

OBSERVATION MICROSCOPIQUE

Des MACROMYCETES

**Quelques techniques nouvelles ou
méconnues en mycologie**

Caractères intéressants à observer

Mémoire présenté à l'occasion du prix Jacques Kets 1996 de la Société royale de zoologie
d'Anvers.

Didier BAAR

Mai 1996

MISES AU POINT APPORTEES AU MEMOIRE

Si vous souhaitez imprimer ce mémoire, je n'y vois aucune objection à condition qu'il le soit DANS SON INTEGRITE et ACCOMPAGNE DE CE FEUILLET DE MISE AU POINT.

Etant donné que je ne comptais plus distribuer ce mémoire, j'ai quelques remarques à faire sur son contenu. Il a en effet été rédigé au cours de mes trois années de secondaire supérieur, et avec un peu de recul, j'ai pu me rendre compte qu'il contenait certains propos qu'il me semble impératif de rectifier :

c'est essentiellement au niveau des généralités que j'aimerais apporter quelques nuances. Au point 2.1, page 8, je conseille de couvrir le fond du panier avec de la mousse. Or nous avons participé depuis, R-C. Bequet, A. Fraselle et moi-même, à une action visant à interdire le ramassage commercial des mousses en forêt, effrayés que nous étions par l'ampleur qu'avait prise cet inacceptable trafic dont vous avez probablement eu des échos. Il me semble donc déplacé à l'heure actuelle d'arracher des mousses pour en couvrir le fond de son panier, même si c'est dans un but naturaliste.

Par ailleurs, au paragraphe suivant, je conseille d'emporter de l'humus en vue de faire une reconstitution photographique. C'est une aberration (peu écologique), car les photographies que l'on obtient dans le site naturel de développement du champignon sont bien meilleures que celles issues d'une reconstitution. Si on préfère réaliser ses photos en studio, il ne faut jamais s'amuser à reconstituer le milieu naturel, mais se contenter de déposer la récolte sur un support adéquat (surface mate, couleur peu saturée et peu lumineuse, granulométrie appropriée, matière non absorbante et lavable).

Il est préférable, plutôt que d'emporter une vingtaine d'exemplaires comme il est dit dans le même paragraphe, de se limiter à cinq, qui sont largement suffisants pour une étude microscopique détaillée, pour la production d'exsiccata, etc., à condition de noter sur le terrain les caractéristiques qui diffèrent éventuellement chez certains des spécimens laissés sur place. L'aspect microscopique varie en effet assez peu d'un exemplaire à l'autre, s'ils en sont arrivés à un même stade de maturité, et particulièrement s'ils proviennent d'une même station.

Dans les généralités toujours, peut-être la méthode d'analyse sommaire du sol serait-elle à revoir. Il existe d'ailleurs une multitude d'appareils et de tests instantanés permettant de déterminer en un clin d'oeil les paramètres d'humidité et de pH des sols.



Didier Baar

Didier Baar a été reçu comme lauréat et 1^{er} prix par le Jury du Prix de Biologie Jacques Kets, en 1996, Enseignement officiel, régime francophone, réuni dans les murs de la Société Royale de Zoologie d'Anvers.

Ce mémoire constitue à nos yeux un travail incontournable pour toute personne qui s'intéresse à la microscopie mycologique, même s'il date déjà maintenant de 12 ans.

Comme ce document n'existait que sous forme papier, et n'avait été distribué à l'époque que dans un cercle très restreint, nous avons choisi, Françoise Draye et moi-même, de rendre hommage à notre ami Didier, décédé à l'aube d'une carrière très prometteuse, en numérisant ce travail afin de le rendre accessible au plus grand nombre, par

le biais de la Toile.

C'est notre manière de le remercier pour tout ce qu'il nous a appris et pour les inoubliables moments passés ensemble, devant un microscope, ou une décoction d'Orval lors de nombreuses soirées de congrès.

Nous avons respecté l'intégralité de son travail, sans y changer un iota. Comme certaines techniques ont évolué encore, nous y apporterons prochainement un petit addendum, afin de l'actualiser.

Marcel Lecomte, août 2008

TABLE DES MATIERES

Mises au point apportées au mémoire	2
Table des matières	3
Introduction	5
GENERALITES	7
Récolte de champignons	7
1. Matériel et accessoires de cueillette	7
1.1. Matériel	7
1.2. Réactifs	7
2. Récolte	8
2.1. Cueillette	8
2.2. Contenu de la récolte	8
2.3. Photographie du site	8
2.4. Notes à prendre sur place	9
Opérations préliminaires	9
1. Détermination des récoltes	9
2. Reconstitution photographique	9
3. Réalisation d'une sporée	10
4. Séchage d'exemplaires	11
5. Analyse sommaire du sol	12
TECHNIQUES MICROSCOPIQUES	13
Dissociations	13
1. Généralités	13
1.1. Nettoyage des lames et des lamelles	13
1.2. Pose de la lamelle couvre-objet	13
2. Dissociation dans le rouge Congo ammoniacal	14
Spores	15
1. Observation extemporanée	15
2. Réalisation d'un frottis	15
2.1. A partir d'une sporée conservée dans un flacon	15
2.2. A partir d'une sporée étalée sur plaque de verre	15
2.3. A partir d'un exemplaire frais	15
2.4. A partir d'un exsiccatum	15
3. Montage de spores naturellement colorées	16
4. Montage de spores amyloïdes	17
5. Montage général des spores	17
Coupes au microtome	18
1. Techniques d'usage général	18
1.1. Affûtage du rasoir	18
1.2. Conception d'un moule en aluminium	19
1.3. Enrobage de la pièce dans la moelle de sureau	19
2. Observation extemporanée	20
2.1. Inclusion de l'objet dans la paraffine	20
2.2. Débitage des coupes	21
2.3. Traitement et observation des coupes	22
3. Montage de coupes colorées	23
3.1. Préparation de l'objet à la découpe	23
3.2. Débitage des coupes	23
3.3. Collage des coupes sur lame	24
3.4. Traitement et montage des coupes	25
Régénération d'exsiccata	26
1. Dissociations	26
2. Spores	27
3. Coupes au microtome	27
CARACTERES A OBSERVER	28
Subdivisions	28
1. Généralités systématiques	28
2. Ascomycotina	28
2.1. Définition	28

2.2. Caractérisation microscopique	28
3. Basidiomycotina	29
3.1. Définition	29
3.2. Caractérisation microscopique	29
Ascomycotina	30
1. Les asques	30
1.1. Définition	30
1.2. Mode de déhiscence	30
1.3. Affinités chimiques	31
2. Les spores	32
2.1. Définition	32
2.2. Contenu des ascospores	32
3. Les paraphyses	32
4. L'hyothecium	32
Basidiomycotina	33
1. Les basides	33
1.1. Définition	33
1.2. Morphologie des basides	33
1.3. Morphologie des stérigmates	34
2. Les spores	34
2.1. Définition	34
2.2. La forme des spores	35
2.3. L'ornementation des spores	35
2.4. La réaction des spores à l'iode	36
3. Les boucles	36
4. Les cystides	36
4.1. Définition	36
4.2. Morphologie des cystides	37
5. La trame des lames	38
5.1. Définition	38
5.2. Les différents types de trames	38
6. Les cuticules	38
6.1. Définition	38
6.2. Type et orientation des hyphes	38
6.3. Localisation des pigments	39
ANNEXES	40
REACTIFS	40
1. Rouge Congo ammoniacal	40
1.1. Préparation du produit brut	40
1.2. Restauration avant utilisation	40
1.3. Commentaires et remarques	40
2. Réactif iodé de Melzer	40
3. Gélatine au rouge Congo	41
4. Picroformol acide de Bouin	41
5. Gélatine phéniquée	41
6. Colorant biacide de Mann	41
6.1. Solution A : bleu d'aniline (ou bleu coton)	41
6.2. Solution B : éosine jaunâtre (ou éosine)	41
6.3. Préparation du colorant	41
7. Mélange de Cendrier	42
8. Bleu d'aniline - Soudan III au lactophénol	42
9. Ethanol-formol de Schaffer	42
BIBLIOGRAPHIE	43
1. Ouvrages collectifs	43
2. Ouvrages d'un ou de deux auteurs	43
3. Figures	43

INTRODUCTION

Bientôt trois ans que j'ai commencé ce travail, et je me dis qu'après un millénaire il y aurait toujours des choses à ajouter pour le compléter. J'étais parti avec l'idée grandiose de cerner l'étude microscopique des champignons - mes fameux Macromycètes -, mais les difficultés rencontrées ont très vite réduit mes prétentions... Il faut dire que la littérature est extrêmement rare sur ce sujet précis!

En septembre 1993, quand j'ai appris par mon professeur de biologie l'existence d'un prix d'encouragement, j'étais très intéressé par les microorganismes. Je venais en effet de terminer la lecture d'un ouvrage qui pourrait susciter bien des vocations: *Initiation à la microbiologie*, de N. Marchal. Ce livre, très clair, rempli de travaux pratiques tous plus passionnants les uns que les autres, avait attiré mon attention sur les bactéries. Réaliser un travail sur les microorganismes était donc une idée enthousiasmante, mais deux problèmes majeurs m'y ont fait renoncer : le manque de moyens d'une part, et la multitude de travaux existant déjà sur ce sujet d'autre part.

En fait, j'ai commencé à m'intéresser à la nature il y a plus de dix ans, lorsqu'on m'a offert un jouet intéressant : un microscope ! Ah ! Qu'il me semblait puissant à l'époque, avec ses deux piles et ses quinze centimètres de hauteur ! J'observais alors des ailes d'insectes, des cheveux, des coupes à la lame de rasoir, etc. En troisième année du secondaire, j'ai eu la chance de pouvoir observer des cellules d'oignon dans un microscope digne de ce nom. Quel spectacle ! Je me mis tout de suite à faire des économies draconiennes et, un an plus tard, j'achetais enfin un bon microscope, beaucoup meilleur encore que ceux de l'école.

A ce moment-là, j'étais déjà intéressé par les champignons depuis un certain temps, poussé par mon estomac. Mais j'étais toujours déçu, en rentrant de promenade, de ne pas pouvoir les déterminer, ni donc les manger. Je possédais pourtant un ouvrage qui, dans mon esprit, décrivait une bonne partie des espèces que l'on trouve dans les bois. Il en contenait 250 ! (Il s'agit d'un livre qui n'en reste pas moins un bon ouvrage d'initiation : *Champignons*, de G. Becker.) C'est alors que je me suis décidé à me procurer un guide plus complet, celui de M. Bon : *Champignons de France et d'Europe occidentale*. Découragé au début par les 1500 descriptions que contient ce livre, je suis petit à petit parvenu à déterminer les espèces les plus courantes, et j'ai compris que mes déboires étaient dus en partie à un manque énorme de documentation. Depuis, j'achète régulièrement des ouvrages que je devore aussitôt. C'est le cas notamment du fantastique *Guide des champignons de France et d'Europe occidentale*, de R. Courtecuisse.

C'est comme cela que, toujours conseillé par mon professeur de biologie, j'ai pu me procurer l'ouvrage de M. Langeron et M. Locquin : *Manuel de Microscopie*, qui m'a paru très ardu pour le débutant que j'étais, d'autant que le premier chapitre, très théorique, est consacré à une étude de l'optique et à une description des différents types de microscopes existants. C'est quand j'ai commencé à lire les techniques microscopiques proprement dites que je me suis passionné pour la microscopie.

J'avais donc deux passions : la microscopie et la mycologie. Que pouvait-il arriver d'autre que la fusion de ces deux passions : la microscopie des champignons ? Plus je m'intéressais aux champignons et plus je me lassais de les manger, recherchant toujours l'espèce que je ne connaissais pas plutôt que l'espèce comestible. C'est alors que j'ai décidé d'entamer un travail que je pourrais présenter, s'il était terminé à temps, à un concours. Mes recherches n'étaient donc plus effectuées dans le vide : je leur avais trouvé un but, et cela m'a aidé à rédiger ce mémoire, ce que, n'ayant pas beaucoup d'ordre dans mes notes, je n'aurais peut-être pas fait en temps normal.

La réalisation de ce travail s'est faite en trois temps. Avant d'acquérir un microscope et avant même de connaître l'existence de ce concours, j'ai lu beaucoup d'ouvrages ayant trait à différents aspects de la biologie comme la biochimie, la génétique, la microbiologie, la botanique, la zoologie, etc. Petit à petit, à force d'économies, je suis parvenu à me procurer un peu de matériel qui m'a permis de commencer des observations dans divers domaines, avant de les orienter vers les champignons.

J'ai alors entrepris de nombreuses expériences, un peu dans la vague il faut le dire, dont très peu sont reprises ici. J'ai entre autres beaucoup observé la germination des spores sur divers milieux de culture artificiels, recherché les métaux lourds dans des extraits de coprins, effectué des chromatographies de cuticules, une étude sur la proportion d'eau contenue dans les champignons, réalisé un élevage d'insectes qui les parasitent, etc. pour finalement me diriger vers l'étude microscopique des champignons. J'ai effectué à ce sujet des expériences pendant plus d'un an, et noté soigneusement tous mes résultats.

Jusqu'à ce que, poursuivant mes expériences, j'en arrive, à partir de mes notes et de mes dessins, à la rédaction proprement dite, qui a pris plus de six mois. Tout cela représente beaucoup de temps, et ce mémoire, bien que relativement peu épais, m'a demandé un travail énorme, sans oublier qu'il m'a fallu le concilier avec des résultats scolaires valables et un minimum d'activités familiales, tous deux si chers au cœur de mes parents.

Une autre chose était très importante pour moi : effectuer un travail dans un domaine encore très peu abordé. C'est pourquoi ce sujet était idéal, car, en commençant ce mémoire, je n'avais pu trouver pour toute documentation s'y rapportant directement que le magnifique *Manuel de microscopie* dont j'ai déjà parlé. Le malheur était que les pages consacrées aux techniques mycologiques ne s'y trouvent qu'au nombre de trois ! J'ai donc décidé, sur base des techniques plus générales qui se trouvent dans cet ouvrage, de créer mes propres techniques pour l'observation des champignons. C'est de là que vient la partie la plus importante de mon travail. Le chapitre de ce mémoire consacré aux techniques microscopiques est donc issu en grande partie de recherches personnelles et de mon expérience dans ce domaine. C'est d'ailleurs lui qui a occupé la plus grande partie de mon temps.

Il m'a paru nécessaire, avant d'entrer dans le vif du sujet, de consacrer un court chapitre à des notions plus générales. Ce premier chapitre rassemble des techniques de récolte et de traitement des échantillons. Ces pages ne sont à nouveau basées que dans une faible mesure sur la littérature mycologique : je conseille par exemple une analyse sommaire du sol de cueillette, ce que je n'ai jamais rencontré dans la littérature. Il en est de même pour la photographie du site de cueillette ou pour la technique de séchage, etc. J'ai tenu à renseigner ces procédés car ce sont ceux qui me paraissent les plus corrects et donc ceux que j'utilise.

Le troisième chapitre, quant à lui, résulte en partie d'observations personnelles et en partie de connaissances acquises par les livres. Comment pourrais-je dire qu'une spore que je vois dans mon microscope est ailée, ou qu'un champignon à lames fait partie de la classe des Basidiomycotina si je ne les avais découverts grâce à mes lectures ? J'avais tout d'abord décidé de ne pas faire figurer ce chapitre dans mon mémoire, mais, me ralliant à l'opinion de mon professeur de biologie, qui trouvait mon texte trop théorique et souhaitait y voir apparaître des résultats plus concrets, j'ai changé d'avis. J'ai donc décrit et dessiné ce que j'avais moi-même observé, en me basant sur les maigres données de la littérature.

En parallèle à la réalisation de ce mémoire, j'ai créé un logiciel informatique (la programmation informatique est mon troisième péché mignon...) qui n'est pas vraiment en rapport étroit avec le texte, mais qui parle tout de même de...champignons, évidemment ! Ce programme comporte trois parties : l'une est consacrée à la systématique des espèces, une autre aux réactions colorées, et la dernière est un glossaire. Mais ne dévoilons pas ici tous nos atouts : je laisse au lecteur le soin de les découvrir. Les données reprises dans ce logiciel ont toutes, ou presque, été tirées de la littérature. Je n'ai pas cherché à y glisser d'observations personnelles, mais mon but a plutôt été de créer un programme attrayant qui puisse être utile à tout mycologue. Je l'ai en fait réalisé pour mon utilisation personnelle, mais j'ai décidé de l'ajouter en annexe originale à ce mémoire.

J'aimerais, pour terminer, remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont soutenu dans mon travail, que ce soit moralement ou matériellement. Je pense spécialement à mes parents. Je désire enfin adresser des remerciements tout particuliers à mon professeur de biologie (je devrais dire mon ami), M. Jean-Pierre Garraux, qui fut un excellent "professeur-conseiller" et qui, ayant fait preuve d'une patience remarquable, a accepté de relire mon texte d'un œil scientifique.

D. Baar

1. GENERALITES

1. RECOLTE DE CHAMPIGNONS

1. MATERIEL ET ACCESSOIRES DE CUEILLETTE

1.1. Matériel

- 1 grand panier tressé, à fond plat et mailles grossières
- 1 sac plastique du commerce
- 1 canif, robuste et bien affûté
- 1 boîte de pêche, légère et richement compartimentée
- 1 appareil photo avec flash
- 1 bon guide de terrain
- 2 sacs en plastique à fermeture hermétique
- 1 loupe à grossissement moyen (10x) et grand champ
- 1 lampe de poche
- 1 carnet et un crayon

1.2. Réactifs

- Sulfate de fer, solution fraîche (1)
- Hydroxyde de potassium (2)
- Ammoniaque (3)



Figure 1 : matériel et accessoires de cueillette

(1) Sulfate de fer (II) : solution à 10 % de FeSO_4 dans l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 1 % aq.

(2) Hydroxyde de potassium : solution aqueuse à 7,5 % de KOH.

(3) Ammoniaque : solution commerciale concentrée (contenant environ 25 % de NH_3).

2. RECOLTE

2.1. Cueillette

Les champignons sont fragiles, et il faut les récolter avec les précautions qu'ils méritent ; un rien d'habitude suffit pour savoir comment cueillir telle ou telle espèce. Pour les profanes, en règle générale, on glisse le canif sous la base du stipe (1) d'une part, et on tire le champignon vers le haut d'autre part. Chaque exemplaire sera soigneusement disposé dans le panier dont on aura préalablement recouvert le fond par de la mousse qui les tiendra humides et amortira les chocs. S'il s'agit de petites espèces, on les installera dans la boîte compartimentée.

