

Aglaospora profusa (Fr.) De Not. 1844, (*Massariaceae*)
Les ascocarpes sont regroupés en groupes de 3-5 dans l'écorce des branches mortes de *Robinia pseudoacacia* (observation dans la fuchsine acide lactique)

Bulletin de l'Association des Mycologues Francophones de Belgique

2011/04

Association des Mycologues Francophones de Belgique

(A.M.F.B. asbl)

Créée le 16 mai 2007
Siège social : Allée des Ecureuils, 6, à 6280 - LOVERVAL
Arrondissement judiciaire de Charleroi
Numéro d'entreprise : 892.031.004

<http://www.amfb.eu>

le site est géré par Emile VANDECASTEELE

Au sein du Conseil d'Administration, le bureau est composé de :

André FRAITURE, Président
Jardin Botanique National de Belgique, Domaine de Bouchout
B-1860 MEISE fraiture@br.fgov.be

Paul PIROT, vice-président
rue des Peupliers, 10, B-6840 NEUFCHATEAU paul.pirot.mycology@skynet.be

Alfred LOSS, secrétaire
Allée des Ecureuils, 6 - B-6280 LOVERVAL alfred.loss@skynet.be

Marcel LECOMTE, trésorier
Rue Basse Chaussée, 117 B-5022 COGNELEE/NAMUR mlecomte@skynet.be

Les autres membres du conseil d'administration sont :

Jacqueline BERNAUD
Françoise DRAYE
Jean-Pierre LEGROS
Camille MERTENS
Joseph PELLICANI
Jean-Marie PIRLOT
Claude QUINTIN
David VALLEE

La cotisation pour 2011 est de 7,00 € (voir page suivante)
Nous publions un bulletin annuel.

Table des Matières

Pages

- 2 : *La truffe : un champignon cannibale ?*, J. DEMERSON
- 5 : *Coprinopsis spelaiophila* , M. LECOMTE & J. PELLICANI
- 8 : *Photos d'une belle trouvaille : Amanita muscaria f. europaea* Neville & Poumarat, J. PELLICANI
- 9 : *Sacrées morilles*, J. GUIMBERTEAU & M. LECOMTE
- 12 : *Utilisation de la résine Epoxy, pour l'inclusion de champignons destinés à la microtomie*, M. LECOMTE & A. MARCHAL
- 23 : *Les tiques*, P. LEROY
- 28 : *Tuber melanosporum, naissance unique ou naissances multiples ?*, J. DEMERSON
- 33 : *Cortinarius salor*, planche réalisée par JACQUES GANE
- 34 : *Lactarius fraxineus, une espèce moins rare qu'on ne le suppose !*, M. LECOMTE & J.P. LEGROS
- 40 : *Lactarius tristis, mythe ou réalité ?*, M. LECOMTE, avec la participation de J.L. CHEYPE
- 42 : *Cortinarius obsoletus*, planche réalisée par JACQUES GANE
- 43 : *Etalons chimiques proposés par MARCEL LOCQUIN pour les odeurs fongiques*
- 44 : *Cortinarius cephalixus var. cephalixus*, planche réalisée par JACQUES GANE
- 45 : *Une trouvaille intéressante : Pholiotina aeruginosa*, F. DRAYE
- 46 : *Quelques réactifs en mycologie ; partie 1 : introduction & généralités*, D. BAAR
- 48 : *Quelques réactifs en mycologie ; partie 2 : réactifs macrochimiques et réactifs mixtes*, D. BAAR
- 57 : *Quelques réactifs en mycologie ; partie 3 : réactifs pour la microscopie*, D. BAAR
- 65 : *Les Myxomycètes*, J. FINGER & M. LECOMTE
- 67 : *Trichia varia*, J. FINGER

CORRIGENDUM

Après avoir pris connaissance de notre publication A.M.F.B. annonçant la prochaine édition des J.E.C., Jean-Pierre Legros nous fait part de son étonnement quant à avoir été choisi comme conseiller technique.

Bien qu'il se soit déclaré flatté par ce choix, il tient à décliner cet honneur, estimant que ses modestes connaissances en cortinariologie ne lui permettent pas d'assumer cette mission. Nous prenons acte de la décision de notre ami et le retirant donc de la liste des conseillers scientifiques.

La truffe, un champignon cannibale ?

Jean Demerson¹, Uzès, janvier 2010

Comment se nourrit la truffe ?

C'est une question qui se pose depuis longtemps aux scientifiques mais aussi aux trufficulteurs, car s'ils le savaient, ils pourraient effectuer dans leurs plantations certains apports complémentaires pour améliorer la nutrition du champignon et ainsi accroître la récolte. Depuis les travaux du Pr. Frank à Berlin dans les années 1880, on sait que les différentes espèces de truffes sont des champignons symbiotiques qui ne peuvent vivre et fructifier qu'en étroite liaison avec certains arbres. Le champignon reçoit de son hôte les substances organiques indispensables à son développement que, faute de chlorophylle, il est incapable de fabriquer. En contrepartie, il fournit à l'arbre de l'eau et des sels minéraux dissous, que son réseau mycélien collecte très efficacement.

La nutrition des ascocarpes

Cette harmonieuse symbiose entre l'arbre et le champignon a toutefois laissé apparaître une anomalie au niveau des fructifications. On pensait qu'il existait des filaments reliant la truffe au système mycélien ou mycorhizien qui lui avait donné naissance, mais malgré de nombreuses tentatives, aucun observateur n'a réussi à détecter la moindre connexion entre l'ascocarpe et le reste du champignon. Il est vrai que le repérage *in situ* de ces éléments microscopiques est extrêmement difficile. Faut de les avoir aperçus, on a conclu que la jeune fructification devenait très vite indépendante du système arbre-champignon et donc qu'elle pourvoyait seule à ses besoins alimentaires.

La présence de houppes mycéliennes à la surface du périidium de la « truffette » et l'excrétion d'enzymes capables de décomposer en fractions solubles et assimilables les grosses molécules organiques insolubles se trouvant dans le sol, comme la cellulose ou les protéines, ont confirmé que le jeune ascocarpe pouvait se nourrir en saprophyte comme l'a suggéré D. BARRY (1992) dans sa thèse de 1992.



Une belle récolte de *Tuber melanosporum*
(photo Miquel A. Perez-De-Gregorio)

Une autre difficulté est alors apparue. Comment la jeune truffe, dont les houppes mycéliennes ne font que quelques millimètres, peut-elle explorer un assez grand volume de sol pour y puiser les nutriments en quantité suffisante, pour lui permettre d'atteindre un poids dépassant souvent une centaine de grammes ?

Pour G. CALLOT (1999), l'intense activité de la mésofaune tout autour de l'ascocarpe provoque un apport renouvelé de nutriments en particulier par les boulettes fécales laissées par ces nombreuses petites bêtes.

Mais l'hypothèse d'une rapide indépendance de l'ascocarpe, si elle est bien acceptée dans la profession, ne fait pas l'unanimité chez les chercheurs. En Australie où l'on s'efforce depuis quelques années d'implanter la truffe, B. BRADSHAW (2005), de la Murdoch University, a constaté une analogie dans l'évolution de la composition des sucres contenus dans la sève et dans l'ascocarpe. Il en conclut que la nutrition carbonée de la truffe se fait à partir des produits de la photosynthèse.

Plus récemment une équipe de Nancy (B. ZELLER et al., 2008), en comparant les isotopes naturels du carbone et de l'azote contenus respectivement dans les matières organiques du sol et dans les ascocarpes, a montré que ces derniers ne s'alimentaient pas de façon saprophytique, ce qui met en doute leur prétendue indépendance vis-à-vis de leur arbre-hôte.

¹ Plan Saint Etienne, 1 – F-30700 UZES – jean.demerson@wanadoo.fr

Une découverte surprenante

Il y a quelques années, une équipe de chercheurs italiens des universités d'Urbino et de Bologne (L. BERTINI et al., 2005) ont remarqué que, dans une truffière bonne productrice de *Tuber magnatum*, contrairement à toute attente, le pourcentage de mycorhizes de cette espèce était extrêmement faible en regard de celui d'autres espèces.

A peu près à la même époque, des chercheurs espagnols (L. MARTINEZ et al., 2006) puis (L. SUZ et al., 2008) constataient que sous des arbres producteurs de *Tuber melanosporum*, la quantité de mycélium déterminée par analyse de l'ADN dans le sol, était très inférieure à celle trouvée sous les arbres non producteurs. Ils ont alors émis l'hypothèse d'un passage de la biomasse fongique du thalle végétatif vers les ascocarpes.



Les « brûlés » caractéristiques de la présence de *Tuber* sp. La présence d'un brûlé est un bon signe, mais n'implique pas obligatoirement une prochaine récolte d'ascocarpes. Il faudra souvent attendre encore quelques années pour récolter.

On sait en effet, depuis longtemps (LANIER et al., 1978), que certains champignons utilisent les parties anciennes de leur thalle, devenues inutiles, pour former de nouveaux hyphes mycéliens. Les hyphes sénescents sont autolysés, c'est-à-dire décomposés par des enzymes en petites molécules solubles qui sont alors transportées à travers le réseau mycélien jusqu'à l'apex des jeunes filaments en croissance. Rien ne se perd chez les Mycètes !

Il est donc logique de penser que, pour former ses organes de reproduction, le champignon recycle les matériaux qu'il a accumulés sous forme de mycélium et de mycorhizes qui n'ont plus alors d'utilité. Tel le pélican de Musset qui se perçait le flanc pour nourrir ses enfants, le champignon cannibalise son propre thalle pour élaborer ses organes reproducteurs.

Lors de sa naissance, le primordium serait alimenté par symbiose puis la truffette grossirait peu à peu en saprophyte jusqu'à sa phase de croissance exponentielle, observée par MONTANT et al. (1983), qui se ferait en mobilisant les composants antérieurement élaborés.

Ce recyclage des hyphes sénescents n'est certainement pas spécifique au genre *Tuber*. Beaucoup d'autres champignons, tant Ascomycètes que Basidiomycètes, doivent avoir le même comportement pour former très rapidement leurs fructifications.

Le rôle des pluies estivales

Toutes ces opérations : décomposition enzymatique des fractions sénescents, transfert des molécules solubles, des noyaux et autres particules vitales vers le mycélium actif ou vers les ascocarpes en croissance, ne peuvent s'exécuter qu'en phase liquide. C'est pourquoi, en cas de sécheresse estivale prolongée, les différentes parties du champignon se déshydratent partiellement, ce qui empêche les réactions d'autolyse et la migration des nutriments solubles. Les truffes, si elles survivent, restent petites et boisées.

Marque en étoile montrant le soulèvement de la terre sous l'effet du grossissement rapide d'un ascocarpe situé à quelques cm sous la surface du sol. Cela se produit en août, septembre, quelques jours après une bonne pluie.



Par contre, de bonnes averses en fin d'été, en humidifiant l'environnement du champignon, vont lui permettre de recycler son mycélium obsolète dans ses fructifications. Quelques jours après, dans les prés et les forêts, surgiront les jeunes carpophores et dans les truffières, apparaîtront les marques, ces fentes superficielles qui dénotent le grossissement brutal des truffes situées à faible profondeur.

Contrairement à une croyance populaire, la pluie ne fait pas naître les champignons, mais

elle permet leur très rapide grossissement à partir des matériaux semi-élaborés prélevés dans les parties de leur réseau mycélien devenues inutiles.

Les Mycètes sont donc depuis longtemps des champions du recyclage !

Bibliographie

- BARRY D.**, 1992 – Croissance et fonctionnement d'un ascocarpe de *T. melanosporum* et *T. aestivum*. Thèse – ENSAM – INRA. Montpellier
- BERTINI L., ROSSI I., ZAMBONELLI A., AMICUCCI A., SACCHI A., CECCHINI M., GREGORI G. & STOCCHI V.**, 2006 – Molecular Identification of *Tuber magnatum* ectomycorrhizae in the field. *Microbiological Research* 61 (1) : 59-64
- BRADSHAW B.PH.**, 2005 – Physiological aspect of *Corylus avellana* associated with *Tuber melanosporum*. Murdoch University Digital Theses Program, Australia
- CALLOT G.**, 1999 – La truffe, la terre, la vie. Ed. INRA
- LANIER, JOLY, BONDOUX & BELLEMÈRE**, 1978 – Mycologie & Pathologie Forestières. Ed. Masson, Paris
- MARTINEZ L., MARTIN M.P. & COLINAS C.**, 2006 – *T. melanosporum* mycelium in soil under trees with different levels of productivity. LTER All Scientists Meeting
- MONTANT CH., KULIFAJ M. & GLEIZE R.**, 1983 – Pourquoi étudier les fructifications de *T. melanosporum*. *Bull. F.N.P.T.* 6 (11)
- SUZ L., MARTIN M., OLIACH D., FISHER CH. & COLINAS C.**, 2008 – Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum* - *Quercus ilex* orchards. *FEMS Microbiol. Lett.* 285 : 72/78
- ZELLER B., BRÉCHET C., MAURICE J.-P. & LE TACON F.**, 2008 – Stratégie saprophyte ou symbiotique durant le développement d'ascocarpes de truffes. *Ann. For. Sci.* 65

Coprinopsis spelaiophila ?

Joseph Pellicani² & Marcel Lecomte³

Coprinopsis spelaiophila (Bas & Uljé) Redhead, Vilgalys & Moncalvo
= *Coprinus spelaiophilus* Bas & Uljé
= *Coprinus extingtorius* (Bull.) Fr. ss. Romagnesi et auct. pl.

Habitat et distribution



Selon la littérature, cette espèce pousse en solitaire ou fasciculée, à l'intérieur des vieux arbres malades, à feuilles caduques. On trouve quelques stations aux Pays-Bas.... Enregistrée en Angleterre, en France, en Corse, en Allemagne, en Espagne, en Italie, et en Turquie. Elle est considérée comme très rare.

J. Pellicani l'a récoltée à Angleur (B-4031) près de Liège sur une souche de feuillus, creuse et pourrissante.

Cette espèce peut être très précoce : elle a été trouvée en mars à Londres⁴, et également en avril, en Tchéquie.

Description

Chapeau : 2,2 et 2,5 cm de diamètre. Très chevelu et un peu brunâtre au sommet, avec un léger reflet rosé. Une légère striation est visible par transparence. Chair blanchâtre à la coupe. Stipes clavés, 2 x 0,8 x 0,4 cm et 2,4 x 0,7 x 0,4 cm ; couverts d'une légère pilosité. Pas d'odeur particulière ou remarquable ; pas de test réalisé au niveau du goût.



Récolte réalisée à Malans (Doubs - France), le 26/11/2009 – photo de Jean-Marc Moingeon

² Joseph PELLICANI, 8, rue Hotteux, B-4630 SOUMAGNE (AYE) - joseph.pellicani@euphony.net

³ Coordonnées en page de couverture

⁴ Récolte réalisée le 04 mars 2010, à Abney Park Cemetery, Stoke Newington, London North

Microscopie (voir photos en page 7)

Spore : 7,6-7,9 x 5,9-6,3 µm. Légèrement fusiforme, faisant même penser à une spore mitriforme ; à revêtement bien lisse, avec un large pore germinatif.

Pas de différenciation marquante entre cheilocystides (55,5-68,7x 34,5-43,2 µm) et pleurocystides (sensiblement les mêmes dimensions) ; elles sont largement clavées, quasi en forme de ballon.

Cuticule : constituée d'éléments allongés (hyphes filamenteuses) de 81-88 x 11-21 µm.

