

MICROSCOPIE, TECHNIQUES ET TRAITEMENTS DIVERS, COLORANTS ET AUTRES PRODUITS CHIMIQUES A DES FINS D'ANALYSE

par Jean Lachapelle

Nous avons constaté que ce que nous connaissons pour l'avoir appris de divers ouvrages et de collègues mycologues se trouve magistralement exposé et résumé dans le "Manuel de microscopie de Locquin et de Langeron"¹, c'est pourquoi nous avons estimé que le plus utile, dans un but d'initiation, consistait à résumer cet ouvrage, en suivant son ordre de présentation. A ce condensé, nous avons ajouté des renseignements recueillis dans d'autres ouvrages, notamment dans des monographies, et auprès d'un préparateur de réactifs, colorants et produits chimiques divers, comme Marcel LECOMTE² ; enfin, nous y avons incorporé quelques commentaires inspirés par notre expérience personnelle - laquelle est axée sur les champignons agaricoïdes. Ce travail a un caractère compilatoire ; nous l'avons voulu pratique avant tout, et à vocation initiatique.

I. - METHODES D'EXAMEN

A. - Traitements préparatoires

Régénération du matériel desséché

Pour regonfler les exsiccata, on peut utiliser notamment des alcalis (ammoniaque, potasse, soude) ou le lactophénol, le chloral-lactophénol, le lactochloral, l'acide lactique, l'hydrate de chloral, le mélange à parts égales d'eau, d'alcool et de glycérine (imprégner d'abord à l'alcool), l'eau acétique à 50%.

Le chloral-lactophénol ou le lactochloral sont des produits supérieurs au lactophénol et à l'acide lactique. L'ammoniaque et l'hydrate de chloral respectent mieux le matériel à observer que les autres produits. Chauffer accentue évidemment l'action du milieu³.

Depuis que CLEMENÇON a découvert le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), qui est un excellent regonflant, la majorité des champignons peuvent être examinés directement dans le rouge Congo SDS, sans usage préliminaire d'une solution alcaline. Cela vaut aussi pour les exsiccata. Néanmoins, si l'on préfère examiner une préparation d'abord dans une solution alcaline et y regonfler et ramollir du

¹ Ouvrage édité en 1978 chez Masson. La matière intéressante pour le mycologue est assez disséminée dans cet ouvrage par ailleurs magistral.

² A l'occasion de nos échanges épistolaires ou de nos rencontres. Certains renseignements sont sans doute attribuables en partie à Didier Baar.

³ Ne pas chauffer le lactophénol.

matériel sec, CLEMENÇON recommande alors d'utiliser la solution GSD même : 5 g Glycérine, 0,2 g hydroxyde de Sodium, 5 g Diméthyl-sulfoxyde, 10 g eau distillée. La glycérine évite le dessèchement et améliore l'indice de réfraction optique, le diméthyl-sulfoxyde active l'imprégnation et favorise le regonflement du matériel sec. L'utilisation du GSD permet de colorer ultérieurement la préparation dans le rouge Congo SDS (voir infra).

Déshydratation du matériel frais

Déposer le matériel sur une lame et le plonger dans du chloral-lactophénol ou lactochloral : les tissus aqueux qui demanderaient à être déshydratés le sont en quelques minutes, sans contraction.

B. - Fixation

Fixer, c'est immobiliser les structures organiques dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. La fixation provoque l'insolubilisation des constituants intracellulaires et l'augmentation de l'indice de réfraction.

La fixation d'une coupe dans un tissu de champignon permet de mieux le colorer en favorisant la pénétration du colorant. En outre, il facilite l'observation des pigments. Selon JOSSERAND, sur le sec, il faut plonger les coupes dans un fixateur pour insolubiliser les pigments et observer dans une solution très concentrée de chloral hydraté après ébullition ; cette méthode est aussi recommandable sur le vivant, surtout si le pigment est très peu abondant.

Il existe des fixateurs simples et des mélanges fixateurs.

L'alcool est très hygroscopique⁴ : il contracte les cellules de la moitié de leur volume et rigidifie les tissus. Il n'a pas d'influence sur la plupart des colorants et n'empêche généralement pas leur diffusion. Son pH = 6 alors que celui de l'eau = 7.