2.2. Contenu de la récolte

Si on désire procéder à l'analyse complète d'une espèce, on ne peut se contenter de l'aspect mycologique proprement dit ; il faut également tenir compte du substrat, de l'écologie, du climat, etc. On prélèvera donc, en plus d'une vingtaine d'exemplaires (10 à 15 adultes et 5 à 10 jeunes), un échantillon de sol qu'on enfermera hermétiquement dans un sac plastique. Pour l'étude du mycélium (2), on récoltera un spécimen particulièrement typique en découpant le substrat autour de son stipe. On déposera délicatement le tout dans l'autre sac hermétique. Il est important également d'emporter, dans le sac du commerce, un peu d'humus qui servira à une reconstitution photographique.



Figure 2 : contenu de la récolte (*Macrolepiota rhacodes*)

2.3. Photographie du site

Il est intéressant de photographier le site de cueillette car nulle description n'est plus parlante qu'une photo. On cadrera donc soigneusement de manière à rassembler le plus de données possible concernant l'écologie de la station et on réalisera le cliché avec flash si nécessaire. Il est préférable que l'espèce étudiée figure sur la photo, dans son milieu naturel, mais ceci n'est pas indispensable, et il ne faut pas oublier qu'il s'agit d'une photographie du site et non du champignon.

(1) Stipe : c'est le terme correct désignant ce qui est communément appelé le pied d'un champignon.

(2) Mycélium : c'est la partie végétative du champignon qui, constituée de fins filaments, est dispersée dans le substrat, au contraire du carpophore qui, lui, n'est que la «fructification», le champignon tel qu'on le conçoit habituellement.



Figure 3 : photographie du site (Ruisseau de Merny)

2.4. Notes à prendre sur place

Sur le carnet, on notera le nom de la station, la date de la sortie et le numéro de la photo précédemment réalisée. On mentionnera également la végétation environnante (arbres et plantes remarquables), et, si on hésite sur le nom d'un arbre ou d'une plante, on en rapportera un rameau. On déterminera provisoirement l'espèce récoltée et on indiquera le résultat à la suite des autres informations.

2. OPERATIONS PRELIMINAIRES

1. DETERMINATION DES RECOLTES

Le but de ce travail n'étant pas d'apprendre à déterminer un champignon, mais bien de s'intéresser principalement aux aspects microscopiques de la mycologie, je ne puis que conseiller le renvoi à une flore spécialisée.

Il semble, d'après la littérature, que la meilleure méthode pour obtenir des résultats concluants est de suivre une clé de détermination, et de comparer ensuite l'exemplaire à déterminer avec l'illustration de l'espèce trouvée dans la clé.

Les meilleures et les plus accessibles des flores actuellement disponibles sur le marché sont incontestablement celle de Marcel Bon d'une part et celle de Régis Courtecuisse d'autre part (voir bibliographie).

Cependant, si on n'a malgré tout aucune idée quant à l'identité d'un spécimen, on peut procéder à l'observation des spores (1), qui est à même de se révéler fort utile pour se mettre sur la voie.

2. RECONSTITUTION PHOTOGRAPHIQUE

But : il peut être intéressant de prendre une photo des récoltes étudiées, afin de constituer, par exemple, un dossier complet sur une espèce déterminée.

Mode opératoire

- Disposer l'humus sur la table.

(1) Spores : ce sont les «graines » du champignon ; elles sont de taille microscopique.

- Planter trois cure-dents dans la base du stipe d'un carpophore (2) adulte et faire de même avec un jeune exemplaire de manière à ce qu'ils tiennent debout.
- Les arranger dans l'humus, en recouvrant les cure-dents afin d'imiter au mieux le milieu naturel.
- Couper un autre spécimen adulte dans le sens de la longueur et l'installer devant les deux autres, face coupée vers le haut.
- Déposer un quatrième champignon à côté des trois autres, hyménium (3) vers l'avant. S'il s'agit d'un lactaire, entailler les lames afin d'en exposer le lait.
- Fixer un appareil photographique (avec flash et objectif de 35mm) sur son pied, en regard de la reconstitution, et cadrer.
- Disposer une lampe à lumière du jour face à l'appareil, de l'autre côté de la reconstitution, de telle manière que la lumière soit orientée vers les champignons mais que la lampe reste invisible dans l'objectif de l'appareil.
- Réaliser le cliché avec flash de manière à limiter les effets d'ombres.

Remarques : la photographie peut éventuellement être réalisée sur place, au moment de la récolte, pourvu qu'on dispose du matériel nécessaire, fort onéreux. Ce procédé, en évitant de devoir rapporter de l'humus, oblige à transporter un appareillage délicat et encombrant mais donne de meilleurs résultats. La disposition des carpophores citée ci-dessus n'est évidemment qu'un exemple, mais, en prenant une photo, on doit faire attention à l'orientation des exemplaires : s'ils sont dirigés perpendiculairement à l'objectif, il sera impossible d'obtenir une parfaite mise au point sur l'ensemble des spécimens, à cause de l'effet de perspective qui sera produit. On s'arrangera donc pour que les exemplaires soient tournés parallèlement à l'objectif.



Figure 4 : reconstitution photographique (*Lactarius deterrimus*)

3. REALISATION D'UNE SPOREE

But : la réalisation d'une sporée est utile si l'on veut pouvoir conserver des spores pour une culture ou un examen ultérieur en vue d'une détermination, par exemple.

Mode opératoire

- Couper, avec un scalpel, le plus près possible du chapeau, le stipe d'un carpophore adulte en parfait état.
- A l'aide de pincettes, éliminer les corps étrangers pouvant se trouver sur l'hyménium, en évitant absolument de blesser celui-ci.

(2) Carpophore : c'est l'organe reproducteur, la partie visible du champignon que l'on cueille habituellement, par opposition au mycélium, qui est la partie végétative, enfouie dans le substrat.

(3) Hyménium : c'est la partie du carpophore qui porte les cellules reproductrices, par exemple les lames, les tubes ou les aiguillons chez les Basidiomycètes.

- Déposer, sur une plaque de verre parfaitement propre, le chapeau, surface fertile vers le bas, et retourner sur celui-ci un bécher avec bec verseur, d'un diamètre légèrement supérieur à celui de l'objet.
- Laisser s'effectuer la sporée pendant 24 h dans la semi-obscurité.
- Retirer le chapeau et recouvrir à nouveau la sporée avec le bécher pendant 5 h puis gratter, avec un scalpel, le dépôt de spores et le transférer dans un petit flacon de 0,25 ml.
- Obturer hermétiquement le flacon par son capuchon.

Commentaires : l'intérêt de réaliser la sporée sur une plaque de verre et non sur une feuille de papier, comme il est trop souvent conseillé dans la littérature, relève du fait que, lors de la récolte sur verre, on n'emporte pas de papier avec les spores. De plus, si le verre utilisé est parfaitement transparent et incolore, il suffit de déposer la plaque supportant la sporée sur une feuille de papier noir ou blanc selon sa couleur pour pouvoir observer la teinte exacte des spores.

Pendant la sporulation, on recouvre le champignon d'un bécher de manière à limiter sa dessiccation car tout exemplaire qui se dessèche n'émet plus de spores mûres, ou très peu. Il est préférable cependant que le bécher comporte un bec verseur pour assurer un minimum d'aération, réduisant ainsi les risques de putréfaction prématurée du carpophore.

Après avoir retiré le chapeau, on laisse encore la sporée sous le bécher pendant 5 h pour qu'elle se dessèche et, qu'une fois enfermée dans son flacon hermétique, elle ne fermente pas.

Remarques : si on ne dispose pas de plaques de verre en suffisance, on peut, le cas échéant, réaliser la sporée sur la face mate d'une feuille de papier d'aluminium, mais la récolte est nettement plus délicate si on veut éviter d'emporter des particules d'aluminium avec les spores, ou même de déchirer la feuille. Les petits flacons de 0,25 ml en matière plastique utilisés pour le stockage des spores sont en fait des godets à échantillons pour analyseur.



Figure 5 : sporée d'un champignon à hyménium lamellé

4. SECHAGE D'EXEMPLAIRES

But : malheureusement, la belle saison des champignons couvre à peine un tiers de l'année. Il est donc impossible, si on n'en fait pas sécher, de poursuivre ses observations durant la mauvaise saison. Bien que la macroscopie ne soit aucunement respectée, le séchage représente sans doute le meilleur moyen de conserver des champignons, au moins au point de vue microscopique.

Mode opératoire

- A l'aide de pincettes, éliminer les corps étrangers pouvant se trouver sur le carpophore à sécher, en évitant absolument de blesser celui-ci.
- Peser le champignon avec une précision de 0,01 g et noter son nom, son poids et le numéro de son futur emplacement de séchage.
- Suspender le carpophore en l'enfilant sur un fil nylon, et s'assurer que les spécimens ne soient en contact ni entre eux, ni avec tout autre objet durant le séchage.
- Glisser la rampe sur son étagère et réchauffer le tout, soit en allumant sous les champignons une lampe de 60 W, soit en ouvrant la vanne du radiateur sur lequel repose le séchoir.
- Laisser se dessécher les champignons ainsi suspendus durant une semaine.
- Peser avec une précision de 0,01 g les exsiccata obtenus et noter les résultats.
- Enfermer séparément chaque exemplaire dans une boîte en plastique et coller sur celle-ci une fiche mentionnant le nom du champignon, son poids frais et son poids sec, le nom de la station et la date de récolte, l'écologie et le substrat, le numéro d'ordre de l'exsiccatum, etc.

Commentaires : nous verrons plus loin l'intérêt microscopique de ces exsiccata et comment les observer, après les avoir régénérés. On serait tenté de croire que les champignons peuvent être séchés pendant un temps moins long, mais l'utilisation de boîtes en matière plastique requiert une parfaite déshydratation, en raison des risques de putréfaction. De plus, les larves d'insectes parasitant presque toujours les champignons doivent être tuées, afin qu'elles ne puissent pas aggraver les dégâts qu'elles ont déjà occasionnés pendant la vie du champignon.

Il est souvent conseillé dans la littérature (Georges Becker, Marcel Bon, Régis Courtecuisse, etc.) d'enfermer avec l'exsiccatum une pincée d'insecticide pour prévenir la prolifération de parasites. Cette pratique est ici inutile et risquerait d'endommager les exsiccata.

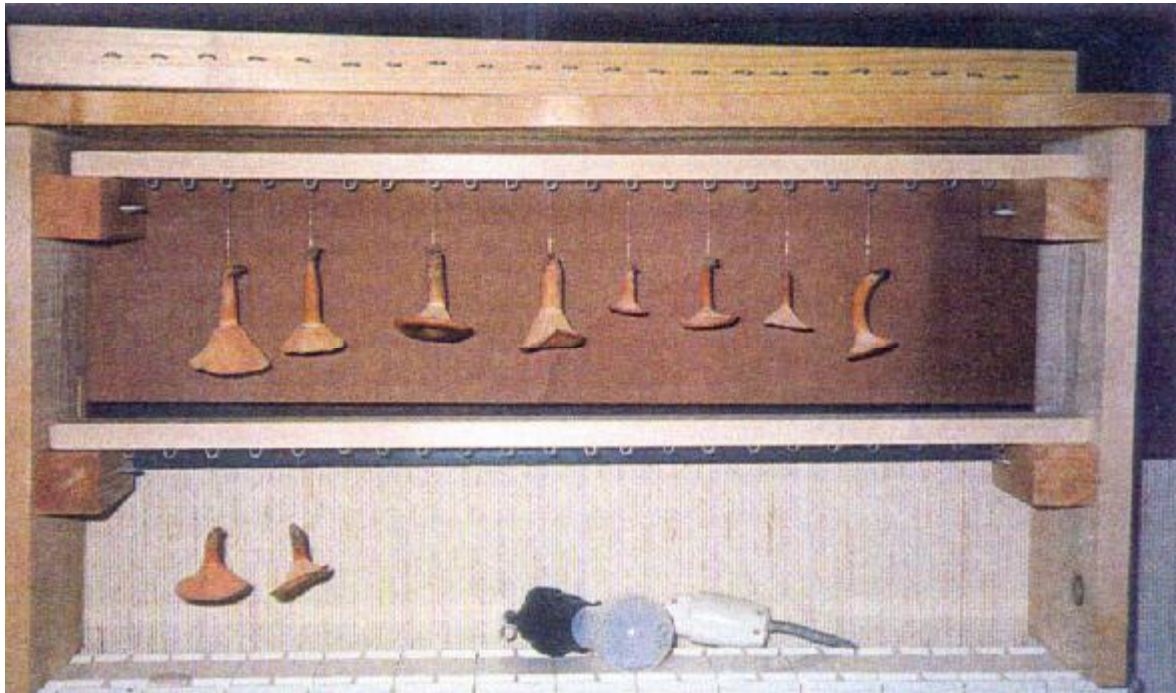


Figure 6 : champignons en cours de déshydratation (*Lactarius deterrimus*)

Remarques : on construira un séchoir à champignons dont la hauteur ne dépasse pas 40 cm et la longueur 80 cm, à cause de l'étendue réduite de chauffage de l'ampoule. Le matériau utilisé sera le bois, en raison de la facilité avec laquelle il se travaille. La profondeur sera choisie en fonction de la surface du radiateur utilisé. Un radiateur étant le plus souvent situé sous une fenêtre, on munira l'ensemble d'une fine plaque de bois faisant office de fond et servant d'écran aux rayons directs du soleil pouvant altérer les pigments fongiques.

5. ANALYSE SOMMAIRE DU SOL

But : connaître le pH du sol et son taux d'humidité est indispensable pour prouver la véracité des observations effectuées. Bien que n'ayant rien trouvé dans la littérature à ce sujet, il me semble possible que le pH du sol influe sur celui des champignons, et ainsi sur l'action des réactifs.

Mode opératoire

- Tamiser dans un cristalliseur (sur un tamis à mailles de 2 mm de côté), le plus rapidement possible, un peu plus de 20 g de l'échantillon de sol en le triturant sur le tamis. Eviter tout contact avec les doigts.
- Peser une petite capsule (C) à fond plat avec une précision de 0,01 g ; y ajouter ensuite exactement 20 g de l'échantillon tamisé.
- Faire évaporer la terre pendant 1h30 sur plaque chauffante à 150° en remuant de temps à autre.
- Laisser refroidir en dessiccateur pendant 10 min puis repeser le tout (T) et calculer la proportion d'humidité (H) de l'échantillon de départ selon la formule :

$$H = \{100 - [(T - C) \times 5]\} \% \text{ d'eau}$$

- Transférer 5 g de l'échantillon desséché dans un bécher de 100 ml et ajouter 50 ml d'eau distillée.
- Faire chauffer sur une plaque et compter 10 min à partir de l'ébullition, qui doit rester modérée. Remuer continuellement.
- Filtrer à chaud, recueillir le filtrat dans un vase erlenmeyer et laisser refroidir.
- Mesurer le pH avec un pH-mètre numérique, si possible, car la coloration originale de l'extrait de sol rend difficile un titrage colorimétrique.

Remarques : le tamisage de l'échantillon peut parfois se révéler difficile, voire impossible, pour les terres grasses et collantes ou fortement humides. On peut donc, le cas échéant, le tamiser après l'avoir déshydraté, juste avant de le mettre en suspension dans l'eau pour la préparation de l'extrait de sol. Quoi qu'il en soit, on respectera toujours rigoureusement le même mode opératoire.

Si l'humidité d'un échantillon de sol se trouvait supérieure à 75 %, il serait préférable de recommencer les opérations, car c'est alors probablement qu'on aurait commis une erreur expérimentale, que ce soit dans les pesages, les calculs ou la température de chauffage.

En principe, lors du repesage de l'échantillon desséché, il faudrait recommencer le chauffage pendant 15 min, puis repeser. Si la masse trouvée différait sensiblement de celle obtenue lors du pesage précédent, il faudrait chauffer à nouveau, jusqu'à ce que l'écart entre deux pesages devienne négligeable. L'intérêt ici n'est pas d'obtenir une valeur exacte de la teneur en eau de tel ou tel échantillon de sol, mais bien d'avoir un point de comparaison entre les divers prélèvements. Un seul pesage suffit donc dans ce cas-ci.

2. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

1. DISSOCIATIONS

Buts : la réalisation de préparations extemporanées par dissociation est très utilisée en mycologie, pour la détermination microscopique des récoltes. Les préparations proposées ci-dessous sont relativement simples et rapides à réaliser. Elles ne seront malheureusement pas conservables. Dissocier un tissu, c'est l'écraser progressivement de manière à en isoler les cellules afin de pouvoir les observer plus aisément.

1. GENERALITES

1.1. Nettoyage des lames et des lamelles

Plonger les lames porte-objets pendant au moins une semaine dans un flacon fermé, à col large et rodé, contenant un mélange de 9 volumes d'éthanol à 90° pour un volume d'acide chlorhydrique concentré. Transférer les porte-objets, après rinçage à l'eau courante, dans un même flacon contenant de l'eau distillée pour les conserver, puis les essuyer avec un linge fin, propre, sec et non pelucheux au fur et à mesure des besoins. Pour rendre les lames mouillables, passer une fois chaque face dans la flamme non fumeuse d'un brûleur à gaz puis les essuyer, une fois refroidies, avec un linge imbibé de méthanol.

Les lamelles, quant à elles, sont simplement essuyées, au fur et à mesure des besoins, avec un linge imbibé de méthanol, en les manipulant avec une pince pour couvre-objets.

1.2. Pose de la lamelle couvre-objet

Poser une lame couvre-objet sur une goutte de liquide en évitant l'emprisonnement de bulles d'air n'est pas si simple qu'il y paraît. On procédera comme suit : déposer la lamelle sur la tranche, à côté de la goutte de liquide, en l'appuyant sur une aiguille à dissection, puis, avec une pincette pour couvre-objet, coucher délicatement la lamelle sur la goutte de liquide.

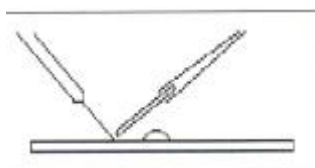


Figure 7 : pose d'une lamelle couvre-objet

Remarque : on procédera exactement de la même manière dans les cas où la goutte de liquide, au lieu de se trouver sur la lame, se trouve sur la lamelle.

2. DISSOCIATION DANS LE ROUGE CONGO AMMONIACAL

Mode opératoire

- Disposer une lame et une lamelle sur un carré de bristol noir.
- Déposer une goutte de rouge Congo ammoniacal sur la lame porte-objet.
- Sur une plaque en verre, découper grossièrement l'objet avec un scalpel puis en débiter une coupe, la plus fine possible, avec une lame de rasoir.
- A l'aide d'une aiguille à dissection, transférer la coupe dans la goutte de rouge Congo ammoniacal, sur le porte-objet.
- Couvrir la préparation avec la lamelle.
- Chauffer l'angle d'un fer à luter dans la flamme d'un brûleur à gaz, puis l'amener au contact d'un bloc de paraffine.
- Déposer une goutte de paraffine en fusion sur deux coins adjacents de la lamelle, de manière à la maintenir en place sur la lame. La paraffine doit fumer mais ne peut grésiller pour bien s'étaler.
- Appliquer sur la lamelle, au-dessus de l'objet, de petits coups répétés avec le manche d'un scalpel, jusqu'à obtention de la dissociation désirée.
- Observer au microscope.