Nous n'avons pas observé de boucles.

Commentaires

Cette espèce a fait l'objet d'une étude sérieuse lors d'une réunion du Cercle de Mycologie de Namur, et après maintes hésitations, ce nom a été retenu en raison de son biotope notamment.

Nous avons le sentiment d'avoir étudié des spécimens encore assez juvéniles ce qui explique que certaines mesures ne correspondent pas avec celles annoncées notamment par Pierre Roux.

Les récentes études moléculaires et phylogénétiques ont provoqué l'éclatement de l'ancien genre *Coprinus* (seules 3 espèces seraient encore retenues dans ce genre) ; toutes les autres espèces de l'ancien genre *Coprinus* et celles des *Psathyrella* et *Lacrymaria* ont été placées dans une nouvelle famille, les *Psathyrellaceae*. Toutes les espèces « sorties » des *Coprinus* ont été scindées en trois genres = *Coprinellus*, *Coprinopsis* et *Parasola*.

Ces études sont assez déstabilisantes pour nous, puisque *Coprinus comatus*, qui représentait l'espèce type des *Coprinaceae*, est placée maintenant dans les *Agaricaceae* ; cela a fait l'objet de nombre de controverses. Il faut également se familiariser avec *Coprinopsis atramentaria*, *Coprinopsis lagopus*, etc.

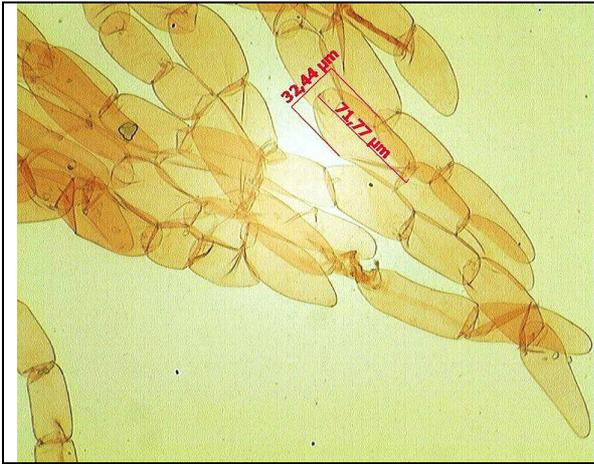


Récolte réalisée à Malans (Doubs - France), le 26/11/2009 – photo de Gilbert Moyne

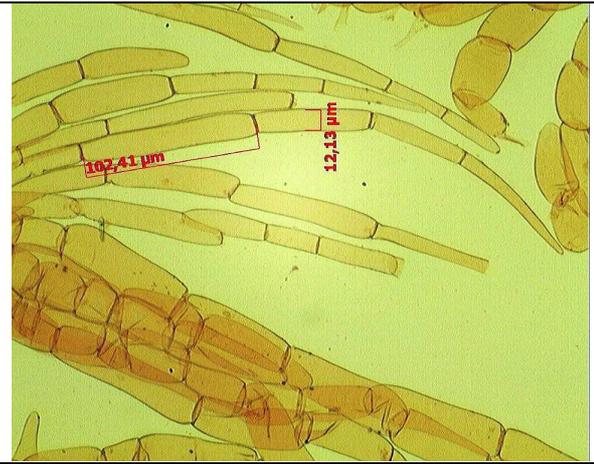
Bibliographie

Roux P., 2006 – Mille et un champignons. Édité à compte d'auteur : 1062

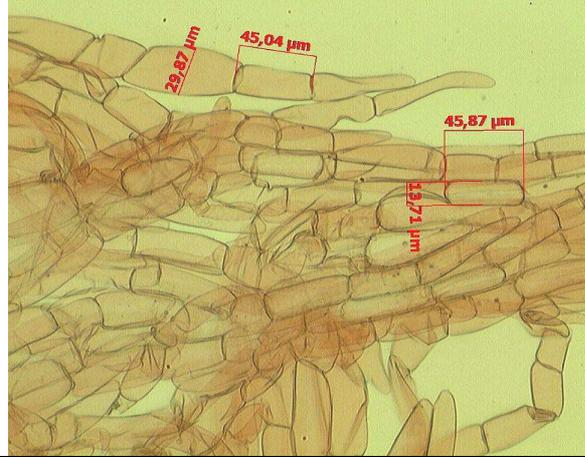
Photos présentant la microscopie de *Coprinopsis spelaiophila*, réalisées par J. Pellicani.



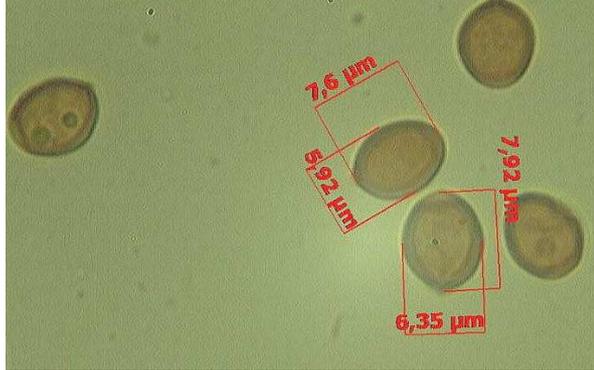
Hyphes filamenteuses au sommet du chapeau



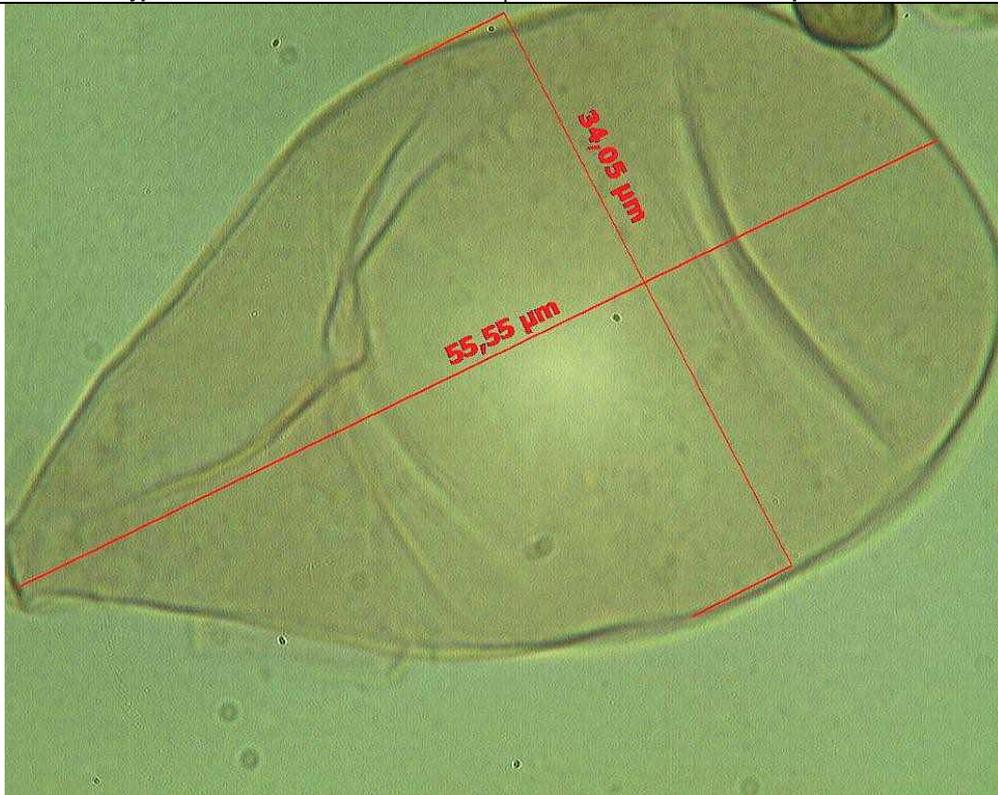
Poils au niveau de la cuticule



Hyphes du voile



Spores



cystide

Photos d'une belle trouvaille

Joseph Pellicani nous a fait parvenir ces deux photos d'une très belle forme d'*Amanita muscaria*, récoltée en pessière, dans la région de Liège. Elle est caractérisée par la remarquable couleur jaune de la bordure annulaire, qui colore également les flocons (vestiges du voile général) ornant la cuticule.

Amanita muscaria [var. *formosa*] f. *europaea* Neville & Poumarat



Bibliographie

NEVILLE P. & POUMARAT S., 2004 – AMANITAE : Amanita, Limacella & Torrendia. Fungi Europaei n°9 : 317-324

Sacrées morilles !

Marcel Lecomte & Jacques Guimberteau ⁵



Photo Jean-Jacques Wuilbaut

Au fil du temps et de nos observations, nous avons eu l'occasion de rencontrer des morilles dans des endroits relativement insolites :

++ 1981 : Mozet (B-5340), 32 exemplaires le long d'une route très fréquentée, dans la terre nue entre le caniveau et le talus (pas une herbe, et pas d'arbres).

++ 1982 : Faulx-les-Tombes (B-5340), 6 exemplaires sur sol nu, dés herbé, à quelques mètres d'un épicéa.

++ 1993 : Wépion (B-5100), 2 exemplaires dans une étroite bande de terre dés herbée, entre le bord de la route et un mur, abondamment « arrosée » par les chiens du quartier.

++ 2005 : Marchin (B-4570), 8 exemplaires dans un parterre couvert de mulch de pin.

++ nous tenons d'une quinzaine de personnes qu'il n'est pas rare d'en rencontrer dans des allées de jardin ou des allées de gravier qui ont été traitées à l'herbicide total l'année précédente.

Faut-il y voir une relation de cause à effet et considérer que le produit chimique peut constituer (parmi d'autres sans aucun

doute) un élément déclencheur de germination et de fructification d'un mycélium ?

Nous osons imaginer que, dans telles circonstances, la morille n'est pas spécialement comestible !

Voici des commentaires reçus de divers mycologues de notre connaissance :

Patrice Tanchaud⁶ : mon allée est effectivement dés herbée ; ainsi, je ne fais qu'un passage léger à l'herbicide, mais passage quand même, et j'y trouve depuis 3 ans, une morille à peu près au même endroit sous un pêcher, alors que je n'en vois pas ailleurs.

Les années précédentes, les rares morilles que j'ai trouvées et d'ailleurs transmises sur le forum, ont été observées sous pommiers ou poiriers appartenant à des professionnels du fruit, dont le dessous des arbres est dés herbé.

Jean-Marc Moingeon⁷ : Oui effectivement, j'ai déjà trouvé des morilles



⁵ Jacques GUIMBERTEAU, Ingénieur d'études INRA - Centre de Recherche Bordeaux, UPR 1264 – MYCSA, Mycologie et Sécurité des Aliments, 71, Avenue Edouard Bourleaux, BP 81 F- 33883 Villenave d'Ornon CEDEX guibert@bordeaux.inra.fr

⁶ patrice.tanchaud@gmail.com

⁷ jmmoingeon@gmail.com

dans les conditions mentionnées par Marcel, dans son message (« Morilles dans allée désherbée chimiquement »).

Georges Fannechère⁸ : Vive les morilles Monsanto ! ... j'ajouterais que René Chalange en trouve tous les ans dans les croutes de pin traitées qui sont dans les parterres de son supermarché... peut-être mêmes causes et mêmes effets.

Jacques Guimberteau : La question des herbicides est certes intéressante, mais ne peut, à elle seule, résoudre le mystère de la fructification des morilles "opportunistes".

Le sujet de la fructification des morilles et des mystères qui l'entourent, sont bien évidemment intéressants à aborder et ça fait des années que cela nous préoccupe à l'INRA, sans que l'on ait les moyens de développer de telles recherches.



Le problème n'est pas simple et je dirai que le cycle biologique, voire de fructification, des morilles est multifactoriel.

Je viens d'en avoir une preuve idéale encore hier dans nos vergers fruitiers expérimentaux INRA où on a depuis une semaine, une vague extraordinaire de fructification de *Morchella conica*, suite à un épandage massif sur les rangs de pêchers, d'écorces de pin maritime, faisant office de mulching et de "désherbage bio" (voir les deux photos ci-dessus).

En effet, dans tous ces cas de fructification spontanée de morilles, on constate la nécessité en dénominateurs communs :

1) D'une source massive de sucres ou d'hydrates de carbone (glucides +/- complexes comme l'inuline). Ici, dans ce cas du verger de pêchers comme d'ailleurs dans certains vignobles, l'abandon important au sol de fruits abîmés ou de baies momifiées constitue un apport important.

2) D'un "vide sanitaire ou microbiologique" créé par un effet "lance flamme" comme par exemple le feu, les herbicides, l'apport de matériaux étrangers à l'environnement (comme le ciment, les écorces de pin bourrées de tannins et terpènes divers, qui jouent un grand rôle d'élimination ou de modification de la microflore du sol, y compris fongique -suppression de la concurrence fongique- ou de la concurrence herbacée), etc.

⁸ gfannechere@gmail.com

3) D'une interface trophique bien connue des "champignonnistes ou cultivateurs de champignons" en provoquant un fort contraste trophique : milieu riche/ milieu pauvre (ex ici : une terre battante et lourde d'alluvions très fertile de Garonne et apport en surface d'écorces de pin très acides et très pauvres (oligotrophiques).

4) De la présence d'une interface contrastée au niveau pH : présence de pierres ou matériaux calcaires.

Sachant aussi que la croissance mycélienne *in vitro* des morilles est très rapide et dépasse de beaucoup la vitesse de nos champignons dits supérieurs !!!

Après avoir dit ça et résumé en partie les grandes lignes de l'écosystème « morille », il reste à décrypter :

- Le rôle important de l'eau en quantité massive et du rôle de sa percolation douce et lente dans les premiers horizons du sol ! (les grandes années neigeuses sont selon moi des bonnes années à morilles !) Je pense que notre ami Philippe Clowez ne me contredira pas !
- Le rôle et la formation du stade sclérote.
- La distribution de l'inoculum qui semble être universellement présent partout (spores).
- Le pourquoi de sa faible concurrence, paradoxalement à une vitesse de croissance végétative mycélienne sans égale !....

Alain Gérard : La morille, comme d'autres champignons, fonctionne comme une éponge et concentre toutes les "saloperies" du sol et devient de ce fait non comestible. Le *Druide de Brocéliande*⁹ n'a pas beaucoup l'occasion de manger des morilles de son pays, car à part sur les dunes, il n'y en a pas. Par contre tous les ans, en Bretagne, il y a des apparitions sporadiques dans des endroits plus ou moins insolites. Les cas les plus fréquents ont lieu dans les chantiers de construction des maisons en particulier, sur les sacs de plâtre en papier abandonnés et mouillés par les pluies. Il y en a également dans les vergers, sous les pommiers dont le tronc a été chaulé, où il a été utilisé du maërl comme engrais (apport de calcium et alcalinisation).

Guy Fourré avait fait un papier sur les morilles et les désherbants, et il semble que ce ne sont que les endroits désherbés avec un certain type de désherbant qui sont propices. Avec d'autres désherbants à base d'autres molécules, cela ne "marcherait" pas. Le manque de concurrence évoqué ne peut pas être la cause dans ce cas. → Roundup Paraquat, Diquat, 2,4 5 T/ 2,4 D / Gramoxone, etc.



(photo Alain Henriot)

Jean-Claude Verpeau : ne serait-ce pas plutôt l'absence de concurrence avec les autres plantes du fait du désherbage en profondeur ? ... Même constatation sur les places à feu, les tas de sable fraîchement remués, les travaux forestiers, les champs de maïs, etc... Le mycélium et sa fructification ne feraient-ils pas un démarrage plus rapide que leurs voisins ?

