réactif macrochimique peu utilisé.

- DANGERS :

Additif alimentaire des plus banals, la vanilline n'est pas un produit dangereux ; elle est cependant un peu nocive. Il est préférable d'éviter le contact avec les mains, non pas à cause d'un danger quelconque, mais bien parce que son odeur forte et tenace masque tous les autres parfums, et notamment ceux des champignons... La sulfovanilline, quant à elle, contient de l'acide sulfurique, avec tous les dangers que cela comporte (voir paragraphe 4.1).

- CONSERVATION :

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

Partie 3 : Réactifs pour la microscopie et bibliographie.

5. Réactifs pour la microscopie.

5.1. Acide lactique concentré.

L'acide lactique, de son vrai nom acide 2-hydroxypropanoïque ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$), est un acide carboxylique (fonction -COOH) porteur, sur le carbone numéro 2, d'une fonction alcool (-OH). C'est, en résumé, un acide propanoïque ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$) dont un des hydrogènes du carbone numéro 2 a été substitué par un groupe hydroxyle (-OH). Il existe deux formes d'acide lactique selon celui des deux hydrogènes du carbone 2 qui a été substitué : la forme D et la forme L. Ces deux formes sont, comme nos deux mains, l'image l'une de l'autre dans un miroir sans être superposables : ce sont des énantiomères (du grec *enantios* : opposé)¹.

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



L'ion hydronium (H_3O^+) libéré est responsable du caractère acide de la solution. Le pKa (constante d'acidité) du couple $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}/\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$ est de 3,86 : l'acide lactique est un acide faible.

- UTILISATION :

L'acide lactique concentré est un regonflant très énergique des exsiccata. Son indice de réfraction assez élevé ($n = 1,439$) en fait un bon milieu d'observation pour de nombreux objets, et spécialement pour les spores. Si sa viscosité présente l'inconvénient de rendre la dissociation difficile, elle offre l'avantage de permettre la réalisation de préparations semi-permanentes. Seul, il est relativement peu utilisé, mais il entre dans la composition de plusieurs milieux d'observation de très grande valeur, tels que le lactophénol ou, mieux, le chloral-lactophénol. C'est d'autre part le solvant du bleu de méthyle (ou bleu coton ; voir paragraphe 5.3) dans le colorant dit « bleu lactique ». Enfin, l'acide lactique est quelque peu utilisé en macrochimie.

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

La conservation de l'acide lactique ne pose aucun problème particulier. Il vaut mieux cependant, comme pour tous les acides, éviter de laisser le flacon ouvert lors de la manipulation d'ammoniaque (il se formerait du lactate d'ammonium : $\text{CH}_3\text{-CHOH-COONH}_4$).

5.2. Ammoniaque diluée 2x.

Les propriétés de l'ammoniaque ont déjà été décrites au paragraphe 4.2 (voir numéro précédent de *Mycos*). Etant donné que l'ammoniaque concentrée contient 20 à 30% de NH_3 (qui est le gaz ammoniac), la solution diluée deux fois en contient 10 à 15%. Cependant, la distinction entre solution concentrée et solution diluée deux fois est un peu arbitraire parce que la concentration en NH_3 des solutions diminue rapidement au cours du temps (lorsque le flacon a été ouvert quelques fois), tant l'ammoniac est volatil. Il est bien évident que cette diminution de concentration est beaucoup plus rapide pour la solution concentrée que pour la solution diluée, ce qui fait qu'au bout du compte, la distinction n'est vraiment valable que pour les solutions assez récentes et conservées dans des conditions idéales.

- UTILISATION :

Les utilisations de l'ammoniaque diluée deux fois sont, en ce qui concerne la microscopie, semblables à celles de l'ammoniaque concentrée (voir paragraphe 4.2 dans le numéro précédent de *Mycos*). Néanmoins, diluée deux fois, l'ammoniaque a une action moins forte sur les tissus que la solution concentrée, ce qui permet de l'employer au montage d'objets plus délicats.