Commentaires : toute préparation microscopique sera réalisée sur un carré de bristol noir de 10 cm de côté. Cette précaution évite la perte des lames et lamelles, amortit les chocs lors de la dissociation, et maintient la propreté des lames de verre.

La dissociation, comme son nom l'indique, ne conserve aucunement la structure des tissus traités. Elle permet donc uniquement l'étude détaillée de cellules isolées, telles les basides (1), les cystides (2) ou les asques (3). Elle est de ce fait réservée à un usage exclusivement cytologique et ne pourra en aucun cas être utilisée à des fins histologiques. La dissociation mécanique, parfois insuffisante, peut dans certains cas être renforcée par une macération chimique.

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

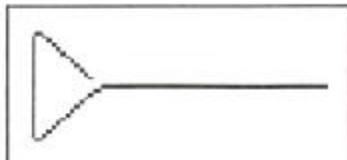


Figure 8 : fer à luter (triangle Drigalski)

Remarques : s'il s'agit de champignons coriaces dont les cellules sont liées par des ciments pectiques, ceux-ci peuvent être dissous, selon M. Langeron et M. Locquin, par macération dans une solution de fluorure de sodium, dite macération chimique :

- Plonger la coupe réalisée comme précédemment, dans une solution aqueuse à 1,5 % de fluorure de sodium contenue dans un verre de montre.
- Après 30 min de macération, repêcher la coupe à l'aide d'une spatule et éliminer le plus gros du liquide avec le coin d'un linge propre et sec, roulé en mèche.
- Transférer la coupe sur la lame porte-objets, dans la goutte de rouge Congo ammoniacal.
- Dissocier comme ci-dessus.

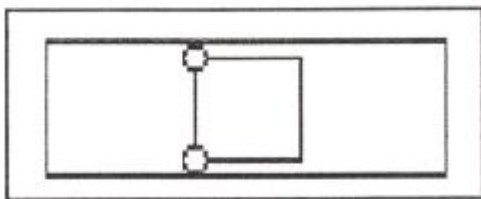


Figure 9 : aspect final d'une préparation extemporanée

Pour la préparation du rouge Congo ammoniacal, voir annexe à la rubrique "Réactifs".

(1) *Basides*: cellules reproductrices caractéristiques des Basidiomycètes, à l'extérieur desquelles sont produites les spores. Ces cellules constituent, avec les cystides, l'hyménium du champignon.

(2) *Cystides*: cellules stériles souvent présentes dans l'hyménium des Basidiomycètes.

(3) *Asques* : cellules à l'intérieur desquelles se forment les spores des Ascomycètes.

2. SPORES

But : La forme, la couleur et l'ornementation des spores sont autant de caractères de la plus haute importance lors de la détermination de champignons. Plusieurs techniques sont proposées ci-dessous, certaines d'entre elles prenant en compte les caractéristiques et affinités chimiques naturelles des spores de nombreuses espèces.

1. OBSERVATION EXTEMPORANEE

But : observer les spores d'un spécimen en vue de le déterminer, sans conserver les préparations.

Mode opératoire

- Déposer, au centre d'une lame porte-objets parfaitement propre et mouillable, une goutte de rouge Congo ammoniacal.
- Introduire une aiguille à dissection dans le flacon contenant la sporée, de manière à en emporter une particule qui sera transférée dans la goutte de colorant.
- Mettre les spores en suspension dans le liquide en décrivant des cercles concentriques de 1,5 cm de diamètre avec une aiguille à dissection.
- Couvrir la préparation avec une lamelle couvre-objets.
- Chauffer le sommet d'un fer à luter dans la flamme d'un bec Bunsen, puis l'amener au contact d'un bloc de paraffine.
- Déposer une goutte de paraffine en fusion sur deux des coins de la lamelle, de manière à la maintenir en place sur la lame. La paraffine doit fumer mais ne peut grésiller pour bien s'étaler.
- Observer au microscope.

Commentaires : le maintien de la lamelle sur la lame est indispensable si on veut pouvoir examiner la préparation avec l'objectif à immersion car, pendant l'observation, il est souvent nécessaire de déplacer la préparation sur la platine du microscope pour pouvoir en examiner une autre partie. Sans maintien, seule la lame porte-objet se déplace, le couvre-objet adhérant à l'objectif à cause de l'huile. De plus, cette technique limite les mouvements dus à l'évaporation du liquide entre la lame et la lamelle, empêchant ainsi les spores de se déplacer, et donc de disparaître du champ de l'objectif au cours de l'observation.

Certains auteurs (M. Langeron et M. Locquin, N. Marchal) conseillent le lutage (1) de la préparation. L'emploi de la paraffine pour cet usage n'est pas avantageux car, pour la faire fondre, il faut chauffer le fer assez fort. De ce fait, le liquide de suspension entre en ébullition et projette des gouttelettes de paraffine en fusion sur la préparation, qui devient alors inobservable.

Remarques : il arrive que subsistent dans la préparation des agglomérats de spores qui n'ont pas été dissous lors de la mise en suspension. On les dissociera en appliquant sur la lamelle de petits coups répétés avec la pointe d'une aiguille très légère. Cette opération est particulièrement délicate car la membrane des spores, fortement gonflée et ramollie par la présence d'ammoniaque, se déchire facilement.

Le rouge Congo ammoniacal sera remplacé par le réactif de Melzer si on désire étudier l'amyloïdité ou la dextrinoïdité positive, négative ou partielle des éléments observés (spores, paraphyses (1), cystides, etc.). Voir à ce sujet le paragraphe "Montage de spores amyloïdes". Si les spores considérées sont amyloïdes, il peut être intéressant d'en réaliser une étude plus approfondie dans ce réactif, qui mettra en évidence aussi bien la membrane de certaines *Amanita* que l'ornementation sporale du genre *Russula* au grand complet.

2. REALISATION D'UN FROTTIS

But : étaler les spores sur la lame porte-objets, de manière à faciliter leur traitement et à permettre une observation détaillée de leur structure.

(1) *Lutage* : fait de luter une préparation (appliquer une couche de paraffine ou de tout autre lut sur le périmètre de la lamelle dans le but de freiner l'évaporation du liquide d'observation).

Mode opératoire

2.1. A partir d'une sporée conservée dans un flacon :

- Prélever et mettre en suspension, comme précédemment, un fragment de sporée dans une minuscule goutte d'eau distillée, sur une lame porte-objets.
- Poursuivre l'étalement jusqu'à évaporation quasi complète du liquide, puis parfaire le séchage du frottis à l'air libre pendant 3 min.

2.2. A partir d'une sporée étalée sur plaque de verre :

- Gratter, avec un scalpel, une minuscule parcelle de la sporée à observer.
- Transférer le prélèvement dans une goutte d'eau, sur une lame, puis étaler les spores et sécher le frottis comme précédemment.

2.3. A partir d'un exemplaire frais :

- Déposer, au centre d'une lame porte-objets parfaitement propre et mouillable, une gouttelette d'eau distillée.
- Avec une pincette à pointes fines, prélever un minuscule fragment de l'hyménium du carpophore dont les spores sont à examiner et l'agiter quelque peu dans la goutte d'eau.
- Eliminer le fragment d'hyménium, puis étaler les spores ainsi récoltées avec une aiguille et sécher le frottis.

2.4. A partir d'un exsiccatum :

- Procéder comme ci-dessus, mais augmenter le volume de la goutte d'eau car le fragment d'hyménium, complètement déshydraté, en absorbe une bonne partie.

Commentaires : il est pratiquement impossible de traiter des spores autrement qu'à partir d'un frottis, car leur taille est bien trop réduite que pour permettre un traitement individuel. Le frottis isole les spores, ce qui les empêche de se déformer par compressions mutuelles et permet une meilleure pénétration des réactifs.

Réaliser un frottis à partir d'un exemplaire frais est une technique s'appliquant particulièrement bien aux espèces trop petites que pour être capables de fournir une sporée suffisante, comme *Geopyxis carbonaria*. Ces espèces, du fait de leur petite taille, se dessèchent très vite, même en milieu clos, et ont une surface hyméniale beaucoup trop réduite.

D'autres espèces, légèrement plus charnues, sont capables de produire une sporée un peu plus importante, mais encore impossible à conserver dans un flacon car en quantité toujours trop faible. D'où l'intérêt d'un frottis à partir d'une sporée étalée sur plaque de verre.

3. MONTAGE DE SPORES NATURELLEMENT COLOREES

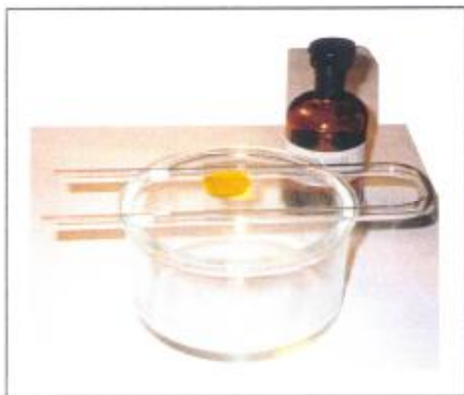


Figure 10 : dispositif de traitement des lames

1) Paraphyses : cellules stériles intercalées entre les asques de nombreux Ascomycètes. Elles sont en quelque sorte équivalentes aux cystides des Basidiomycètes.

4. MONTAGE DE SPORES AMYLOIDES

But : réaliser des préparations conservables en mettant à profit la réaction que présentent les spores de nombreuses espèces de champignons mises en contact avec l'iode. Cette réaction est dite amyloïde, selon que la coloration obtenue est bleue ou noirâtre, ou dextrinoïde, selon qu'elle est brune ou brun-rouge. La spore toute entière, y compris son contenu, peut être concernée par la réaction, comme chez certaines *Amanita*, alors que, comme chez les *Russula*, la réaction peut être localisée dans l'ornementation sporale uniquement.

Mode opératoire

- Fixer, laver et sécher comme précédemment un frottis des spores à monter.
- Laisser évaporer le liquide restant à l'air libre pendant 2 min, puis colorer le frottis en le couvrant par dix gouttes de réactif iodé de Melzer.
- Laisser agir pendant 10 min, puis égoutter et plonger la lame dans un bain d'eau distillée.
- Après 5 sec de lavage, égoutter puis sécher comme précédemment.
- Monter la préparation en déposant sur le frottis coloré une grosse goutte d'*Histomount*.
- Couvrir d'une lamelle puis laisser durcir le milieu de montage pendant 24h avant d'observer.

Commentaires : le réactif iodé de Melzer, comme son nom l'indique, contient de l'iode, qui a la propriété de réagir avec certains glucides comme l'amidon, principalement présent dans les spores de nombreuses espèces de champignons.

Certains auteurs préfèrent au Melzer le réactif de Lugol en raison de son meilleur pouvoir éclaircissant ; tous deux contiennent de l'iode et de l'iodure de potassium, mais l'un d'eux, le Melzer, contient en plus de l'hydrate de chloral. Ce dernier composant, grâce à ses propriétés regonflantes, renforce la distinction entre la réaction amyloïde et la réaction dextrinoïde, ce qui facilite l'observation.

Remarque : pour la préparation du réactif iodé de Melzer, voir annexe A la rubrique "Réactifs".

5. MONTAGE GENERAL DES SPORES

But : permettre le montage des spores qui ne sont ni amyloïdes, ni colorées naturellement, ou alors insuffisamment.

Mode opératoire

- Réaliser, comme expliqué précédemment, un frottis des spores à traiter.
- Fixer les spores en les couvrant par dix gouttes d'une solution aqueuse à 0,5 % d'oxyde de chrome (VI). Laisser agir pendant 5 min, puis laver et sécher le frottis fixé.
- Déposer, sur la préparation, une goutte de gélatine au rouge Congo fondue à la chaleur, puis couvrir d'une lamelle posée délicatement.
- Laisser durcir ce milieu de montage pendant 10 min avant d'observer au microscope.

Commentaires : on fixe les spores avec une solution d'oxyde de chrome (VI) afin qu'elles ne se rétractent pas, une fois montées dans la gélatine. L'action du rouge Congo contenu dans le milieu de montage ne s'exerce pas directement sur l'objet ; c'est-à-dire que ce colorant n'est pas destiné à agir sur les structures des spores, mais principalement sur le fond de la préparation. Une coloration de ce type est dite négative : le résultat est que les spores, moins colorées que le reste de la préparation, ressortent sur le fond teinté plus vivement. La présence d'ammoniaque dans la gélatine au rouge Congo participe au maintien de la forme des spores, en les gonflant au maximum.

Toutefois, après plus de trois cents essais pour lesquels j'ai fait varier la nature du fixateur, celle du colorant et les temps d'action, je n'estime pas cette technique satisfaisante. J'ai sélectionné pour ces essais une dizaine de fixateurs et le double de colorants ; il ne m'a pas semblé utile de les reprendre ici. Chaque technique avait des avantages et des inconvénients, mais aucune n'était parfaite. Toute suggestion sera bienvenue !

Remarque : pour la préparation de la gélatine au rouge Congo, voir annexe à la rubrique "Réactifs".

3. COUPES AU MICROTOME

But : réaliser, à l'aide du microtome à main, des coupes fines qui pourront être soit observées extemporanément, soit colorées et montées.

1. TECHNIQUES D'USAGE GENERAL

1.1. Affûtage du rasoir

But : aiguiser le rasoir pour rendre son tranchant plus fin, de manière à ce qu'il pénètre mieux les objets, sans en altérer les structures ni en déchirer les cellules.

Mode opératoire :

- Enduire une des faces du bloc d'affûtage (toujours la même), avec la pâte noire, en passant le cube de graisse à aiguiser sur toute la surface du cuir jusqu'à ce qu'il glisse aisément.
- Déposer sur le cuir, côté manche, le rasoir sur son dos, puis le faire pivoter de manière à ce que le tranchant soit dirigé vers le manche du bloc à aiguiser.
- Faire glisser le rasoir sur toute la longueur du cuir en appuyant légèrement. Le dos de la lame est donc orienté vers l'avant sur toute l'étendue du mouvement.
- Retourner le rasoir en le faisant pivoter sur son dos, puis le faire glisser, toujours dos vers l'avant, jusqu'au manche du bloc.
- Retourner à nouveau le rasoir de la même manière, puis recommencer le mouvement complet une trentaine de fois.
- Essuyer la lame avec un linge fin imbibé de méthanol afin d'en éliminer le dépôt de graisse.
- Enduire, comme ci-dessus, l'autre face du bloc avec la pâte à aiguiser rouge, puis repasser le rasoir sur le cuir comme précédemment, à cinquante reprises. - Après avoir soigneusement nettoyé la lame avec un linge imbibé de méthanol afin que tout reflet gras ait disparu, passer le rasoir à l'eau courante, puis l'essuyer avec un linge fin, propre, sec et non pelucheux.

Commentaires : un rasoir mal affûté est la cause de bien des incidents lors du débitage d'un objet inclus à la paraffine. Il est en effet impossible d'obtenir des coupes suffisamment fines avec un tranchant imparfait ; aussi le rasoir devra-t-il être repassé avant chaque utilisation.

La pâte noire est celle dont la granulométrie est la plus ample ; c'est pourquoi elle est toujours utilisée en premier lieu. Elle a pour effet d'enlever les aspérités du tranchant et d'effectuer un polissage grossier. La pâte rouge, à grain plus fin, est employée ultérieurement pour parfaire le polissage du tranchant. .

L'action du cuir résulte de son élasticité : il se déprime sous le poids du couteau pour épouser le relief du tranchant, qu'il polit et uniformise.

Remarques : le bloc à aiguiser utilisé est en fait un bloc en bois à deux faces utiles, recouvertes chacune d'une lanière de cuir. Ce matériau, s'il était utilisé seul, n'aurait pour ainsi dire aucun effet ; aussi sont livrés, avec le bloc d'affûtage, deux petits cubes de graisse à aiguiser : un noir à granulométrie moyenne et un rouge à grain plus fin.

Pour s'assurer que l'affûtage du rasoir est suffisant, on peut en observer le tranchant au microscope, à un grossissement de 100x environ. Manipuler le couteau très précautionneusement pour éviter d'endommager l'optique. L'affûtage est considéré comme satisfaisant si le tranchant, à ce grossissement, ne présente que des stries très fines et parfaitement régulières. Si ce n'est pas le cas, le repassage doit être répété.

On ne repassera jamais sur le cuir une lame ébréchée, sous peine de le déchirer irrémédiablement. Il faut être très prudent avec le rasoir repassé car le moindre choc sur le tranchant y marque une brèche.

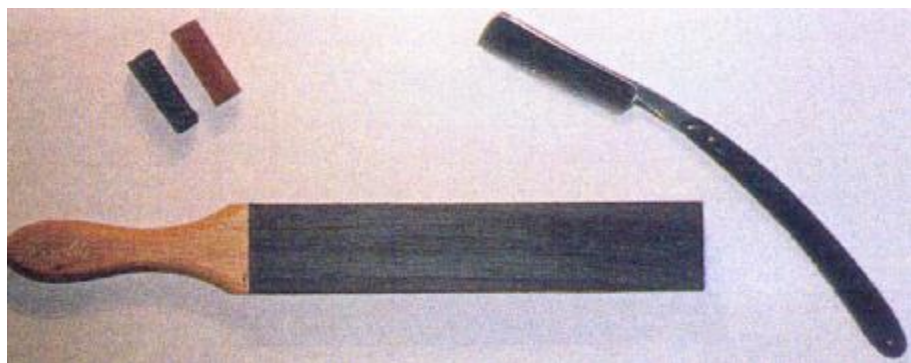


Figure 11 : matériel d'affûtage du rasoir

1.2. Conception d'un moule en aluminium

But : réaliser un moule dans lequel la paraffine contenant l'objet sera coulée.

Mode opératoire

- Découper, dans une feuille d'aluminium, un rectangle d'une largeur de 6 cm et d'une longueur de 9 cm.
- Déposer, au centre de ce rectangle, un bloc de bois de 2 cm x 2 cm x 4 cm environ.
- Par pliages successifs, sans jamais couper ni déchirer l'aluminium, réaliser le moule comme il est décrit sur la figure ci-dessous.

Commentaires : un moule comme celui-ci n'est pas conservable ; on devra donc en fabriquer un nouveau à chaque utilisation.

La souplesse de la feuille d'aluminium étant relativement limitée, il est très difficile d'obtenir des moules parfaitement étanches: le pliage provoque presque toujours la formation d'un minuscule orifice à chaque angle. Aussi y coulera-t-on l'objet en dernière minute ; l'imprégnation doit se faire dans un autre récipient.