Alain Henriot : ... N'allez pas penser à autre chose : il s'agit d'une morille qui est venue chez moi, dans une allée de mon jardin qui a été désherbée il y a deux ans avec du « Roundup » (l'année dernière elles étaient 2). Il faut vite que je désherbe cette année...

⁹ Surnom donné à Alain Gérard, lors des échanges de messages. Brocéliande est une forêt mythique de la légende arthurienne, généralement identifiée tantôt à la forêt de Paimpont (France, département d'Ille-et-Vilaine, à 30 km au SW de Rennes), tantôt à la forêt de Huelgoat (France, département du Finistère), et anciennement à la forêt de Quintin (France, département des Côtes d'Armor).

UTILISATION DE LA RESINE EPOXY Pour l'inclusion de champignons destinés à la microtomie

Marcel Lecomte

Cette technique d'utilisation de la résine époxy nous a été enseignée par A. Marchal, éminent mycologue de Couvin (Belgique) qui l'a lui-même apprise auprès de Heinz Cléménçon, en 1978, à Lausanne. Nous tenons ici à le remercier pour son amabilité et sa disponibilité sans limites, malgré ses multiples occupations.

Nous avons tout de suite été séduits par la qualité des coupes (testées jusqu'à 5 µm), par la relative simplicité de la mise en œuvre (si on ne tient pas compte du temps) et surtout par la possibilité de conserver les blocs d'inclusion durant des dizaines d'années. En janvier 2010, A. Marchal a réalisé devant moi des coupes dans des blocs datant de 1978.

Par comparaison, l'inclusion à la paraffine, que nous pratiquons, nous paraît beaucoup plus fastidieuse, plus lourde, dévoreuse de temps et souvent décourageante par ses résultats souvent médiocres en mycologie (gros phénomènes de rétraction notamment).

H. Cléménçon a mis des années pour peaufiner sa technique, car il accordait la priorité absolue à la préservation de la nature intime du champignon étudié. En effet, les modes de fixation classiques, utilisés depuis des dizaines d'années en botanique, présentaient à ses yeux des inconvénients majeurs en microscopie mycologique : coagulation des protéines cellulaires, apparition de granulations cytoplasmiques, forte rétraction ou destruction des vacuoles, noyaux rétractés, cellules hyphales déformées ou collapsées.

Son but a été atteint finalement en utilisant des fixateurs non coagulants, générant une excellente conservation de la finesse des détails, sans apparition d'une granulation artificielle, sans déformation des cellules, notamment lorsqu'elles contiennent des vacuoles de grande taille.

Voici une synthèse du modus operandi original complet, agrémenté de commentaires et d'améliorations proposés par A. Marchal. Nous décrivons également des « raccourcis » de techniques susceptibles de réduire le nombre et la durée des interventions, ainsi que le coût du matériel. Tout cela vous paraîtra peut-être fastidieux la première fois, mais on peut aller relativement vite avec un peu d'entraînement et surtout, beaucoup d'organisation et de rigueur.

MATERIEL de base nécessaire

- Un microtome automatique de laboratoire (rotatif ou à glissière)
- Une étuve pouvant atteindre 70°C (c'est la température qui sera toujours utilisée)
- 1 litre de 2-méthoxyéthanol (2-MOE) ou éther monoéthylique de l'éthylène glycol (C₃H₈O₂)
- Paraformaldéhyde en poudre (polyoxyméthylène – trioxyméthylène) ou formol très pur de laboratoire (celui du commerce est à rejeter car il contient trop d'impuretés)
- Tampon : Cacodylate de sodium (introuvable chez nous, car contenant de l'arsenic) → voir l'adresse suivante aux USA, où il se vend « prêt à l'emploi » :
<http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/chemicals/buffers.aspx>
- 1 litre de 1-2 propylène oxyde (C₃H₆O) = (PPO)
- 1 kit de résine epoxy du Dr. Spurr (4 flacons), qu'il est possible de se procurer à cette adresse aux USA : <http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/embedding/kits.aspx>



- 1 litre d'acétone de laboratoire (celui du commerce est à rejeter car il contient trop d'impuretés)
- 50 g de borax (borate de Na)
- Colorants divers en poudre : fuchsine basique, bleu Azur A (CI 52005) ou Azur II, safranine, permanganate de potassium
- 1 listel de porte (12 x 12 x 200) en bois dur
- Colle Araldite à 2 composants
- 10 cc de potasse à 5 %
- Balance de précision (à 0,1 g)
- Petite verrerie : 1 flacon Erlen-

meyer de 100 cc, et divers flacons de stockage (→ des pots à confiture feront très bien l'affaire)

Il nous paraît conseillé, voire indispensable, d'avoir la possibilité de consulter un mycologue pratiquant cette technique, afin de prendre la mesure de ce qu'elle implique comme obligations et aussi (élément non négligeable) comme éventuels engagements financiers.

Chapitre 1. RECOLTE DES ECHANTILLONS

Comme la procédure complète d'inclusion s'étale sur 10 à 14 jours, il est conseillé de préparer plusieurs échantillons différents à la fois : 5, 10 voire 20 espèces différentes... → cela dépendra de votre disponibilité et de votre temps libre (la retraite a son charme !).

Choisir des exemplaires bien frais et mûres, les conditionner selon leur taille, et les placer très rapidement dans le fixateur. Il nous semble nécessaire de tenir un carnet de notes où toutes les expérimentations seront consignées en détail.

Les spécimens récoltés peuvent se conserver très facilement au cours de leur fixation (voir chapitre 3) ; il peut donc s'avérer utile, chaque fois que c'est possible, de se constituer un stock de matériel de travail qui sera bien utile en cas de « disette mycologique » (la météo semble de plus en plus capricieuse...).

Chapitre 2. LA FIXATION et LA DESHYDRATATION

Quelle que soit la méthode utilisée, la fixation se fait toujours à 0°C. (bain de glace).

1^{ère} méthode, que nous appellerons METHODE « LENTE A » → c'est la meilleure, mais la plus longue et la plus onéreuse

FIXATION : utilisation du formol

- **Phase préalable 1 : préparation d'une solution tampon (STM) → solution mère**
 - Mélanger 21,4 g de cacodylate de Na, 87,4 cc d'eau distillée, 12,6 cc d'HCl (1 N)
 - On obtient une solution mère 1 m avec pH de 6,9, à diluer 20x → 0,05 m
- **Phase préalable 2 : préparation d'une solution de chlorure de Ca (SCaM) → solution mère**
 - Mélanger 225 cc d'eau distillée et 250 mg de CaCl₂ anhydre (ou 330 mg en cas si on dispose de CaCl₂ 2-hydraté)
- **Phase 1 : préparation du formol pur (FP) → flacon A**
 - mélanger 2 g de paraformaldéhyde avec 25 cc d'eau distillée froide (on obtient un mélange d'un blanc laiteux)
 - chauffer à 60-70° (la température est atteinte lorsqu'on ne peut plus poser le flacon sur la paume de la main)
 - ajouter 2-3 gouttes de KOH à 5 %
 - maintenir la température et agiter jusqu'à clarification
 - refroidir sous l'eau courante
 - éventuellement filtrer
- **Phase 2 : préparation du tampon → flacon B**
 - Mélanger 22,5 cc de SCaM et 2,5 cc de STM
- **Phase 3 : préparation du fixateur**
 - Mélanger le contenu des flacons A et B : cela représente 50 cc de fixateur, qui doit être utilisé immédiatement
- **Phase 4 : refroidir le fixateur dans un bain de glace**
 - Placer le flacon dans un contenant en polystyrène expansé (moins de déperdition de chaleur) et placer le tout dans le réfrigérateur
- **Phase 5 : introduire les spécimens dans le fixateur**
 - Selon le nombre et la taille des spécimens les laisser entre 1 et 12 h dans le bain

REMARQUES : si le champignon est de bonne taille, le refroidir au préalable ; le réhydrater éventuellement en plaçant le pied dans l'eau (comme pour provoquer une sporulation)

ATTENTION ! Pas de rinçage entre la fixation et la déshydratation

DESHYDRATATION : utilisation du 2-méthoxyéthanol

- Poser l'objet fixé durant quelques secondes sur du papier absorbant
- Refroidir une quantité adéquate de 2-MOE sur bain de glace
- Ensuite, y transférer l'objet et laisser 1 à 12 heures à 0°C.
- Réchauffement à température ambiante
- Changer le 2-MOE et y replacer les pièces
- **On peut stocker dans ce second bain durant très longtemps, en flacon bien fermé, soit à température ambiante ou dans le freezer**
- Si on choisit de continuer tout de suite : placer les pièces, à température ambiante, dans un 1^{er} bain de PPO durant 1 à 12 heures (on peut le remplacer par de l'acétone très pur) → le propylène oxyde permet d'éliminer toute trace de 2-MOA... des traces de celui-ci ne peuvent pas se retrouver dans la résine qui ne durcirait pas bien lors de la polymérisation...
- 2^{ème} bain de PPO durant 1 à 12 heures
- Inclure ensuite dans le mélange suivant : résine + PPO (25/50) et suivre la démarche du § 5 (inclusion)

2ème méthode, dite METHODE « LENTE B » → un peu moins longue, mais reste onéreuse

Lors de l'imprégnation, on passe directement du PPO dans la résine : cela permet de court-circuiter 6 bains successifs.

H. Cléménçon a revu par la suite sa position sur ce sujet, et annonce qu'il a obtenu des résultats tout aussi valables en plongeant directement les pièces déshydratées dans de la résine pure.

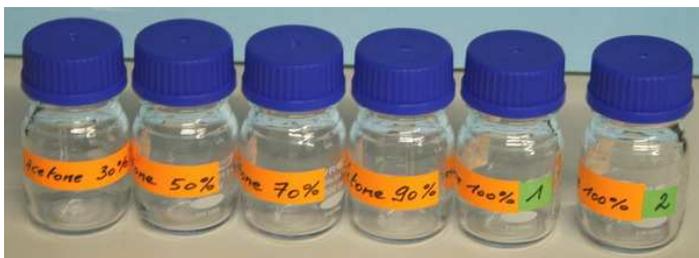
- Laisser l'objet descendre dans la résine par gravitation et par imprégnation progressive
- Des blocs de petite taille (jusque 6 mm) sont complètement imprégnés après 10-12 heures, à température ambiante
- Pour de plus gros blocs, cela peut prendre plusieurs jours ; les placer alors au réfrigérateur
- La résine utilisée pour l'imprégnation peut aussi être utilisée pour l'inclusion, mais c'est déconseillé si on travaille sur des pièces non encore colorées (en effet, les résidus d'imprégnation du champignon qui sont en suspension dans la résine, vont également se colorer et polluer la future préparation).
- Polymériser durant 12 heures à 70°

Cette méthode est à expérimenter, car nous n'avons pas de passé à son sujet.

3ème méthode, dite METHODE « RAPIDE A » → c'est plus rapide et plus économique

FIXATION : on reprend le mode opératoire de la méthode lente

DESHYDRATATION : utilisation de l'acétone



- Préparer des bains d'acétone (solution aqueuse) à 30 % - 50 % - 70 % - 90 % - 100 % A – 100 % B
- Eponger les pièces colorées au KMnO_4
- Aller de la concentration la plus faible à la plus forte et laisser les pièces durant 1 à 12 heures dans chaque bain

INCLUSION :

- Verser la résine dans le dernier bain d'acétone à 100 %, où se trouvent les pièces
- Placer le récipient sur une étuve pour que l'acétone s'évapore lentement (12 à 24 heures) → « pour accélérer l'évaporation, j'utilise un petit ventilateur d'ordinateur qui ventile directement au-dessus de l'orifice du flacon... » (A. Marchal) → quand tout l'acétone est évaporé, l'objet se retrouve dans le Spurr à 100 %
- Polymériser à 70°C. durant 10 à 16 heures

Cette méthode n'a pas d'avantages semble-t-il par rapport au 2-MOE, sinon qu'elle permet de se passer de produits assez coûteux (2-MOE & PPO) et difficiles à trouver.

Selon CLEMENCON, elle est utile si l'objet est difficile à pénétrer (sclérotés, pieds de marasmes, spores à paroi épaisse).

A. MARCHAL l'a expérimentée il y a peu de temps, avec du formol et de l'acétone du commerce, à bas prix, ce que déconseille fortement H. Cléménçon, ... Résultats : problèmes majeurs à cause des impuretés contenues dans les produits basiques. Cependant, il vaudrait la peine de l'expérimenter avec de l'acétone très pure, de laboratoire.

4^{ème} méthode, dite METHODE « RAPIDE B » → c'est de loin la plus rapide et la plus économique

FIXATION : utilisation de $KMnO_4$

Le fixateur sera une solution aqueuse de permanganate de K à 1 %, tamponnée au cacodylate (0,5 g de permanganate, 50 cc eau distillée, 2,5 cc de tampon stock).

- Les pièces vont se colorer en violet sombre quasi noir (la coloration est donc déjà réalisée)
- Laisser tremper à température ambiante durant 20 à 30 minutes
- Rincer 2 ou 3 fois avec la solution tampon avant de déshydrater

DESHYDRATATION : utilisation de l'acétone, comme dans la méthode rapide A, ci-dessus : cela permet de conserver la coloration générée par le permanganate

- On déshydrate ensuite avec la série d'acétone mentionnée ci-dessus
- Avec du 2-MOE, la coloration est régressive et les objets se décolorent quasi complètement

Chapitre 3. L'IMPREGNATION

METHODE 2-MOE :

- Préparation de la résine : voir le chapitre 5 (inclusion) juste avant l'emploi.
- Elle peut être stockée dans des pipettes à échantillons de 2,5 cc qui, bien fermées, se conservent durant plusieurs semaines dans le bac à glaçons d'un frigidaire
 - **A** = mélanger deux volumes de PPO et un volume de résine (50/25) → utiliser des flacons en verre car le PPO dissout plastique et PVC
 - Y placer l'objet et attendre 1 à 12 heures
 - **B** : ajouter un volume de résine (= 75 %)
 - attendre 1 à 12 heures
 - **C** : prélever 2 volumes de B et ajouter un volume de résine
 - Attendre 1 à 12 heures
 - **D** : prélever 1 volume de C et ajouter un volume de résine
 - Attendre 1 à 12 heures
 - **E** : ajouter 2 volumes de résine neuve
 - Attendre 1 à 12 heures
 - **F** : ajouter 2 volumes de résine neuve
 - Attendre 1 à 12 heures
- Polymériser durant 12 heures à 70°, à l'étuve (la vitesse de polymérisation est une fonction directe de la température : à 50°, il faudra 18 à 24 heures ; à température ambiante, cela prendra des semaines)

Chapitre 4. L'INCLUSION

Préparation de la résine :

- Manipuler avec précaution, dans un endroit ventilé
- Le kit du Dr. Spurr est composé de 4 éléments : ERL-4206 / DER-736 / NSA / S-1
- Selon la quantité désirée, il faut les mélanger dans les proportions suivantes : utiliser une balance de précision pour la pesée
- Le mélange se réalise dans des petits récipients jetables (gobelets PVC cristal par exemple)

- Les mesures ci-dessous sont exprimées en grammes (gouttes pour S-1), à mesurer avec une balance de précision
- Les valeurs surlignées en rouge sont intéressantes car elles représentent un nombre entier de gouttes

Chez le fournisseur américain (Electron Microscopy Sciences), le ERL 4206 est maintenant remplacé par ERL 4221 ; S-1 est appelé DMAE (diméthylaminoéthanol).

