

Etude des pigments chez les champignons

Marcel Lecomte

Comment expliquer la coloration du chapeau des champignons ?

Elle est influencée par plusieurs facteurs biologiques et environnementaux, parmi lesquels :

1. Les pigments naturels

Les champignons contiennent différents pigments qui donnent à leurs chapeaux des couleurs variées. Parmi les plus courants, on trouve :

- ++ **Les mélanines** : ce sont des pigments sombres (bruns ou noirs).
- ++ **Les caroténoïdes** : ils sont jaunes, oranges ou rouges, similaires à ceux des plantes.
- ++ **Les anthraquinones** : ils donnent des teintes rougeâtres ou orangées.
- ++ **Les bétalaines** : ils sont rarement présents dans les champignons, mais peuvent générer des couleurs allant du rouge au violet intense.

2. L'écologie

Il semble que la coloration du chapeau puisse aussi avoir des fonctions écologiques :

- ++ **Une protection contre les prédateurs ?** Comme chez les insectes notamment, on peut envisager que certaines couleurs vives pourraient servir d'avertissement aux prédateurs, signalant que le champignon est toxique ou désagréable au goût : on parle alors de mimétisme aposématique ou batésien (du nom du naturaliste britannique Henry Walter Bates qui a mis en évidence cette stratégie).
- ++ **Attraction d'organismes** : certains champignons aux couleurs vives peuvent attirer des « consommateurs » qui, par ingestion, aident indirectement à la dispersion des spores.
- ++ **Le camouflage** : les champignons de couleur terne ou brune peuvent se fondre dans leur environnement forestier, les rendant moins visibles.
- ++ **Niveau d'humidité et température** : cela peut affecter la pigmentation, ce qui explique que certains champignons changent de couleur selon les saisons ou les conditions climatiques.

3. Des réactions chimiques

Certains champignons changent de couleur lorsqu'ils sont manipulés ou endommagés en raison de réactions chimiques au niveau des cellules :

- ++ **Par oxydation** : lorsqu'ils sont coupés, manipulés, blessés ou écrasés, ils peuvent réagir avec l'oxygène de l'air, changeant ainsi de couleur (bleuissement, rougissement, jaunissement...)
- ++ **pH** : La couleur peut aussi varier en fonction du pH de l'environnement dans lequel le champignon pousse. Par exemple, un pH acide ou basique peut modifier la teinte des pigments naturels.



M. Lecomte - ©

Russula emetica var. *sylvestris* ↑
Russula nigricans ↓



Photo M. Lecomte - ©

Amanita rubescens ↑
Hygrocybe pseudoconica ↓



J. Pellicani - ©

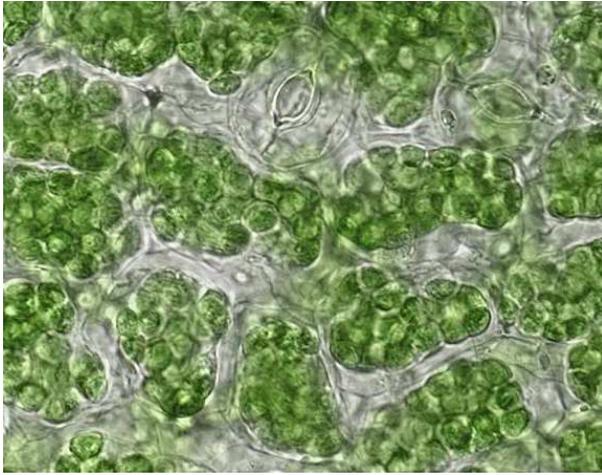


B. Clesse ©

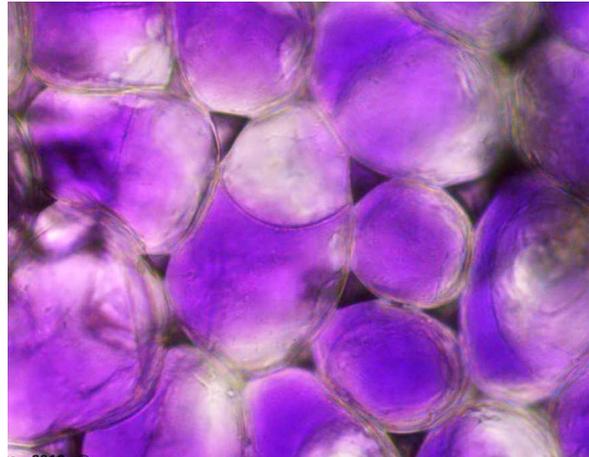
Quid des pigments ?

Un pigment est une substance colorée présente dans les cellules des êtres vivants auxquels elle confère leur couleur. Des exemples sont bien connus des naturalistes : la mélanine est le pigment brun de la peau ; la chlorophylle est le pigment vert des feuilles ; des pigments sont responsables de la couleur des fleurs et des fruits. Ils sont très présents notamment dans le monde végétal, car ce sont des métabolites secondaires¹ des plantes ; on les rencontre aussi chez les bactéries et les champignons.

La principale famille des pigments flavonoïdes² est celle des anthocyanes³.



← **Chloroplastes** (organites des cellules végétales contenant de la chlorophylle), dans les feuilles du bourgeon terminal d'une plante aquatique (*Elodea canadensis*).



Chromoplastes (organites des cellules végétales contenant des pigments caroténoïdes (jaunes, rouges ou orangés) ou des anthocyanes (couleur bleue, mauve, violette) : ici → chez un *Delphinium*.