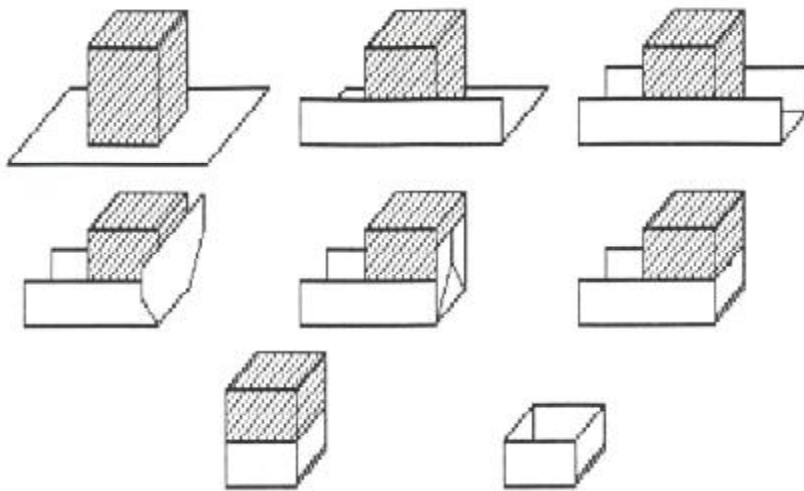


Figure 12 : étapes successives de la réalisation d'un moule en aluminium

1.3. Enrobage de la pièce dans la moelle de sureau

But : introduire la pièce dans un segment de moelle de sureau qui la maintiendra en place dans le cylindre du microtome.

Mode opératoire

- Fendre longitudinalement en deux parties égales, à l'aide d'un scalpel, un segment de moelle de sureau dont la longueur dépasse de 0,5 cm environ la pièce.
- Avec ce même instrument, gratter, sur chacune des deux parties, les squames se trouvant sur la surface de section.
- Toujours à l'aide du scalpel, creuser dans chaque moitié, au niveau de l'extrémité, une petite cavité de la taille et de la forme exactes de l'objet, mais de sa demi- épaisseur.
- Introduire la pièce dans la dépression d'une des deux moitiés puis ajuster l'autre moitié de manière à reformer le cylindre de moelle. L'objet doit être bien calé et ne doit plus pouvoir bouger.
- A l'aide d'une pincette, insérer le tout à la hauteur voulue dans le cylindre du microtome puis serrer la pince juste assez pour que la moelle soit maintenue fermement, mais pas écrasée.

Commentaires : la pièce à débiter doit être de taille relativement réduite et de forme allongée. La surface à couper (sans tenir compte de la moelle de sureau) ne peut excéder 10 mm², mais l'objet doit avoir une longueur variant de 1 à 1,5 cm, bien que cette dernière mesure dépende du modèle du microtome utilisé. Dans tous les cas, plus la surface de section sera réduite, meilleures seront les coupes.

Remarques : le coût de la moelle de sureau étant relativement élevé dans le commerce, on pourra s'en procurer en fendant délicatement les bois morts et secs du sureau noir (*Sambucus nigra*). Pour ce faire, on casse la branche à un nœud, puis on fend précautionneusement l'écorce et on en extrait la moelle. On la débite en morceaux de 10 cm de longueur environ, puis on la laisse sécher pendant une semaine à l'air libre, après quoi on élimine les mauvais segments. Seules les sections dont la consistance est bien ferme seront conservées ; celles qui s'effritent ou se rompent à la moindre manipulation seront rejetées.

Le microtome utilisé est un microtome de Ranvier. Cet instrument comprend essentiellement un cylindre surmonté d'une large plate-forme, dans lequel est glissé l'objet enrobé dans la moelle de sureau. Un piston, actionné par une vis micrométrique, fait monter l'objet par très petits paliers. Le rasoir coupe tout ce qui dépasse de la plate-forme. Avec cet instrument, la minceur des coupes n'a d'autres limites que la finesse du tranchant et la perfection de la vis micrométrique.

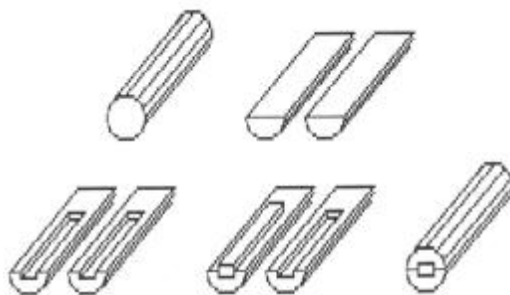


Figure 13 : enrobage dans la moelle de sureau

2. OBSERVATION EXTEMPORANEE

But : observer, à partir de coupes faites au microtome, la trame des lames des champignons : l'orientation et la structure des hyphes (cellules fongiques) constituant celles-ci sont en effet des caractères importants de détermination chez les Basidiomycètes. Les préparations obtenues en suivant la technique proposée ci-dessous ne seront pas conservables.

2.1. Inclusion de l'objet dans la paraffine

But : inclure dans la paraffine un fragment de l'hyménium à observer afin de faciliter la découpe.

Mode opératoire

- Prélever, à l'aide d'une lame de rasoir et d'un scalpel, une lamelle dans l'hyménium de l'exemplaire à déterminer. Utiliser des pincettes afin d'éviter tout contact avec les doigts.
- Avec la lame de rasoir, découper dans le flanc de cette lamelle, du côté de l'arête, un rectangle d'une largeur maximum de 0,5 cm et d'une longueur d'environ 1,5 cm. Procéder à plat sur une plaque de verre pour plus de facilité.
- Saisir, à l'aide d'une pincette, le fragment de lamelle par un coin, puis le plonger, sans le lâcher, dans un bain de paraffine à 80° C.
- Laisser s'imprégner de paraffine pendant 5 sec le tissu toujours retenu par la pincette, puis le sortir du bain et le laisser refroidir 2 sec à l'air avant de le déposer bien à plat à la surface d'un bain d'eau distillée.
- Une fois la paraffine bien prise, retirer de l'eau l'échantillon inclus et le déposer sur un papier filtre afin de l'égoutter.
- Détacher délicatement le fragment d'hyménium de la pincette à l'aide d'un scalpel, en prenant garde de ne pas entamer le film de paraffine qui s'est formé autour de l'objet.
- Avec la lame de rasoir, couper, perpendiculairement aux deux bords, l'extrémité par laquelle était maintenu l'échantillon, de manière à obtenir une surface bien régulière.

Commentaires : cette inclusion à la paraffine est indispensable à cause de la haute teneur en eau de nombreux champignons. Découper au microtome un échantillon aussi délicat sans inclusion préalable serait extrêmement ardu, car, lors de l'enrobage dans la moelle de sureau, les tissus exprimés s'écraseraient. La paraffine rend donc l'ensemble plus résistant et forme autour de l'objet un film imperméable empêchant la moelle de sureau d'aspirer l'eau des tissus.

Remarques : pendant toutes ces opérations, l'objet doit être maintenu dans la pincette et ne peut être lâché qu'au moment de l'égouttage. Le milieu d'inclusion utilisé est une paraffine solide dont la température de fusion est située aux alentours de 53° C.

On peut naturellement procéder de la même manière avec d'autres tissus qu'avec les lames, mais il faut veiller dans tous les cas aux dimensions de l'objet dont l'épaisseur ne peut excéder 1,5 mm, sans quoi l'inclusion serait insuffisante et les coupes difficiles. Pour les autres mesures, se référer à celles données ci-dessus. La longueur de l'échantillon, comme il a déjà été dit plus haut, dépend de la capacité du microtome.

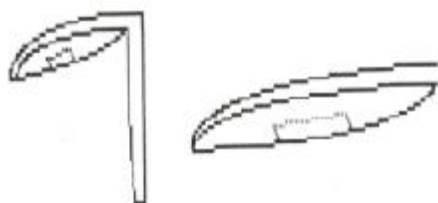


Figure 14 : prélèvement dans le flanc d'une lamelle

2.2. Débitage des coupes

But : réaliser les coupes qui seront traitées ultérieurement.

Mode opératoire

- Enrober la pièce incluse, comme expliqué précédemment, dans un segment de moelle de sureau (il est ici inutile de creuser une cavité, l'objet étant suffisamment fin), puis insérer le tout dans le cylindre du microtome.
- Actionner la vis micrométrique jusqu'à ce que l'objet dépasse la plate-forme de 1 mm environ.
- Déposer le rasoir bien à plat sur la platine de l'instrument, puis approcher de l'objet la partie du tranchant qui se trouve près du manche.
- Orienter la lame de manière à ce qu'il y ait un angle de 60° environ entre le tranchant et le côté de la pièce incluse.
- D'un mouvement franc et régulier, faire glisser le rasoir sur la platine, en l'attirant vers soi de manière à débiter la première coupe. Toute la longueur du tranchant doit être utilisée pour obtenir les meilleurs résultats (voir figure 16).
- Essuyer le rasoir et la plate-forme du microtome avec un linge fin, imbibé de méthanol en évitant tout contact du solvant avec la pièce.
- Faire monter l'échantillon de 25 µm, puis réaliser la coupe comme ci-dessus. Essuyer à nouveau le rasoir et la platine au méthanol.
- Recommencer, de la même manière, des coupes à 25 µm jusqu'à ce que le bloc de paraffine soit entamé et que la surface de coupe soit bien régulière, en rejetant les coupes, qui sont bien trop épaisses.
- Une fois ces deux conditions remplies, réaliser une coupe à 15 µm qui sera éliminée également ; essuyer le rasoir et la plate-forme au méthanol.
- Réaliser une coupe à 10 µm qui pourra être traitée si elle est entière et semble bien réussie. Si ce n'est pas le cas, recommencer une coupe à 15 µm puis une à 10 µm jusqu'à ce que cette dernière soit valable.

Commentaires : on ne peut malheureusement pas espérer réussir une coupe après seulement deux ou trois essais. Il faut parfois en réaliser vingt ou trente avant d'en obtenir une convenable.

Figure 15 : microtome à main de Ranvier



Entre chaque coupe d'une épaisseur de 10 µm, on en réalise une, qui est éliminée, à 15 µm, dans le but de remettre l'objet à niveau et de rectifier la surface de coupe. Chaque fois qu'elles sont mauvaises, les coupes à 10 µm provoquent à la surface de l'objet des striures microscopiques qui rendraient, si on ne les éliminait, la coupe suivante aussi mauvaise que celle qui vient d'être rejetée. En effet, les tissus, au lieu d'être pénétrés proprement, sont alors déchirés et déformés.

Un nettoyage du rasoir et de la plate-forme du microtome est indispensable entre chaque coupe afin d'éliminer les agglomérats de paraffine se déposant sur ces surfaces, et créant des surépaisseurs qui empêchent la régularité des coupes. On prendra garde cependant à ce que le méthanol n'entre jamais au contact de l'objet, car

ce solvant pourrait altérer aussi bien le film de paraffine que les cellules constituant des tissus.

Remarques : pour obtenir les meilleurs résultats, pour les droitiers, la meilleure méthode est certainement de tenir fermement le microtome dans la main gauche, posée bien à plat sur la table de travail, et, dans la main droite, de tenir le rasoir. Le mouvement de la lame, pour être bien régulier, doit être dû non pas au poignet, mais au coude : l'avant-bras et la main doivent rester dans un même axe. Pour les gauchers, inverser la position des instruments.

Le rasoir ne sera en aucun cas utilisé comme une scie, car les coupes seraient alors très irrégulières. On doit équilibrer les forces de son geste de manière à ce que la coupe soit entièrement réalisée en un seul mouvement.

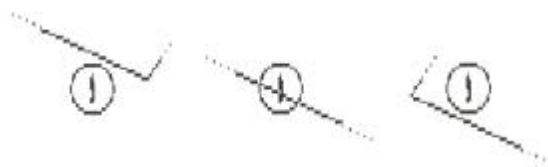


Figure 16 : position d'un tranchant par rapport à l'objet pendant la coupe

2.3. Traitement et observation des coupes

But : déparaffiner et colorer les coupes avant l'observation.

Mode opératoire

- Tenir, avec une pincette, une des deux moitiés de la tranche de moelle et tirer, avec une autre pincette, sur la deuxième moitié, afin de les séparer.
- Détacher, à l'aide d'une aiguille montée, la coupe de la partie à laquelle elle est restée accrochée,
- Déposer la coupe à la surface d'un bain de trichloréthylène, contenu dans une boîte de Pétri.
- Après 90 sec de déparaffinage, repêcher la coupe sur une spatule fine et courbée, puis la déposer sur une lame porte-objets propre et mouillable,
- Avec le coin d'un linge fin roulé en mèche, aspirer, autour de la coupe, le plus gros du trichloréthylène déposé sur la lame.
- Laisser évaporer le reste du liquide pendant 2 min, puis déposer, sur la coupe, une goutte de rouge Congo ammoniacal.
- Couvrir d'une lamelle, puis déposer une goutte de paraffine en fusion sur deux des coins du couvre-objet, comme décrit plus haut, pour le maintenir en place sur la lame.
- Observer au microscope la préparation ainsi terminée. Si la membrane des cellules n'est pas bien distincte, il faut recommencer la coupe car c'est alors qu'elle est trop épaisse.

Commentaires : autant la paraffine rend de services lors de la coupe, autant devient-elle nuisible pendant l'observation. Elle empêche en effet la bonne pénétration des réactifs, et masque les cellules lors de l'examen. D'où l'intérêt du passage de la coupe dans le trichloréthylène, qui dissout complètement la paraffine.

Certains auteurs (M. Langeron et M. Locquin) conseillent, au lieu de trichloréthylène, le toluène, le benzène ou le xylène. C'est à mon avis une grave erreur car, la densité de ces solvants étant trop faible, la coupe tombe au fond du récipient. On doit alors, pour la récupérer, utiliser des pincettes qui écrasent les tissus ; il est d'ailleurs bien souvent impossible de repêcher la coupe. Donc, même si les propriétés chimiques du trichloréthylène sont légèrement inférieures à celles du toluène qui éclaircit les tissus en plus de les déparaffiner, on optera tout de même pour ce solvant, bien qu'il soit légèrement plus onéreux.

Remarques : si, au microscope, on observait dans la préparation finale la présence de bulles qui n'ont pas l'aspect caractéristique des bulles d'air, mais qui évoquent plutôt des globules graisseux, il faudrait prolonger le temps d'évaporation du trichloréthylène avant de couvrir la coupe d'une goutte de rouge Congo ammoniacal. Ce solvant, n'étant pas miscible à l'ammoniac, trahit sa présence par l'apparition de ces globules qui sont en fait des gouttelettes de trichloréthylène en suspension dans le liquide d'observation.

3. MONTAGE DE COUPES COLOREES

But : colorer et monter des coupes réalisées au microtome afin de pouvoir les conserver indéfiniment et les mettre en collection pour des observations et comparaisons futures. La technique décrite ci-après est assez longue mais donne d'excellents résultats.

3.1. Préparation de l'objet à la découpe

But : fixer, laver, déshydrater puis inclure dans la paraffine la pièce à découper.

Mode opératoire

- Prélever, dans la région à étudier, un échantillon dont la longueur est d'environ 1,5 cm et dont la surface à couper n'excède pas 2 mm x 2 mm.
- Fixer le prélèvement en le plongeant dans un flacon fermé, à col large et rodé, contenant 50 ml de picroformol acide de Bouin.
- Après 12 h de fixation, récupérer délicatement l'échantillon à l'aide d'une spatule puis le plonger dans un même flacon contenant 50 ml d'eau distillée.
- Repêcher, comme précédemment, la pièce lavée pendant 24 h, puis l'immerger dans un troisième bain composé de 50 ml d'acétone anhydre.
- Après 48 h de déshydratation, introduire l'échantillon dans un flacon contenant 50 ml de trichloréthylène et l'y abandonner pendant 2 h avant de le déposer dans un bain de paraffine à 60° C.
- Laisser les tissus s'y imprégner pendant 24 h.
- Couler 1,5 cm de paraffine liquide dans un moule en aluminium réalisé comme expliqué plus haut et tenu à la température de 60° C.
- A l'aide d'une spatule, sortir l'échantillon du bain et le déposer sur le fond du moule, dans la paraffine, en s'assurant qu'il se trouve à peu près au centre de celui-ci.
- Laisser refroidir le tout pendant 12 h sans aucun mouvement, sous peine de déformer le bloc de paraffine encore molle ou, ce qui est plus grave, de décentrer la pièce.

Commentaires : l'intérêt de la fixation a déjà été exposé précédemment, je n'y reviendrai donc pas. Le lavage dans l'eau distillée est indispensable avant toute autre opération, car il débarrasse la pièce des excès de fixateur qui pourraient nuire à l'action des réactifs ultérieurs.

Déshydrater les tissus par l'acétone est nécessaire à une bonne pénétration de ceux-ci par la paraffine. Lors du passage dans le dernier bain, on remplace dans les tissus l'acétone par le trichloréthylène en raison de la trop basse température d'ébullition de l'acétone (56,5°C à 101,3kPa). Ce solvant, au contact du bain de paraffine à 60°C, entrerait en ébullition et ferait éclater la membrane des cellules, au contraire du trichloréthylène qui, lui, bout à 86,8°C (à 101,3kPa).

Remarques : tous ces bains (sauf la paraffine qui se trouve dans une petite capsule à fond plat) sont contenus dans des flacons de 100 ml, à col large et rodé, à raison de 50 ml de liquide par flacon. Pour la préparation du picroformol acide de Bouin, voir annexe à la rubrique "Réactifs".

3.2. Débitage des coupes

But : réaliser, au microtome à main, des coupes très fines qui seront ensuite collées sur une lame porte-objets.

Mode opératoire

- Extraire le bloc de paraffine en déchirant le moule d'aluminium, qui sera ensuite éliminé.
- Tailler le bloc de paraffine en en détachant de fines écailles à l'aide d'un scalpel jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 1mm de paraffine autour de l'objet. Les faces du bloc doivent être parallèles.
- Enrober le bloc taillé dans un segment de moelle de sureau, comme décrit plus haut, puis insérer le tout dans le cylindre du microtome.
- Réaliser les coupes comme expliqué précédemment, en choisissant une épaisseur de 7 µm, plutôt que de 10 µm, pour les coupes qui seront conservées.
- Réaliser 10 coupes convenables de cette épaisseur, en les déposant au fur et à mesure à la surface d'un bain d'éthanol à 96° contenu dans une boîte de Pétri.

Commentaire : il est possible ici de faire des coupes de 7 µm d'épaisseur seulement car l'objet est pénétré plus régulièrement par le tranchant du rasoir, la qualité de l'inclusion à la paraffine étant infiniment meilleure que précédemment.