ERL-4221	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,25	2,50	2,75	3,00	3,25
DER-736	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,40	2,60
NSA	1,30	1,95	2,60	3,25	3,90	4,55	5,20	5,85	6,50	7,15	7,80	8,45
S-1 (gouttes)	0,80	1,20	1,60	2,00	2,40	2,80	3,20	3,60	4,00	4,40	4,80	5,20
TOTAL	2,20	3,30	4,40	5,50	6,60	7,70	8,80	9,90	11,00	12,10	13,20	14,30

ERL-4221	3,50	3,75	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00	6,25
DER-736	2,80	3,00	3,20	3,40	3,60	3,80	4,00	4,20	4,40	4,60	4,80	5,00
NSA	9,10	9,75	10,40	11,05	11,70	12,35	13,00	13,65	14,30	14,95	15,60	16,25
S-1 (gouttes)	5,60	6,00	6,40	6,80	7,20	7,60	8,00	8,40	8,80	9,20	9,60	10,00
TOTAL	15,40	16,50	17,60	18,70	19,80	20,90	22,00	23,10	24,20	25,30	26,40	27,50

ERL-4221	6,50	6,75	7,00	7,25	7,50	7,75	8,00	8,25	8,50	8,75	9,00	9,25
DER-736	5,20	5,40	5,60	5,80	6,00	6,20	6,40	6,60	6,80	7,00	7,20	7,40
NSA	16,90	17,55	18,20	18,85	19,50	20,15	20,80	21,45	22,10	22,75	23,40	24,05
S-1 (gouttes)	10,40	10,80	11,20	11,60	12,00	12,40	12,80	13,20	13,60	14,00	14,40	14,80
TOTAL	28,60	29,70	30,80	31,90	33,00	34,10	35,20	36,30	37,40	38,50	39,60	40,70



- Placer l'objet dans de la résine pure, dans un moule adéquat
 - Trouver des objets de la vie courante adaptés (petits godets en alu de 3 – 4 cm de diamètre contenant à l'origine une bougie pour chauffe-plat)
- Polymériser à 70°C. durant 12 heures

Chapitre 5. PREPARATION DES BLOCS

- Découper la latte de bois en morceaux de 3 ou 4 cm de longueur (futur support des blocs de résine) selon la taille des mâchoires de votre microtome
- Démouler l'objet et le façonner à l'aide d'une petite scie à lame fine (cette opération est très importante, car c'est ici qu'on va orienter l'objet pour les futures coupes)

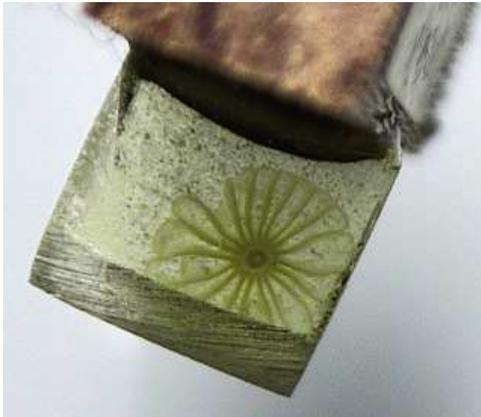
les blocs d'inclusion fixés sur son support en bois



- Passer le bloc sur du papier de verre à grain fin, pour lisser les arêtes
- Mélanger 2 gouttes de chaque composant d'une colle époxy (Araldite ou autre ...)
- Fixer le bloc sur la réglette en bois
- Laisser à l'étuve (70°) durant 1 à 2 heures pour polymérisation de la colle
- Le bloc est prêt à être fixé dans les mors du microtome

Chapitre 6. LES COUPES

- Fixer le support en bois dans les mors du microtome
- Il est indispensable d'utiliser un couteau spécial, adapté à la résine (en principe, ceux utilisés pour la paraffine ne conviennent pas)
- La première fois, bien régler la position transversale du couteau (nous ne reprenons pas ici la théorie relative à la qualité de l'aiguisage de la lame, et à l'utilisation générale d'un microtome automatique ... voir d'autres articles personnels écrits sur ce sujet)
- La majorité des coupes sera réalisée avec un réglage de 10 à 8 µm (parfois 5)



un chapeau de *Marasmius rotula* inclus dans la résine

- Les coupes, d'aspect un peu laiteux, vont adhérer au couteau par électricité statique (pas possible ici de réaliser des rubans comme avec la paraffine)
- Les ranger une à une sur le dessus du couteau avec une aiguille montée, durant quelques minutes
- Après 4-5 minutes, les coupes peuvent être enlevées avec une fine pincette, sans danger d'enroulement
- Éliminer les éventuels déchets avec un petit pinceau

Chapitre 7. RECONSTITUTION DE LA FORME de la coupe



- Prendre de l'eau bien chaude, dans un flacon à col bien large (7-8 cm de diamètre)
- Y déposer les coupes une à une
- Après quelques minutes, elles ont retrouvé leur forme originale
- Laisser refroidir
- Elles acquièrent maintenant leur forme définitive, bien plane
- Les coupes sont prêtes pour une observation en contraste de phase
- Si on décide de les colorer, passer directement de l'eau chaude au flacon de colorant (toujours à col large)

Chapitre 8. LA COLORATION

La question se pose de savoir s'il ne serait pas intéressant de réaliser une coloration de masse, au départ du 2-MOE (y dissoudre le colorant brut) ... à expérimenter !

Notre méthode de coloration (les résultats obtenus sont remarquables)

- Les coupes sont colorées en les flottant sur les divers colorants

- Les transferts sont réalisés avec une pincette à becs fins
- Laisser durant 12 à 24 h dans le bac à colorant (certaines colorations se feront à l'étuve à 70°)

1. la plus simple :

- Solution aqueuse de permanganate de potassium à 2 %, non tamponnée, durant 15 minutes, à température ambiante
- Rincer à l'eau
- Décolorer la coupe avec une solution aqueuse d'acide oxalique à 0,5 % durant 30-40 secondes
- Rincer à l'eau et sécher à température ambiante, sur papier absorbant



2. coloration au bleu Azur A ou Azur II :

- (A) préparer une solution aqueuse (300 cc) de borax à 1 %, de pH = 9
- (B1) préparer une solution mère à 0,1 % : mélanger 100 cc de (A) et 0,1 g de bleu (cette dernière va se conserver durant des années)
- (B2) mélanger 100 cc de (A) et 10 cc de (B1) : on a une solution à 0,01 %
- (B3) mélanger 100 cc de (A) et 10 cc de (B2) : on a une solution à 0,001 %
→ ce sont les solutions B2 & B3 qui serviront à la coloration des coupes
- Dans un tout petit cristalliseur muni d'un couvercle, on verse la solution à 0,01% ou 0,001 % ; on y fait flotter les coupes et on place le tout à l'étuve à 70° durant 1 à 2 heures (B2) ou toute la nuit (B3)

3. coloration à la fuchsine basique :

- (A) préparer une solution aqueuse d'alun de potasse à 5 %, de pH = 3
- (B1) préparer une solution mère à 1 % : mélanger 100 cc de (A) et 1 g de colorant (cette dernière va se conserver durant des années)
- (B2) mélanger 50 cc de (A) et 50 cc de (B1) : on a une solution à 0,5 % → c'est celle-ci qui servira souvent à la coloration des coupes
- (B3) mélanger 100 cc de (A) et 10 cc de (B1) : on a une solution à 0,01 % → pour des colorations plus douces
- Placer le colorant supportant les coupes à l'étuve durant 12 heures

4. possibilité d'utiliser d'autres colorants :

Comme solvant, utiliser une solution aqueuse d'alun de potasse à 5 %, de pH = 3
Safranine (0,005 %), pyronine (1 %), bleu Azur II (0,002 %), trypan blue (1 %), bleu de méthyle (1 %), crystal violet (0,1 %), fuchsine acide (0,5 %), bleu de méthyle (1 %)



5. les coupes sont colorées :

- Les manipuler avec grand soin, à l'aide d'une pince à becs très fins, en les prenant par un coin
- Les sortir avec précaution du bain de colorant refroidi (afin de les laisser redurcir)
- Les poser sur du papier absorbant afin d'éliminer le surplus de colorant et les laisser sécher
- Les retailler afin d'éviter le surplus de résine inutile (cela facilite le montage)
- Personnellement, nous plaçons ensuite les coupes entre deux plaques de verre (30 x 30 cm), à température ambiante, durant 24 à 48 heures, afin de les rendre bien planes et faciliter le montage ou le stockage

Chapitre 9. LE MONTAGE DES COUPES

- Il se fera entre lame et lamelle ; personnellement, notre choix va sans hésitation vers les lames couvre-objet (CO) rondes pour le montage définitif ; nous utilisons des lames porte-objet (PO) à bande inscriptible
- Les coupes sèches ne peuvent pas être montées dans n'importe quel milieu : dans la plupart des cas, la bande de plastique laiteux sera visible. Nous avons testé 5 milieux de montage conventionnels : PVA lactophénolé (à proscrire, car il décolore les coupes), baume du Canada (mauvais résultats), Aquatex, Histolaque & Neo-Entellan (donnent des résultats variant de B- à TB, et ces 3 milieux polymérisent très vite)
- Il est beaucoup plus judicieux de monter la coupe dans la résine d'inclusion : en effet, comme les indices de réfraction sont identiques, la partie non colorée devient quasi invisible

Technique :

- On a intérêt à utiliser une résine vieille de quelques jours (ainsi, elle est plus épaisse et la coupe ne gondole pas aussi facilement)
- Envisager une série de lames à monter pour éviter le gaspillage de résine
- La veille, sortir du réfrigérateur un microtube (1,5 cc) contenant de la résine (il va servir pendant plusieurs jours et s'épaissir de plus en plus)
- Lui ajouter en dernière minute, une goutte (voire 2) de durcisseur : ensuite, la résine d'inclusion doit être utilisée très vite
- Avec une tige de verre (5 mm de diamètre), déposer une grosse goutte de résine au milieu de la lame PO
- Avec l'extrémité de la baguette de verre imprégnée de résine, transférer une coupe colorée dans la grosse goutte de résine au milieu de la lame
- Toujours avec l'extrémité de la baguette, orienter convenablement la coupe tout en l'immergeant entièrement dans la résine
- Positionner la lame CO en la présentant de biais (pour éliminer les éventuelles bulles d'air)
- Retourner la lame PO face vers le bas et la déposer délicatement sur une quadruple couche de papier absorbant : immédiatement, l'excès de résine diffuse dans le papier absorbant

- Surtout, ne pas placer la lame préparée dans l'étuve, car sous l'action de la chaleur, la coupe va ressembler à de la tôle ondulée, dans 99 % des cas

- Changer la couche de papier absorbant et y positionner à nouveau les lames, face vers le bas



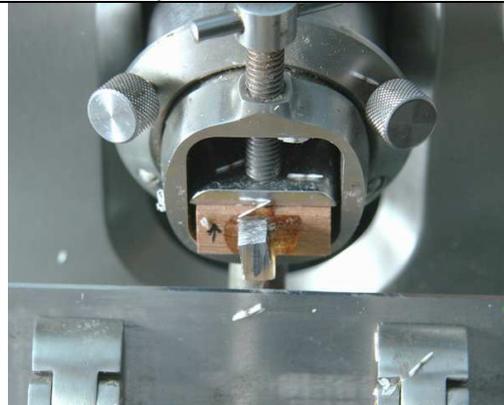
- Poser une petite masse métallique sur la lame préparée (par exemple un poids de 5 g), durant 12 h, afin d'éliminer le solde du surplus de résine (cela permet d'observer au grossissement 100x, sans toucher la lame avec l'objectif) → personnellement, j'utilise plutôt une pince à linge (beaucoup plus facile à manipuler)
- Retourner les lames face vers le haut, les numéroter éventuellement, les marquer des indications nécessaires et suffisantes, vérifier le bon état de la coupe au microscope
- S'il manque de la résine (c'est fréquent dans les coins des lames CO carrées), il suffit alors d'en déposer une gouttelette avec la baguette en verre juste au bord de la lamelle → le vide se comble par diffusion
- Laisser polymériser durant 2-3 jours à température ambiante
- Eventuellement, luter au vernis à ongle incolore
- Ranger les préparations dans une boîte ad hoc durant 3 à 4 semaines jusqu'à polymérisation totale
- Nettoyer les surplus de résine et les taches avec un morceau de chiffon ou de papier absorbant imbibé d'acétone
- Vous êtes maintenant l'heureux possesseur d'une coupe qui va se conserver durant des dizaines d'années (32 ans de recul à ce jour)



La verrerie utilisée pour les manipulations diverses. Tout cela peut être remplacé à moindre frais par de la verrerie « quotidienne » (pots à confiture ou autres...)



Plan de travail avec microtome et réchaud. Il est impératif de travailler dans une pièce bien ventilée



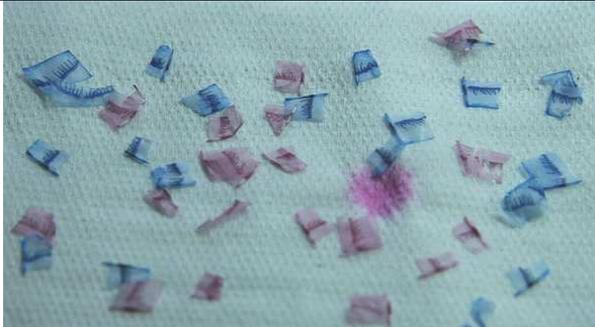
Détail du microtome avec le bloc d'inclusion en place pour la coupe



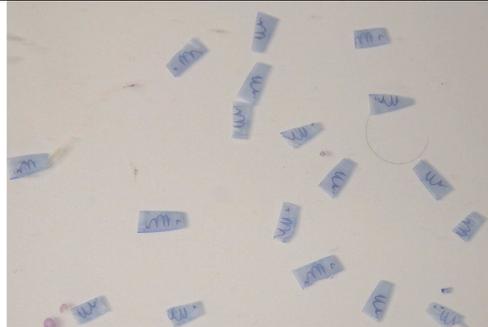
Moulage des blocs dans des capsules PVC (couvre-capsules de boîtes à médicaments) → difficile à démouler



Inclusion dans des supports de bougies à chauffe-plat → excellent : rien de mieux jusqu'à présent