L'acide picrique⁵ (solution saturée) est à la fois un fixateur et un colorant ; il est très acide. Peu pénétrant, il contracte moyennement les tissus et les durcit peu. C'est un bon fixateur pour la topographie histologique, moins bon pour les détails intracellulaires.

L'acide acétique (à 5% en solution aqueuse) est un acide moyen. Il peut être mélangé à l'alcool. Il a une vitesse moyenne de pénétration et gonfle les tissus : les tissus fixés sont extrêmement mous.

Le formol est un autre fixateur. Le formol commercial est assez impur (il contient de l'acide formique et du méthanol) et très acide (il doit être neutralisé avant emploi avec du carbonate de calcium par exemple). Il nous paraît plus

⁴ Remarquer que le méthanol, produit à usage ménager bon marché, est beaucoup moins hygroscopique que l'éthanol.

⁵ L'acide picrique cristallisé est très sensible aux chocs et au feu. Ne jamais le mélanger à de la glycérine car il donne un produit hautement explosif : la trinitroglycérine (dynamite) !!

indiqué d'utiliser du formol de laboratoire, nettement plus pur. Le formaldéhyde durcit fortement les tissus. Il agit plus vivement s'il est additionné de sel ou de sucre. C'est un fixateur d'un emploi simple et d'un domaine d'application assez étendu quoique souvent médiocre.

La solution était tentante évidemment de combiner trois de ces produits dans une sorte de fixateur « universel » : l'AFA (Alcool Formolé Acétique) ; ce mélange s'avère très intéressant et vaut la peine d'être exploité.

Il existe de nombreux autres mélanges fixateurs qui ont le mérite d'utiliser d'une manière appropriée les attributs des divers composants. En histologie, on utilise notamment : le picroformol de Bouin, le picroformol cuprique de Hollande, le picroformol mercurique, le fixateur de Bouin-Hollande, etc... Chaque mélange a son domaine d'application : tout fixateur, simple ou en mélange, doit être utilisé avec à propos !

C. - Eclaircissement et ramollissement

Déminéralisation

Lorsque l'oxalate de chaux obscurcit une préparation, faire agir notamment de l'acide chlorhydrique (5 à 10 %), nitrique (à 6%) ou picrique (solution aqueuse saturée).

Coupes obscurcies

Lorsque les espaces interhyphiques sont remplis d'air, les coupes peuvent être presque illisibles : on les fera bouillir entre lame et lamelle dans l'ammoniaque pour en chasser l'air. On peut aussi laver la préparation à l'alcool.

Ramollissement

L'ammoniaque concentrée a le pouvoir non seulement de regonfler les exsiccata mais aussi de ramollir les hyphes de champignons frais. La potasse et la soude ont une action plus forte que celle de l'ammoniaque.

Lorsqu'on n'utilise pas le SDS ou le GSD, on peut recommander, pour ramollir les exsiccata, l'emploi du ramollisseur de CLEMENÇON : ammoniaque concentré 20 ml, glycérine 1 g, éthanol 96 % 80 ml. Sur la partie prélevée laisser tomber quelques gouttes du liquide à ramollir et laisser agir quelques minutes (voire quelques heures) jusqu'à évaporation. Le champignon ayant acquis une consistance comparable à celle de la cire, on peut alors pratiquer les coupes. Bien rincer pour éliminer l'excédent de glycérine.

Dépigmentation

Pour certains traitements spécialisés, il est indiqué de dépigmenter, autrement dit de blanchir : on utilise notamment de l'eau oxygénée, du permanganate de potassium, de l'hypochlorite de soude (dont l'eau de Javel est un dérivé impur, peu conseillé en microscopie).

Attention cependant ! l'hypochlorite de soude a la propriété de dissoudre complètement le contenu des cellules (pratiquement, on l'utilise surtout en histologie végétale lorsqu'on souhaite ne garder que les parois des tissus.)