Chez les champignons, les hyphes vivantes produisent toutes sortes de métabolites secondaires, certains essentiels au fonctionnement cellulaire, d'autres (déchets du métabolisme) devant être stockés ou évacués par les cellules. Nombre d'entre eux sont colorés et sont responsables des « couleurs » du champignon. Il s'avère primordial pour le déterminateur de savoir où sont localisés ces pigments très importants pour l'identification des espèces dans certains genres (notamment *Entoloma*, *Inocybe*, où cela permet de s'orienter vers les différentes sections) ou encore *Galerina*.

Certains pigments sont célèbres : ce sont les anthraquinones, qu'on rencontre chez les représentants du genre *Dermocybe*. Cependant, il faut être bien conscient que l'intérêt de ces pigments ne s'exprime que par rapport à des espèces proches des *Dermocybe*, qui ne possèdent pas ces pigments, et qu'on peut classer ou trier sur cette base. Il est certain qu'on trouve des anthraquinones dans beaucoup d'autres groupes (comme les *Tricholomes*, par exemple) qui n'ont pas le moindre caractère commun avec les *Dermocybe*. Les pigments de ces derniers sont remarquablement mis en évidence par la chromatographie en couche mince (voir notre article dans le bulletin 3/2010 de l'AMFB, pp. 22/35). Dans le genre

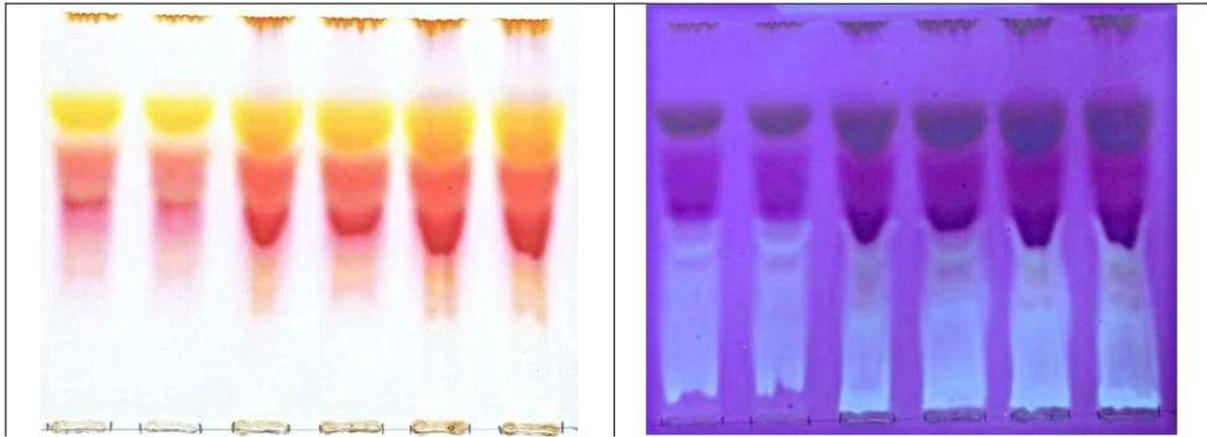
¹ Il faut savoir que les métabolites primaires participent directement à la vie d'un organisme en assurant sa croissance et son développement, et sont indispensables à la nutrition ; on compte parmi eux les acides aminés, les glucides, les lipides ou encore les acides nucléiques.

Les métabolites secondaires jouent un rôle plus ponctuel et ne participent pas directement au cycle vital, mais peuvent intervenir dans la vie relationnelle d'un organisme (défense ou attirance par exemple) ou dans sa coloration (partielle ou totale). Ils appartiennent à trois grands groupes : les phénols, les terpènes, les composés azotés.

² Les flavonoïdes sont des composés chimiques qui appartiennent aux polyphénols. Ces molécules sont principalement responsables de la couleur, notamment des fleurs et des fruits ; ils représentent une source importante d'agents antioxydants dans l'alimentation humaine. Leur structure de base est composée de deux cycles benzéniques de carbone (C₆) séparés par un pont en C₃. Les flavones et flavonols couvrent la gamme de crème à ivoire ; les chalcones et auronos vont de jaune à orange et les anthocyanes vont de rouge à bleu ou mauve-violet. Ils ont été découverts par hasard en 1936, par un médecin, Albert Szent-Györgyi, alors qu'il cherchait à traiter un patient souffrant de problèmes capillaires.

³ Ce sont des molécules absorbant certaines longueurs d'ondes lumineuses. Elles vont du rouge au bleu et sont situées dans les vacuoles des cellules. En modifiant le pH, on peut modifier la délocalisation électronique de la molécule, et donc la couleur. Voilà pourquoi une fleur vieillissante change de couleur : en effet son pH augmente. Une expérience : si vous versez du bicarbonate de soude sur du chou rouge, il va devenir bleu. Les fleurs des hortensias (*Hydrangea macrophylla*) seront roses ou bleues selon que l'arbuste sera planté en milieu calcaire ou acide (pour maintenir le bleu, il faut aussi des sels de fer et d'aluminium absorbables).

Cortinarius, section des *Incrustati*, les hyphes de l'épicutis sont souvent incrustées, de même que le revêtement cuticulaire a des hyphes à pigmentation incrustante.



Chromatogramme montrant les pigments de *Dermocybe sanguinea* (↖ éclairage normal ; ↑ en lumière ultra-violette)

> Extrait de KÜHNER & ROMAGNESI « Flore analytique des champignons supérieurs », pp. 176 & 177 >

2° **Topographie des pigments** : les substances qui communiquent leurs colorations aux carpophores peuvent se trouver à l'intérieur des hyphes ou fixées à leur membrane.