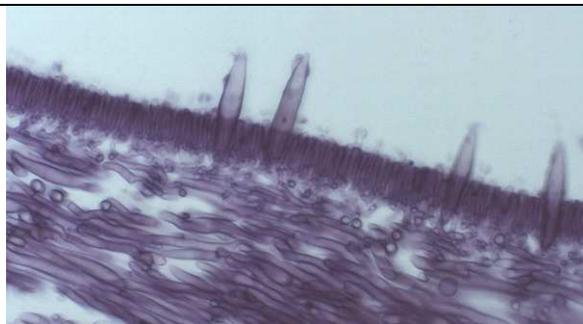
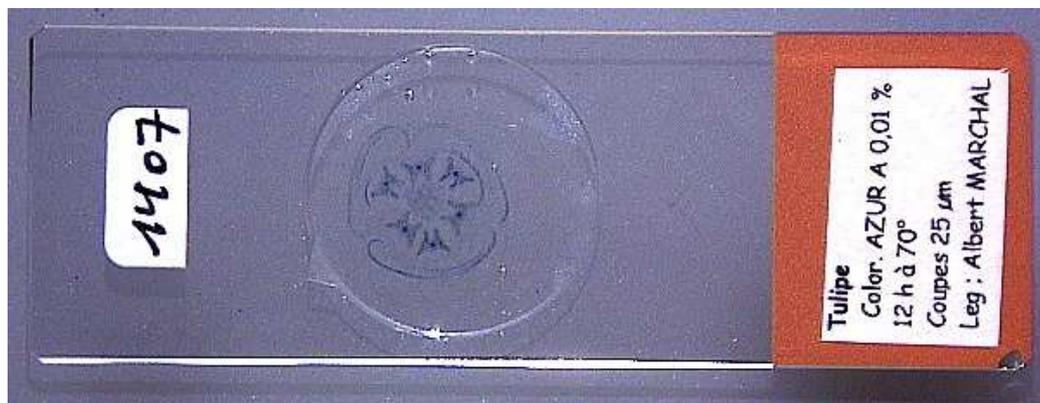
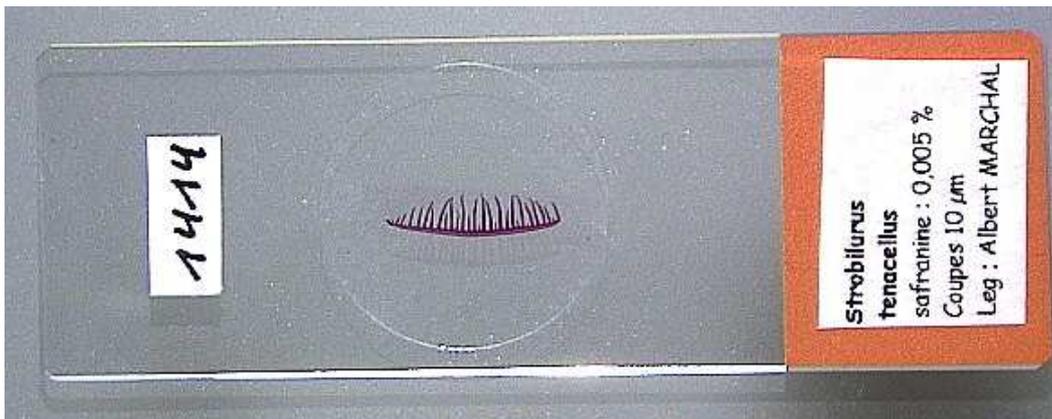


Des coupes en train de sécher, à la sortie du bain de coloration



Les coupes retallées et mises en forme, prêtes pour le montage

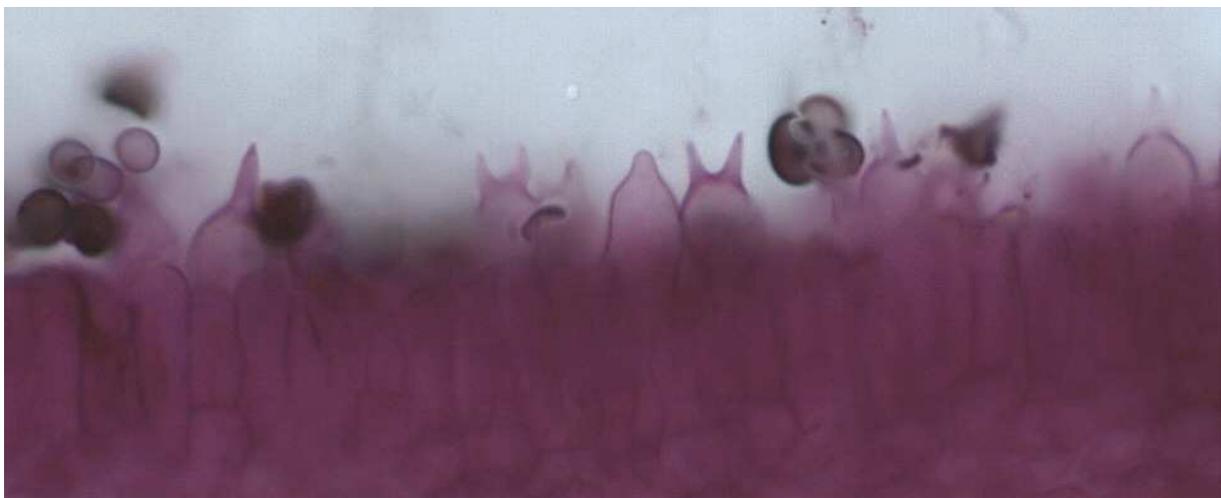
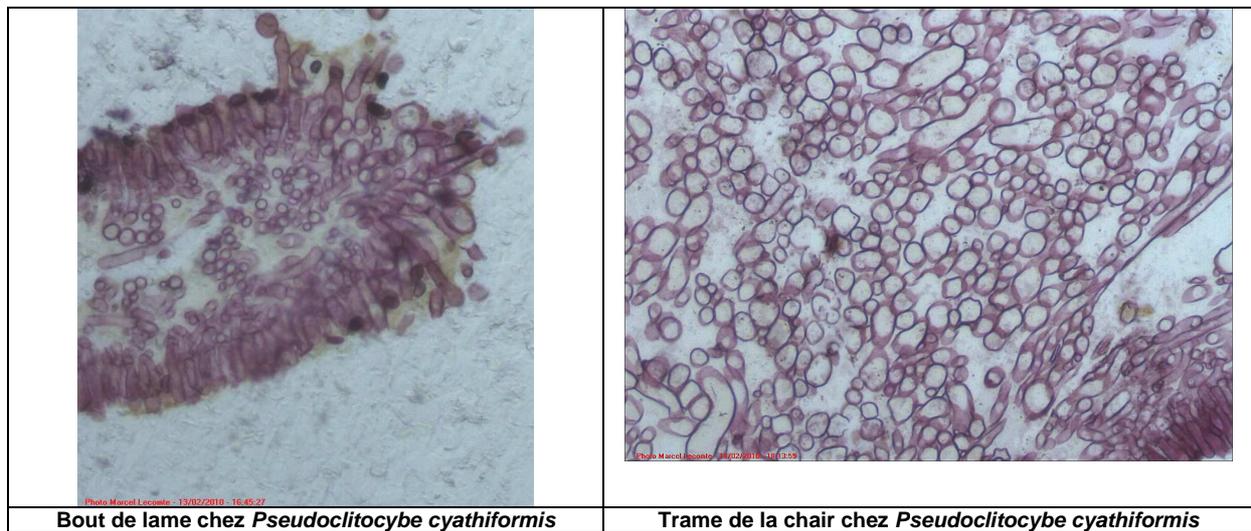
Chapitre 10 : LES RESULTATS



Macrocystides de *Strobilurus tenacellus*



Macrocystides multidigitées de *Mycena metata*



Chapitre 11 : Une page « archive » d'un précieux carnet de notes

Voici la transcription de la page 418 du carnet de notes d'A. Marchal, qui vous donne une idée de l'évolution du développement dans le temps de cette technique.

Récoltes du 09/09/1978 : *Lepiota hetieri*, *Crucibulum laeve*, feuille de *Senecio vulgaris* parasitée par une rouille

Immerger dans le fixateur au moment de la récolte.

- Fixateur (bain de glace) : samedi 09/09, 10h30 du matin
- 1^{er} bain de 2-MOA (sur glace) : samedi soir
- 2^{ème} bain de 2-MOA (à température ambiante) : dimanche matin
- 1^{er} bain de 2-PPO (ou acétone) : lundi matin
- 2^{ème} bain de 2-PPO : lundi matin
- Imprégnation A : lundi soir → 1 volume de 2-PPO + 1 volume de Spurr (1 volume = 3 pipettes dans ce cas)
- Impr. B : mardi soir → ajouter 1 volume de Spurr
- Impr. C : mercredi soir → enlever 2 volumes de B et ajouter 1 volume de Spurr
- Impr. D : samedi 16/09 matin → enlever 1 volume de C et ajouter 1 volume de Spurr
- Impr. E : dimanche matin → ajouter 2 volumes de Spurr
- Impr. F : mardi soir → ajouter 2 volumes de Spurr
- Jeudi matin : placer la pièce dans du Spurr 100 %, dans le moule choisi et polymérisation à 70°
- Vendredi midi : démouler le bloc

Cela représente une succession d'opérations réparties sur 14 jours, mais avec des temps d'intervention très limités : chaque phase ne demande que quelques minutes ! C'est simplement une question de rigueur et de méthode.

LES TIQUES (1^{ère} partie)

Paul Leroy¹⁰

Cet exposé sur les tiques n'a pas la prétention de tout dire sur le sujet ni d'être un moyen d'identifier ces acariens.

Après un rappel historique des premières observations consignées par écrit, il sera question de l'importance qu'elles représentent sur le plan médical et vétérinaire, puis un exposé rapide de leur mode de vie et enfin quelques mots sur les moyens employés pour s'en débarrasser, ainsi que pour s'en prémunir.

Très peu d'ouvrages de vulgarisation parlent des tiques et ceux qui abordent le sujet se bornent à quelques commentaires assez imprécis sur leur mode de vie ainsi que sur la diversité des espèces. Ces bestioles très discrètes, n'ayant ni les couleurs chatoyantes des papillons, ni la grâce des libellules, n'intéressent pas vraiment le grand public.

Lorsqu'elles sont connues des citadins, en particulier ceux pratiquant des activités nature, c'est surtout par le « bouche à oreille » à propos des maladies qu'elles peuvent transmettre. Les gens habitant et travaillant à la campagne sont plus concernés, ainsi que les forestiers, chasseurs et ramasseurs de champignons. Cependant la plupart de ces personnes, même ayant eu le désagrément de subir leur morsure, ne connaissent rien de leurs mœurs. De ce fait, mal connues, elles font souvent l'objet d'histoires toutes plus farfelues les unes que les autres.



Hypostome dentelé chez *Ixodes ricinus* ; il se trouve entre les deux palpes maxillaires (photo Marcel Lecomte)

Me passionnant pour ce groupe d'acariens, je les ai assez bien étudiés pour être en mesure d'apporter quelques précisions à leur sujet. La connaissance des tiques est très ancienne. Elles étaient connues de façon certaine des Grecs du temps d'Homère. Mais selon d'autres sources, elles avaient déjà été remarquées des Égyptiens : des papyrus remontant aux alentours de 1150 avant Jésus-Christ en font état. Selon Von Oefele, en 1901, ce seraient même les Égyptiens qui les premiers auraient comparé les femelles gorgées de sang à une graine de ricin.

Par la suite le terme « *ricinus* » fut utilisé par les auteurs tant grecs que latins, pour désigner les tiques en général. C'est donc tout naturellement, qu'en 1758, Linné nomma la plus commune d'entre elles *Acarus ricinus*. Dans sa classification des espèces Linné range tous les acariens quels qu'ils soient dans le seul genre « *Acarus* » ; les tiques étant prises dans un sens

très large, peu d'espèces sont décrites. Dans les décennies qui suivirent, les entomologistes, dont Fabricius (1794) et Latreille (1796) parmi les premiers, constatèrent que ce rassemblement hétérogène ne convenait pas et devait être révisé. Progressivement de nouveaux genres et espèces furent créés.

Donc, depuis l'Antiquité, on savait que les tiques se nourrissaient sur des hôtes variés (mammifères dont l'homme, oiseaux, reptiles). Toutefois, même si le mode de prédation avait retenu l'attention par la durée et la solidité de la fixation, ainsi que la spectaculaire augmentation de volume de la bestiole, sa présence était jusque là considérée sans gravité pour l'hôte. Ce n'est que dans la dernière moitié du XIX^{ème} siècle qu'on supposa l'implication des tiques dans la transmission de certaines maladies affectant les animaux domestiques. La faune sauvage bien que concernée elle aussi ne susci-

¹⁰ Paul LEROY, 9, rue de la Douzillère, apt C51, F-37300, JOUE- LES-TOURS (France)

taut que peu d'intérêt. L'homme moins exposé aux risques restait encore plus ou moins en dehors du sujet.

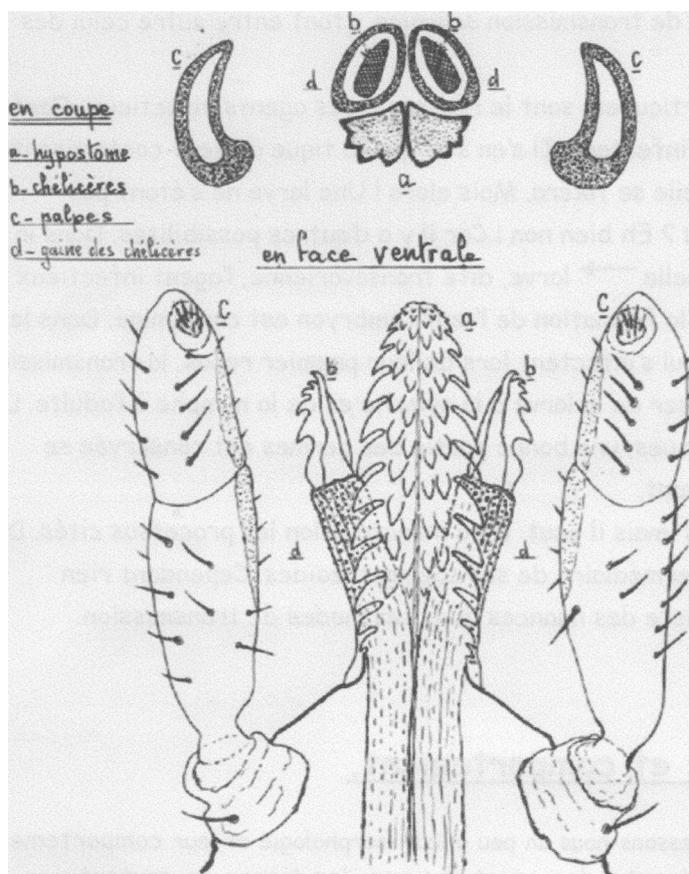
La science progressant à grands pas en cette fin de siècle, le voile se levait peu à peu sur des pathologies non expliquées jusqu'alors. Divers agents infectieux avaient été identifiés mais le mode de transmission, bien que supposé n'était toujours pas confirmé.

C'est entre 1889 et 1893 que des chercheurs américains (T. Smith et F.L. Kilborne) travaillant sur l'hémoglobinurie des bovins ou " fièvre du Texas ", démontrèrent de manière irréfutable la transmission d'un organisme pathogène par un arthropode. L'agent infectieux identifié, un protozoaire, étant *Babesia bigemina*, désigné "piroplasma" à l'époque, utilisant la tique *Boophilus annulatus* comme agent vecteur.

En Europe, ce n'est qu'en 1903, qu'une équipe de chercheurs allemands apporta la confirmation d'une semblable découverte. Dans ce cas, la tique incriminée était *Ixodes ricinus*. Ces premières découvertes entraînèrent d'autres, confirmant le rôle joué par les tiques dans le développement de nombreuses maladies. De grandes avancées furent faites dans le premier tiers du XXème siècle, mais des zones d'ombre subsistaient, notamment en médecine humaine.

A l'échelle mondiale, de tous les groupes d'arthropodes, les tiques sont certainement les plus importants vecteurs de germes pathogènes pour les animaux. L'homme étant un hôte occasionnel par intrusion dans les biotopes qu'elles occupent, aucune espèce n'est connue comme étant parasite spécifique de l'Homme. Ce rôle vecteur peut s'expliquer par la durée des repas et le volume de sang prélevé, les probabilités d'absorber les germes présents dans l'organisme de l'hôte étant ainsi amplifiées. Etant hématophages¹¹ à tous les stades de développement, certaines changent d'hôte à chaque repas, ce qui signifie qu'elles sont en contact avec une large gamme de porteurs d'agents infectieux. Les germes absorbés avec le sang passent dans les glandes salivaires où ils sont stockés. Certains de leurs hôtes ayant de grands territoires, d'autres effectuant de grandes migrations, elles peuvent ainsi être distribuées un peu partout. De plus elles sont très prolifiques.