D. - L'observation

Il est toujours courant aujourd'hui d'observer les prélèvements directement entre lame et lamelle, dans une goutte d'eau, avec éventuellement une dilacération, une dissociation ou une micro-compression pour mieux en séparer les éléments. Les techniques mises en œuvre à cette occasion continuent à faire avancer la mycologie. L'examen en question n'est pas une méthode facile et n'est praticable que sur des cellules faciles à isoler, des tissus aisés à dissocier, des cellules assez petites pour être montées entre lame et lamelle. Si l'examen est court, un montage dans l'eau entre lame et lamelle est suffisant ; pour pouvoir le prolonger, il faut éviter l'évaporation : on se tournera alors vers le lactophénole ou le chloral-lactophénole par exemple....

Les colorations

Une coloration est une expérience de physiologie cellulaire : l'opérateur travaille dans l'infinie complexité de la matière vivante et doit particulièrement surveiller ses conditions opératoires pour pouvoir tirer de bons enseignements de ses résultats. Les colorations sont utilisées pour mettre en évidence des structures morphologiques intra-cellulaires, mais aussi pour étudier la perméabilité de certaines interfaces, la réaction cellulaire à l'introduction d'un colorant, etc.

Notons cependant que les colorants que nous utilisons, opèrent tous, à concentration normale, une action létale sur les éléments étudiés, même sans fixation préalable ; les colorants vitaux (qui laissent les cellules en vie) sont rares ; le moins nocif est le rouge neutre, utilisé à 1/1.000 ; citons également le bleu de méthylène, le bleu de crésyl, le vert Janus, employés à des dilutions de l'ordre de 1/10.000 à 1/30.000, voire 1/100.000.

Plasmolyse⁶

Lors de l'examen de cellules contenant des vacuoles pigmentées, le pigment est souvent dilué et peu visible. Pour en intensifier la visibilité, les cellules sont placées dans une solution sucrée concentrée : la différence de pression osmotique provoque un départ de l'eau de la cellule, les vacuoles se contractent et se concentrent rendant alors les pigments plus visibles. Ceci ne s'applique pas aux nécropigments ni aux pigments ayant une autre localisation. Beaucoup d'auteurs proposent indifféremment le sel ou le sucre comme agent de plasmolyse ; l'eau glycinée provoque également une plasmolyse.

⁶ Langeron préfère le terme "osmodialyse".

Recommandation de JOSSERAND : placer la pièce à observer dans une solution sucrée à 8% et attendre car l'osmose n'est pas instantanée. Si, au bout de 10 ou 15 minutes, on ne découvre aucune hyphe dont la vacuole se soit contractée, au moins assez pour permettre le diagnostic, on fera une deuxième préparation en utilisant cette fois une solution à 12 %. On attendra de nouveau. Si l'on n'obtient aucun résultat, il sera inutile d'employer une solution plus concentrée.

Dissociation chimique

Certains champignons, tels les polypores, ont une structure très ferme à dure ; d'autres, tels les pleurotes ont une structure gélatineuse. L'observation de leurs éléments, comme dans les cas fréquents de champignons à structure simplement ferme ou compacte, demande un traitement ramollissant préalable : celui-ci évite ou réduit la dissociation "mécanique" par pression ou par chocs (dilacération, squash) qui souvent abîme ou disperse les éléments. Pour cela, on utilise, selon le cas, de l'alcool, de l'acide acétique (0,2 à 2%) et, le plus souvent, des bases (ammoniaque, potasse, soude). La macération chimique est suivie d'une faible dissociation mécanique. **Nous vous conseillons d'ailleurs d'effectuer cette dissociation entre deux lames porte-objets, car une lame couvre-objet ne résiste pas la pression qui doit être exercée pour réaliser la dissociation !**

Intensificateurs de contraste

Ce sont, en fait, des intensificateurs d'indice de réfraction par fixation d'atomes lourds sur les structures à observer. On peut trouver ces métaux dans des fixateurs et des colorants. A ce sujet, il est utile de se rappeler que la glycérine présente dans plusieurs solutions accroît l'indice de réfraction et que le réactif de Melzer (chloral iodo-ioduré), grâce à la présence de l'iode, améliore le contraste de la préparation.

II. - TEINTURES ET IMPREGNATIONS

Conseils généraux

Pour que les colorants pénètrent dans les membranes (souvent imperméables), il faut en général passer ces dernières dans l'alcool dilué et rincer aussitôt.