Les membranes pigmentées le sont parfois uniformément, mais très souvent les parties colorées forment des incrustations qui rendent leur paroi ± rugueuse ou aspéculée [Fig. 244* A]; dans les espèces où cette pigmentation est peu évidente sous le microscope, on trouvera l'incrustation particulièrement au voisinage des cloisons transversales. Les pigments intracellulaires se trouvent généralement à l'intérieur de vésicules spéciales, les vacuoles, où ils sont primitivement dissous, mais où ils peuvent précipiter en granulations ± grosses; dans la jeunesse, il y a souvent plusieurs vacuoles arrondies qui tranchent par leur coloration sur le fond incolore [Fig. 144* B]; il n'y a alors aucune difficulté à distinguer la pigmentation vacuolaire d'une pigmentation membranaire uniforme; mais il arrive qu'avec l'âge, parfois de très bonne heure, la cellule ne renferme plus qu'une grosse vacuole qui la remplit presque tout entière, au point que les dangers de confusion entre les deux types de pigmentation peuvent devenir très grands. On examinera attentivement le voisinage des cloisons transversales, où subsiste souvent une couche plus ou moins épaisse de protoplasme incolore, séparant le contour de la vacuole de la membrane; on pourra aussi provoquer la contraction de la vacuole en plaçant les coupes dans des solutions assez concentrées de sucre ou de sel de cuisine (plasmolyse); il est préférable de commencer par des concentrations assez faibles.

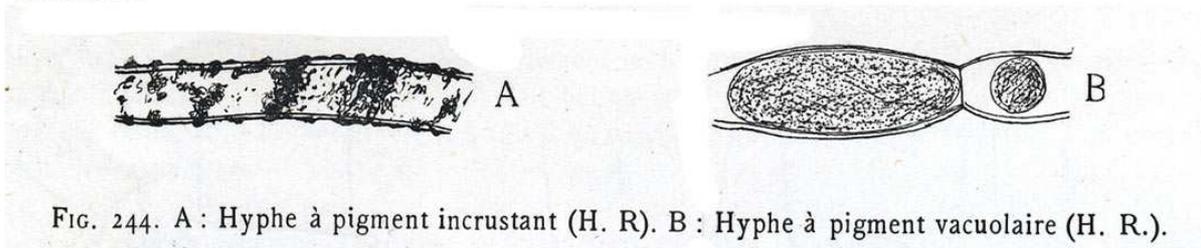
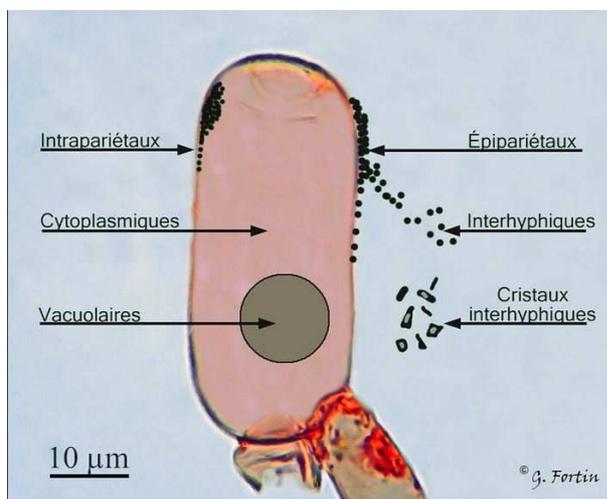


FIG. 244. A : Hyphe à pigment incrustant (H. R.). B : Hyphe à pigment vacuolaire (H. R.).



← **Dénomination des différents types de pigments selon leur positionnement** (croquis G. Fortin)