Les maladies transmises



représentation schématique du rostre d'*Ixodes ricinus* femelle

En ce début de XXème siècle, diverses pathologies étaient encore d'origine inconnue. Ce n'est qu'après les découvertes sur l'animal que l'implication des tiques dans ces affections fut mise en évidence. Les premiers cas rapportés à une morsure de tique furent des fièvres éruptives telles la fièvre boutonneuse méditerranéenne (transmise par un *Rhipicephalus*) surtout dans la moitié sud de la France et la fièvre pourprée des montagnes rocheuses en Amérique du Nord. Une affection nommée « paralysie ascendante à tique », touchant les jeunes animaux, avait été observée dans différentes zones chaudes de la planète. Un cas déclaré chez une fillette de 13 ans fut signalé d'Australie. On sait maintenant que cette maladie n'est pas consécutive à l'inoculation d'un parasite mais d'une toxine sécrétée par la tique. Elle peut être mortelle selon la dose émise, d'où l'importance de retirer la tique rapidement.

Les symptômes de ce que nous appelons aujourd'hui " maladie de Lyme " avaient été observés en Europe dès le début du XXème siècle. Cette affection se manifestant sous

¹¹ Hématophage : qui se nourrit exclusivement de sang

différentes formes, les recherches entreprises pour l'identifier ne purent aboutir ; le nombre limité et la dispersion des cas déclarés a sans doute contribué à cet échec. Les dermatologues se sont aussi intéressés à la plaque érythémateuse se développant suite à la morsure et après retrait de la tique. En 1910, Afzelius, dermatologue suédois décrivit le phénomène sous le qualificatif : *Erythema chronicum migrans*. Ce sont deux médecins lyonnais, Garin et Bujadoux, qui en 1922, furent les premiers à diagnostiquer et décrire les symptômes neurologiques associés à une morsure de tique. Le malade, un cultivateur-éleveur de moutons, s'étant aperçu qu'une tique s'était fixée sur lui, la retira sans y prêter plus d'attention. C'est environ 3 semaines après qu'il ressentit divers maux très douloureux et survenus rapidement. Les praticiens soupçonnèrent l'implication d'une bactérie transmise par la tique dans le déclenchement de cette affection. Mais là encore, ce cas isolé n'entraîna pas de recherches approfondies.



Face ventrale d'*Ixodes ricinus*, avec hypostome, palpes et pattes – photo Marcel Lecomte

Ce n'est qu'entre 1975 et 1982, donc assez récemment, que les causes de cette maladie ont été formellement établies. Une cinquantaine de cas groupés d'arthrite inflammatoire ayant été à cette époque constatés dans le comté de Lyme (Connecticut - USA), c'est à cette occasion que l'ensemble des composantes cliniques et épidémiologiques a été reconnu.

De ce fait, le rôle vecteur des tiques du genre *Ixodes* est enfin confirmé et le spirochète responsable identifié par Burgdorfer, en 1982, et rapporté au genre *Borrelia*. Suite à l'analyse moléculaire, on sait maintenant qu'il existe un groupe *Borrelia burgdorferi* s.l., comprenant 13 espèces. Trois d'entre-elles sont pathogènes pour l'homme, les affections se manifestant sous diverses formes. N'étant pas médecin, je n'irai pas plus avant dans les détails. Néanmoins, je préconise qu'après retrait d'une tique, il est indispensable de désinfecter le point de fixation. Si dans les jours qui suivent, apparaît l'érythème migrant, il faut se rendre rapidement chez un médecin. Un diagnostic précoce est généralement gage d'efficacité. Actuellement, il n'existe aucun moyen préventif.

En France, la borréliose de Lyme est la plus répandue des maladies transmises par les tiques. Toutefois, je n'ai pas connaissance du nombre de cas déclarés annuellement. D'autre part, le taux de tiques porteuses de *Borrelia burgdorferi* étant variable selon les régions, je n'avancerai aucun chiffre. Pour information consulter les publications spécialisées.

Une autre maladie grave transmise par les tiques a été décrite au début des années 1930. D'abord observée en Sibérie, elle s'est ensuite étendue en divers points d'Union soviétique, puis progressivement dans de nombreux pays d'Europe. Elle est apparue en France en 1971. Les premiers cas ont été observés en Alsace (HANNOUN et al. - 1987) : c'est l'encéphalite à tiques. Il s'agit d'une maladie virale qui atteint le système nerveux central avec manifestations neuro-méningées. Là non plus je ne m'étendrai pas davantage sur les cas cliniques inhérents à cette maladie : en cas de symptômes, voir rapidement un médecin. Je préciserai seulement que peu de cas ont été constatés en France, et surtout localisés à la région Est-Nord-est. Un vaccin existe. Je ne cite que ces 2 cas car ce sont les plus connus du public, sinon et rien qu'en France, il existe d'autres maladies transmises à l'homme par les tiques. Différentes espèces sont impliquées, ayant chacune leur spécificité. Les animaux sont beaucoup plus concernés et au niveau mondial, tant pour les uns que pour les autres, la liste est longue. Les progrès de la science en feront sûrement découvrir d'autres.

Mode de transmission

Suite à cette première présentation, quelques mots sur le mode de transmission de ces maladies. Il en existe plusieurs, mais je me bornerai au mode de transmission salivaire, étant entre autre celui des maladies précédemment citées.

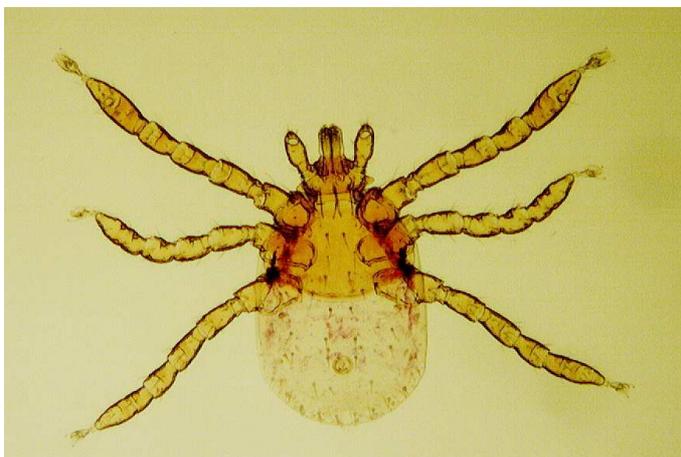
Il faut savoir que les animaux (sauvages, en particulier) sont le réservoir des agents infectieux. C'est en se nourrissant de leur sang que les tiques s'infectent. Il s'ensuit que la tique devient contaminante et transmettra les germes à l'hôte sur lequel elle se fixera.

Mais alors ! Une larve ne s'étant pas encore fixée est supposée exempte de germes ? Eh bien non ! Car il y a d'autres possibilités. Dans la plupart des cas il s'agit de la transmission femelle → larve, dite transovarienne, l'agent infectieux passe des glandes salivaires dans l'ovaire. Dès la formation de l'œuf, l'embryon est contaminé. Dans le cas de larves non contaminées par la mère et qui s'infectent lors de leur premier repas, la transmission peut être alors transtadiale ; c'est-à-dire passer de la larve à la nymphe et de la nymphe à l'adulte. Les organes internes étant peu modifiés lors des mues, une bonne partie des germes est conservée, se retrouvant ainsi dans l'organisme au stade suivant.

Chez le genre *Ixodes*, le mâle ne se nourrit pas mais il peut être infecté selon les processus cités. De ce fait, il contaminera sa descendance par l'intermédiaire de ses spermatozoïdes. Cependant rien n'étant absolu : selon les types de germes, il existe des nuances dans ces modes de transmission.

Morphologie et comportement

Après cette approche du mode d'infestation, intéressons-nous un peu à leur morphologie et leur comportement. D'abord écartons les idées fausses qu'on peut entendre ça et là : non, les tiques ne sautent pas, ne tombent pas des arbres et n'attaquent pas en rangs serrés ! Les modes de prédation diffèrent selon les genres, mais aussi les espèces, et d'autre part, selon les animaux qu'elles parasitent.



Dermacentor reticulatus (forme larvaire¹²) - photo Marcel Lecomte, d'après une préparation microscopique de Paul Leroy

Avant de poursuivre, il est utile de signaler un détail anatomique important concernant les individus des 2 familles du sous-ordre *Ixodina* : *Ixodidae* et *Amblyommidae*. Chez la première, toutes les femelles ainsi que les nymphes et les larves ont un rostre long et de ce fait fragile. Chez la seconde, le rostre est court et robuste et identique pour les 2 sexes, excepté 2 espèces, non ou très peu représentées en France métropolitaine. Cette particularité est désignée sous le qualificatif de « longi-

¹² Les tiques sont des Acariens, et appartiennent à la classe des Arachnides (caractérisés par 4 paires de pattes). Au stade larvaire, elles présentent seulement 6 pattes, ce qui peut créer une confusion avec un insecte. Au stade nymphal, la tique est octopode comme l'imago, mais ne possède pas encore d'orifice génital.

rostre » d'une part et « brévirostre » d'autre part On se rend compte de l'importance de ce détail quand il s'agit de retirer une tique fixée. Sur le même registre que ce qui vient d'être présenté, quelques mots sur les moyens dont disposent les tiques pour assurer certaines des fonctions indispensables à tout être vivant.

Chez les *Ixodidae*, les yeux sont absents ; les *Amblyomidae* en possèdent, sauf dans le genre *Haemaphysalis*. Ces yeux très petits sont placés de chaque côté du dos au niveau de la deuxième paire de pattes. Ils ne sont peut-être pas très fonctionnels, c'est pourquoi les tiques de toutes espèces disposent d'autres moyens pour se diriger. L'un des organes des plus importants est certainement celui dit de « Haller ». Ce petit organe sensoriel est disposé au dos du tarse de la première paire de pattes et est certainement celui qui remplit le plus de fonctions. Il a été prouvé qu'une tique amputée de cet organe est totalement désorientée et ne sait éviter les pièges qui lui sont tendus.



Face ventrale d'*Ixodes ricinus*, montrant les soies sensorielles – photo Marcel Lecomte

Toutefois, les soies plus ou moins longues dispersées sur toutes les parties du corps ont aussi un rôle détecteur. Sensibles au dégagement de chaleur et surtout de CO₂, ces capteurs à des degrés divers, lui indiquent la proximité d'un hôte et l'orientent dans sa direction. Ils permettent aussi aux mâles de rejoindre les femelles.

La cadence de ponte est assez irrégulière : quelques oeufs un jour, le double ou le triple le lendemain et la durée est variable : 20 à 30 jours selon les genres concernés.

Bibliographie

NEVEU-LEMAIRE M., 1938 - Traité d'entomologie médicale et vétérinaire. Edit. Vigot frères, Paris, 1339 p.

PEREZ-EID CL., 2007 - Les tiques ; iden-

tification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Monographie de microbiologie. Tec. & Doc. Eminter, Lavoisier, 314 p.

RODHAIN F., WOEHL-KREMER B., PERRET C., WIEDERKEHR J.L., PEREZ C. & HANNOUN C., 1987 - Nouvelle observation d'encéphalite à tiques en Alsace, Médecine et Maladies infectieuses. Volume 17, issue 1 : 35-37

SENEVET G., 1937 – Ixodoidés. Faune de France n°32, Paul Le chevalier et fils, 101 p.

Tuber melanosporum, Naissance unique ou naissances multiples ?

Jean Demerson, Uzès, mars 2009

S'il y a un champignon qui mérite bien l'appellation de cryptogame (à la reproduction cachée), c'est bien la truffe. Sa vie souterraine, de son éclosion à sa maturité, nous est encore très mal connue. Il est vrai qu'il est bien difficile de suivre le développement de cet organisme hypogé dont les filaments mycéliens microscopiques sont pratiquement invisibles. Quelques curieux ont cependant, depuis longtemps, cherché à repérer la naissance des jeunes truffettes et à suivre leur évolution.

Selon le PR. CHATIN (1892) :

"Suivant la plupart des observateurs, savants et rabassiers, les truffes d'hiver commencent à se former en mai, pour continuer en juin-juillet-août, et même plus tard, les dernières formées paraissant répondre aux dernières mûres, soit aux récoltes de mars-avril....Le fait que l'absence de pluies en juillet-août est habituellement suivie d'une faible récolte l'hiver suivant, semble indiquer que c'est vers ces deux mois que se produirait la plus forte génération, ou tout au moins la principale évolution. L'utilité de quelques pluies en septembre-octobre est, en outre, généralement admise. On comprend l'effet favorable de ces pluies pour augmenter le volume des tubercules, peut-être aussi pour la production de fin d'hiver."

Plus tard, le DR. PRADEL, (1914) précise à propos du mycélium :

... Au cours de l'été, à la suite de pluies d'orage et dans un sol humecté, les ramifications s'agglutinent entre elles et donnent lieu à une sorte de feutrage ayant l'aspect d'un amas de cordons blanchâtres et très faciles à observer. C'est en général au mois de mai (à l'époque où l'arbre truffier est à peu près pourvu de son feuillage) qu'on rencontre ces feutrages,.... petites masses blanches et d'un centimètre et demi de diamètre d'autant plus visibles qu'elles tranchent sur la teinte brune des radicales où elle est placée. Si l'on observe ces feutrages quelques jours plus tard, on distingue d'imperceptibles renflements qui apparaissent disséminés à leur surface et se présentent sous la forme de corpuscules blancs, arrondis et de la grosseur d'un grain de mil. Ils ne tardent pas à prendre une teinte grisâtre dès qu'ils ont atteint un diamètre d'environ un millimètre. Dès ce moment il est manifeste que cet organisme de nouvelle formation est bien le point de départ de la truffe elle-même. De ces petites truffettes, très nombreuses lors de leur apparition, quelques-unes seulement persistent, les autres disparaissent."

Les travaux de CH. MONTANT, M. KULIFAJ ET R. GLEIZE (1983, 1984)

D'autres observations très instructives ont été effectuées par le Pr. Charles Montant et Michel Kulifaj en 1982 et 1983, dans des truffières de la Drôme appartenant à L. Fioc et à R. Gleize. Avec des techniques d'archéologues, en utilisant scalpels, tamis et pinceaux, ces scientifiques ont cherché à suivre entre juin et septembre l'évolution des ascocarpes par des prélèvements successifs de terre de brûlés productifs. De quelques milligrammes à la mi-juin, les truffettes déterrées atteignaient plusieurs dizaines de grammes à la mi-septembre, montrant une courbe de croissance d'allure exponentielle. (Voir tableau des résultats, dans la suite de l'article)

De ces différents constats, on a déduit, peut-être un peu trop rapidement, que les ascocarpes de *Tuber melanosporum* naissent vers le mois de mai, se développent très lentement en juin puis plus rapidement en juillet pour atteindre en août leur taille définitive, elle-même fonction des orages. En septembre-octobre, la gléba se colore, les spores se forment, les truffes mûrissent puis en novembre – décembre, avec les premiers froids, elles développent leurs qualités gustatives.