Remarques : la marche générale des opérations pour la coupe est exactement identique à celle décrite dans la technique précédente, hormis le fait que les coupes traitables sont faites à l'épaisseur de 7 µm au lieu de 10 µm. Afin de faciliter la pénétration du rasoir dans le bloc de paraffine, il est très efficace, entre chaque coupe, d'exposer la plate-forme du microtome, et donc l'objet, à un courant d'air chaud à la température de 40° C pendant quelques secondes. Le but de cette opération est d'empêcher les coupes de s'effriter mais non pas de s'enrouler. Le rasoir doit être réchauffé lui aussi, mais beaucoup moins longtemps et moins fréquemment, de manière à ce que sa température reste toujours sensiblement inférieure à celle de l'objet. La pièce incluse peut, le cas échéant, avoir une taille nettement plus importante que celle préconisée plus haut, mais cette différence augmente proportionnellement la difficulté de la coupe.

3.3. Collage des coupes sur lame

But : coller les coupes déparaffinées qui seront ensuite traitées avant montage.

Mode opératoire

- Déposer, au centre d'une lame porte-objets parfaitement propre et mouillable, une goutte de gélatine phéniquée.
- Placer la lame sur deux petits tubes servant de support, dans une boîte de Pétri fermée contenant du formol, afin d'insolubiliser la gélatine. La lame ne doit jamais entrer en contact avec le liquide.
- Après 5 min, retirer la lame des vapeurs de formol puis la laisser 2 min à l'air libre.
- Pendant ce temps, sortir, à l'aide d'une spatule, une coupe du bain d'éthanol et aspirer le liquide autour des tissus à l'aide d'une bandelette de papier filtre, sans jamais entrer en contact avec ceux-ci.
- Laisser évaporer l'éthanol restant pendant 2 min, puis transférer la coupe dans un bain de trichloréthylène afin de la déparaffiner.
- Après 3 min de déparaffinage, ressortir la coupe, éponger le liquide et laisser sécher pendant 2 min, comme précédemment.
- Déposer la coupe à la surface de la goutte de gélatine phéniquée, sur la lame, à l'aide d'une spatule et d'aiguilles montées.
- Exposer, pendant 15 min, la lame dans un courant d'air chaud à la température de 40° C afin de faire sécher la gélatine phéniquée et de coller la coupe.
- Recommencer les mêmes opérations pour 4 autres coupes, celles qui, à l'œil nu, semblent les meilleures.
- Observer, à un grossissement de 100x environ, les 5 lames telles quelles, choisir les 3 meilleures et éliminer les autres.

Commentaires : la gélatine phéniquée est une colle soluble dans l'eau, c'est pourquoi on l'expose pendant 5 min aux vapeurs de formol avant d'y déposer la coupe. Le formol, de la même manière que le piciformol acide de Bouin pour les tissus, fixe la gélatine et la rend insoluble. La coupe ne pourra donc pas se décoller lors du passage dans les bains aqueux : le colorant biacide de Mann et le bain de lavage, en l'occurrence.

Remarques : pendant toutes ces opérations, la coupe reste sur la spatule : le séchage, après passage dans les différents bains, se fait sur la spatule. La coupe est lâchée uniquement quand elle est plongée dans un liquide. Il faut absolument éviter de manipuler les coupes à l'aide de pincettes, qui écraseraient, déchireraient et déformeraient cellules et tissus.

Pour la préparation de la gélatine phéniquée, voir annexe à la rubrique "Réactifs".

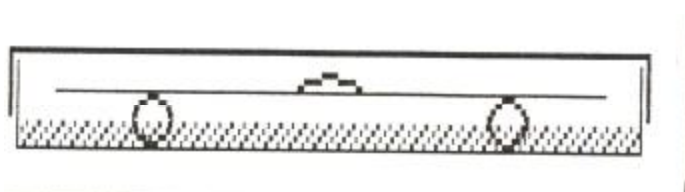


Figure 17 : insolubilisation de la gélatine phéniquée

3.4. Traitement et montage des coupes

But : colorer, laver, différencier, déshydrater et éclaircir les coupes pour pouvoir les monter et les conserver indéfiniment.

Mode opératoire

- Déposer délicatement chacune des lames, coupe vers le haut, au fond d'une boîte de Pétri remplie sur une hauteur de 0,5cm de colorant biacide de Mann.
- Après 12 h de coloration, repêcher précautionneusement une des lames puis la plonger, pendant 15 sec, dans une boîte de Pétri contenant de l'eau distillée.
- Sortir la lame de l'eau, l'égoutter, puis l'insérer entre deux épaisseurs de papier filtre afin d'éponger le plus gros du liquide en évitant de frotter, sous peine de voir la coupe emportée par le filtre.
- Déposer la lame sur le dispositif de traitement (voir figure 10) et laisser évaporer l'eau restante pendant 2 min.
- Couvrir la coupe par quinze gouttes d'une solution d'orange G à 0,1% dans l'éthanol à 70° afin de différencier la coloration des tissus. Laisser agir pendant 20 sec, puis égoutter la lame et renouveler le liquide.
- Après 20 nouvelles secondes de différenciation, sécher, comme précédemment, la lame entre deux épaisseurs de papier filtre et laisser évaporer le liquide restant à l'air libre pendant 2 min.
- Couvrir la préparation par quinze gouttes d'éthanol absolu afin de déshydrater la coupe, puis égoutter et sécher comme précédemment, après 15 sec d'action,
- Déposer sur la lame quinze gouttes de toluène puis égoutter et sécher, après 10 sec d'éclaircissement.
- Monter la préparation en déposant sur la coupe une grosse goutte d'*Histomount* puis en couvrant le tout par une lamelle bien propre.
- Laisser durcir le milieu de montage pendant 24h avant d'observer au microscope.

Commentaires : les coupes sont différenciées dans une solution alcoolique d'orange G afin d'en éliminer les excès de colorant. Si on ne différenciait pas la préparation, tous les tissus seraient teintés de la même manière, et la coloration n'aurait alors pour ainsi dire aucun intérêt. En effet, chacune des deux substances colorantes constituant le Mann biacide va se fixer sur les cellules, avec des préférences cependant pour certaines structures. D'où l'intérêt de la différenciation, qui élimine sur chaque structure celui des deux colorants qui est le moins bien fixé.

Si les deux colorants ont la même emprise sur telle ou telle structure, cette dernière prendra alors une teinte intermédiaire. Par contre, plus un des deux colorants dominera l'autre sur une structure déterminée, plus la teinte prise par celle-ci se rapprochera du dominant et s'éloignera de l'autre.

La déshydratation de la coupe à l'éthanol absolu est indispensable pour deux raisons : le toluène n'étant pas miscible à l'eau mais bien à l'éthanol, il faut substituer l'éthanol à l'eau dans les tissus afin de permettre la pénétration du toluène, dont le but est d'éclaircir les tissus, afin de rendre les coupes moins opaques et donc plus nettes à l'observation. D'autre part, il est exclu de monter une préparation dans laquelle il reste de l'eau (à moins d'utiliser un milieu hygrophile, plus difficile d'utilisation car il faut souvent luter les préparations), étant donné que ce liquide forme, au contact de *Histomount*, un trouble blanc et contrevient à la bonne pénétration des cellules par ce milieu de montage.

Remarque : pour la préparation du colorant biacide de Mann (ou Mann biacide), voir annexe à la rubrique "Réactifs".

<p>Prélèvement de l'échantillon frais</p> <ul style="list-style-type: none">↳ Fixation dans le picroformol acide de Bouin (12h)↳ Lavage dans l'eau distillée (24h)↳ Déshydratation dans l'acétone anhydre (48h)↳ Remplacement de l'acétone par le trichloréthylène (2h)↳ Inclusion dans la paraffine à 60°C (24h)↳ Moulage dans un moule en aluminium↳ Durcissement du bloc dans son moule (12h)
<ul style="list-style-type: none">↳ Taille du bloc au scalpel↳ Enrobage du bloc dans un segment de moëlle de sureau↳ Débitage des coupes de 7µm d'épaisseur↳ Etalage des coupes sur l'éthanol à 96°
<ul style="list-style-type: none">↳ Insolubilisation de la gélatine phéniquée par les vapeurs de formol (5min)↳ Déparaffinage des coupes dans le trichloréthylène (2min)↳ Collage des coupes à la gélatine phéniquée insolubilisée↳ Séchage de la gélatine dans un courant d'air à 40°C (15min)
<ul style="list-style-type: none">↳ Coloration dans le blacide de Mann (12h)↳ Lavage dans l'eau distillée (15sec)↳ Différenciation par l'orange G dans l'éthanol à 70° (2x20sec)↳ Déshydratation par l'éthanol absolu (15sec)↳ Eclaircissement par le toluène (10sec)↳ Montage dans l'<i>Histomount</i>↳ Durcissement du milieu de montage (24h)

Figure 18 : marche des opérations

4. TRAITEMENT D'EXSICCATA

But : régénérer les exsiccata de manière à pouvoir les traiter et les observer comme des exemplaires frais.

1. DISSOCIATIONS

But : dissocier un fragment d'exsiccatum en vue de l'observation d'hyphes isolées.

Mode opératoire :

- A l'aide d'un scalpel, prélever sur l'exsiccatum un minuscule fragment dans la région à observer. Opérer sur une plaque de verre pour plus de facilité.
- Plonger ce prélèvement dans le mélange de Cendrier contenu dans une boîte de Pétri. Laisser les tissus se regonfler durant 5 min.
- Transférer, au centre d'une lame porte-objets, le fragment régénéré et absorber le plus gros du liquide autour des tissus à l'aide du coin roulé en mèche d'un linge fin, propre et sec.
- Couvrir le fragment d'une goutte de rouge Congo ammoniacal, puis d'une lamelle.

- Pour la suite des opérations, relire le paragraphe "Dissociation dans le rouge Congo ammoniacal" du chapitre traitant des dissociations.

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

Remarque : pour la préparation du mélange de Cendrier, voir annexe à la rubrique "Réactifs".

2. SPORES

But : observer les spores d'un exsiccatum.

Mode opératoire :

- Déposer une grosse goutte de rouge Congo ammoniacal au centre d'une lame porte-objet parfaitement propre et mouillable.
- Prélever, à l'aide d'une pincette, un fragment dans l'hyménium de l'exsiccatum dont les spores sont à observer.
- Déposer ce prélèvement dans le colorant et l'y agiter quelque peu avant de l'éliminer.
- Couvrir d'une lamelle qui sera maintenue sur la lame à l'aide de deux gouttes de paraffine fondue avant d'observer.

Commentaire : il est ici inutile de passer par le mélange de Cendrier, puisque aucune dissociation n'est nécessaire. L'ammoniaque présente dans le colorant suffit à regonfler la membrane des spores.

Remarque : on peut évidemment réaliser facilement des préparations montées de spores récupérées sur des exsiccata. Pour ce faire, consulter les paragraphes 2 à 5 du chapitre consacré aux spores.

3. COUPES AU MICROTOME

But : réaliser des coupes colorées à partir d'un exsiccatum.

Mode opératoire

- Prélever l'échantillon comme expliqué au paragraphe "Montage de coupes colorées" du chapitre traitant des coupes au microtome, en réduisant légèrement ses dimensions.
- Plonger ce prélèvement dans un flacon fermé hermétiquement, à col large et rodé, contenant 50 ml d'ammoniaque concentrée pour le régénérer.
- Après th, transférer l'échantillon regonflé dans un même flacon contenant 50 ml d'éthanol-formol de Schaffer afin de le fixer.
- Relire le même paragraphe pour la suite des opérations (à partir du lavage à l'eau distillée, bien entendu, la fixation ayant déjà été assurée).

Commentaires : l'échantillon à traiter doit avoir une taille plus réduite que le prélèvement sur un exemplaire frais, puisqu'il s'agit ici d'un exsiccatum qui sera regonflé. La taille de l'échantillon augmentera donc, une fois cette opération terminée. On utilise ici l'éthanol-formol de Schaffer pour la fixation, car le picroformol acide de Bouin employé pour le traitement des exemplaires frais contient de l'acide picrique, incompatible avec l'ammoniaque de régénération forcément présent dans les tissus.

Remarque : pour la préparation de l'éthanol-formol de Schaffer, voir annexe à la rubrique "Réactifs".

III. CARACTERES A OBSERVER

1. SUBDIVISIONS (1)

1. GENERALITES SYSTEMATIQUES

Les champignons, que l'on a longtemps classés dans le règne végétal, sont maintenant isolés dans un règne à part, un peu entre végétaux et animaux : le règne fongique. Celui-ci comprend quatre divisions : Deuteromycota, Gymnomycota, Mastigomycota et Amastigomycota. Cette dernière division est celle qui nous intéresse, elle-même scindée en trois subdivisions: Zygomycotina, Ascomycotina et Basidiomycotina.

La subdivision Zygomycotina, comprenant essentiellement des espèces microscopiques comme les mucors, ne sera pas considérée ici, étant donné que ce travail porte sur les Macromycètes, c'est-à-dire les champignons macroscopiques. Nous nous intéresserons donc aux deux subdivisions Ascomycotina et Basidiomycotina, qui comprennent la quasi totalité des espèces que nous trouvons lors des promenades, à l'exception toutefois des Myxomycètes. Ces derniers se présentent sous forme de masses gélatineuses informes et en général vivement colorées. Ils possèdent, à un moment de leur croissance, la faculté de se déformer, ce qui leur permet la phagocytose (2) et le déplacement.

Bien qu'il soit souvent (mais pas toujours) aisé de déterminer macroscopiquement la subdivision à laquelle appartient une récolte, un examen microscopique peut apporter des éléments intéressants, et confirmer cette détermination. Là est l'objet du présent chapitre.

2. ASCOMYCOTINA

2.1. Définition

Cette subdivision, bien que comprenant une grande majorité d'espèces microscopiques, compte tout de même un nombre important d'espèces visibles à l'oeil nu. C'est le cas des morilles, helvelles, et pezizes, mais aussi d'espèces hypogées comme les truffes, ou parasites comme les cordyceps ou les claviceps. Tous ces champignons, et plus généralement les Ascomycètes que l'on rencontre habituellement, font partie de la classe des Hyménoascomycètes, qui est une des quatre classes que comprend la subdivision Ascomycotina. Les autres classes ne comprennent, à quelques exceptions près, que des espèces microscopiques parasites de végétaux ou d'animaux.

Il est intéressant de savoir que cette classe des Hyménoascomycètes est divisée en cinq sous-classes : les Erysiphomycetideae, les Loculoascomycetideae, les Lecanoromycetideae, les Pyrenomycetideae et les Pezizomycetideae. Les deux premières de ces sous-classes ne nous concernent pas. La sous-classe des Lecanoromycetideae comprend toutes les espèces ascomycètes qui vivent en symbiose avec une algue ou une cyanobactérie pour former les lichens ; nous ne nous y attachons pas non plus. Ce sont en effet les deux sous-classes Pyrenomycetideae, mais surtout Pezizomycetideae qui comptent toutes les espèces couramment récoltées.

2.2. Caractérisation microscopique

Technique à employer :

Dissocier un fragment de carpophore dans une goutte de rouge Congo ammoniacal. Prélever ce fragment à l'endroit où semble se trouver l'hyménium, ce qui n'est pas toujours évident à déterminer.

(1) Subdivisions: la classification adoptée ici est celle de R. Courtecuisse (1996), bien que Basidiomycotina et Ascomycotina soient le plus souvent considérés comme de simples classes (M. Bon, H. Romagnesi). R. Courtecuisse les élève pourtant au rang de-subdivisions, ce qui est à mon avis une excellente idée. C'est pourquoi J'ai choisi la classification de cet auteur, quoique marginale. Dans les pages précédentes, les noms français Basidiomycètes et Ascomycètes correspondent respectivement aux subdivisions Basidiomycotina et Ascomycotina.

(2) Phagocytose : processus par lequel certaines cellules (amibes, plasmodes fongiques) englobent des particules ou d'autres cellules par leurs pseudopodes, les absorbent puis les digèrent.

Observations : s'il s'agit bien d'une espèce ascomycète, on doit observer dans la préparation de grosses cellules allongées, les asques, contenant huit cellules plus petites qui sont les spores. Celles-ci se trouvent donc à l'intérieur de la cellule fertile ; c'est ce qui caractérise la subdivision Ascomycotina.

Des cellules stériles (ne contenant pas de spores), plus fines et plus allongées, sont souvent présentes entre les asques : il s'agit des paraphyses. Voir figure 19 A.

3. BASIDIOMYCOTINA

3.1. Définition

Cette subdivision est scindée en trois classes: Télémycètes, Homobasidiomycètes et Phragmobasidiomycètes. Elle comprend également des groupes à position systématique difficile, c'est pourquoi R. Courtecuisse les a classés dans un ensemble qu'il a appelé "Groupes de transition", car leurs caractères microscopiques font la transition entre Homobasidiomycètes et Phragmobasidiomycètes.

Nous ne nous intéresserons pas à la classe des Télémycètes, car celle-ci ne comprend pratiquement que des espèces microscopiques parasites de végétaux : il s'agit des Rouilles et des Charbons.

La grande majorité des espèces que l'on peut trouver lors des promenades appartiennent à la classe des Homobasidiomycètes. C'est le cas de tous les champignons dont la face inférieure du chapeau est munie de lames rayonnantes, de plis, de tubes ou d'aiguillons. Les vesses de loup à hyménium interne, les clavaires en forme d'arbuscules, les phalles (en forme de...), etc., sont également des Homobasidiomycètes.

La classe des Phragmobasidiomycètes, quant à elle, comprend quelques espèces gélatineuses que l'on rencontre couramment, comme les trémelles, les oreilles de Judas, ou les calocères. Il en est de même pour les groupes de transition, qui comptent notamment une espèce très courante : *Dacrymyces stillatus*.

3.2. Caractérisation microscopique

Technique à employer : dissocier un fragment d'hyménium dans le rouge Congo ammoniacal. L'hyménium des représentants de la subdivision des Basidiomycotina se trouve généralement à la face inférieure du chapeau, qui l'abrite : il s'agit des lames, des tubes, des plis ou des aiguillons. Chez les Gastéromycètes que sont entre autres les lycoperdons, les sclérodermes ou les géastres, l'hyménium se trouve à l'intérieur du carpophore.

Observations : si l'espèce observée appartient à la subdivision des Basidiomycotina, on doit observer dans la préparation la présence de cellules remarquables, les basides, qui portent à leur extrémité généralement quatre spores. Chacune est reliée à la baside par un stérigmate, qui est une sorte de pédoncule. Les spores se développent donc à l'extérieur de la cellule fertile : c'est ce qui caractérise les Basidiomycètes. Les basides immatures sont appelées basidioles.

Comme chez les Ascomycotina, des cellules stériles sont souvent intercalées entre ces dernières : il s'agit des cystides ; mais elles sont ici généralement beaucoup plus volumineuses que les basides. Voir figure 19 B.