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

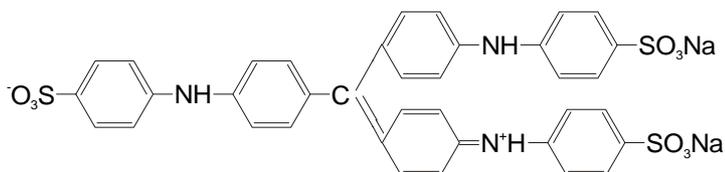
¹ Les énantiomères sont un cas particulier d'isomères. Pour rappel, des isomères sont des molécules qui possèdent la même formule brute, c'est-à-dire la même composition en atomes, mais qui diffèrent par leur formule développée, c'est-à-dire par la disposition spatiale relative de leurs atomes.

• DANGERS ET CONSERVATION :

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

5.3. Bleu coton au lactophénol.

Le vrai nom du bleu coton est le bleu de méthyle (à ne pas confondre avec le bleu de méthylène!). Le numéro du *Color Index* (C.I., c'est la référence internationale en matière de colorants) pour le bleu de méthyle est le 42 780. C'est un dérivé du triphénylméthane : son chromophore (région de la molécule qui est principalement responsable de la teinte) est formé d'un atome de carbone qui porte trois cycles benzéniques substitués (c'est-à-dire que certains de leurs atomes d'hydrogène ont été remplacés par des groupements chimiques). Deux de ces cycles sont liés au carbone central par une liaison simple, le troisième par une liaison double.

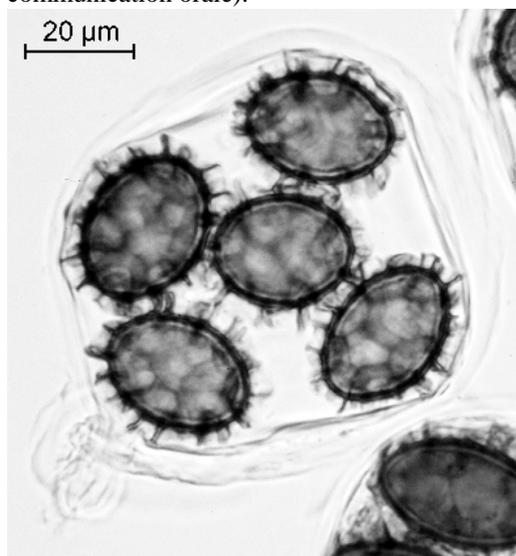


Bleu de méthyle (C.I. : 42 780)

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

• UTILISATION :

Le bleu de méthyle au lactophénol est un bon milieu d'observation pour les champignons. Il ne se fixe pas électivement sur certaines cellules, mais il a la particularité de teinter la paroi de la plupart des hyphes, ce qui en fait un colorant d'usage général. Néanmoins, il met particulièrement bien en évidence les ornements des spores chez les ascomycètes (chez *Scutellinia*, par exemple). D'autre part, c'est aussi un réactif microchimique à proprement parler, en ce sens qu'on peut dire de certaines structures qu'elles sont cyanophiles si elles prennent le bleu de méthyle avec une intensité spectaculaire, ce qui est relativement courant. C'est le cas, notamment, du contenu amorphe des chrysocystides (voir paragraphe 5.10), sur lequel le bleu coton se fixe avec une intensité remarquable (d'après Jean-Marie PIRLOT, communication orale).



Cette photographie, prise au microscope, illustre les propriétés colorantes du bleu de méthyle. Il s'agit d'un asque de Tuber sp. qui a été monté dans le bleu d'aniline au lacto-phénol. Le bleu d'aniline est un colorant extrêmement proche du bleu de méthyle et, comme lui, il se fixe très bien sur l'ornementation des spores de nombreux ascomycètes. Les ornements, qui forment chez cette truffe une sorte de réseau plus ou moins régulier, sont bien mises en évidence sur ce cliché (elles apparaissaient bleu foncé sur l'original).

Pour avoir les meilleures préparations possibles, on a intérêt à colorer les éléments à observer dans ce réactif, mais à les laver et à les monter dans le lactophénol pur. Le contraste s'en trouve augmenté, ce qui est très utile pour la photomicrographie. Le lactophénol (voir paragraphe 5.6) a deux avantages : son indice de réfraction élevé ($n = 1,44$) rend les préparations très transparentes, ce qui facilite leur interprétation (toutefois, le chlorallactophénol lui est encore supérieur à ce point de vue). D'autre part, sa viscosité importante permet de conserver les préparations quelques jours, voire quelques semaines, sans altération : il permet la réalisation de préparations semi-permanentes. Mais cette viscosité est également un désavantage, car la dissociation est très difficile dans ce réactif (à ce point de vue, le bleu de méthyle acétique est supérieur au bleu de méthyle au lactophénol).