Les résultats de ces explorations méthodiques d'un sol truffier, qui ont mobilisé scientifiques et trufficulteurs une quinzaine de jours sur deux années, ont fait autorité et il est admis depuis que les truffes naissent en mai puis qu'elles évoluent plus ou moins lentement pour être mûres de novembre à mars.

Cette conclusion sur le cycle annuel de *Tuber melanosporum* ne colle pas avec de nombreuses observations de terrain qui conduisent à penser que plusieurs générations se succèdent du printemps à l'automne. Ainsi, lors des premiers cavages de novembre, il n'est pas rare de trouver un bébé-truffe, ressemblant davantage à une framboise qu'à un petit diamant noir.

Aimé Richaud¹³ s'étonne de caver vers le 15 mars des truffes en parfait état après un gel prolongé en décembre 2001, qui avait détruit tous les ascocarpes formés et se demande si les truffes ne pourraient pas naître, grossir et arriver à maturité en quelques semaines. Cet article a provoqué sur la publication suivante n°40, une intéressante réponse de J-M. Olivier qui propose différentes hypothèses explicatives de ce curieux phénomène.

En cette même fin d'année 2001, Michel Tournayre¹⁴ observe, à la mi-novembre puis à la mi-décembre, l'apparition de truffes de marque qui ne semblent pas avoir souffert du gel. À fin avril, en cherchant des blanches, il a cavé une belle noire, bien parfumée. De nombreux autres exemples confirment que *Tuber melanosporum* ne suit pas toujours le calendrier qu'on lui attribue.

L'échelonnement des récoltes : les volées

Faute de pouvoir examiner le début du cycle vital de la truffe, on ne peut qu'observer la fin c'est-à-dire la récolte. On constate qu'au cours d'une même campagne, les quantités cavées varient énormément d'une semaine à l'autre ce qui conduit à penser que la truffe, comme beaucoup d'autres champignons, fructifie par poussées successives que l'on appelle « volées ».

Ainsi pour le champignon cultivé *Agaricus bisporus*, on exploite les cinq à six premières volées qui se produisent à d'une dizaine de jours d'intervalle. Les quantités récoltées diminuant à chaque volée, on estime qu'au-delà, la production n'est plus rentable ; on remplace alors le compost et on renouvelle la culture. A noter que ce même champignon à l'état sauvage, le Rosé des prés, ne fournit qu'une à deux volées et parfois aucune car les conditions climatiques dans la nature (température, hygrométrie, atmosphère gazeuse) ne sont pas contrôlées comme dans les champignonnières ce qui rend les sorties aléatoires. Il en est de même pour chaque espèce fongique, mais le nombre de volées et l'intervalle entre elles sont très variables.

Les apports de truffes sur les marchés

Liodes cinnamomea, Coléoptère trufficole (photo trouvée sur le Net)

Les quantités de truffes négociées chaque semaine sur les marchés sont accessibles auprès du Service des Nouvelles du Marché (S.N.M.) via le Minitel ou Internet, mais les chiffres publiés par ce service ne reflètent qu'imparfaitement les quantités réellement produites. Le poids total des transactions est estimé et non mesuré, il est donc approximatif. Au moment des fêtes de fin d'année, beaucoup de ventes se font directement sans passer par les courtiers et ne sont donc pas comptabilisées. Le pic correspondant est donc réduit d'autant. Certaines perturbations climatiques comme le gel ou la neige, les dégâts dus aux sangliers, les perforations des ascocarpes par les *Liodes*¹⁵ font que beaucoup de truffes produites à certaines périodes ne peuvent être commercialisées et n'apparaissent pas dans la production. Malgré ces perturbations, les apports sur les marchés reflètent assez bien les variations des quantités produites au cours de la campagne.

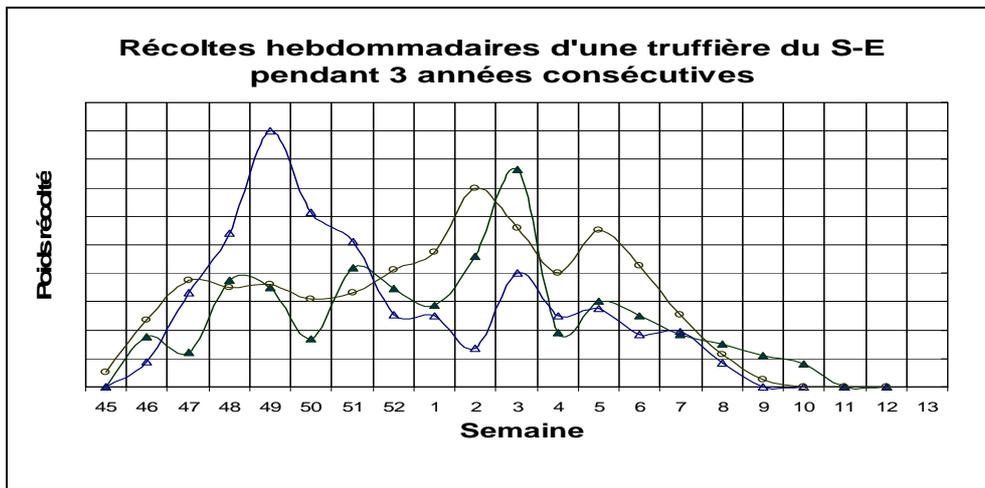


Le graphique ci-dessous représente quelques courbes lissées des ventes hebdomadaires de plusieurs années. Sur chaque courbe, on peut nettement distinguer trois, quatre ou même parfois cinq pics successifs, de hauteurs variables, et distants d'environ quatre semaines.

¹³ Dans le Trufficulteur n°39 (3ème trim. 2002) sous le titre « Une année trufficole invraisemblable »

¹⁴ le Trufficulteur n°38, 39 et 40

¹⁵ *Liodes cinnamomea* est un petit coléoptère très agile, de couleur cannelle, qui vit exclusivement dans les truffes

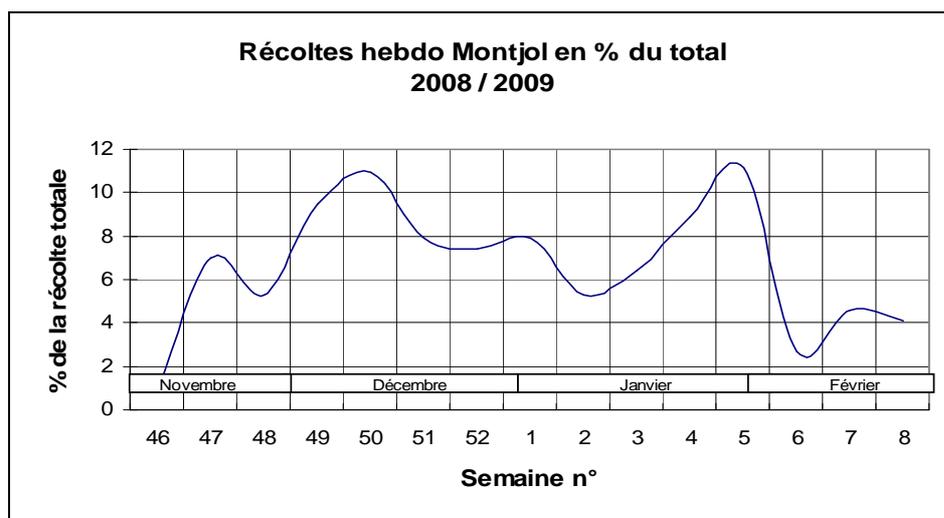


Synchronisme des pics de production

Pour beaucoup de trufficulteurs, ce synchronisme des poussées et leur écart assez régulier, de l'ordre d'un mois entre pics, seraient imputables à la lune, d'autant plus que l'expérience montre que c'est autour de la pleine lune que les récoltes sont les plus généreuses. La lune, à leurs yeux, aurait donc une influence déterminante sur la maturité des tubercules. Afin de le vérifier, pour une dizaine de campagnes, nous avons représenté les pleines lunes sur les graphiques des récoltes hebdomadaires et constaté que les pics se situent effectivement autour de la pleine lune, mais souvent une semaine avant ou une semaine après. La coïncidence n'est donc pas rigoureuse. Si notre satellite intervient dans le cycle vital de la truffe, ce n'est donc pas sur la maturation des ascocarpes mais peut-être beaucoup plus tôt, lors de l'induction fructifère et la naissance des primordiums. Cela reste cependant à confirmer !

Que peut-on déduire de ces courbes¹⁶ ?

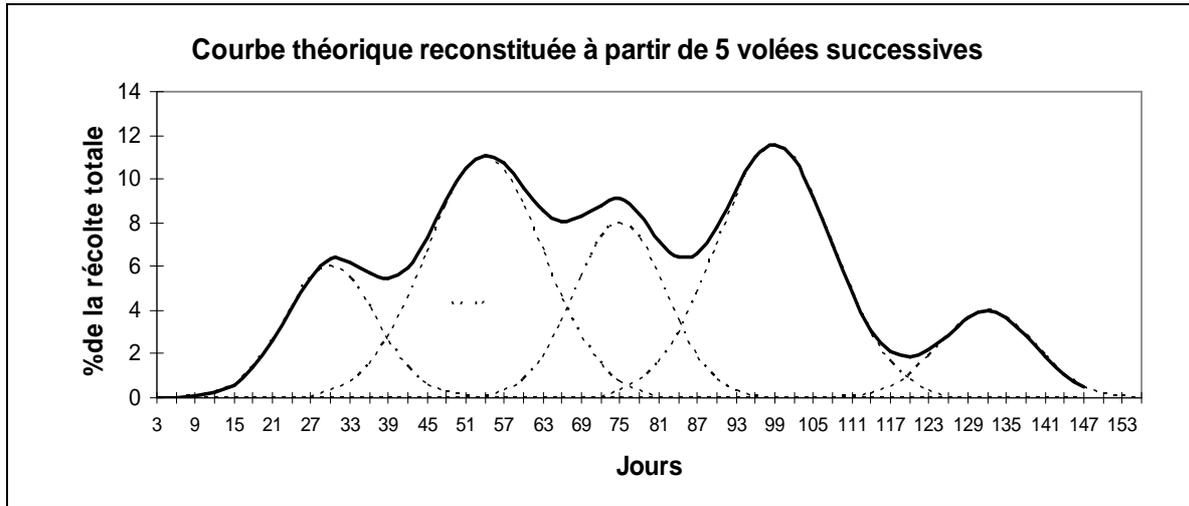
Au cours d'une même campagne, les pics des volées successives présentent une périodicité assez régulière mais leur hauteur proportionnelle à la quantité de truffes récoltées, est très variable comme on peut le constater sur le graphique ci-dessus. Certaines volées sont à peine ébauchées et n'apparaissent sur la courbe que sous forme d'une légère bosse. C'est généralement le cas de la première volée qui correspond aux truffes de marque que l'on repère après les orages en août ou septembre mais qui n'atteignent généralement pas la maturité. Quant à la dernière volée dont on arrête la récolte au 15 mars par tradition ou par réglementation, elle est généralement peu marquée.



¹⁶ Les lecteurs que les maths n'effraient pas pourront tracer les courbes de Gauss des différentes volées de leurs truffières

à partir de l'équation $y = h \times 2,72^{-\frac{x^2}{d}}$ ou en écriture Excel = h*2,72^(-(x^2)/d) où h = hauteur, d = largeur de la courbe. Je tiens à leur disposition la feuille de calcul Excel permettant d'obtenir la courbe des volées ci-dessus.

La courbe irrégulièrement ondulée qui représente les récoltes hebdomadaires de la campagne 08/09, est en réalité la résultante d'une série de courbes en cloche, dites courbes de Gauss, assez régulièrement décalées les unes par rapport aux autres qui figure chaque volée de production.



Cette forme de courbe en cloche se retrouve dans beaucoup de productions agricoles, en particulier les fruits ; la récolte de chaque variété apparaît sous forme d'une courbe de Gauss plus ou moins décalée dans le temps en fonction de sa période de maturité, tandis que le total des apports apparaît sous forme d'une courbe sinuée, semblable à celle que l'on obtient pour les récoltes de truffes et facilement décomposable en une série de courbes de Gauss comme représenté ci-dessus.

Pour les truffes, les dérèglements climatiques déjà mentionnés qui perturbent leur développement ou gênent leur cavage, font que les courbes de récoltes présentent souvent des irrégularités dans leur ondulation.

Chaque volée de truffes correspond-elle à une variété différente comme pour les fruits ?

Jusqu'ici, aucune différence morphologique n'a été remarquée entre les ascocarpes des différentes volées d'un même brûlé. On sait seulement que les générations tardives sont plus parfumées que les hâtives, qualité que l'on attribue à l'effet du froid. On peut toutefois se demander s'il n'y aurait pas de légères différences génétiques entre les volées successives qui seraient responsables des qualités organoleptiques.

Laissons le soin à nos chercheurs spécialistes de l'ADN de voir si les génomes des différentes volées sont identiques et de repérer le gène responsable de l'arôme pour répondre à cette question.

L'induction fructifère

Puisque la truffe, comme la plupart des champignons, fructifie par volées successives, il reste à savoir s'il ne se produit qu'une seule induction fructifère vers fin avril/début mai, à l'origine de toutes les générations ou bien si chaque volée a sa propre naissance, décalée des autres d'un délai de l'ordre de quatre semaines.

Cette seconde hypothèse paraît beaucoup plus vraisemblable. On peut logiquement penser que chaque volée a sa propre initiation et que les fructifications se succèdent à la même cadence. La durée d'un cycle de *Tuber melanosporum* serait de cinq à six mois et non pas de neuf comme certains le croient.

Schéma théorique des volées de <i>Tuber melanosporum</i>													
	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avr.	
Volées	Naissances						Récoltes						
1ère	●						→	→	→	→			
2ème		●					→	→	→	→			
3ème			●				→	→	→	→			
4ème				●			→	→	→	→			
5ème					●		→	→	→	→			
6ème						●	→	→	→	→	→		

Commentaires sur ce schéma théorique

Ce sont peut-être les orages de la mi-juillet et de la mi-août, tant attendus par les « truffeurs », qui, en créant un choc hydrique ou thermique, favorisent l'induction fructifère des volées qui seront récoltées en janvier ou février. En attribuant à la foudre la formation des truffes, Pline l'Ancien avait peut-être raison !

Chaque année, certaines volées manquent, soit parce que les naissances ne sont pas produites soit parce que les primordiums ont avorté (sécheresse, excès d'eau,...) ou ont été dévorés par la mésofaune, très active au printemps et à l'automne. Les truffes de marque, visibles dès le mois de septembre après les averses, proviennent sans doute de la première volée. Elles sont très vulnérables et pourrissent en général avant d'atteindre la maturité, attaquées par les levures et bactéries qui sont très virulentes lorsque le sol est chaud. Comme l'a observé Ferry de la Bellone, le froid favorise la maturité des tubercules.

Conséquences pour la trufficulture de la fructification par volées successives

En général, dans une même truffière au cours de l'été et de l'automne, plusieurs générations de truffes coexistent à des stades d'évolution différents. Une pluie ou un arrosage peut avoir un effet bénéfique sur l'une des générations présentes mais néfaste sur une autre. En cas de sécheresse prolongée, les jeunes truffettes sont certainement plus vulnérables que les gros ascocarpes déjà protégés par leur périidium. La jeune génération risque d'être décimée, tandis que la précédente peut être peu touchée. Une longue période gélive peut être catastrophique pour les ascocarpes formés sans altérer la génération suivante, comme l'ont montré différentes observations.