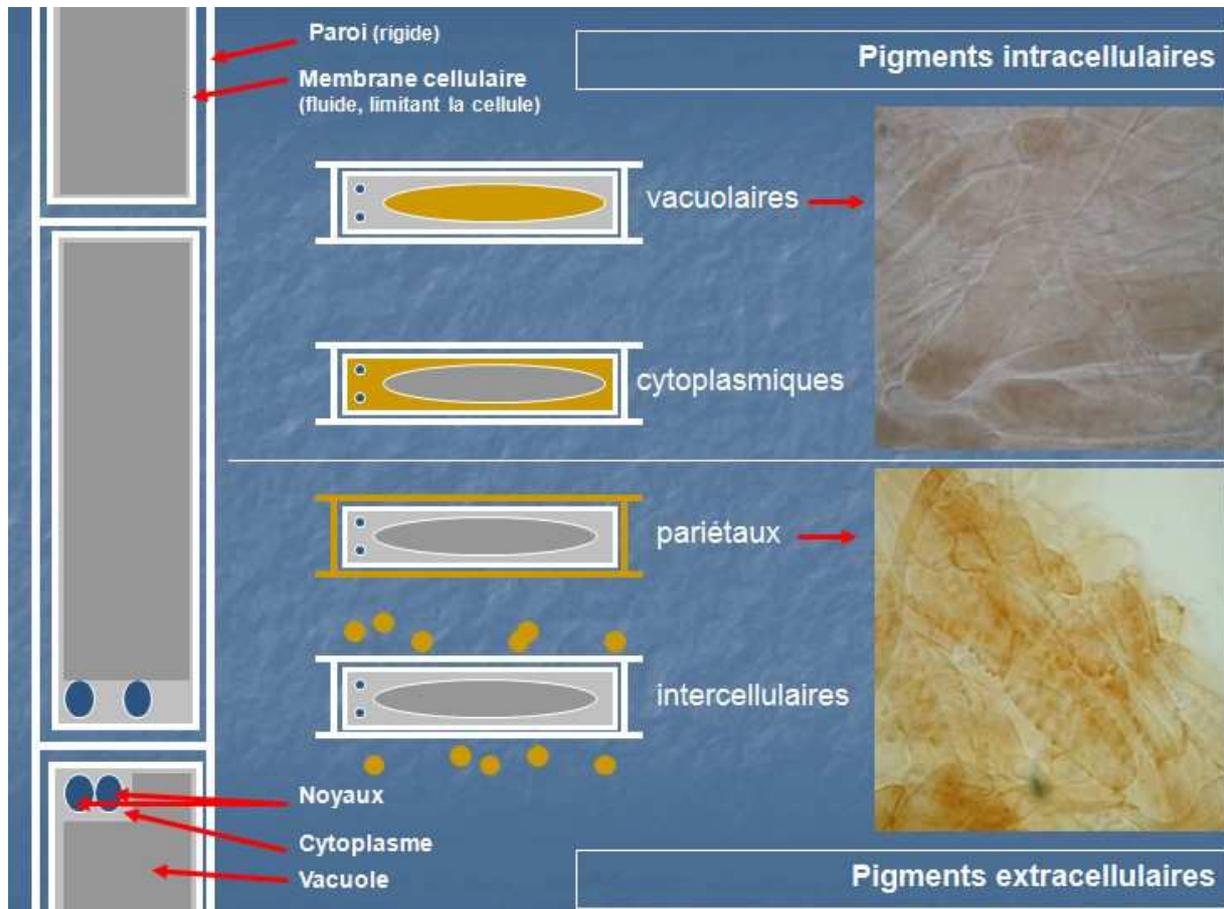
Dans le schéma de la page suivante (réalisé par Guillaume Eyssartier), nous reconnaissons les différents types de pigments que nous allons rencontrer lors d'observations microscopiques réalisées au niveau de la cuticule des champignons (une cellule hyphale est représentée par un rectangle).

On va rechercher les pigments dits **intracellulaires** (ils se rencontrent à l'intérieur de la cellule) : les pigments **vacuolaires** sont présents à l'intérieur des vacuoles ; les pigments **cytoplasmiques**

se trouvent au cœur du cytoplasme.

Les pigments **extracellulaires** (qui sont à l'extérieur de la cellule) sont de deux ordres : les pigments **pariétaux** qui se trouvent dans ou sur les parois (intra- ou épipariétaux) ; les pigments **intercellulaires** (ou **interhyphiques**) qui portent bien leur nom : ils se situent entre les hyphes.

Les mettre en évidence n'est pas très facile, car ils ne résistent pas longtemps aux traitements chimiques (colorations) et la plupart sont hydrosolubles. Dans certains cas de figure, on rencontrera également des cristaux interhyphiques, facilement reconnaissables, car ils présentent des formes géométriques et angulaires.



LES PIGMENTS INTRACELLULAIRES

LES PIGMENTS VACUOLAIRES : ils sont concentrés dans la vacuole, qui est uniformément colorée. Ils ne sont visibles que sur des cellules vivantes⁴ ; on les observe plus facilement en provoquant une plasmolyse⁵ des cellules (observation dans de l'eau fortement salée ou sucrée^{**}). Ces pigments sont fréquents dans les revêtements, et très rares dans la trame. Il nous semble quasi impossible de reconnaître un pigment vacuolaire sur exsiccatum, car la vacuole éclate à la mort du spécimen et le contenu se diffuse dans l'espace cellulaire. On peut juste qualifier ce qui est visible « d'intracellulaire » (cela inclut aussi bien les pigments cytoplasmiques que les nécropigments), et on peut être certain que ce ne sera pas observé de la même manière sur du matériel vivant. Sur des exsiccata, ce qu'on croit être des pigments vacuolaires sont souvent des nécropigments. Par contre, les pigments intrapariétaux et épipariétaux se conservent intacts, car la dessiccation n'a pas d'effet sur eux.

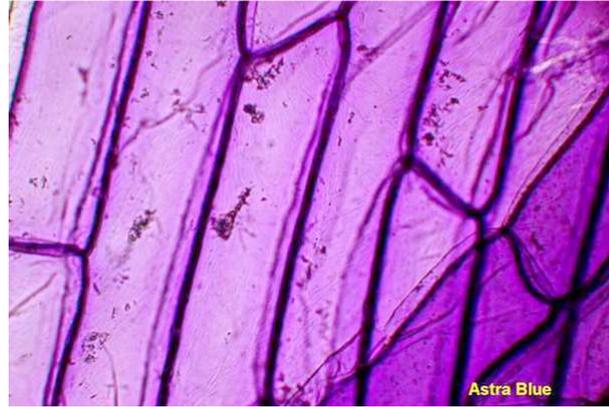
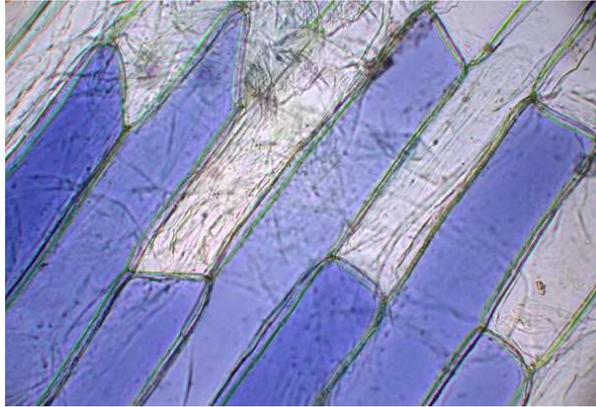
******Une solution de sucre ou de sel de cuisine à 20-30 % signifie qu'elle est composée de 20-30 g de sucre ou de sel et de 70-80 g (ou 70-80 cl) d'eau. Nous vous conseillons d'utiliser de l'eau distillée du

