

Le traitement des exsiccata

Par Marcel LECOMTE

Depuis très longtemps, les herbiers mycologiques sont constitués de spécimens séchés appelés exsiccata. Et cela permet, à l'heure actuelle, de consulter dans les herbiers de certains musées (à condition quand même d'avoir « pignon sur rue »), des exemplaires qui sont âgés de plusieurs dizaines d'années, voire même séculaires.

Quelles seront les qualités d'un bon exsiccatum :

- *La dessiccation doit être complète, sous peine de voir le spécimen attaqué par les moisissures (surtout s'il est conservé dans un sachet plastique hermétique)*
- *L'exemplaire doit être conservé dans un endroit sec, protégé chimiquement contre les insectes mycophages et destructeurs de collections (boules anti-mites ou paradichlorobenzène, ou thymol dans la boîte ou l'armoire)*
- *L'exemplaire doit être identifié par un numéro unique, et être accompagné de notes précises (nom, auteur, biotope, caractéristiques discriminatives) inscrites directement sur le contenant pour éviter les confusions lors de manipulations*
- *Il est intéressant, à notre avis, de tenir en parallèle un registre des exsiccata où on peut encore consigner des renseignements supplémentaires (c'est assez facile maintenant que nous disposons de l'outil informatique, surtout quand il s'agit d'effectuer des tris)*

Un exsiccatum, lorsqu'il est sorti de son enveloppe, est inutilisable comme tel : il est cassant et très dur et ne permet aucune manipulation microscopique. Il va donc falloir le ramollir afin de le rendre malléable.

Deux méthodes s'offrent à nous :

- **La méthode naturelle** qui est utilisée en entomologie : il suffit de placer le spécimen dans un espace restreint et fermé (boîte PVC) en compagnie de feuilles hachées de *Prunus laurocerasus* (arbuste d'ornementation utilisé pour former des haies et appelé laurier-cerise) ; l'humidité naturelle va ramollir le spécimen en 48 ou 72 heures, et l'acide cyanhydrique qui se trouve dans les feuilles joue un rôle aseptique contre les moisissures. Inconvénient : cela demande beaucoup de temps et échappe à toute spontanéité !
- **Le forçage chimique** qui va ramollir et « regonfler » le spécimen en quelques minutes. Voici, dans le tableau ci-dessous, quelques produits utilisables :

Nom	Composition	commentaires
Les alcalis à 5 % (soude et potasse)	5 cc de soude ou de potasse dans 100 cc d'eau ; peut s'utiliser à chaud ou à froid	Attention ! les alcalis (surtout à chaud) peuvent précipiter ou dissoudre certaines substances
ammoniaque à 50 % voire 10 %	50 cc d'ammoniaque avec 50 cc d'eau ; la solution à 10 % sera utilisée pour des exemplaires très fragiles	Assez agressif pour le nez ; ne pas chauffer
Lactophénol	22 g Phénol aqueux à 3 % + 40 g de glycérine + 20 g d'acide lactique + 9 g d'eau bidistillée	Chauffer à 60° sinon apparition de bulles dans la préparation
Chloral-lactophénol	20 g hydrate de chloral + 10 g phénol en cristaux + 40 g acide lactique	Supérieur au précédent et utilisable à froid
Mélange de Cendrier	100 cc éthanol à 95° + 10 cc eau + 50 cc acétate d'éthyle + 50 cc éther sulfurique + 0,5 cc acide acétique glacial	Superbe composition qui regonfle, ramollit et éclaircit
Lactochloral	50 % acide lactique + 50 % hydrate de chloral	Permet d'obtenir un gonflement maximum
Ramollisseur de Cléménçon	20 cc ammoniaque pure + 80 cc éthanol à 95° + 1 g glycérine	A utiliser uniquement avant du rouge Congo ammoniacal comme colorant
Liquide de Dean	90 cc eau bidistillée + 1 g Sodium Dodécyl Sulfate + 10 cc glycérine	Intéressant par sa facilité de préparation, surtout si on remplace le SDS par un liquide de vaisselle concentré
Ramollisseur GDS de Cléménçon	100 cc eau bidistillée + 50 d Diméthyl Sulfoxyde + 50 g glycérine + 2 g hydroxyde de sodium pur	A utiliser uniquement avant du rouge Congo SDS comme colorant
Rouge Congo ammoniacal	1 g rouge Congo + 100 cc d'ammoniaque pure	Convient pour ramollir et colorer directement des pièces microscopiques (fragment de lame par exemple)