Une solution colorante aqueuse ne doit pas être mise en contact avec un objet imprégné d'alcool : celui-ci sera impérativement rincé à l'eau au préalable afin d'éviter la formation d'un précipité.

Les objets colorés qui doivent être lavés le sont dans le solvant du colorant (eau, alcool, etc.).

Pendant la coloration, l'objet ne doit pas se dessécher. Il existe à cet effet de petites cuves à coloration très pratiques. Les colorants agissent progressivement : soit on surveille la coloration pour l'arrêter au stade voulu (on

parlera de coloration progressive), ou on surcolore pour décolorer ensuite dans un milieu approprié (solvant du colorant) appelé différenciateur (on parlera ici de coloration régressive).

On peut colorer un même objet par différents colorants : ceci facilite les observations.

On distingue trois groupes de colorants :

- colorants neutres (Giemsa),
- colorants basiques ou nucléaires (bleu de méthylène),
- colorants acides ou plasmatiques (éosine).

Basophilie et cyanophilie sont synonymes ; de même acidophilie et éosinophilie. Les affinités basophiles sont nettement renforcées par la fixation, notamment par le formol. On parle aussi d'iodophilie (voir infra).

Selon DONADINI, la vitesse d'une réaction quelconque est fonction de trois facteurs : la concentration des constituants entrant en réaction, la température à laquelle on opère et le solvant dans lequel on effectue la réaction.

Observation, réfraction, contraste

Les éléments naturellement colorés s'observent bien sous le microscope : il n'en est pas de même des éléments hyalins c'est-à-dire à la fois clairs et transparents. Il est donc recommandé de colorer puis d'observer dans un milieu clair approprié : l'eau, l'ammoniaque, le lactophénol, l'hydrate de chloral, etc.

Pour une observation approfondie, il est préférable d'observer d'abord dans un liquide non coloré. Ensuite on peut être amené à colorer. A ce sujet, il faut savoir que chaque champignon, chaque organe de champignon et chaque partie de cet organe peut demander une coloration spécifique en fonction de la nature de sa constitution et de ses propriétés chimiques.

On a intérêt, particulièrement lors de la photomicrographie ou pour des préparations à destination définitive, à laver dans l'ammoniaque diluée 2 fois les préparations montées dans le rouge Congo ammoniacal, dans le lactophénol pour les préparations montées dans le bleu lactique, etc. Par cette opération, le fond se décolore et le contraste se trouve encore augmenté. L'ammoniaque diluée 2 fois a ici l'avantage sur l'ammoniaque concentrée de ne dissoudre que le colorant non fixé sur les structures fongiques. L'ammoniaque concentrée, au contraire, dissout assez facilement le rouge Congo, même fixé, et fait donc pâlir les éléments observés. L'eau convient moins bien parce que le colorant n'y est que peu soluble, et qu'elle a tendance à provoquer sa cristallisation. Cette recommandation peut s'appliquer, mutatis mutandis, à d'autres colorants.

Méthodes de coloration

Les phénomènes de teinture des cellules résultent d'un ensemble très complexe de phénomènes physico-chimiques. Certaines réactions colorantes sont

réversibles, d'autres non, certains colorants fixés sont extractibles par un solvant approprié, certains colorent en une autre teinte que leur coloration propre, certains ne colorent que des éléments particuliers, d'autres ne se fixent qu'en présence d'un sel métallique ; certains sont très sensibles au pH.

Il n'est pas de recette de coloration valable pour tous les objets. Le bon opérateur est celui qu'une longue expérience a dressé pour lui permettre de varier les temps ou les concentrations, voire de substituer un colorant à un autre pour obtenir le meilleur résultat. Ces variations sont nécessaires pour tenir compte : du fixateur utilisé, de la nature de la pièce, de l'épaisseur des coupes, de la structure à mettre en évidence, du colorant utilisé, etc.

LANGERON distingue diverses méthodes de coloration, parmi lesquelles on peut relever :

Colorations topographiques : ce sont celles qui différencient le mieux les différents tissus constituant d'un ensemble et permettent la visibilité en général jusqu'aux noyaux, d'un organe.