⁴ On pratique ce qu'on appelle une coloration vitale, c'est-à-dire une coloration qui n'altère pas les fonctions vitales de la cellule, du moins durant un certain temps. Le rouge neutre, l'éosine, le BdC en solution aqueuse à 1/1.000, voire 1/10.000 sont les colorants les plus utilisés. Les vacuoles sont capables d'absorber ce colorant, car leur membrane se comporte comme un tissu semi-perméable : l'eau colorée pénètre dans les vacuoles mais ne peut en ressortir, ce qui les met en évidence.

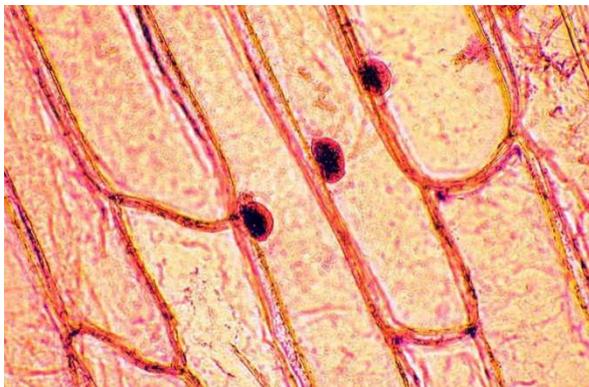
⁵ La plasmolyse provoque une contraction du cytoplasme vacuolaire par sortie d'eau vers l'extérieur (on parle alors d'exosmose), sous l'action d'une solution hypertonique (solution aqueuse à 20-30 % de saccharose ou de chlorure de sodium). Cette action est létale.

commerce. Personnellement, nous avons opté pour la solution saline car contrairement à une solution sucrée, elle n'est pas attaquée par les moisissures après un certain temps.

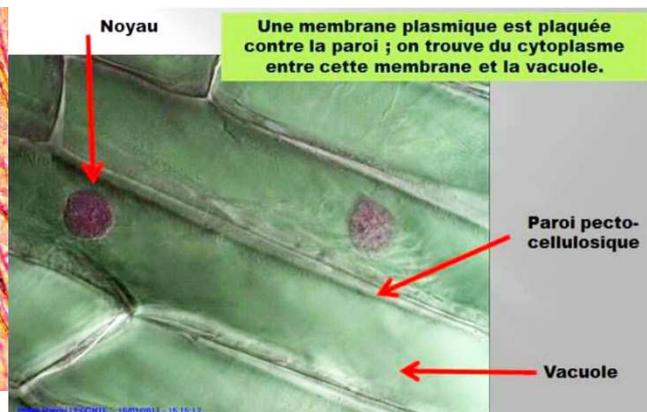
Une expérimentation préalable, à titre d'entraînement (réalisée sur des cellules d'oignon).



Coloration au bleu trypan ↑ et astra blue ↗ : le contenu de la cellule est bien coloré (ce sont des colorants cytoplasmiques et vacuolaires ; on ne voit pas les noyaux).



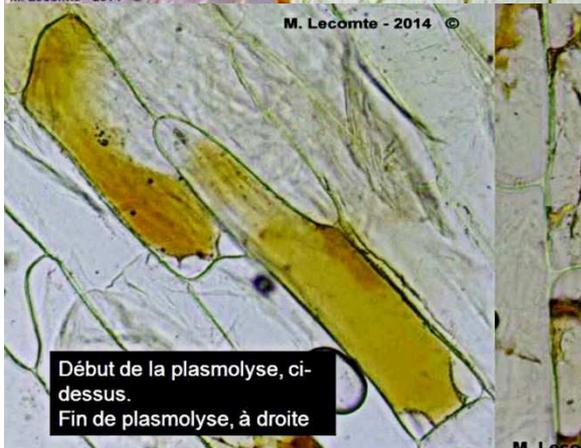
Coloration au rouge neutre ↑ après fixation au formol. Les noyaux sont bien visibles, avec pelote d'ADN en noir.



Coloration au vert de Mirande : toutes les vacuoles sont verdâtres.



M. Lecomte - 2014 © M. Lecomte - 2014 ©



Début de la plasmolyse, ci-dessus.
Fin de plasmolyse, à droite

M. Lecomte - 2014 ©

1. Cellule colorée au rouge neutre et observée en DIC.
2. La même cellule observée en lumière transmise.

1. Dans un verre de montre, déposer une goutte d'éosine ou de rouge neutre ; déposer ensuite 10 gouttes d'eau distillée et bien mélanger.
2. Préparer deux LPO et déposer une petite goutte d'eau au centre de chacune.
3. Eplucher un oignon et conserver la fine membrane transparente qui se trouve à l'intérieur de l'écaïlle, et prélever 2 petits morceaux d'environ 1/2 cm² chacun et en déposer un sur chaque lame.
4. Sur la 1^{ère} LPO, déposer une LCO, dissocier légèrement afin de ne pas faire éclater les cellules et

observer à 40x.

5. Sur la 2^{ème} LPO, couvrir avec une goutte de la solution colorante que vous avez préparée, poser une LCO, dissocier légèrement et observer à 40x.