Trois cas peuvent se présenter : les basides peuvent être soit entières, soit cloisonnées en travers ou en longueur, soit cornues. Les basides entières (figure 19 C) caractérisent la classe des Homobasidiomycètes ; c'est le cas le plus commun. Par contre, lorsque les basides sont cloisonnées (figures 19 D et E), l'espèce observée fait partie des Phragmobasidiomycètes. Le troisième cas, dans lequel les cellules fertiles ne sont pas complètement cloisonnées mais bien bifides ou cornues (figure 19 F), définit les groupes de transition.

La classe des Phragmobasidiomycètes (basides cloisonnées) comprend deux ordres: les Auriculariales et les Trémellales. Les Auriculariales possèdent des basides cloisonnées transversalement (figure 19 D), tandis que les basides des Trémellales sont cloisonnées longitudinalement (figure 19 E).

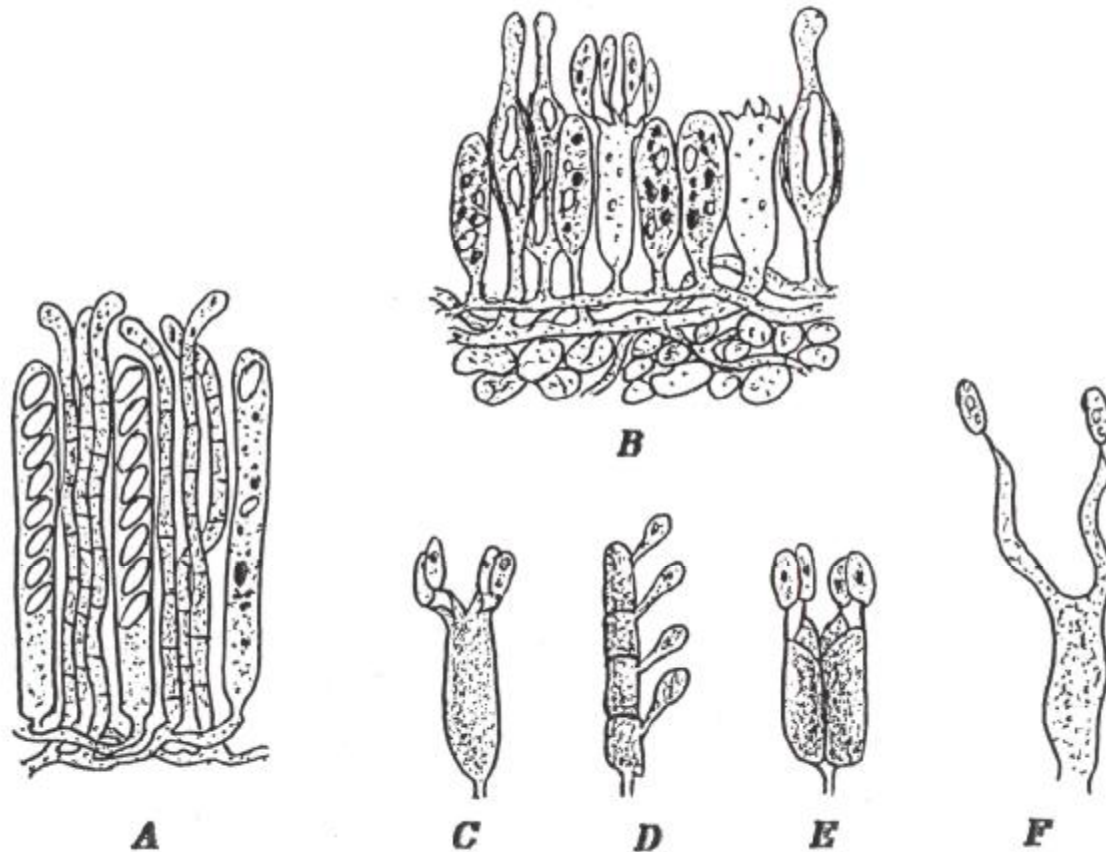


Figure 19 : Différents types d'hyméniums et de basides

2. ASCOMYCOTINA

1. LES ASQUES

1.1. Définition

Comme il a déjà été dit précédemment, les asques sont les cellules fertiles qui, contenant les spores (dites ascospores), composent l'hyménium des ascomycètes. Ils comptent généralement huit spores (exceptionnellement quatre ou six) ; celles-ci peuvent toutefois présenter des cloisons transversales qui multiplient leur nombre pas deux, par quatre ou par huit. Les asques sont généralement étudiés à plusieurs points de vue : le mode de déhiscence (manière dont s'ouvrent les asques), la forme, les dimensions, les affinités chimiques et même la couleur. Le premier de ces caractères joue un rôle très important au niveau de la classification des espèces : c'est sur ce critère qu'est basée la définition de plusieurs ordres !

1.2. Mode de déhiscence

Technique à employer : la dissociation simple d'un fragment d'hyménium dans le rouge Congo amoniacal donne de bons résultats. Un fort grossissement (1000x) est cependant requis.

Observations : les asques sont divisés en deux grands groupes : les asques prototuniqués (figure 20 A) et les asques eutuniqués (figures 20 B à D). Les premiers, présentant une paroi mince et dépourvus d'appareil apical, s'ouvrent par éclatement inactif de la membrane, c'est-à-dire que les spores sont libérées sans être projetées en l'air. Les asques eutuniqués, quant à eux, sont pourvus d'une paroi solide et d'un appareil apical destiné à éjecter les spores lorsqu'elles sont mûres.

On distingue, chez les eutuniqués, les asques bituniqués (figure 20 B), munis d'une membrane dou-

ble, des asques unituniqués (figures 20 C et D) dont la membrane est simple. Ces derniers sont encore répartis entre deux groupes : les operculés (figure 20 C), présentant à leur sommet une sorte de couvercle (opercule) qui peut s'ouvrir comme par une charnière ou être simplement arraché, et les inoperculés (figure 20 D), dépourvus de couvercle, mais munis d'un pore à structure variable par l'orifice duquel les spores sont éjectées.

Le mode de déhiscence des asques définit en grande partie quatre des cinq ordres que compte la sous-classe des Pezizomycetideae. Les asques operculés caractérisent l'ordre des Pezizales (morilles, helvelles, pezizes), tandis que les ordres Phacidiales, Ostropales et Leotiales sont caractérisés par des asques inoperculés. L'ordre des Tuberales (truffes) est quant à lui défini par l'état souterrain de toutes les espèces qui en font partie.

1.3. Affinités chimiques

Le réactif iodé de Melzer est le plus intéressant, après le rouge Congo ammoniacal, pour l'étude des Ascomycotina. La littérature conseille souvent (M. Langeron et M. Locquin, Z. de Izarra, A. Ayel et A. Moinard) l'usage du bleu d'aniline (ou bleu coton) au lactophéno. Malgré de nombreux essais, je n'ai pas trouvé l'intérêt de ce réactif, aussi ne l'ai-je pas exploité dans ce travail. La dissociation dans ce produit est difficile, la coloration mauvaise et les vacuoles tellement gonflées que les cellules s'en trouvent déformées.

Technique à employer : la dissociation dans le réactif de Melzer donne des résultats satisfaisants. Il s'agit de la même technique que dans le rouge Congo ammoniacal. Si l'étude porte sur un exsiccatum, il sera régénéré par passage de 5 min dans le mélange de Cendrier avant d'être dissocié dans le Melzer. Pour la préparation du mélange de Cendrier, voir annexe à la rubrique "Réactifs".

Observations : les asques de certaines espèces bleuissent dans ce réactif : il s'agit à nouveau d'une forme de la réaction amyloïde. L'asque tout entier peut être concerné, ou seulement son sommet. Lorsque la réaction est positive, elle peut aider à déceler l'opercule qui n'a pas été repéré dans le rouge Congo ammoniacal.

L'ordre des Pezizales compte deux sous-ordres : les Pezizineae, dont la réaction à l'iode est variable, et les Sarcoscyphineae, dont les asques sont iodonegatifs. Certaines des familles du sous-ordre des Pezizineae peuvent être caractérisées grâce à cette réaction, qui est positive chez les Pezizaceae (pezizes), tandis qu'elle est négative chez les Morchellaceae (morilles, morillons, verpes) et Helvellaceae (rhizines, gyromitres, helvelles).

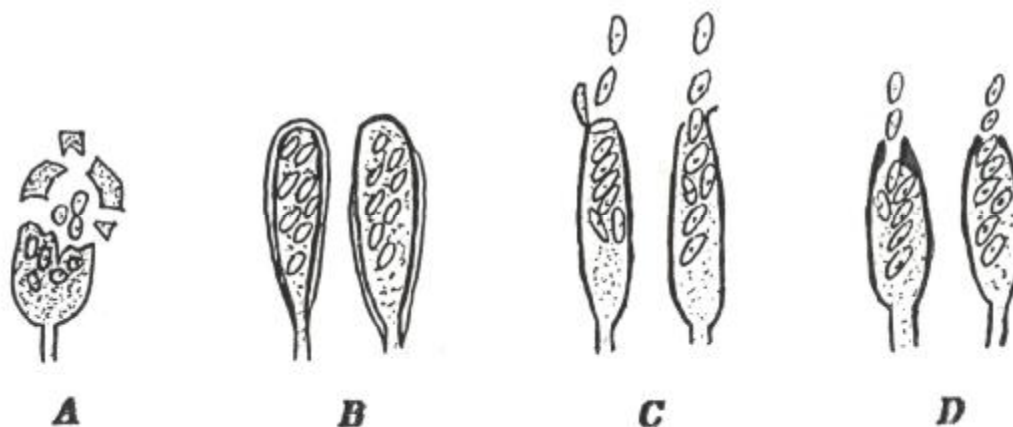


Figure 20 : Différents types d'asques

2. LES SPORES

2.1. Définition

L'apicule, vestige du stérigmate qui reliait la spore à la baside chez les Basidiomycètes, est naturellement absent chez les Ascomycètes. C'est évident, puisque les spores sont produites à l'intérieur de l'asque. De même, le pore germinatif (pore dont sont munies les spores de nombreux Basidiomycètes et qui sert à la germination) est inexistant chez les Ascomycètes. Les ascospores ont de ce fait une symétrie généralement plus régulière que les basidiospores. Les éléments des ascospores généralement observés sont principalement leur forme, leur ornementation, leur taille et leur contenu ; la réaction à l'iode est peu considérée.

2.2. Contenu des ascospores

Technique à employer : observer, à un grossissement moyen, une suspension de spores dans le bleu d'aniline - Soudan III au lactophénol (formule de M. Locquin et M. Langeron). Voir annexe à la rubrique "Réactifs" pour la préparation de ce colorant.

Observations : le Soudan III est un colorant liposoluble : il agit donc électivement sur les lipides qu'il teinte de brun acajou. Cette coloration tranche sur le cytoplasme de la spore que le bleu d'aniline a rendu bleu, fatalement. Les ascospores peuvent ne pas être guttulées : aucune inclusion acajou n'est alors observable, comme chez les Morchellaceae. D'autres contiennent une, deux (Pezizaceae) ou plusieurs (Helvellaceae) gouttelettes huileuses teintées d'acajou.

3. LES PARAPHYSES

La morphologie, la couleur, la taille et la réaction à l'iode des paraphyses sont autant de caractères qui peuvent également être étudiés et contribuer à une détermination. Les techniques employées pour leur observation sont identiques à celles utilisées pour l'examen des asques ; on décrit d'ailleurs généralement asques et paraphyses simultanément, à partir des mêmes préparations. Leur morphologie est variable d'une espèce à l'autre : elles peuvent être septées (figure 21 B), ramifiées (figure 21 C), terminées par un crochet (figure 21 D), clavées (figure 21 E) ou reliées au sommet par des cristaux (figure 21 F). Les paraphyses peuvent bien sûr posséder deux, voire plusieurs de ces caractéristiques, ou alors aucune (figure 21 A).

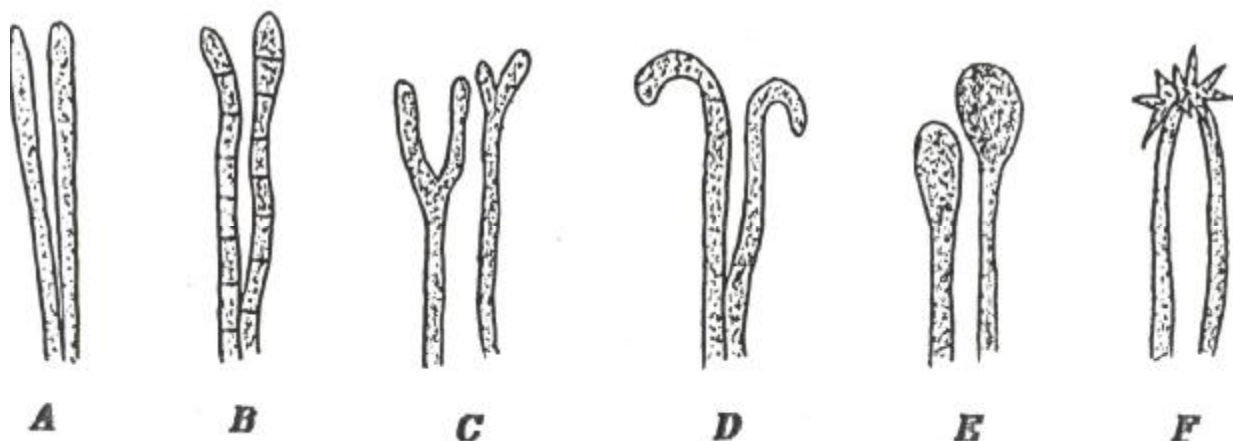


Figure 21 : différents types de paraphyses

4. L 'HYPOTHECIUM

Hypothécium est le nom donné à la couche de cellules qui se trouve juste sous l'hyménium (asques et paraphyses éventuelles). On observe, pour le caractériser, une coupe profonde de l'hyménium. Cette coupe doit avoir été colorée par le biacide de Mann et montée dans l' *Histomount*.

Ce tissu peut être constitué d'articles (cellules fongiques, hyphes) courts (figures 22 A, B et C) ou longs (figures 22 D à G). Les premiers présentent une forme prismatique (figure 22 A), arrondie

(figure 22 B) ou polyédrique (figure 22 C), tandis que les seconds peuvent être intriqués (figure 22 D), épidermoïdes (figure 22 E) ou bien parallèles (figures 22 F et G). On distingue, parmi les structures à hyphes parallèles, celles dont la paroi des cellules est épaisse avec un canal interne étroit (figure 22 F) de celles dont les articles, peu serrés, possèdent une paroi plus fine (figure 22 G).

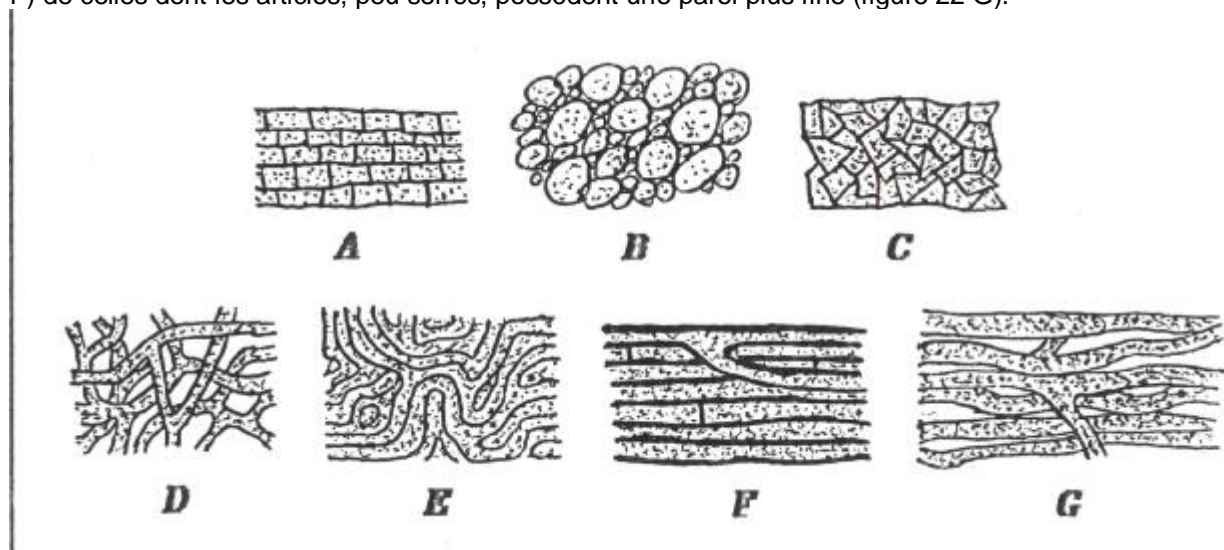


Figure 22 : différents types d'hypothéciums

3. BASIDIOMYCOTINA

1. LES BASIDES

1.1. Définition

Au même titre que les asques, les basides sont des cellules productrices de spores sexuées. Celles-ci, on l'a déjà dit, se développent à l'extérieur de la baside au nombre général de quatre, mais parfois deux, six ou huit. Les basidiospores (spores des basidiomycètes), possèdent toujours un apicule, qui est en quelque sorte la cicatrice de ce qu'était le stérigmate qui relie la spore à la baside pendant la maturation.

Avant de produire ses spores, la baside, qui est alors nommée basidiole, se présente, en général, comme un article au contenu granuleux, très colorable car chargé de substances nucléiques et de réserves.

Les caractères considérés pour l'étude des basides sont les suivants: forme, dimensions, couleur, type de paroi, insertion, contenu, et enfin morphologie des stérigmates.

1.2 Morphologie des basides

Technique à employer : la traditionnelle dissociation d'un fragment d'hyménium dans le rouge Congo ammoniacal est sans aucun doute la méthode la plus convaincante. D'autres réactifs sont quelquefois utilisés, mais les reprendre tous systématiquement dépasserait le cadre de ce mémoire.

Observations : les différents types de basides ont déjà été évoqués au chapitre traitant des subdivisions : je n'y reviendrai donc pas. On privilégie pour leur mesure le stade auquel les spores sont mûres mais toujours présentes sur les stérigmates. Leur forme peut être plutôt allongée (figure 23 A) ou plutôt globuleuse (figure 23 B), et leur paroi peut être soit mince (figures 23 A, B et D à I) soit épaisse (figure 23 C), ce qui est plus rare (les basides sont alors appelées pachybasides). Une fois ses spores détachées, la baside peut avoir un aspect fripé qu'il est intéressant de noter.

Le point d'attache de la baside au sous-hyménium est également un caractère à considérer : leur base peut être droite (figures 23 A à C et E à I) ou bien alors en biais (figure 23 D) ce qui, en général, traduit la présence d'une boucle (voir paragraphe traitant des boucles, ci-après).