Colorations histologiques : ce sont celles qui différencient finement tous les éléments d'un tissu y compris ses structures fines et ses excréments ou sécrétats. Une telle coloration devient histochimique si elle est spécifique de tel ou tel composé défini.

Colorations cytologiques : ce sont celles qui permettent d'analyser les détails internes des cellules. De telles colorations peuvent être cytochimiques si elles mettent en évidence des fonctions chimiques déterminées.

Colorations Lysochromes : elles se fixent directement sur les huiles, graisses et cires.

Colorations progressives : elles nécessitent d'arrêter la montée de la coloration au point voulu en observant celle-ci au microscope.

Colorations régressives : après surcoloration, on différencie par un réactif qui enlève progressivement l'excès de colorant, en surveillant au microscope pour arrêter l'effet au moment voulu.

Colorations directes : elles se fixent directement sur l'objet.

Colorations indirectes avec mordantage : la fixation du colorant a lieu par l'intermédiaire d'un sel métallique "mordant".

Coloration indirecte par mordantage : mordant

Le mordantage est l'utilisation d'un mordant, c'est-à-dire d'une substance qui renforce les colorations et dans certains cas, les rend possibles. On n'emploie que des mordants neutres ou acides. On peut dire qu'un mordant est une substance qui sert d'intermédiaire entre le colorant et la pièce à colorer : il provoque une combinaison chimique entre 2 corps qui n'ont aucune affinité chimique au départ ; il sensibilise le corps à colorer en formant avec lui une combinaison stable. Il se forme donc entre le tissu, le mordant et le colorant, une triple combinaison colorée suffisamment stable pour résister aux

décolorants (acides, alcool...). On utilise fréquemment le Lugol à cet effet (solution forte de Nicolle).

Coloration directe : mouillant

Un agent mouillant est un agent qui diminue la tension superficielle ; les détergents en font partie. Ils facilitent la pénétration des colorants dans les cellules ou dans les structures de la cellule en détruisant la couche grasse ou huileuse qui les protègent : on peut donc parler ici de coloration directe. Précisons que le mouillant ne réduit pas la tension superficielle de la solution colorante mais la tension superficielle du coloré (coupe ou préparation).

L'Invadin suggéré par CLEMENÇON et MOSER peut être avantageusement remplacé par un simple détergent de ménage (utilisé pour la vaisselle). Le SDS plus récemment recommandé par CLEMENÇON a l'avantage de la pureté et de la stabilité comme composant de base. Il faut éviter de dépasser la dose recommandée dans les formules de colorant afin de ne pas provoquer l'apparition de mousse dans la préparation.

Certains auteurs recommandent de placer le prélèvement à observer dans l'alcool pendant un temps non rigoureusement déterminé (5 à 15 minutes) pour assurer la "mouillabilité" des tissus. Il y a ici un usage inapproprié du terme mouillabilité : en effet, l'alcool est le meilleur des déshydratants et un fixateur de premier ordre. Avec le risque cependant de trop déshydrater les tissus et de leur faire perdre leur taille initiale.

Matières colorantes

Ce sont des substances qui se fixent de façon appropriée sur les objets qui sont mis en contact avec eux par l'intermédiaire d'une solution.

Les principales modalités des teintures ou colorations sont : réactions chimiques entre colorant et objet, imbibition différentielle de l'objet, précipitation du colorant sur l'objet, adsorption du colorant sur l'objet, liaison à l'objet par un "mordant", interdiction de liaison à l'objet.

Certains colorants, acides par nature, se fixent différemment sur certaines structures et conduisent ainsi à des colorations signalétiques, sinon spécifiques, par imbibition à des vitesses différentes ; de plus, le premier colorant ayant occupé un "espace" affine, en interdit l'accès aux autres en compétition avec lui.

Coloration des différents types de tissus

Tissus contenant des lipides

a) Coloration par les Lysochromes

Parmi les colorants Lysochromes on trouve le bleu de crésyl ammoniacal. La coloration par le bleu de crésyl se fait ainsi : on fait agir une solution aqueuse à

1-2%, on lave à l'eau puis par de l'ammoniaque diluée à 50%; les lipides apparaissent jaune d'or, les parois des tissus fongiques étant incolores ou vineux pâle. On peut mettre ainsi en évidence les chrysozystides des Strophaires et des Hypholomes.

b) Coloration par les bleus métachromatiques

La coloration métachromatique consiste en un virage du colorant dans une teinte autre que la sienne propre lorsqu'il est fixé par l'objet.

