

Partie 3 : Réactifs pour la microscopie et bibliographie.

Didier Baar¹

5. Réactifs pour la microscopie.

5.1. Acide lactique concentré.

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

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



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

- UTILISATION :

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

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

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

5.2. Ammoniaque diluée 2x.

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

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

² Les énantiomères sont un cas particulier d'isomères. Pour rappel, des isomères sont des molécules qui possèdent la même formule brute, c'est-à-dire la même composition en atomes, mais qui diffèrent par leur formule développée, c'est-à-dire par la disposition spatiale relative de leurs atomes.

• UTILISATION :

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

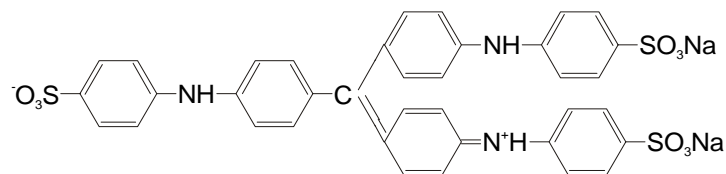
Par contre, en macrochimie, la solution diluée deux fois n'est pas employée parce que l'ammoniaque concentrée donne toujours des réactions plus nettes sans détruire la chair des champignons pour autant.

• DANGERS ET CONSERVATION :

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

5.3. Bleu coton au lactophénol.

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

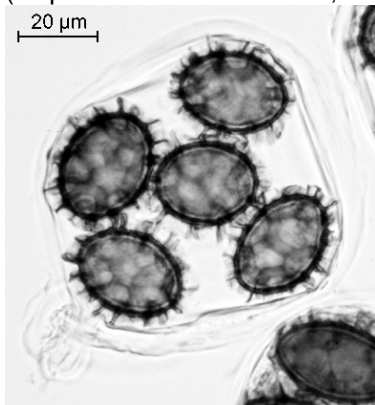


Bleu de méthyle (C.I. : 42 780)

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

• UTILISATION :

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



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

Pour avoir les meilleures préparations possibles, on a intérêt à colorer les éléments à observer dans ce réactif, mais à les laver et à les monter dans le lactophénol pur. Le contraste s'en trouve

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

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

- DANGERS :

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

- CONSERVATION :

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

5.4. Chloral-lactophénol.

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

- UTILISATION :

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

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

- DANGERS :

Les dangers sont les mêmes que pour le bleu de méthyle au lactophénol (voir paragraphe 5.3), si ce n'est que le chloral lactophénol contient, en plus, de l'hydrate de chloral, qui est loin d'être un produit inoffensif (il est toxique et irritant). Eviter donc absolument de respirer les vapeurs.

Naturellement, le chloral lactophénole ne contient pas de bleu de méthyle, ce qui limite (sans les supprimer) les risques de taches sur les vêtements.

- CONSERVATION :

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

5.5. Eau bidistillée.

L'eau bidistillée est une eau qui, comme son nom l'indique, a été distillée deux fois successivement. En principe, elle ne contient donc aucune impureté ; mais en pratique, les gaz de l'atmosphère, tels que le dioxygène (O₂), le diazote (N₂) ou le dioxyde de carbone (CO₂) ont tôt fait de s'y dissoudre. Elle reste néanmoins intéressante parce qu'elle ne contient pas (ou presque pas) de substances minérales telles que le sodium (Na⁺), le potassium (K⁺), le chlore (Cl⁻), le calcaire (essentiellement CaCO₃), etc. En théorie, son pH est de 7.

- UTILISATION :

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

Mais ses inconvénients sont nombreux : elle a un très faible indice de réfraction (n = 1,333), ce qui rend les préparations difficilement intelligibles. De plus, comme elle est incolore, les éléments qu'on y observe manquent sensiblement de contraste. D'autre part, elle a tendance à faire gonfler (voire éclater) les hyphes par le phénomène de turgescence, qui est dû au fait que la concentration en éléments dissous est beaucoup plus importante dans les cellules que dans l'eau. Or les éléments en question ne peuvent pas traverser les membranes cellulaires tandis que l'eau, elle, peut le faire. Pour équilibrer la différence de concentration, l'eau a donc tendance à entrer dans les cellules, ce qui provoque la turgescence. Ce gonflement a non seulement le désavantage de déformer les hyphes mais, en plus, si l'eau n'altère pas les pigments dissous dans le cytosol (liquide intérieur de la cellule), la turgescence les dilue. L'intensité de leur couleur diminue donc et ils peuvent devenir invisibles.

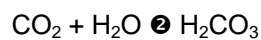
Pour empêcher la turgescence, on peut utiliser la solution dite physiologique, qui contient 9 g de chlorure de sodium (NaCl) par litre, et qui est en équilibre avec la concentration du cytosol. Pour mettre les pigments en évidence, on utilise quelquefois une solution beaucoup plus concentrée en NaCl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

- DANGERS :

L'eau bidistillée ne présente vraiment aucun danger.

- CONSERVATION :

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



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

5.6. Lactophénole.

Le lactophénole est un liquide visqueux et incolore, à l'odeur de phénole. C'est un mélange de plusieurs constituants : phénole, acide lactique, glycérine et eau bidistillée. Le phénole (voir paragraphe

3.2), l'acide lactique (voir paragraphe 5.1) et l'eau bidistillée (voir paragraphe 5.5) ont déjà été décrits. La glycérine (en vérité propane-1,2,3-triol : $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$), quant à elle, est un triol : elle possède trois fonctions alcool (-OH). C'est un liquide très visqueux aux températures habituelles.