Concrètement, le bleu de méthyle au lactophénol n'est donc véritablement intéressant que pour l'observation des spores et des hyphes de champignons frais et bien mous. Le bleu de méthyle est aussi utilisé en solution acétique ou lactique, mais, d'une manière générale, la solution dans le lactophénol leur est préférée. Un chauffage modéré facilite généralement la dissociation, en rendant le milieu plus fluide. De plus, le chauffage accélère et intensifie la coloration. Mais chauffer déforme souvent les hyphes et provoque l'éclatement de certaines spores.

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

Le lactophénoL contient du phénoL, qui est un dérivé du benzène. Sa formule compte trois liaisons doubles (voir paragraphe 3.2) ; il est donc sensible aux radiations ultraviolettes. Quant au bleu de méthyle, s'il est bleu, c'est parce qu'il absorbe les autres couleurs de la lumière visible grâce à ses innombrables liaisons doubles entre atomes. Cette absorption de lumière est susceptible, à long terme, de détruire le colorant. Il faut dès lors conserver le bleu coton au lactophénoL à l'obscurité, dans un flacon en verre (le plastique pourrait être attaqué) fermé hermétiquement (risque d'altération par l'oxygène de l'air et de dilution par absorption de vapeur d'eau).

5.4. Chloral-lactophénoL.

Le chloral-lactophénoL est un liquide visqueux. C'est un mélange de trois substances : hydrate de chloral, phénoL et acide lactique. L'hydrate de chloral, de son vrai nom 2,2,2-trichloroéthane-1,1-diol est une molécule d'éthane ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$) sur laquelle les trois hydrogènes d'un des deux atomes de carbone ont été substitués par des chlores et deux des hydrogènes de l'autre carbone par des fonctions alcool (-OH). Sa formule est donc $\text{CCl}_3\text{-CH(OH)}_2$. C'est un solide blanc, très soluble dans l'eau et à l'odeur forte, caractéristique. Le phénoL (voir paragraphe 3.2) et l'acide lactique (voir paragraphe 5.1) ont déjà été décrits.

- UTILISATION :

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

Sa viscosité lui donne l'avantage de permettre la réalisation de préparations semi-permanentes, sans pour autant rendre la dissociation trop difficile. L'hydrate de chloral, en effet, ramollit très bien les tissus et facilite cette opération. A ce point de vue, comme à beaucoup d'autres, le chloral-lactophénoL est très supérieur au lactophénoL (voir paragraphe 5.6). De plus, il n'est pour ainsi dire pas volatil et ne cristallise pas avec le temps. Cela permet de ne pas avoir à se soucier d'ajouter du milieu de montage en cours d'observation. Enfin, les milieux visqueux sont toujours intéressants pour la photomicrographie, car ils limitent le mouvement des objets au cours de l'exposition, qui peut être de plusieurs secondes.

- DANGERS :

Les dangers sont les mêmes que pour le bleu de méthyle au lactophénoL (voir paragraphe 5.3), si ce n'est que le chloral-lactophénoL contient, en plus, de l'hydrate de chloral, qui est loin d'être un produit inoffensif (il est toxique et irritant). Éviter donc absolument de respirer les vapeurs. Naturellement, le chloral-lactophénoL ne contient pas de bleu de méthyle, ce qui limite (sans les supprimer) les risques de taches sur les vêtements.

- CONSERVATION :

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

5.5. Eau bidistillée.

L'eau bidistillée est une eau qui, comme son nom l'indique, a été distillée deux fois successivement. En principe, elle ne contient donc aucune impureté ; mais en pratique, les gaz de l'atmosphère, tels que le dioxygène (O_2), le diazote (N_2) ou le dioxyde de carbone (CO_2) ont tôt fait de s'y dissoudre. Elle reste néanmoins intéressante parce qu'elle ne contient pas (ou presque pas) de substances minérales telles que le sodium (Na^+), le potassium (K^+), le chlore (Cl^-), le calcaire (essentiellement CaCO_3), etc. En théorie, son pH est de 7.