6. Enlevez délicatement la LCO et déposer une grosse goutte de la solution hypertonique que vous avez préparée (sel ou sucre de cuisine).

7. Poser à nouveau la LCO et observer à 40x : vous allez constater que les vacuoles se sont contractées avec une coloration plus intense, générée par la concentration des pigments.

Expérimentation sur un champignon

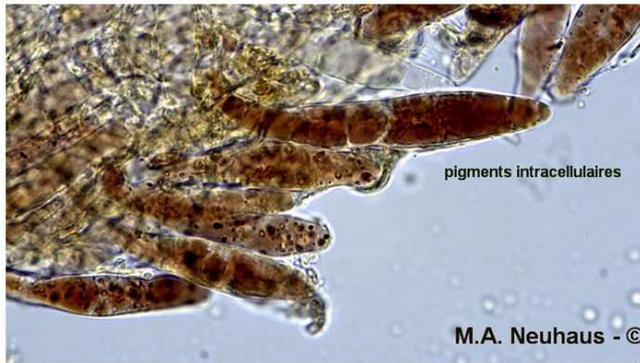
1. et 2. : voir le protocole précédent.

3. Prélever deux morceaux de cuticule sur un spécimen frais (on peut aussi expérimenter sur le revêtement du pied si ce dernier est coloré) et les étaler chacun délicatement sur les LPO en attente.

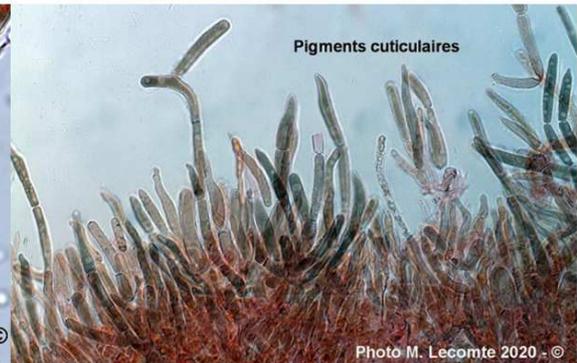
4. Sur la 1^{ère} LPO, déposer une LCO, dissocier légèrement afin de ne pas faire éclater les cellules hyphales, et observer à 40 ou 60x.

5. Sur la 2^{ème} LPO, couvrir avec une goutte de la solution colorante que vous avez préparée, poser une LCO, dissocier légèrement et observer à 40 ou 60x.

6. et 7. : voir le protocole précédent.



↑ *Mycena pelianthina*



Leccinum scabrum ↑

LES PIGMENTS CYTOPLASMIQUES : ils sont dissouts dans le cytoplasme, qui n'occupe qu'un faible volume autour de la vacuole, et qui apparaît légèrement plus coloré que celle-ci. La plasmolyse est indispensable pour le repérer (impossible à mettre en évidence sur du matériel sec).

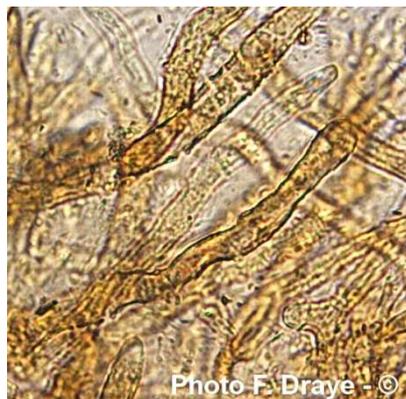


↑ *Entoloma polioopus*



Tricholomopsis rutilans ↑

LES PIGMENTS EXTRACELLULAIRES : les pigments sont situés à l'extérieur de la cellule.



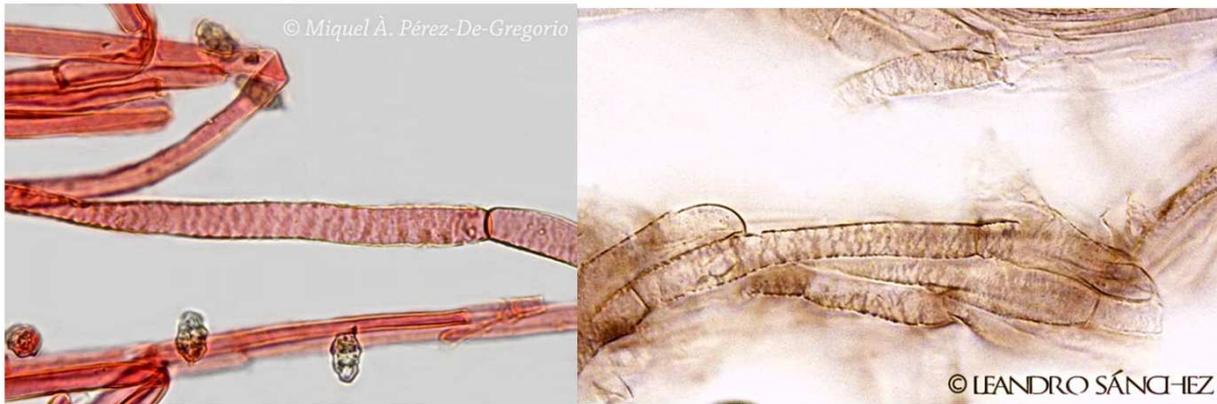
← *Boletus badius* *Inocybe praetervisa* ↓ (photo E. Maradan)



LE PIGMENT INTRAPARIÉTAL (ou pariétal lisse) ↑ : il est dissout dans la paroi, qui apparaît plus colorée, comme soulignée +/- fortement.