- UTILISATION :

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

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

- DANGERS ET CONSERVATION :

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

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

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

- UTILISATION :

On utilise, en microscopie, la potasse à différentes concentrations : 10%, 5% et 2%. La solution à 5% est la plus universellement employée. Elle a des effets semblables à l'ammoniaque concentrée, mais elle présente l'avantage sur cette dernière d'être sensiblement moins volatile et d'être inodore. On peut donc, au lieu d'ammoniaque concentrée, employer de la potasse à 5% pour toutes les observations courantes ; on peut même y dissoudre du rouge Congo. Globalement, la potasse offre les avantages de regonfler les exsiccata et de ramollir les tissus, mais elle altère souvent les cellules. C'est, finalement, un assez bon milieu d'observation, mais dont il faut se servir avec une certaine circonspection parce qu'il est susceptible de dissoudre certains éléments, dont notamment l'ornementation des spores chez les ascomycètes.

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

- DANGERS ET CONSERVATION :

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

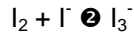
5.8. Potasse à 2% dans l'eau bidistillée.

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

5.9. Réactif de Melzer.

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

potassium (KI), suite à la formation d'un ion complexe³ entre l'iode (I₂) et l'ion iodure (I⁻) suivant l'équation :

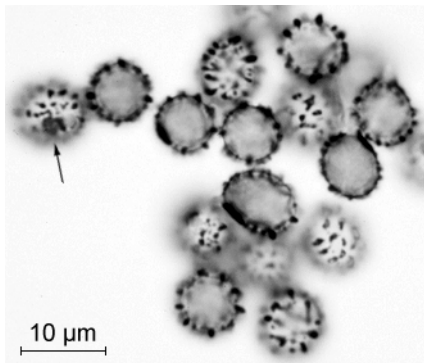


C'est pour cela que le réactif de Melzer contient de l'iodure de potassium. Celui-ci est un solide blanchâtre, soluble dans l'eau. L'hydrate de chloral a déjà été décrit (voir paragraphe 5.4).

• UTILISATION :

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

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



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

• DANGERS :

Le réactif de Melzer est assez dangereux : l'hydrate de chloral est toxique et irritant et l'iode est nocif ; aussi, éviter tout contact avec la peau ou les yeux, et éviter de respirer les vapeurs. D'autre part, il est bon de savoir que l'iode, au contact de l'ammoniaque, provoque des réactions à caractère explosif. Enfin, l'iode se fixant très bien sur la cellulose (qui est un polymère de glucose, c'est-à-dire de sucre), à laquelle il donne une coloration noirâtre, il faut éviter d'en tacher les vêtements en coton (les taches peuvent être enlevées à l'aide d'une solution diluée de thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃), mais ce procédé présente un risque de décoloration du tissu).

• CONSERVATION :

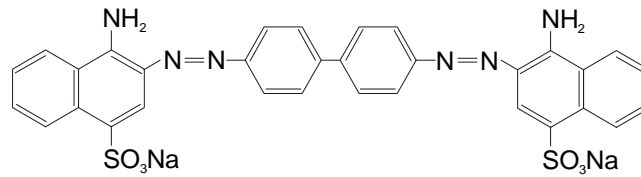
Le réactif de Melzer doit être conservé dans un flacon en verre hermétiquement fermé parce que ce liquide est assez corrosif et que l'iode, volatil, est capable de s'échapper de certains flacons, à travers le plastique. D'autre part, il est préférable de garder le flacon à l'obscurité car la lumière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

5.10. Rouge Congo ammoniacal.

Le rouge Congo est un colorant qui fait partie de la catégorie des polyazoïques parce qu'il possède deux chromophores de type azoïque, c'est-à-dire formés chacun de deux atomes d'azote doublement liés, et substitués. Le numéro du *Color Index* du rouge Congo est le 22 120. C'est un colorant acide, c'est-à-dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques. Il

³ Les ions complexes résultent de l'association d'un atome, voire d'une molécule (neutres), ou plus souvent d'un cation, avec un ou des ligands. Les ligands sont des molécules (neutres) ou des anions. Ils peuvent être de nature minérale ou organique. L'iode, qui est ce qu'on appelle en chimie un « non-métal », constitue une exception parce que généralement, c'est un métal qui s'associe aux ligands.

colore particulièrement bien les parois des cellules de champignons ; c'est pour cela qu'il est un des colorants les plus utilisés en mycologie générale.

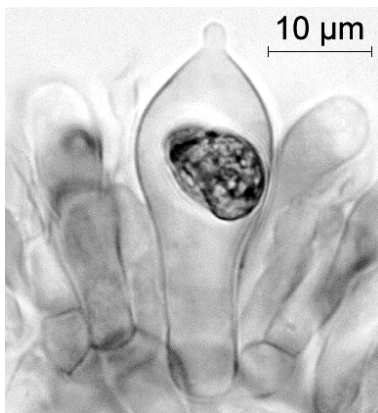


Rouge Congo (C.I. : 22 120)

• UTILISATION :

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

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



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

• DANGERS :

Tous les dangers que présente le rouge Congo ammoniacal sont dus à l'ammoniaque, sauf le risque de tacher irrémédiablement les vêtements, qui, lui, incombe au rouge Congo. L'ammoniaque, étant très volatile, libère le gaz ammoniac, qui est fortement irritant.

Ses propriétés basiques la rendent corrosive, donc éviter le contact avec la peau et surtout avec les yeux, et éviter de respirer les vapeurs. D'autre part, il est bon de savoir que l'ammoniaque, au contact de l'iode, provoque des réactions à caractère explosif.

• CONSERVATION :

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

6. Bibliographie.

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

7. Remerciements.

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