Parmi les bleus les plus utilisés on trouve le bleu de toluidine et le bleu de crésyl. Cette coloration met en évidence non seulement les lipides acides mais aussi tous les autres constituants métachromatiques.

c) Réactions des caroténoïdes

On rattache habituellement les caroténoïdes aux lipides en raison de leurs caractères de solubilité. Ils se colorent directement en violet, bleu ou vert dans les acides forts et en violet dans les liquides iodés (Lugol, Melzer).

d) Réaction des chromolipoides

Ce sont en général des pigments jaunes à bruns, basophiles et acido-résistants. On les rencontre notamment chez les Russules et Rhodophylles. ROMAGNESI a tiré un grand parti systématique de leur présence. Leur acido-résistance est mise en évidence par la technique de Ziehl-Nielsen (fuchsine de Ziehl).

Tissus contenant des polyosides

Ces polyosides sont des sucres ± polymérisés.

a) coloration métachromatique : voir ci-dessus.

b) coloration au rouge de ruthénium : en solution aqueuse à 0,1%.

Colorants des oxydases

En injectant dans un tissu un mélange de solutions d'alpha-naphtol et de diméthylparaphénylène-diamine, on provoque une réaction (dite "*Nadiréaction*") permettant de localiser les oxydases. La réaction donne, par oxydation, un produit de condensation coloré en bleu. Aucune fixation préalable n'est possible, le colorant formé diffuse facilement et est un lysochrome.

Si on se contente d'une mise en évidence topologique comparée, on peut faire appel à la présence *in situ*, spécialement en ce qui concerne les composés des tissus fongiques, d'un des deux composants fondamentaux de la Nadiréaction. C'est ce qu'on fait en colorant certains tissus de Russules ou de Bolets à l'aide d'un phénol. On fait encore appel à la même réaction lorsqu'on utilise la paraphénylène-diamine ou la teinture de Gaïac.

Iodophilie - coloration à l'iode

Suivant le mode opératoire et la coloration obtenue, l'iode permet de déceler : le glycogène, la cellulose, l'amidon, la chitine non sclérifiée ni fossilisée, et certains autres polyosides dextrinoïdes.

Voici les principaux réactifs utilisables :

- le lugol, fort ou faible suivant sa concentration : iode 1 g + iodure de potassium 2 g + eau 100 à 400 ml suivant la "force" désirée.
- le Melzer ou chloral iodo-ioduré : iode 1,5 g + iodure de potassium 5 g + hydrate de chloral 100 g + eau 100 ml.

La couleur et l'intensité doivent être soigneusement notées. On peut avoir suivant les cas : une coloration noir pur, violet foncé, bleu foncé, bleu ciel, brun acajou, vineux, jaune brunâtre, jaune d'or, jaune clair. On n'attache en général pas de signification à ces trois derniers termes.

- Si les objets prennent une teinte brun acajou à brun vineux on les dit "dextrinoïdes" ou pseudo-amyloïdes. Ils peuvent contenir soit du glycogène, soit des dextrans.
- L'amidon et l'amyloïde se colorent directement en bleu dans le lugol ou le Melzer; la réaction est dite amyloïde.

La coloration à l'iode est une véritable coloration métachromatique par opposition aux couleurs jaunes orthochromatiques que prennent la plupart des substances plongées dans l'iode.

La réaction de l'iode s'observe bien sur les éléments pâles. Il n'en est pas de même des éléments fortement pigmentés : ici, l'action de l'iode peut être beaucoup moins apparente et d'une interprétation délicate.

Sensibilité au fer - sidérophilie - carminophilie

JOSSERAND rappelle que KÜHNER est le premier à avoir constaté la présence, dans les basides de la tribu des *Lyophylleae*, de granulations dites carminophiles. Ces grains se présentent sous la forme de très nombreuses sphérules entassées les unes contre les autres. La carminophilie ou sidérophilie exprime l'affinité pour le carmin acétique en présence de fer.