LE PIGMENT EPIPARIETAL (ou incrustant) : il s'accumule à la surface extérieure de la paroi et apparaît sous forme de manchon, de zébrures, de granules ou de dépôts amorphes. Il est souvent de même nature que le précédent, mais nettement plus abondant.

A) Le pigment zébrant



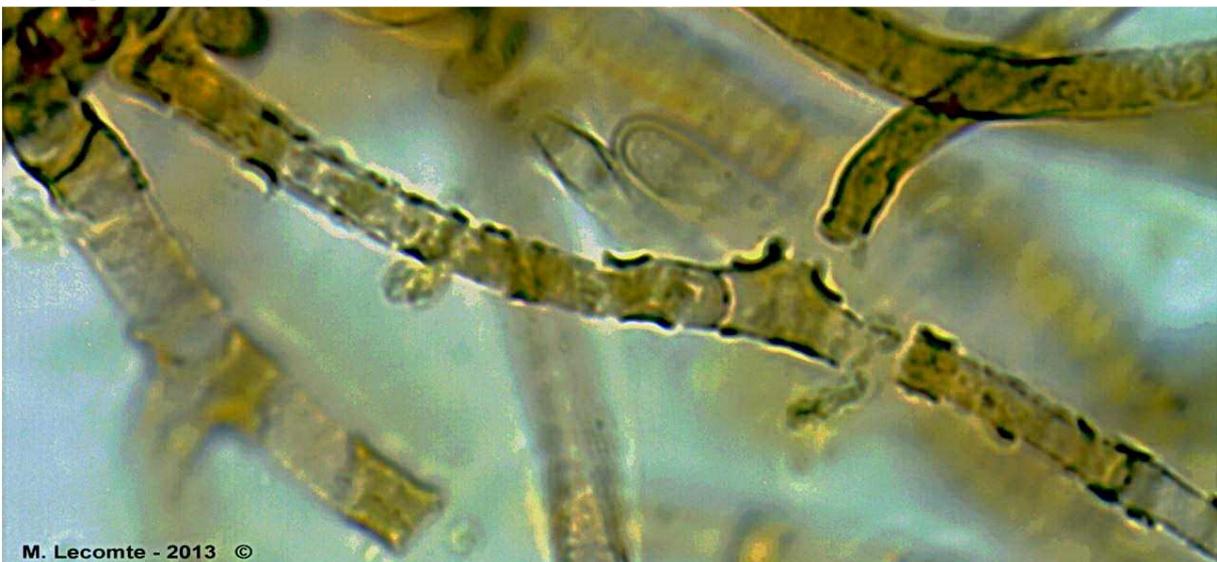
Pigment zébrant chez *Entoloma dysthales* et chez *E. undatum*



↑ Pigment zébrant chez *Leccinum scabrum* et chez *Gymnopilus penetrans* ↑

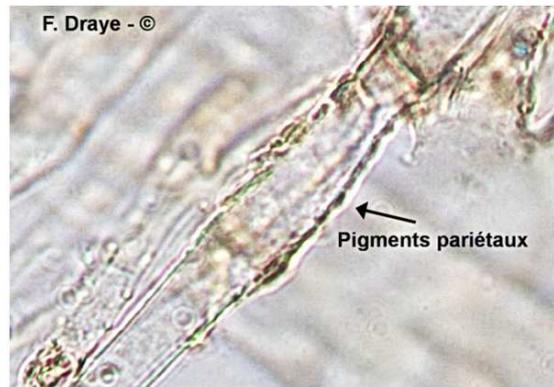
ATTENTION ! Il est impératif d'essayer de visualiser ces pigments zébrants en trois dimensions, car ils ne se trouvent pas à l'intérieur des hyphes comme on pourrait le croire en regardant les photos ; en réalité, ils forment une sorte de manchon qui entoure les cellules hyphales.

B) Les granules et dépôts amorphes



M. Lecomte - 2013 ©

Pigment épipariétal chez *Tricholoma ustale* (cuticule) combiné à du pigment intracellulaire (contenu verdâtre des cellules)



↑ Pigment épipariétal sous forme de dépôts chez ↑ *Hypholoma fasciculare* et chez *Tubaria hiemalis* ↑

C) Les dépôts amorphes acido-résistants

Nous envisageons ici le cas des incrustations acido-résistantes (I.A.R.) qu'on peut trouver sur les hyphes primordiales ou le chevelu de la cuticule de certaines russules. Leur mise en évidence nécessite l'application d'une technique très précise que nous ne mentionnerons pas ici, car elle est développée en long et en large dans « Microscopie et Champignons », pp.180-185.

Chez les Russules, il semblerait que les IAR ne soient pas responsables de la couleur ; les pigments seraient vacuolaires. Lorsque le pied est coloré, Il faudrait chercher les pigments dans les vacuoles des pilécystides. On peut se poser la question de savoir alors de quoi sont réellement constitués ces dépôts... Mais jusqu'à preuve du contraire, nous considérons que ce sont des pigments.