Traitement spécial Insectes et autres Arthropodes, ainsi que les tissus kératineux		
Chloral-phénol de Murray	50 g phénol en cristaux + 50 g hydrate de chloral pur fondus à chaleur douce	Excellent ramollisseur et surtout éclaircissant de la chitine et de la kératine
Ce traitement est assez long, mais donne des résultats spectaculaires :		
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fixation des pièces ➤ Déshydratation ➤ Bain de 12 h dans le mélange suivant : (1/3 alcool absolu + 1/3 chloroforme + 1/3 acide acétique glacial) saturé de chlorure de mercure ➤ Laisser dans le chloral-phénol durant 7 jours ➤ Laver au xylol ➤ Inclure dans le baume du Canada 		

Lorsqu'il s'agit simplement de ramollir sans éclaircir, afin d'effectuer des observations dans l'eau, notre préférence va vers l'ammoniaque et le chloral lactophénol.

Pour éclaircir des sujets fortement lignifiés et colorés, nous utilisons du chloral lactophénol additionné de salicylate de sodium (ce mélange constitue l'éclaircissant le plus puissant que nous connaissions) → très intéressant pour travailler sur des Polypores.

Lorsque nous souhaitons appliquer une coloration pour faciliter l'observation (ce qui est très souvent le cas en mycologie), nous utilisons :

- **Le ramollisseur de Cléménçon** : il permet d'utiliser, après rinçage, du rouge Congo ammoniacal
- **Le ramollisseur GDS de Cléménçon** : il permet d'utiliser, après rinçage, du rouge Congo aqueux SDS (nous accordons notre nette préférence à ce dernier, car la coloration obtenue avec le RC SDS est de bien meilleure qualité que celle générée par le Congo ammoniacal ; c'est dû à la présence du SDS qui « dégraisse » tous les éléments, et facilite la pénétration du colorant).

Mode opératoire :

- Utiliser un flacon fermant hermétiquement pour limiter l'évaporation des solvants
- Y placer un volume de ramollisseur égal à 5, voire 10x le volume du sujet (si pièce de 1 cm³, verser 5 à 10 cc de ramollisseur)
- Utiliser un flacon par espèce, sous peine d'avoir des éléments polluants et notamment des spores
- Bien veiller à ne pas mélanger les exsiccata, à replacer le solde éventuel dans son contenant et à identifier le flacon de ramollissage
- Selon sa taille, la pièce va séjourner de 3 à 24 h dans le ramollisseur
- Sortir la pièce du liquide et la placer dans un verre à montrer
- Rincer abondamment à l'eau, à l'aide d'une pissette
- Eponger avec du papier essuie-tout
- Prélever le morceau à observer et le colorer selon les techniques habituelles (nous insistons sur l'importance du rinçage après coloration, afin d'obtenir des images bien contrastées)
- Il nous paraît déconseillé d'utiliser plusieurs fois le même liquide de ramollissage pour des problèmes de pollution du milieu

Deux cas particuliers :

1. Votre préparation est particulièrement encombrée par les spores qui couvrent les hyphes, basides et cystides
2. Vous souhaitez mettre en évidence le capillitium d'un Myxomycète et éliminer les spores qui masquent tout

→ faire passer par capillarité entre lame et lamelle couvre-objet (déposer la goutte d'un côté, pencher légèrement la préparation et placer un papier buvard ou un film absorbant à l'opposé) d'abord une goutte d'alcool à 70° et ensuite une goutte d'ammoniaque à 50 % : on voit apparaître des remous importants qui chassent les spores vers l'extérieur de la lame

Bibliographie :

MANUEL DE MICROSCOPIE, de Locquin & Langeron

PRECIS DE MICROSCOPIE, de M. Langeron

OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES MACROMYCETES, par Didier Baar