Extrait de la fiche technique de LECOMTE :

"Le carmin acétique commercialisé est une combinaison d'acide carminique avec de l'alumine, de la chaux et des albuminoïdes. Par sa double action de fixateur et de colorant, le carmin acétique est utilisé pour l'observation des noyaux qui sont fortement mais finement colorés. L'acétate de fer rend la coloration rouge intense noirâtre.

"Il faut savoir que les verrues, granulations, parois et ornements amyloïdes ne se colorent pas par le carmin.

"Manière de procéder :

- placer une grosse goutte de réactif sur une lame de verre et y placer les coupes
- chauffer durant quelques secondes quasi jusqu'à ébullition
- agiter le carmin acétique avec une aiguille en acier (ce qui provoque la formation d'acétate de fer)
- alternative : y déposer quelques grains de sulfate de fer ou une solution de chlorure de fer III
- dès que le carmin acétique vire au rouge bleuâtre, voire noirâtre, et perd sa transparence, refroidir avant la formation d'une pellicule de surface
- placer les pièces colorées dans une nouvelle goutte de carmin acétique, dissocier et observer.

"Dans une préparation réussie, le protoplasme est faiblement et uniformément coloré, tandis que les noyaux sont vivement teintés de rouge ou de pourpre noirâtre.

CLEMENÇON procède comme suit pour mettre en évidence la carminophilie des basides :

- prélever un fragment de lame (s'il s'agit d'un exsiccatum, hydrater d'abord à l'ammoniaque et tamponner au papier buvard)
- mordancer dans une solution de sulfate de fer à 10% durant 5 à 10 minutes
- tamponner le fragment puis le plonger dans le carmin acétique et faire bouillir durant 1 à 2 minutes; des précipités noirs se forment dans la solution rouge
- observer ensuite dans une goutte de chloral hydraté.

III. - COLORATIONS TOPOLOGIQUES

Les pigments

On peut les envisager du point de vue :

1/ de leur localisation dans les tissus et cellules

2/ de leur constitution chimique

3/ de leur métabolisation

4/ enfin de leur liaison avec les autres constituants cellulaires.

Méthodes spéciales en histologie mycologique

a) Spores

Les spores présentent une certaine différenciation des membranes et une assez grande imperméabilité de celles-ci. Pour que les colorants pénètrent à travers elles, il faut en général les placer dans l'alcool dilué ou de l'eau sulfurique à 0,01% et rincer aussitôt.

b) Techniques végétales applicables à la mycologie

La cellule végétale a un squelette rigide et réfringent formé de parois cellulaires ± soudées les unes aux autres en forme de tissu ou de faux tissu.

La destruction du cytoplasme, en ne laissant subsister que le squelette cellulosique, permet de mieux observer les parois ainsi que l'anatomie des éléments soumis à l'examen. A cet effet, on baigne la préparation de quelques secondes à 5-10 minutes, dans une solution à 50 % d'hypochlorite de soude (l'eau de Javel est à rejeter, à cause de ses impuretés). Laver ensuite à l'eau acidulée par l'acide acétique.

L'hydrolyse basique se fait à la potasse. Il s'agit d'une technique spéciale utilisée par KÜHNER dans l'étude des spores (cf. son ouvrage *Hyménomycètes agaricoïdes*). KÜHNER parle fréquemment de ce traitement qu'il appelle le "traitement potassique"; il l'utilise notamment pour éliminer la couche externe (myxosporium) des spores.

Si l'on éprouve des difficultés à reconnaître la présence des boucles au pied des basides des entolomes, KÜHNER recommande de colorer au rouge Congo après un traitement potassique suffisant pour lyser le contenu cellulaire.

Les protides ne donne pas de réaction absolument caractéristique, aussi faut-il essayer plusieurs réactifs pour les reconnaître sûrement. Il est bon de fixer d'abord le tissu à l'alcool qui le durcit et dissout un certain nombre de substances qui pourraient troubler les réactions. L'éosine en solution aqueuse très faible est un de ces réactifs ; elle donne une coloration rouge non élective.

Les réactions de la cellulose sont quelques fois difficiles à obtenir : elles ne se manifestent qu'après transformation notamment par des alcalis caustiques. La cellulose des champignons est généralement mélangée à une grande quantité de chitine.