- UTILISATION :

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

Mais ses inconvénients sont nombreux : elle a un très faible indice de réfraction ($n = 1,333$), ce qui rend les préparations difficilement intelligibles. De plus, comme elle est incolore, les éléments qu'on y observe manquent sensiblement de contraste. D'autre part, elle a tendance à faire gonfler (voire éclater) les hyphes par le phénomène de turges-

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

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

- DANGERS :

L'eau bidistillée ne présente vraiment aucun danger.

- CONSERVATION :

Il convient de conserver l'eau bidistillée dans des flacons bien fermés, et cela pour limiter le plus possible la dissolution du dioxyde de carbone (ou gaz carbonique : CO₂) et la formation subséquente d'acide carbonique (H₂CO₃), qui se dissocie, et conduit à la libération d'ions hydronium (H₃O⁺), dont la concentration augmente :



Le résultat est une diminution du pH, c'est-à-dire une acidification de l'eau. Il est cependant à remarquer que cette acidification est réversible, puisqu'il suffit de faire bouillir l'eau pour que le gaz carbonique s'échappe.

5.6. Lactophénol.

Le lactophénol est un liquide visqueux et incolore, à l'odeur de phénol. C'est un mélange de plusieurs constituants : phénol, acide lactique, glycérine et eau bidistillée. Le phénol (voir paragraphe 3.2), l'acide lactique (voir paragraphe 5.1) et l'eau bidistillée (voir paragraphe 5.5) ont déjà été décrits. La glycérine (en vérité propane-1,2,3-triol : CH₂OH-CHOH-CH₂OH), quant à elle, est un triol : elle possède trois fonctions alcool (-OH). C'est un liquide très visqueux aux températures habituelles.

- UTILISATION :

Le lactophénol est reconnu comme un très bon milieu d'observation. Son indice de réfraction assez élevé (n = 1,44) permet la réalisation de préparations très lisibles, mais sa viscosité importante rend la dissociation difficile, quoiqu'elle permette de conserver les préparations pendant quelques temps. Le chloral-lactophénol est supérieur au lactophénol parce que son indice de réfraction est encore meilleur et que la dissociation y est plus facile grâce à la présence d'hydrate de chloral, qui ramollit les structures. Cependant, ces deux milieux, s'ils rendent les préparations très lisibles, ne leur donnent qu'un assez faible contraste.

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

- DANGERS ET CONSERVATION :

Ces deux points ont été traités avec le bleu coton au lactophénol (voir paragraphe 5.3). Les dangers et les recommandations relatives à la conservation sont les mêmes, mis à part que le lactophénol ne contient pas de bleu de méthyle. Le risque de taches sur les vêtements s'en trouve donc réduit (mais non supprimé).

5.7. Potasse à 5% dans l'eau bidistillée.

Les propriétés de la potasse ont déjà été décrites au paragraphe 4.3.

- UTILISATION :

On utilise, en microscopie, la potasse à différentes concentrations : 10%, 5% et 2%. La solution à 5% est la plus universellement employée. Elle a des effets semblables à l'ammoniaque concentrée, mais elle présente l'avantage sur cette dernière d'être sensiblement moins volatile et d'être inodore. On peut donc, au lieu d'ammoniaque concentrée, employer de la potasse à 5% pour toutes les observations courantes ; on peut même y dissoudre du rouge Congo. Globalement, la potasse offre les avantages de regonfler les exsiccata et de ramollir les tissus, mais elle altère souvent les cel-

lules. C'est, finalement, un assez bon milieu d'observation, mais dont il faut se servir avec une certaine circonspection parce qu'il est susceptible de dissoudre certains éléments, dont notamment l'ornementation des spores chez les ascomycètes.

La solution à 10%, plus concentrée, est utilisée pour la dissociation de champignons coriaces (polypores, croûtes), ou gélatineux (*Auricularia*, *Tremella*), tandis que la solution à 2% est préférée par certains auteurs en vertu de son action plus douce. D'autre part, la potasse, de même que la soude, est employée à la concentration de 10% pour les réactions macrochimiques.

- DANGERS ET CONSERVATION :

Les consignes de sécurité et de conservation sont les mêmes, à la dilution près, que pour la potasse à 10% (voir paragraphe 4.3).