Le contenu de cette cellule mérite également l'intérêt, car il peut être granuleux (figure 23 E), guttulé (figures 23 F et G), vacuolaire (figure 23 H) ou encore sembler vide (figure 23 I). On distingue, chez

les basides à contenu guttulé, deux groupes : celles qui ne contiennent qu'une seule goutte sont dites uniguttulées (figure 23 F) tandis que celles qui en contiennent plusieurs sont qualifiées de pluriguttulées (figure 23 G).

1.3. Morphologie des stérigmates

La technique employée est encore et toujours la dissociation dans le rouge Congo ammoniacal. Le nombre des stérigmates, et donc des spores, peut être variable sur un même carpophore, mais c'est assez rare. Ils présentent des formes et des dimensions variées : ils peuvent être longs ou courts, trapus ou grêles, rectilignes ou arqués, parallèles ou divergents. Après l'émission des spores, ils peuvent se flétrir ou même être résorbés. Un caractère peu courant mais néanmoins intéressant à observer est la présence de cloisons entre les stérigmates et la baside.

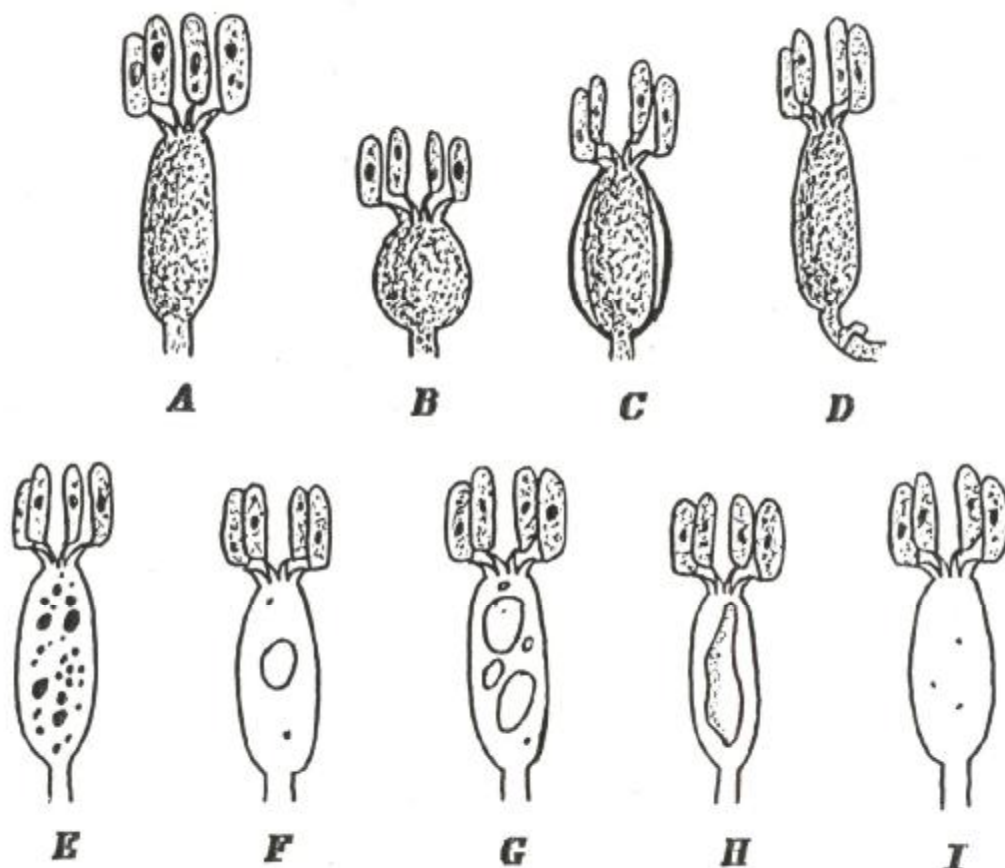


Figure 23 : différents types de basides

2. LES SPORES

2.1. Définition

Les basidiospores, en plus d'un apicule, présentent souvent un pore germinatif dont la morphologie est intéressante mais difficile à étudier. Lorsqu'il existe, c'est par ce pore que s'effectue la germination. Les paramètres habituellement étudiés sont la couleur, la forme, l'ornementation, les dimensions et la réaction à l'iode. La couleur des spores est un de leurs caractères les plus importants ; nous ne nous y intéresserons pourtant pas, étant donné qu'il est préférable d'user de techniques macroscopiques pour l'apprécier. Certaines espèces, mais c'est heureusement assez rare, possèdent des spores très variables au niveau des formes et des dimensions.

L'étude des spores est extrêmement répandue ; c'est toujours par elle que le débutant commence à s'intéresser à l'aspect microscopique des champignons qu'il rencontre. Leur observation (de base) ne nécessite en effet que très peu de matériel, aussi trouve-t-on régulièrement des dessins de spores même dans les ouvrages les plus simples.

2.2. La forme des spores

Technique à employer : observer, avec un fort grossissement (1000x), une suspension de spores dans le rouge Congo ammoniacal.

Observations : la forme des spores est un caractère très important, car il permet presque toujours de confirmer (ou d'infirmer) une détermination douteuse. Leur morphologie est à mon avis bien plus intéressante que moult caractères macroscopiques comme les couleurs, qui sont beaucoup trop variables. Il m'est souvent arrivé d'être incapable de mettre un nom de genre sur une récolte avant d'en observer les spores. La différenciation entre de nombreuses espèces est également possible en ne se basant que sur ce caractère. On peut même commencer l'identification d'une récolte pour laquelle on n'a aucune idée par l'observation des spores.

Les spores des entolomes, par exemple, ont toujours un profil plus ou moins polyédrique (figure 24 A). Celles de nombreux bolets sont très allongées (figure 24 B). Celles des lépiotes de la section *Stenosporae* possèdent la particularité d'être éperonnées (figure 24 C), tandis que les spores de certains coprins sont plutôt mitriformes (figure 24 D), etc.

2.3. L'ornementation des spores

Technique à employer : lorsque les spores à étudier sont amyloïdes ou dextrinoïdes, on a tout intérêt à les observer en suspension dans le réactif de Melzer, particulièrement intéressant chez les russules et les lactaires, sinon, il faut se contenter du rouge Congo ammoniacal. L'examen sera toujours effectué à un fort grossissement (1000x).

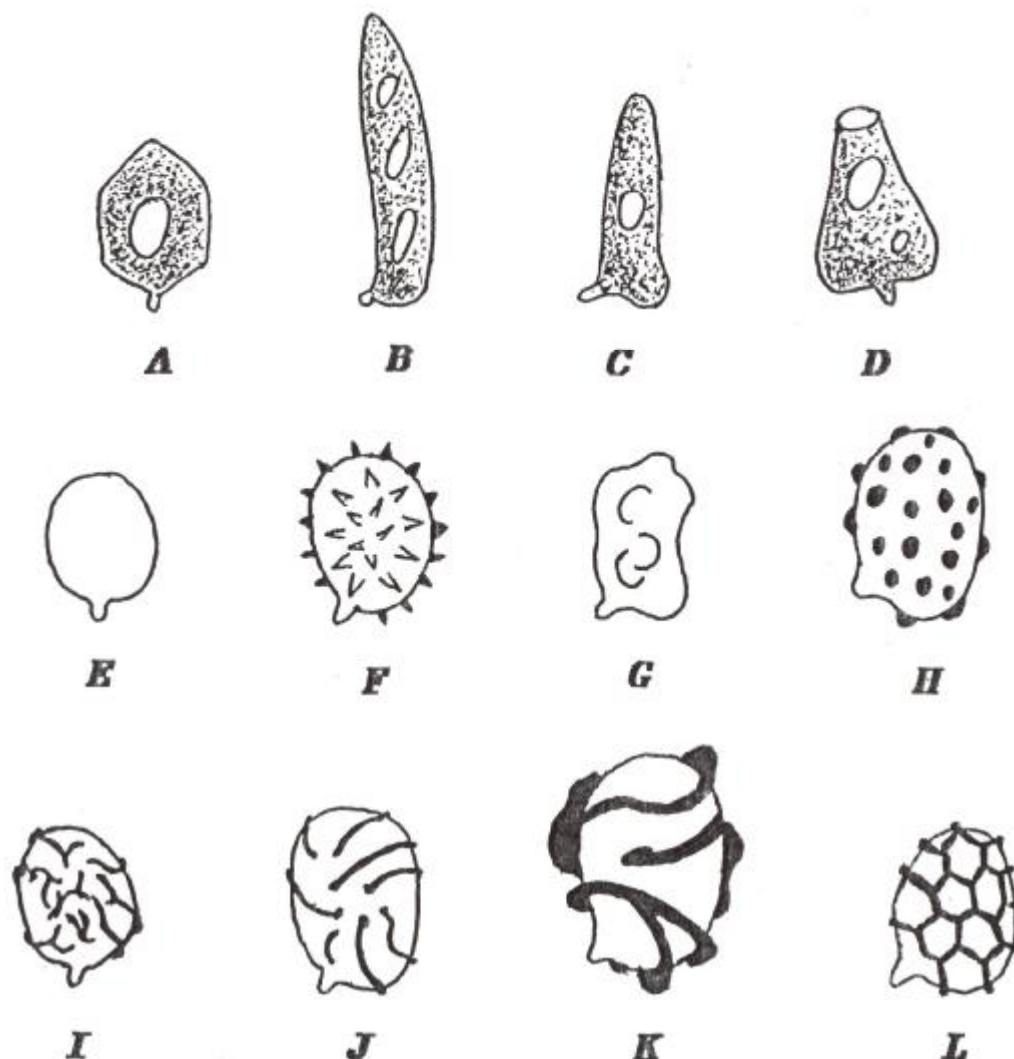


Figure 24 : différents types de spores

Observations : de même que la forme, l'ornementation des spores est très variée : on trouve des spores lisses (figure 24 E), épineuses (figure 24 F), gibbeuses (figure 24 G), verruqueuses (figure 24 H),

caténulées (figure 24 I), cristulées (figure 24 J), ailées (figure 24 K), réticulées (figure 24 L), etc. Ces ornements, un peu petites pour être correctement détaillées au microscope optique, sont plus parlantes au microscope électronique. On pourra donc déterminer si une spore est ornée ou non, si elle est réticulée ou plutôt épineuse, mais faire la distinction entre les spores caténulées de deux espèces de russules sera le plus souvent impossible si on n'a pas une spore de chaque espèce dans le champ du microscope pour les comparer.

2.4. La réaction des spores à l'iode

Technique à employer : mettre les spores en suspension dans une goutte de réactif de Melzer et observer à un grossissement moyen (400x). Si les spores sont amyloïdes, on peut observer leur bleuissement à l'oeil nu et remarquer qu'elles ne se dispersent généralement pas bien dans le liquide, au contraire des spores non amyloïdes.

Observations : cette propriété qu'ont certaines spores de réagir à l'iode rend d'immenses services en mycologie. Si la réaction observée est bleu-grise, les spores sont amyloïdes ; si la réaction est brun-rouge, elles sont dextrinoïdes.

Les spores de la quasi totalité des espèces de lépiotes et affines (tribu des Lepioteae de la famille des Agaricaceae) sont dextrinoïdes. L'étude des mycènes est en partie basée sur cette réaction, de même que l'étude des lactaires et russules, dont on profite de l'amyloïdité de l'ornementation des spores pour les décrire. Par contre, aucun clitocybe n'est amyloïde.

3. LES BOUCLES

Les boucles de conjugaison (ou anses d'anastomose) sont le témoignage du passage des noyaux lors de la multiplication des articles. Pendant l'allongement d'une hyphe, un article nouveau se forme à l'extrémité d'un article ancien. Les noyaux contournent la paroi de l'hyphe grâce à une sorte de pont qui, jeté au-dessus de la cloison de l'hyphe, subsiste à la fin de l'allongement du filament.

On retrouve ces anses d'anastomose chez de nombreux Basidiomycètes. Leur présence constitue un caractère important de détermination, principalement chez les représentants de la sous-classe des Aphyllorphoromycetideae (polypores). Toute dissociation de quelque partie que ce soit d'un carpophore peut montrer des boucles. La figure 25 montre quelques exemples de boucles.

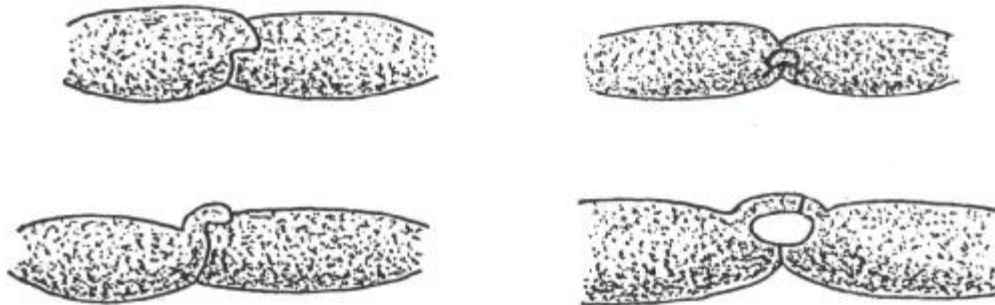


Figure 25 : quelques exemples de boucles

4. LES CYSTIDES

4.1. Définition :

Les cystides sont, après les spores, les articles les plus étudiés des Basidiomycètes : les basides elles-mêmes le sont moins. C'est sans doute leur grande diversité qui leur confère tant d'intérêt. On les retrouve en effet chez de nombreuses espèces sous des formes souvent très différentes de l'une à l'autre. On trouve des cystides un peu partout dans le champignon : les cystides situées sur la face des lames sont nommées pleurocystides, tandis que celles que l'on trouve sur l'arête des lames

ont été appelées cheilocystides. On a regroupé piléocystides (cystides du chapeau) et caulocystides (cystides du stipe) sous le terme commun de dermatocystides. Quoi qu'il en soit, les cystides ne se trouvent jamais au milieu de la chair, mais toujours plutôt vers l'extérieur des tissus. Les plus généralement étudiées sont les pleurocystides, dont on considère entre autres la forme, la taille, la paroi, l'insertion, le contenu, les affinités chimiques et la pigmentation.

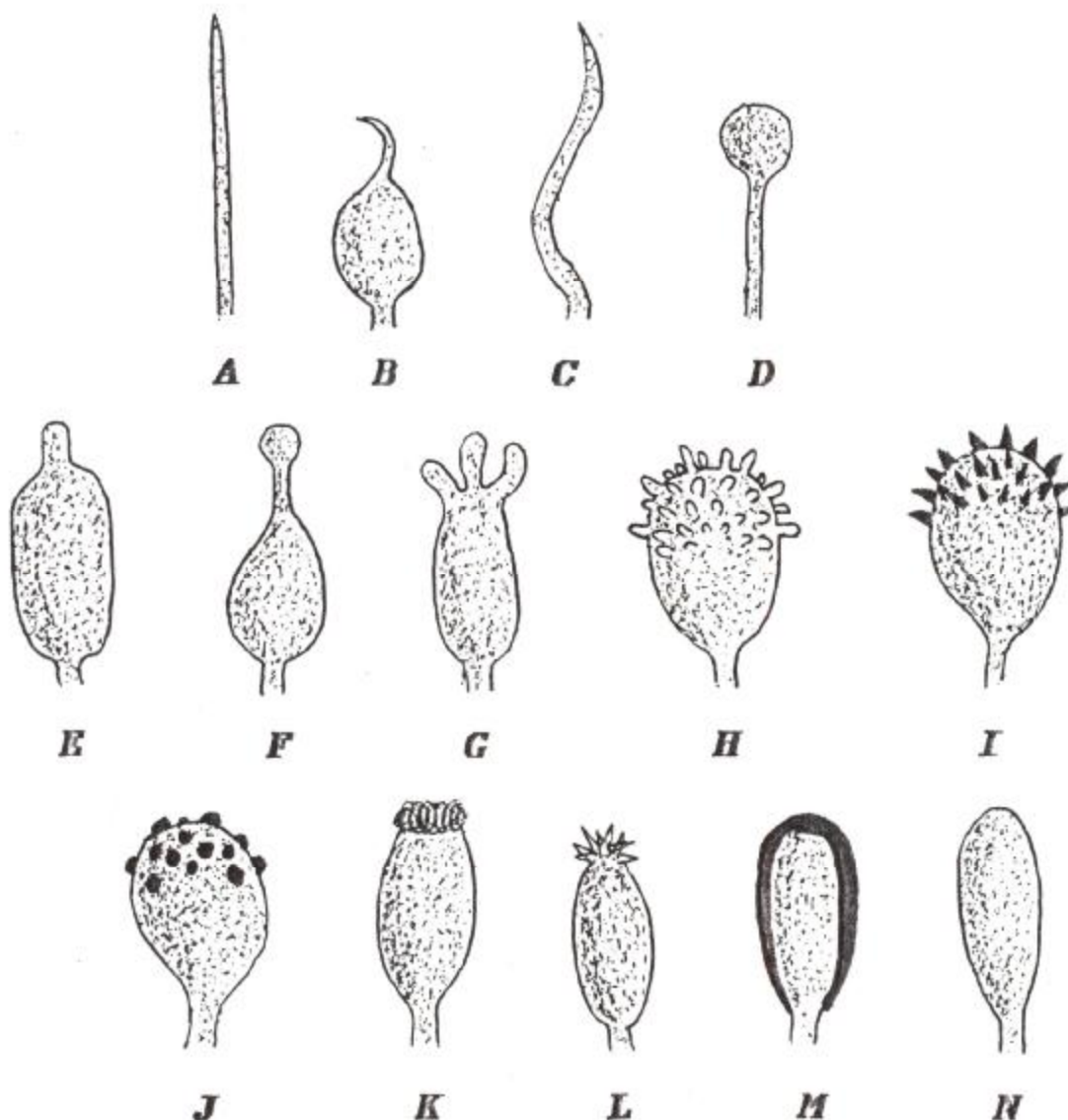


Figure 26 : différents types de cystides

4.2. Morphologie des cystides

Technique à employer : la dissociation habituelle d'un fragment d'hyménium dans le rouge Congo ammoniacal est bien suffisante.

Observations : en plus des formes rondes, elliptiques, fusiformes ou cylindriques, on trouve des cystides piléiformes (figure 26 A), en poil d'ortie (figure 26 B), sinueuses (figure 26 C), capitées (figure 26 D), lagéniformes (figure 26 E), lécythiformes (figure 26 F), etc.

On attache également beaucoup d'importance à leur sommet, qui peut être digitéolé (figure 26 G), en brosse (figure 26 H), échinulé (figure 26 I), verruqueux (figure 26 J), incrusté (figure 26 K), etc. Le sommet des cystides cristallifères (figure 26 L) est couvert de cristaux qui ont été identifiés comme étant de l'oxalate de calcium.