I.A.R. chez ↑ *Russula ochroleuca* et *Russula pseudointegra* ↑

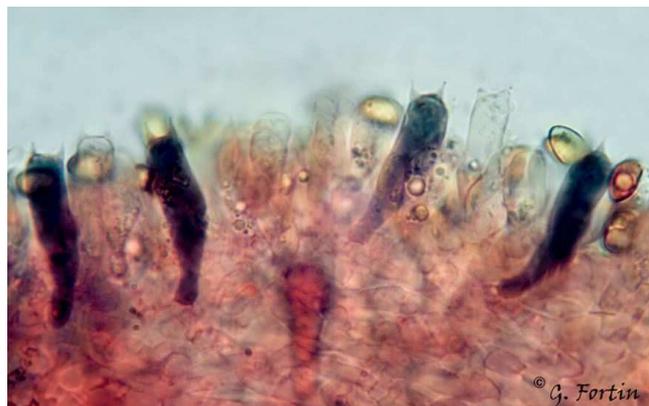
LE PIGMENT MATRICIEL (ou intercellulaire) : le pigment est dissout dans la matrice (espace séparant les hyphes) ; bien que parfois très coloré (comme le pigment rouge d'*Amanita muscaria* p.ex.), il est quasiment impossible à observer au microscope, en raison de sa grande solubilité dans les liquides de montage ; on peut juste constater, dans l'eau ou la glycérine, que le rouge est en dehors des cellules.

LE PIGMENT « MIXTE » : il s'agit d'une expression ambiguë, s'appliquant généralement à la présence sur une même hyphe, d'un pigment vacuolaire et d'un pigment incrustant (typique d'*Hydropus trichoderma*, mais rare en général).

LES NÉCRO-PIGMENTS

Cortinarius uliginosus →

« Ils apparaissent à la mort ou après la mort de la cellule. Ils sont en général d'une teinte qui va du brun au noir et peuvent se rencontrer partout dans le champignon, de l'intérieur des vacuoles jusqu'aux régions inter-hyphiques. Lorsqu'ils sont écrasés ou manipulés, les basidiomes de certaines espèces prennent une teinte rouge, jaune, brune, bleue, grise ou presque noire. D'autres espèces prennent une couleur orange, brune ou foncée avec l'âge. Ces



« décolorations » sont accompagnées naturellement d'une production de nécro-pigments dans les hyphes, les basides ou les cystides ». (Guy Fortin)

PRINCIPES DE BASE

- Chaque fois que c'est possible, travailler sur du matériel vivant.
- Utiliser une solution hypertonique de sel de cuisine ou de sucre, à 20 ou 30 %** ; les pièces montées dans ces milieux perdent l'eau de leurs vacuoles, et les pigments vacuolaires sont condensés dans un volume plus petit, ce qui intensifie la coloration des vacuoles et permet éventuellement de localiser un pigment (qui n'est pas toujours cytoplasmique, membranaire ou incrusté dans les parois).
- Les pigments sont reconnaissables à leur couleur déclinée en tonalités +/- jaunâtres à ocre.

** Dans la littérature, vous trouverez des concentrations très variables, de 6, 8, 12 % ; mais plus la concentration à faible, plus la plasmolyse prendra du temps. Chacun fera son choix !

DES CONSIDÉRATIONS PRATIQUES

Selon les spécialistes, les pigments incrustants sont résistants et s'observent très bien sur des exsiccata dans n'importe quel regonflant (ammoniacal, ramollisseurs de Cléménçon, de Carnot, de Dean). La pratique démontre également qu'ils semblent insolubles dans les bases fortes (soude et potasse à 5 ou 10 %). Les autres pigments ne sont pas visibles sur exsiccatum ; **on peut en déduire raisonnablement que, si ce n'est pas incrustant, c'est intracellulaire** ; « il s'avère impossible de différencier les pigments cytoplasmiques des vacuolaires sur du matériel sec » (raisonnement tenu par M. Noordeloos dans ses publications sur les Entolomes).



← Hyphes incrustées, dans la chair du pied de *Russula pseudointegra*

Généralement, on observe une franche similitude entre le pied et le chapeau d'une russule ; mais dans certains cas, on peut rencontrer des I.A.R. sur les hyphes du pied et pas sur celles de la cuticule.

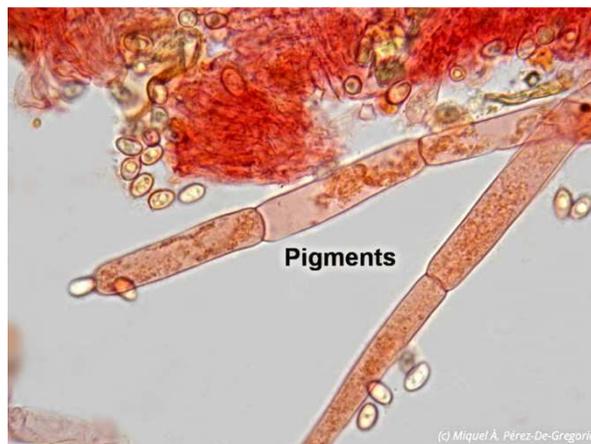
Toutes les espèces à pied brunissant ou noircissant présentent, avec l'âge soit une forte accumulation de pigments incrustants, soit (plus sou-

vent) des hyphes thromboplères ou des glioplères à contenu jaune, très abondantes dans la chair du pied.

Galerina marginata possède une trame lamellaire formée d'hyphes parallèles ou légèrement emmêlées en vieillissant, avec un pigment incrustant jaunâtre à jaune dans la potasse à 5 ou 10%.



↑ Dermatocystides à pigment zébrant chez *Russula violeipes*



Pigments intracellulaires chez *Leucoagaricus barsii* ↑

Nous adressons nos remerciements les plus vifs à Guillaume Eyssartier, et à Guy Fortin pour l'aide qu'ils nous ont apportée, ainsi qu'aux fidèles collaborateurs du site de l'AMFB qui partagent généreusement leurs photos.