5.8. Potasse à 2% dans l'eau bidistillée.

La solution de potasse à 5% (voir paragraphe 5.7) convient bien pour la plupart des observations, mais la solution à 2% est parfois préférée parce que son action est plus douce. Elle peut, par conséquent, être utilisée pour des champignons plus délicats.

5.9. Réactif de Melzer.

Le réactif de Melzer est un liquide brun, épais, composé d'iode, d'iodure de potassium, d'hydrate de chloral et d'eau. Son odeur est irritante et résulte du mélange de l'odeur de l'iode et de celle de l'hydrate de chloral. Le constituant le plus important de ce réactif est l'iode, qui a la propriété de se fixer sur certains glucides, notamment. L'iode est un solide à l'éclat métallique, volatil et à l'odeur particulière. Il est peu soluble dans l'eau, mais l'est plus dans les solutions d'iodure de potassium (KI), suite à la formation d'un ion complexe¹ entre l'iode (I₂) et l'ion iodure (I⁻) suivant l'équation :

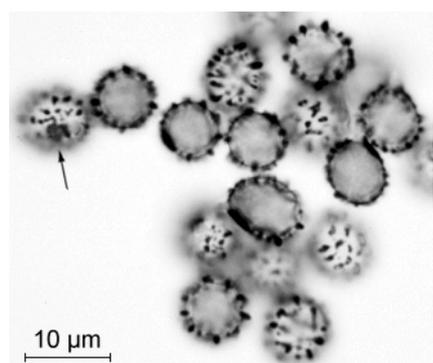


C'est pour cela que le réactif de Melzer contient de l'iodure de potassium. Celui-ci est un solide blanchâtre, soluble dans l'eau. L'hydrate de chloral a déjà été décrit (voir paragraphe 5.4).

- UTILISATION :

Le réactif de Melzer est un des milieux de montage les plus utiles pour la microscopie. En effet, c'est un réactif vis-à-vis duquel les éléments observés peuvent avoir trois comportements différents : ou bien ils sont iodo-négatifs, ou bien ils sont soit amyloïdes, soit dextrinoïdes. L'iodo-négativité correspond à l'absence apparente de réaction : les cellules se teintent de jaune-brunâtre, qui est la couleur du réactif. Des éléments amyloïdes prendront une coloration gris-bleu ardoise, voire noire, tandis que des cellules dextrinoïdes se teinteront de brun-rouge foncé. La réaction amyloïde signale généralement la présence d'amidon, tandis que la réaction dextrinoïde révèle le plus souvent les dextrines.

Ainsi, le réactif de Melzer est utilisé dans de nombreux genres, aussi bien chez les basidiomycètes que chez les ascomycètes. Il permet de savoir si les spores, notamment chez *Amanita* et *Mycena*, ainsi que chez de nombreux aphyllophorales, sont amyloïdes ou non, et si, chez les lépiotes *lato sensu*, elles sont dextrinoïdes ou pas. Il facilite l'observation et la description de l'ornementation des spores chez *Lactarius* et *Russula*, principalement. Enfin, il intervient lors de la détermination des ascomycètes, dont le sommet des asques (que ce soit un opercule ou un pore) peut être amyloïde ou non, et lors de l'identification des mycènes, dont la chair est souvent dextrinoïde, mais pas toujours. Le réactif de Melzer est aussi quelque peu utilisé en macrochimie, mais dans ce domaine, le liquide de Lugol lui est préférable. Le Lugol est un Melzer sans hydrate de chloral, et avec des proportions en iode et iodure de potassium un peu différentes.



Les spores, notamment chez les Russulaceae (genres *Lactarius* et *Russula*), présentent des ornements amyloïdes, ce qui permet de les étudier très aisément grâce au réactif de Melzer. Ici, un amas de spores de *Russula nauseosa*, montées dans le réactif de Melzer. On distingue, sur certaines spores, et notamment celle qui se trouve à l'extrême gauche, une tache supra-apiculaire, amyloïde également.