La callose se colore par les bleu d'aniline solubles à l'eau (bleu de méthyle employé en solution à 1% acidulée par 3% d'acide acétique).

Les membranes cutinisées sont acido-résistantes et se colorent électivement par la méthode de Ziehl-Nielsen.

Les composés pectiques se comportent comme des acides et prennent les colorants basiques (de préférence en solution acidulée à 0,05% d'acide acétique) mais non les colorants acides, comme la cellulose. Le meilleur réactif de ces composés est le rouge de ruthénium ; en revanche, ils ne prennent pas le rouge Congo ammoniacal.

Les mucilages. Les mucilages cellulosiques (rares) réagissent comme la cellulose. Les mucilages pectiques (fréquents) se gonflent, se colorent par les colorants basiques et par le rouge de ruthénium. Les mucilages callosiques (qui se dissolvent sans se gonfler) se colorent par le bleu d'aniline en solution acétifiée mais non par les colorants basiques. Ces mucilages se mélangent entre eux et avec les gommages : il n'est donc pas facile de les identifier.

Les lipides. Le réactif le plus commode est le Soudan III en solution alcoolique qui les colore en rouge vif. Ce colorant colore aussi les cires, résines, cutine, subérine et latex mais ne colore pas la cellulose, la lignine, les mucilages.

c) Techniques mycologiques

Milieu alcalin ou acide

Si un milieu alcalin dissout ou déforme les cellules, pigments, etc., il faut essayer alors l'eau éventuellement colorée au rouge Congo, à l'éosine ou l'acide lactique concentré éventuellement coloré par le bleu coton.

Le rouge de ruthénium

Colorant remarquable ; il est coûteux. Il est soluble dans l'eau mais non dans l'alcool et la glycérine : on le prépare extemporanément (traces de poudre dans un peu d'eau pour obtenir un rouge foncé). Ce colorant colore uniquement les éléments basophiles, c'est par excellence le réactif des composés pectiques.

Bleu de méthyle au lactophénol ou bleu coton

Le bleu de méthyle est un bleu d'aniline habituellement appelé bleu coton. Il est un colorant spécifique de la callose. Il colore les membranes callosiques ainsi que le contenu cytoplasmique des hyphes.

Réactif iodé de Melzer

Ce réactif a été créé pour distinguer les parois amyloïdes, les parois non amyloïdes et les parois dextrinoïdes. Ce réactif possède en outre un grand pouvoir éclaircissant, ce qui le rend pratique pour l'examen des plectenchymes.

Le liquide de lugol

Ce réactif est excellent pour les champignons filamenteux. Peu réfringent, il éclaircit peu mais donne des images à contours extrêmement nets. Il colore électivement le glycogène en brun acajou qui tranche sur la teinte jaune brun que prennent les membranes et parties non glyco-géniques du cytoplasme.

Le Soudan III au lactophénol

Est utilisé pour la recherche et la coloration des lipides.

Coloration des noyaux

On peut utiliser à cet effet, le Giemsa et le carmin acétique recommandés par KÜHNER. Voir aussi les travaux de DONADINI et de BERTHET, sur les Dyscomycètes.

Coloration des polypeptides

Les réactifs sulfoaldéhydiques colorent les substances phénoliques contenues dans certaines cystides et hyphes. Inventé par MAIRE et largement utilisé par ROMAGNESI, il trouve son application dans les Russules. En définitive, c'est la sulfovanilline qui est préférée, dans un premier temps, bien que moins sensible

que d'autres aldéhydes : elle a en effet un grand pouvoir de pénétration et permet toutes les observations structurales que l'on souhaite. La préparation est extemporanée. Le sulfobenzaldéhyde s'avère également très intéressant, car il dépasse les limites de la sulfovanilline !

L'acido-résistance.

MELZER a appliqué la méthode de la coloration de Ziehl aux incrustations périhyphiques des Russules ; ce procédé a été largement utilisé par ROMAGNESI.

Le bleu de crésyl ammoniaco-acétique.

Imaginé par LOCOUIN, il met en évidence la métachromasie, les lipides et le gonflement de certaines strates membranaires.