L'épaisseur de la paroi des cystides est également un caractère à observer : cette paroi peut être épaisse (figure 26 M) ou mince (figure 26 N). On a donné le nom de lamprocystides aux premières et de leptocystides aux dernières.

Le contenu des cystides peut être qualifié d'une façon semblable à celui des basides (voir paragraphe traitant des basides).

5. LA TRAME DES LAMES

5.1. Définition

Bien qu'elle ne soit souvent considérée que dans les monographies à cause de la difficulté de son étude, la trame des lames peut apporter des éléments intéressants au micrographe. On s'attache ici à la nature des hyphes qui la composent et à l'orientation de celles-ci par rapport à l'arête.

5.2. Les différents types de trame

Technique à employer : observer, à un grossissement moyen (400x), une coupe transversale de lame montée dans l'*Histomount* après coloration au biacide de Mann.

Observations : on s'entend généralement à en distinguer cinq types principaux. La trame à sphérocytes (figure 27 A) est presque entièrement constituée de grosses cellules rondes qui sont les sphérocytes, d'où son nom. Les quatre autres types de trames sont tous constitués d'hyphes plus ou moins longues. La trame parallèle (figure 27 B) se caractérise par des hyphes allongées qui, disposées côte à côte, sont parallèles aux faces de la lame et dirigées vers l'arête. La trame emmêlée (figure 27 C) est faite d'hyphes très longues qui se recouvrent les unes les autres dans des directions variées, sans ordre apparent. Les trames bilatérale et inversée sont très proches l'une de l'autre: on pourrait d'ailleurs donner à la trame inversée le nom de trame bilatérale inversée. Toutes deux sont composées d'hyphes de taille moyenne orientées obliquement par rapport aux faces de la lame, de part et d'autre d'un axe central parfois différencié par des hyphes parallèles. Les hyphes de la trame inversée (figure 27 D) convergent vers l'arête, tandis que celles de la trame bilatérale (figure 27 E) convergent vers la base.

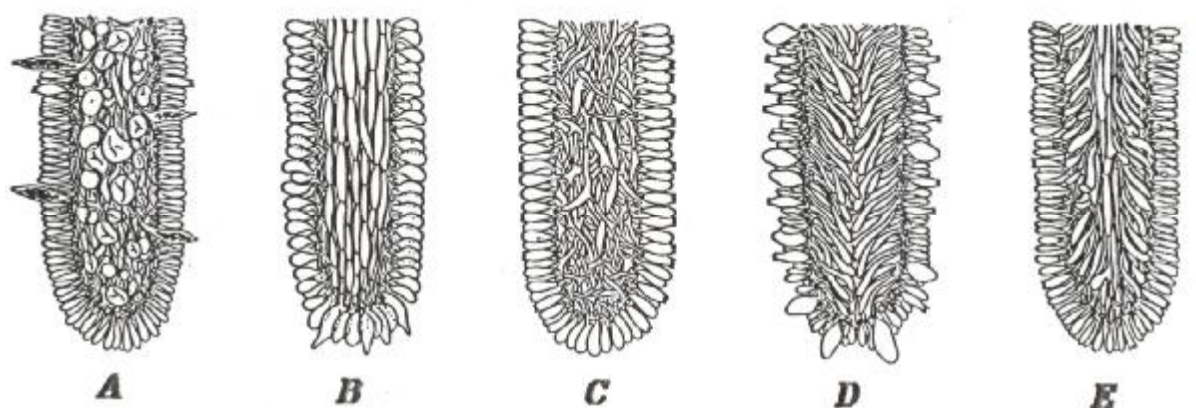


Figure 27 : différents types de trames

6. LES CUTICULES

6.1. Définition

La surface supérieure du chapeau, souvent plus colorée que le reste du champignon, se présente, vue au microscope, sous forme d'une couche de cellules de nature différente de celles de la chair : la cuticule. Cette cuticule est fréquemment parée d'ornementations variées : squames, écailles, méchules, fibrilles, rides, flocons, scrobicules, granules, etc. De même que pour la trame des lames, ce caractère est relativement peu considéré dans les flores générales, car il nécessite presque toujours l'emploi de la longue technique des coupes à la paraffine pour pouvoir être observé.

On se contente généralement de décrire deux caractères : type et orientation des hyphes, d'une part, et localisation des pigments dans les articles, d'autre part.

6.2. Type et orientation des hyphes

Technique à employer : observer à un grossissement moyen (400x) une coupe faite dans le revêtement du chapeau et colorée par le biacide de Mann avant d'avoir été montée dans l' *Histomount*.

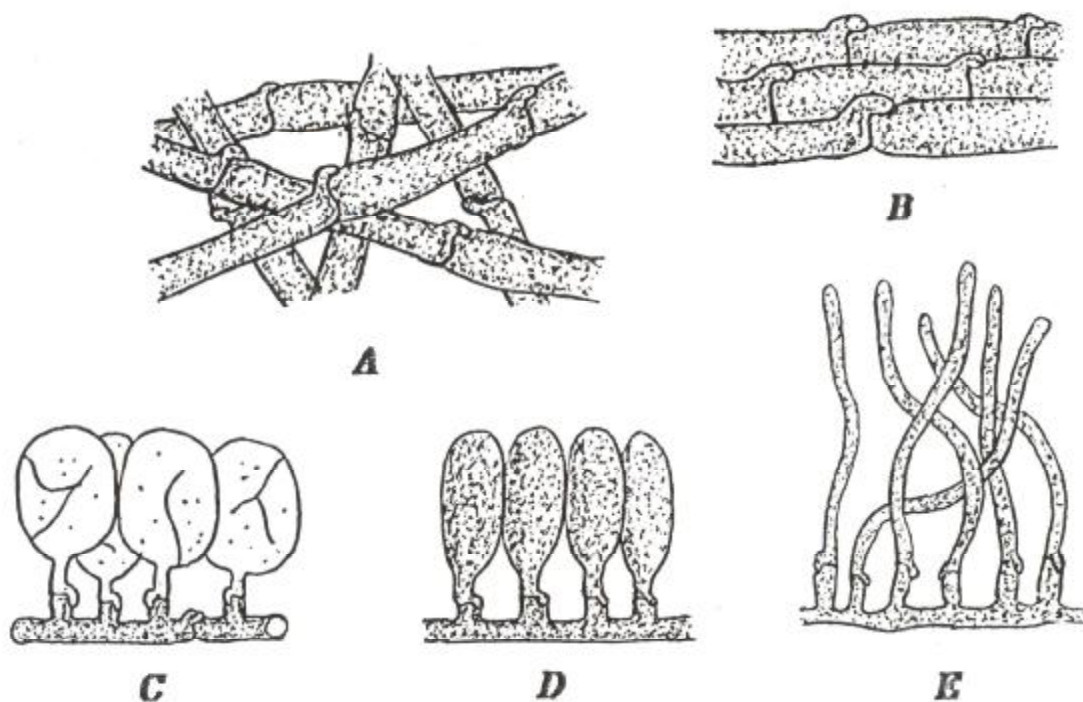


Figure 28 : Différents types de cuticules

Observations : la cuticule trichodermique (figures 28 A et B) est caractérisée par des hyphes allongées disposées parallèlement à la surface du chapeau, de façon très régulière (figure 28 B), ou plutôt emmêlée (figure 28 A). Si les hyphes observées ont une forme à peu près sphérique et sont disposées en une seule ou en plusieurs couches, la cuticule observée est dite celluleuse (figure 28 C). La cuticule hyméniforme (figure 28 D) est ainsi nommée parce qu'elle évoque un hyménium à basides typiques : les hyphes, clavées, ont une forme ovoïde et sont dressées côte à côte. Naturellement, il ne s'agit pas de basides, mais bien d'hyphes stériles comme celles de la chair du chapeau ou du pied, par exemple.

Et enfin, la cuticule palissadique (figure 28 E) est caractérisée par des hyphes très allongées et dressées les unes à côté des autres à la manière d'une palissade, à la surface du chapeau.

6.3. Localisation des pigments

Pour observer la localisation des pigments dans les tissus, et tout particulièrement dans la cuticule, on dissocie le fragment à étudier dans l'eau distillée.

Les pigments sont dits **vacuolaires** (figure 29 A) s'ils sont localisés, à l'intérieur des hyphes, dans des vacuoles ; si au contraire ils sont présents entre les hyphes, donc à l'extérieur de celles-ci, ils sont dits **extracellulaires** (figure 29 C). Et enfin, lorsqu'ils se trouvent incrustés dans la membrane de l'hyphe,

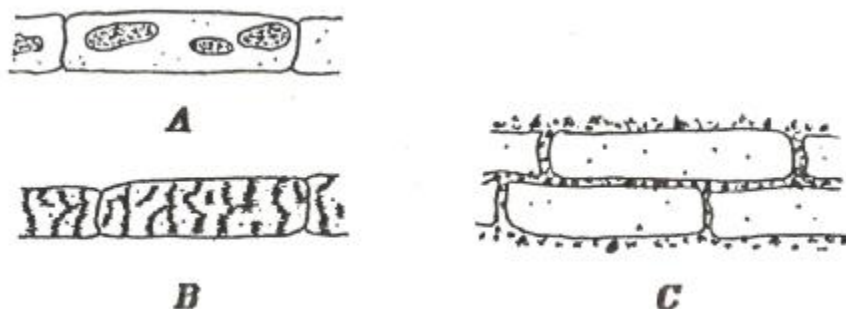


Figure 29 : localisation des pigments dans les tissus on les qualifie de **membranaires incrustants** (figure 29 B).

Les pigments vacuolaires, lorsqu'ils ne sont pas très abondants dans les vacuoles, peuvent être mis en évidence par dissociation dans le chlorure de sodium en solution aqueuse à 30 % au lieu d'eau distillée. Les hyphes, grâce à la différence importante de pression osmotique engendrée par la solu-

tion salée, subissent l'osmolyse, c'est-à-dire que leurs vacuoles perdent une grande partie de leur eau pour compenser cette différence de pression. Les pigments qui s'y trouvent concentrés, sont donc mis en évidence.

Annexes

REACTIFS

Tous ces produits sont idéalement stockés dans des flacons hermétiques en verre fumé, avec ou sans compte-gouttes, à la température du laboratoire.

1. ROUGE CONGO AMMONIACAL

1.1. Préparation du produit brut

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Rouge Congo (C.I. (1) 22120) 0,5g

- Ammoniaque concentrée 49,5g

Chauffer, au bain marie à 80°C, le mélange jusqu'à ce qu'il atteigne la température de 35°C, en agitant continuellement. Ne jamais dépasser 40°C, sous peine de voir bouillir l'ammoniaque dont la concentration diminuerait alors sensiblement. Une fois les 35°C atteints, retirer l'erlenmeyer du bain marie et le refroidir rapidement sous un courant d'eau très froide, jusqu'à ce que sa température redescende à 20° C environ.

Filtrer le mélange dans un entonnoir couvert d'un verre de montre et passé à travers un bouchon percé obturant un erlenmeyer propre, de manière à ce que le moins possible de vapeurs s'échappent du liquide, qui sera ensuite transféré dans un flacon hermétique.

1.2. Restauration du colorant avant utilisation

Agiter convenablement le flacon contenant le colorant puis en transférer 10 ml dans un tube à essais que l'on obture à l'aide d'un bouchon percé dans lequel est passé un morceau de tube capillaire permettant l'échappement des gaz. Déposer le tube dans un bain marie à 50° et agiter continuellement jusqu'à ce que le liquide commence à bouillir. Le retirer aussitôt et le refroidir rapidement sous un courant d'eau très froide jusqu'à ce qu'il redescende à la température de 20° C environ.

Le liquide devrait être devenu à peu près limpide. S'il ne l'est pas, recommencer le chauffage. Si après une nouvelle ébullition il n'est toujours pas clair, alors il faut le remplacer. Boucher le tube hermétiquement, à l'aide d'un autre bouchon, sans capillaire, celui-là.

1.3. *Commentaires et remarques* : le colorant brut se garde plusieurs mois, voire plusieurs années selon les conditions de stockage et la valeur des produits. Il doit être «restauré» avant chaque utilisation car le rouge Congo, après quelques semaines, se dépose au fond du récipient. Le produit ainsi restauré se garde une semaine au maximum, à condition que le tube à essais soit hermétiquement fermé. La préparation du produit brut est très pénible en raison de l'ammoniac gazeux qui se dégage du liquide lors du chauffage. Ce gaz n'est pas toxique mais seulement irritant. Opérer sous hotte aspirante dans la mesure du possible.

2. REACTIF IODE DE MELZER

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Iode 0,375 g

- Iodure de potassium 1,25 g

- Hydrate de chloral 25 g

- Eau distillée 25 g

Bien agiter, puis obturer le flacon et laisser reposer jusqu'à dissolution complète de l'iode (toujours très longue), en remuant de temps en temps.

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

3. GELATINE AU ROUGE CONGO

Restaurer, comme indiqué précédemment, 25 g de rouge Congo ammoniacal.

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Gélatine pour microbiologie 3,5 g
- Phénol 0,5 g
- Glycérine 25 ml

- Rouge Congo ammoniacal «restauré » 21 g

Mélanger la gélatine, le phénol et la glycérine dans un petit bécher puis laisser reposer 5 min avant d'ajouter le rouge Congo ammoniacal. Bien homogénéiser avant de chauffer doucement. Dès que le liquide entre en ébullition, arrêter le chauffage pendant quelques secondes, puis le reprendre en agitant continuellement jusqu'à dissolution complète de la gélatine. Cette opération est un peu délicate car il faut réduire le plus possible l'évaporation de l'ammoniaque.

A chaque utilisation, chauffer doucement le milieu jusqu'à ce qu'il fonde complètement, en agitant avec un thermomètre. La température ne doit en aucun cas dépasser 55° C.

4. PICROFORMOL ACIDE DE BOUIN

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Acide picrique 0,6 g
- Formol (solution commerciale) 5,5 g
- Acide acétique cristallisable 2,8 ml
- Eau distillée 50 ml

Agiter jusqu'à dissolution complète de l'acide picrique, parfois difficile mais toujours possible.

5. GELATINE PHENIQUEE

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Gélatine pour microbiologie 0,05 g
- Phénol 0,25 g
- Eau distillée 49,7 ml

Faire chauffer ce mélange à la température de 55° environ où il sera maintenu jusqu'à dissolution complète des divers constituants.

6. COLORANT BIACIDE DE MANN

6.1. *Solution A : bleu d'aniline (ou bleu Coton)*

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Bleu d'aniline (C.I. 42755) 0,175 g
- Eau distillée 17,325 ml

Agiter sans chauffer jusqu'à dissolution complète du bleu d'aniline.

6.2. *Solution B : éosine jaunâtre (ou éosine)*

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Eosine jaunâtre (C.I. 45380) 0,225 g
- Eau distillée 22,275 g

Agiter sans chauffer jusqu'à dissolution complète de l'éosine jaunâtre.

6.3. *Préparation du colorant*

Mélanger l'entièreté des solutions A et B, bien agiter, puis filtrer.

7. MELANGE DE CENDRIER

Mélanger dans un erlenmeyer :

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

Ajouter dans l'ordre les produits l'un après l'autre. Bien agiter.

8. BLEU D'ANILINE - SOUDAN III AU LACTOPHENOL

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Phénol 10 g
- Acide lactique 10 g
- Glycérine 20 g
- Eau distillée 10 ml

Bien agiter, puis porter à ébullition ce mélange sursaturé de Soudan III (C.I. 26100). Filtrer à chaud, puis laisser refroidir avant d'ajouter 0,25 g de bleu d'aniline (C.I. 42755). Filtrer à nouveau.

9. ETHANOL-FORMOL DE SCHAFFER

Mélanger dans un erlenmeyer :

- Ethanol à 80° 40 ml
- Formol du commerce 20 ml

Bien agiter. Le formol du commerce, contenant généralement 35-40 % de formaldéhyde, n'est pas pur, mais contient également 10-15 % d'alcool méthylique, ainsi que des traces d'acide formique. Le méthanol ralentit sa polymérisation tandis que l'acide formique le rend très acide, ce qui provoque l'acidité du mélange éthanol-formol. On décèle cette acidité par la teinte fuchsia que prend une solution aqueuse de rouge neutre (C.I. 50040) à 0,1 % mise à son contact. On procède, pour neutraliser le fixateur, à des ajouts successifs de très petites quantités de carbonate de calcium, en agitant bien et en testant la réaction au rouge neutre entre chaque ajout (employer la méthode de la réaction dite "à la touche", sur une plaque alvéolée de porcelaine). Poursuivre les ajouts jusqu'à ce que l'indicateur ne vire plus au fuchsia, mais reste bien rouge ou tende même vers l'orangé. Laisser reposer 24 h, puis filtrer sur papier fin.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. OUVRAGES COLLECTIFS

- Expériences de génétique*: Centre Technique de l'Enseignement de l'Etat 1984.
Le microscope: Centre Technique et Pédagogique de l'Enseignement de la Communauté Française 1995.
Le sol, support de l'agriculture: Centre Technique de l'Enseignement de l'Etat 1983.
Petit Larousse en couleurs, Larousse 1988.

2. OUVRAGES D'UN OU DE DEUX AUTEURS

- AYEL A. et MOINARD A. : *Le microscope*, Bulletin Spécial n' 3a de la Société Mycologique du Poitou.
BECKER G. : *Champignons*, Gründ 1987.
BON M. : *Champignons de France et d'Europe occidentale*, Arthaud 1988.
COURTECUISSÉ R. et DUHEM B. : *Guide des champignons de France et d'Europe*, Delachaux et Niestlé 1994.
DERMEK A. : *Champignons*, PML éditions 1995.
IZARRA Z. de : *Introduction à l'étude microscopique des champignons*, bulletin spécial n. 5 de la Société Mycologique du Poitou.
LANGERON M. et LOCQUIN M. : *Manuel de microscopie*, Masson 1979.
MARCHAL N. : *Initiation à la microbiologie*, Dunod 1992.
MONCEAUX R.H. : *La vie mystérieuse des champignons sauvages*, Stock 1991
PACIONI G. : *Les champignons*, Nathan 1995.
PHILIPS R. : *Les champignons*, Solar 1981.
ROMAGNESI H. : *Atlas des champignons d'Europe*, Bordas 1995.
SVRCEK M. : *Les champignons*, Marabout Service 1976.

3. FIGURES

Toutes les figures présentées dans ce mémoire ont été entièrement réalisées par mes soins, à l'exception de deux :

- FIGURE 5 (Sporée d'un champignon à hyménium lamellé) : *Champignons*, Becker G., Gründ 1987, page 33.
FIGURE 27 (Différents types de trames) : *Guide des champignons de France et d'Europe*, R. Courtecuisse et B. Duhem, Delachaux et Niestlé 1994, page 54.