- DANGERS :

Le réactif de Melzer est assez dangereux : l'hydrate de chloral est toxique et irritant et l'iode est nocif ; aussi, éviter tout contact avec la peau ou

¹ Les ions complexes résultent de l'association d'un atome, voire d'une molécule (neutres), ou plus souvent d'un cation, avec un ou des ligands. Les ligands sont des molécules (neutres) ou des anions. Ils peuvent être de nature minérale ou organique. L'iode, qui est ce qu'on appelle en chimie un « non-métal », constitue une exception parce que généralement, c'est un métal qui s'associe aux ligands.

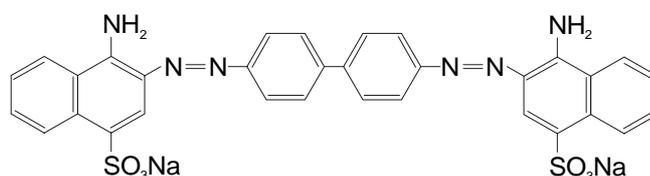
les yeux, et éviter de respirer les vapeurs. D'autre part, il est bon de savoir que l'iode, au contact de l'ammoniaque, provoque des réactions à caractère explosif. Enfin, l'iode se fixant très bien sur la cellulose (qui est un polymère de glucose, c'est-à-dire de sucre), à laquelle il donne une coloration noirâtre, il faut éviter d'en tacher les vêtements en coton (les taches peuvent être enlevées à l'aide d'une solution diluée de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), mais ce procédé présente un risque de décoloration du tissu).

- CONSERVATION :

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

5.10. Rouge Congo ammoniacal.

Le rouge Congo est un colorant qui fait partie de la catégorie des polyazoïques parce qu'il possède deux chromophores de type azoïque, c'est-à-dire formés chacun de deux atomes d'azote doublement liés, et substitués. Le numéro du *Color Index* du rouge Congo est le 22 120. C'est un colorant acide, c'est-à-dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques. Il colore particulièrement bien les parois des cellules de champignons ; c'est pour cela qu'il est un des colorants les plus utilisés en mycologie générale.

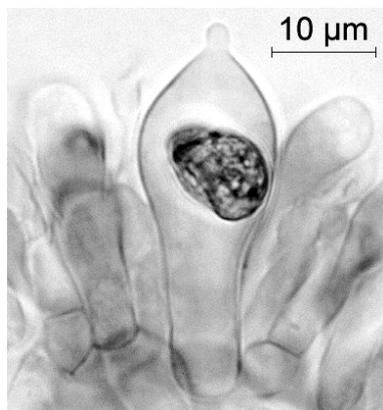


Rouge Congo (C.I. : 22 120)

- UTILISATION :

Le rouge Congo ammoniacal est un excellent milieu pour toutes les observations courantes. Il a les mêmes qualités regonflantes et ramollissantes que l'ammoniaque (voir paragraphe 4.2 dans le numéro précédent de *Myco*'), et a l'avantage supplémentaire de colorer la paroi de la plupart des hyphes, ce qui augmente le contraste et facilite ainsi l'observation et l'interprétation. Il convient parfaitement lors de la recherche des anses d'anastomose, qu'il met admirablement en évidence. On a intérêt, et particulièrement lors de la photomicrographie, à laver dans l'ammoniaque diluée deux fois les préparations montées dans le rouge Congo ammoniacal. Par cette opération, le fond se décolore et le contraste se trouve encore augmenté. L'ammoniaque diluée deux fois a ici l'avantage sur l'ammoniaque concentrée de ne dissoudre que le colorant non fixé sur les structures fongiques. L'ammoniaque concentrée, au contraire, dissout assez facilement le rouge Congo, même fixé, et fait donc pâlir les éléments observés. L'eau convient moins bien parce que le colorant n'y est que peu soluble, et qu'elle a tendance à provoquer sa cristallisation.

Mais le rouge Congo ammoniacal a les défauts de l'ammoniaque : il est très volatil et la préparation se dessèche au cours de l'observation. Plutôt que d'ajouter du colorant pour maintenir la préparation humide, on a intérêt à ajouter de l'ammoniaque diluée deux fois pour les raisons évoquées précédemment. Par ailleurs, il faut savoir que l'ammoniaque dissout certains éléments comme les incrustations acido-résistantes de la cuticule des russules. On peut aussi utiliser le rouge Congo ammoniacal au lieu d'ammoniaque pour l'étude des chrysocystides (qui sont des cellules stériles dont le contenu vire au jaune au contact des bases), car le rouge Congo ne masque pas la réaction.



*Le rouge Congo ammoniacal est très efficace pour l'étude des chrysocystides, comme en témoigne cette photomicrographie. La teinte rouge du colorant ne nuit aucunement à la réaction (au contraire, le rouge Congo fait admirablement ressortir les parois des hyphes), et l'ammoniaque qu'il contient met très bien en évidence la masse amorphe que présentent les chrysocystides (cette masse apparaît dorée sur l'original). Il s'agit ici d'une chrysocystide d'*Hyppholoma capnoides*.*

- DANGERS :

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

• CONSERVATION :

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

6. Bibliographie.

- ARNAUD, P. : *Chimie organique*. Seizième édition. Dunod, 1996.
- AYEL, A. ET MOINARD, A. : *Le microscope. Constitution, fonctionnement, emploi en mycologie*. Bulletin spécial numéro 3a de la Société mycologique du Poitou.
- BATAILLE, F. : *Les réactions macrochimiques chez les champignons*. Cramer, 1969.
- BON, M. : *Champignons de France et d'Europe occidentale*. Arthaud, 1988.
- BOULLARD, B. : *Dictionnaire plantes & champignons*. Estem, 1997.
- BREITENBACH, J. ET KRÄNZLIN, F. : *Les champignons de Suisse. Tome 2 : Champignons sans lames. Hétérobasidiomycètes, aphylophorales, gastéro-mycètes*. Mykologia, 1986.
- CHARBONNEL, J. : *Les réactifs mycologiques. Tome 1 : Les réactifs macrochimiques*. Edité par l'auteur, 1995.
- COURTECUISSÉ, R. ET DUHEM, B. : *Guide des champignons de France et d'Europe*. Delachaux et Niestlé, 1994.
- DE IZARRA, Z. : *Introduction à l'étude microscopique des champignons*. Bulletin spécial numéro 5 de la Société mycologique du Poitou.
- DE IZARRA, Z. : *L'examen des champignons (étude de leurs caractères - avant tout recours au microscope)*. Bulletin spécial numéro 6 de la Société mycologique du Poitou.
- EHRMANN, E. : *Traité des matières organiques colorantes et de leurs diverses applications*. Dunod, 1922.
- KÜHNER, R. ET ROMAGNESI, H. : *Flore analytique des champignons supérieurs. Agarics, bolets, chanterelles*. Masson, 1984.
- LAROCHE, G. ET LAROCHE C. : *Examens de laboratoire du médecin praticien*. Cinquième édition. Masson, 1949.
- LOCQUIN, M. : *Mycologie générale et structurale*. Masson, 1984.
- LOCQUIN, M. ET LANGERON, M. : *Manuel de microscopie*. Masson, 1978.
- MARCHAND, A. : *Champignons du Nord et du Midi*. Edité par l'auteur.
- Tome 5 : *Les russules*. 1977.
 - Tome 6 : *Lactaires et pholiotés*. 1980.
 - Tome 7 : *Les cortinaires*. 1982.
 - Tome 8 : *Les cortinaires (fin)*. 1983.
- MC QUARRIE, D. A. ET ROCK, D. P. A. : *Chimie générale*. Troisième édition. De Boek, 1992.
- MERCK : *Réactifs, produits chimiques, diagnostica*. Catalogue Merck, 1996.
- MERCK : *The Merck Index*. Eleventh edition. Merck, 1989.
- MEYBECK, J. : *Les colorants*. Troisième édition. Presses Universitaires de France, 1963.
- RAWN, J. D. : *Traité de biochimie*. De Boek, 1990.
- SEGUY, E. : *Le microscope. Emploi et applications*. Lechevalier.
- Tome 1. 1951.
 - Tome 2. 1949.
- TONNEAU, J. : *Tables de chimie. Un mémento pour le laboratoire*. De Boek, 1991.
- UCB : *Chimie. Produits pour le laboratoire et l'industrie*. Catalogue UCB, 1995.
- VOLLHARDT, K. P. C. ET SCHORE, N. E. : *Traité de chimie organique*. Deuxième édition. De Boek, 1995.

7. Remerciements.

Un amical merci à Jean-Marie PIRLOT pour ses suggestions et la réorganisation en un texte continu des fiches qui sont à la base de cet article.