C'est pourquoi les études de corrélations pluies/récolte globale de la campagne que nous sommes nombreux à avoir réalisées, n'ont que peu d'intérêt pratique. Elles seraient beaucoup plus riches d'enseignements si elles étaient faites pour chaque volée de production. Nous pourrions alors comprendre pourquoi telle volée disparaît, telle autre donne des truffes petites, boisées ou peu parfumées... mais nous manquons de données précises sur les récoltes hebdomadaires et les données climatiques concomitantes pendant plusieurs années pour établir ces corrélations.

Commentaires sur l'étude de CH.MONTANT ET M.KULIFAJ (1984)

L'hypothèse d'une succession de quatre à six générations d'ascocarpes suggérée ci-dessus semble en total désaccord avec les observations effectuées in situ par ces chercheurs. Il est surprenant que deux générations distinctes n'apparaissent qu'en 1982 et pas en 1983 comme on le constate sur le tableau joint donnant le poids des truffettes récoltées en fonction du temps. Le climat du printemps et de l'été 83 en serait-il responsable ?

Tableau : Récapitulation des récoltes de Truffes sur deux campagnes 1982/1983 montrant l'évolution des poids (en mg) au cours du temps

	1982	1983
17 juin		2,8 – 4,9 – 7,9 – 1,7
24 juin	38,7 - 41	
28 juin		10
7 juillet	27 – 30,4 – 213 – 455 - 673	60 – 68 – 89 – 110 – 120 – 129,5 – 154 – 208
12 juillet		– 237 – 252,3 – 308 - 578
26 juillet		342 – 756 – 1010
28 juillet	367,6 – 1.812,8	
14 août	1800 – 3175	
16 août		1120 – 5340
9 septembre	39600	
13 septembre		8205 - 15635
15 septembre	31000 - 55500	

Nous avons donc recherché les données climatiques pour les deux années de l'étude. En 1983, dans le sud de la Drôme, le printemps a été particulièrement sec : 52 mm de pluie en avril, 49 en mai et 4 en juin à Montségur-sur-Lauzon, suivi d'une vague de chaleur en juillet. Même au niveau national, la production de l'année 1983 a été très faible : 31 tonnes au lieu de 64 en 1982. On peut donc penser que cette année-là, certaines générations ne sont pas nées ou ont rapidement disparu en raison des mauvaises conditions climatiques.

Ces scientifiques n'ont pas eu de chance d'effectuer cet important travail au cours d'une année qui s'est avérée particulièrement sèche et mauvaise pour la trufficulture. Il est vraisemblable que, réalisées au cours d'une année plus "normale" que 1983, les extractions auraient montré la coexistence de plusieurs générations de truffettes et orienté les chercheurs vers l'hypothèse de naissances successives.

Conclusion

Les différentes observations présentées dans ce papier soulignent bien la difficulté du métier de trufficulteur. Jusqu'au moment de la récolte, contrairement au jardinier, à l'agriculteur ou l'arboriculteur, il n'a aucune information sur l'existence même de sa culture, sur ses besoins, sur son état de santé. La présence simultanée de plusieurs générations à des niveaux de développement différents complique le problème car toute intervention qui est bonne pour l'une est peut-être nuisible pour une autre.

Les champignonnistes ont bien de la chance de pouvoir récolter jusqu'à six volées en maîtrisant la température, l'humidité et l'oxygène dans leurs carrières alors que dans les prés, le même Rosé ne donne le plus souvent qu'une seule sortie.

Quand *Tuber melanosporum* acceptera-t-il de se passer de son arbre symbionte pour se laisser cultiver en cave et fructifier tout au long de l'année comme *Agaricus bisporus* ? Ce n'est sans doute pas encore pour demain et c'est tant mieux, car le métier y perdrait beaucoup de sa passion !

Bibliographie

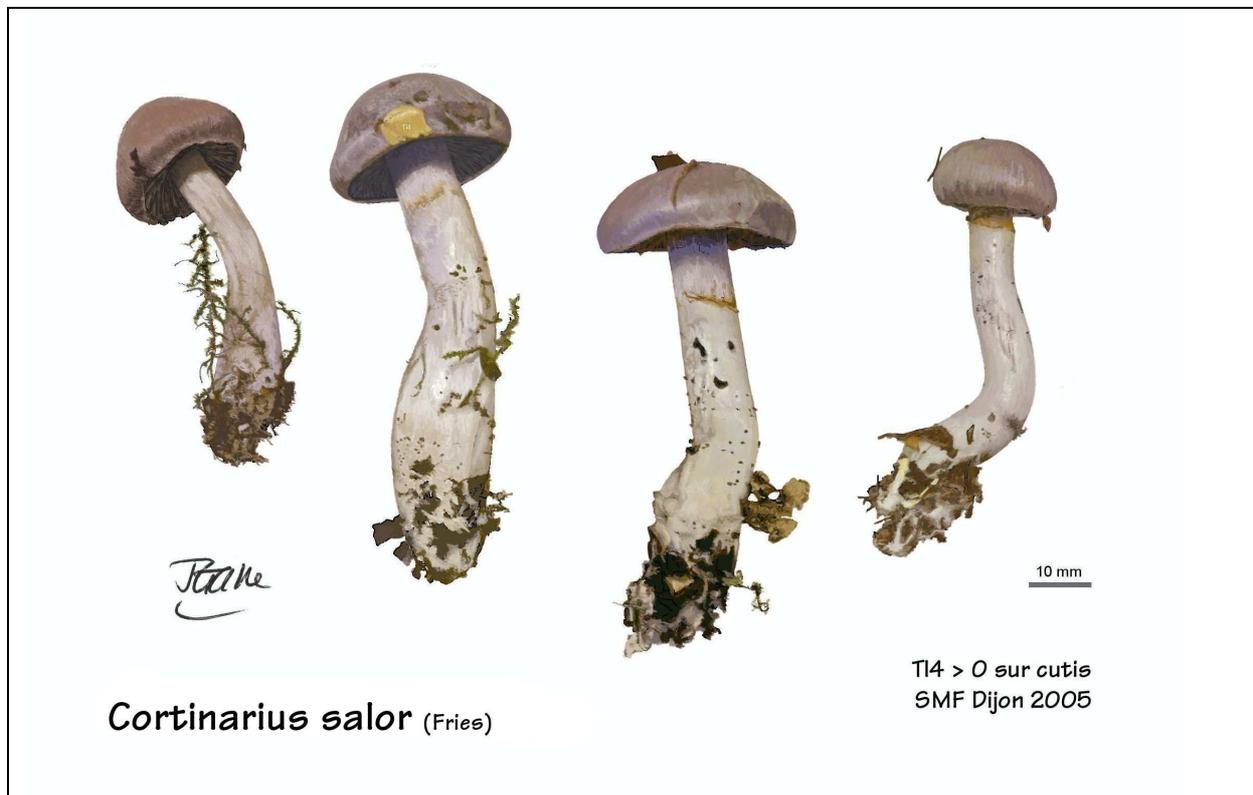
CHATIN PR., 1892 - La Truffe, éditeur inconnu : 145

MONTANT C., KULIFAJ M., GLEIZE R., 1983 - Pourquoi étudier la fructification de *Tuber melanosporum*. Bulletin FNTP, 6 : 9-15

MONTANT C., KULIFAJ M., 1984 - Structure et évolution de l'ascocarpe de *Tuber melanosporum* Vitt. Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. III : 299-315

PRADEL DR., 1914 - Manuel de Trufficulture. Editions Baillière & Fils : 17

Nos artistes sont à l'œuvre : *Cortinarius salor* – dessin électronique de Jacques Gane



Lactarius fraxineus Romagnesi **une espèce moins rare qu'on ne le suppose !**

Marcel Lecomte & Jean-Pierre Legros¹⁷

La 1^{ère} quinzaine de septembre a connu, en 2010, une poussée exceptionnelle dans les zones calcaires de Wallonie. Le hasard faisant merveilleusement bien les choses, nous avons choisi d'y organiser à Massembré le congrès des Russulales durant cette période, avec la participation de tous les spécialistes européens des lactaires.

René Chalange nous avait déjà mis en appétit en apportant une imposante collection, originaire de la région parisienne, de ce qu'il détermine comme *L. fraxineus*. Puis, à quelques kilomètres du lieu du congrès, Philippe Cerclay a découvert un biotope très riche qui a fourni plusieurs dizaines d'exemplaires de cette même espèce.



Collection de *Lactarius fraxineus* de la région parisienne (photo R. Chalange)

DESCRIPTION macroscopique

Chapeau : (30-85 mm), convexe au début puis plan-déprimé ; cuticule rouge-brun, finement ruguleuse, grasse, **visqueuse** (rappelant *Lactarius hygginus*), çà et là guttulée, avec des zonations plus ou moins marquées, plus présentes vers la marge et au centre de la dépression où se lit une sorte d'ocelle plus sombre.

Lames : adnées-décurrentes, assez serrées, brunâtres pâles, fourchues et parfois crispées-anastomosées près du stipe.

Stipe : (20-60 mm) cylindrique, atténué en bas ou, au contraire, légèrement dilaté ; gras, **visqueux** au point de glisser sous les doigts ; toujours **creux**, concolore au chapeau, pourvu de scrobicules plus volontiers situées dans le bas ; les pieds sont fréquemment **connés** par deux, et parfois même **cespiteux**.

Chair : moyennement ferme, concolore, un peu plus rouge vers le bas et à l'intérieur de la cavité du stipe ; lait blanc se tachant de gris-vert selon R. Chalange, car nous ne l'avons pas observé ; saveur

¹⁷ jeanpierrelegros@base.be

distinctement âcre ; à peu près inodore, mais sur des spécimens très imbus ; dans des conditions hygrométriques normales, odeur bien marquée de *Lactarius quietus* mêlée à celle de *Lactarius hysginus* ; c'était particulièrement évident sur les exemplaires français.



Collection de *Lactarius fraxineus* de Heer-sur-Meuse, 12/09/2010 (photo J.P. Legros)

Habitat : Sur sol frais, en ronds de sorcières à proximité de *Quercus* avec lequel il semble associé et non loin de *Corylus* et d'*Acer*, en compagnie de *Lactarius chrysorrheus*, *Lactarius subumbonatus* et *Russula luteotacta* ; 12/09/2010, Heer-sur-Meuse ; legavit P. Cerclay, déterminavit R. Chalange, collection présentée aux « Journées des Russulales » organisées à Masseur du 7 au 12 septembre 2010 (herbier J.P.L. 2010006 & M.L. 201009001 & A.M.F.B.).

MICROSCOPIE

Spores : 6,0-7,0 x 5,0-6,0, réticulées à subréticulées, bassement ailées)
Basides : 41-46 µm de long, avec stérigmates de 3-4 µm



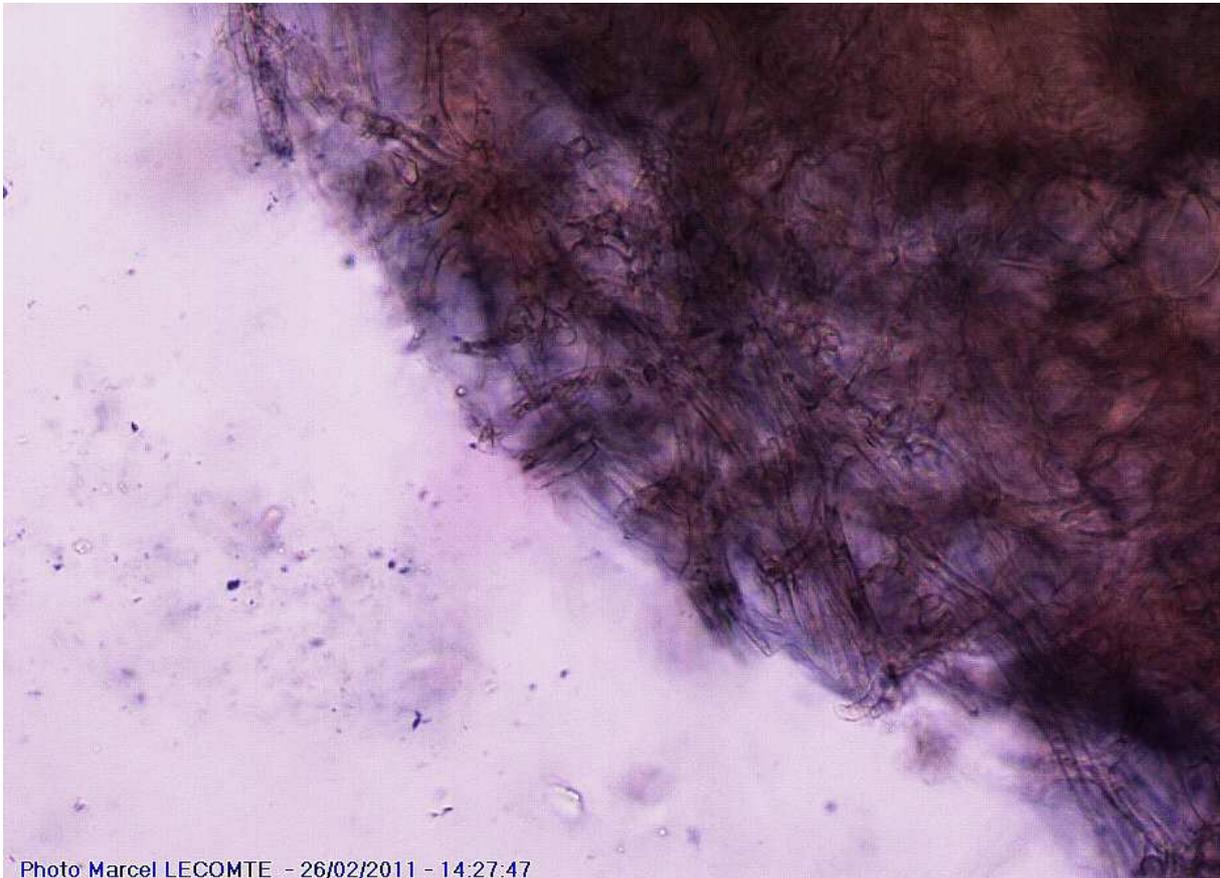
Basides et cystides, observées dans le rouge Congo SDS
(photos M. Lecomte)





Macrocheilocystide – A gauche, observation en lumière classique, avec coloration au rouge Congo SDS – A droite, la même vue en DIC (contraste interférentiel de Nomarski) (photos M. Lecomte – Zeiss planapo 63x, 1,40)

Macrocytides : allongées-clavées et apointées-mucronées, contenant une masse réfringente importante ; 72-78 μm de long



Cuticule nettement gélifiée, de type ixocutis, composée d'hyphes filamenteuses, assez espacées et entremêlées, à extrémité arrondie, sans caractères particuliers. Nous n'avons pas observé de pigments intra-cellulaires ; quelques traces de granulations incrustantes membranaires, peu visibles, mises en évidence à la fuchsine de Ziehl.

Autres RECOLTES de REFERENCE

= Paul Pirot, France ; leg. Maxime Chiaffi, forêt de Gemme (Vendée), sous *Corylus* et *Clematis alba*, 04/06/2003

= Leg. Françoise Draye, Citadelle de Namur, sous *Quercus* & *Fagus*, 05/07/2003



Autre collection de *Lactarius fraxineus* de Heer-sur-Meuse, 13/09/2010, avec stipes remarquablement connés (photo J.P. Legros)

= Camille et Gaby Mertens : Barvaux-sur-Ourthe, en bordure de chemin humide, sous feuillus avec notamment *Betula* ; 27/09/2006. Merlemont, = Leg. Francis Farcy, 1 exemplaire sous feuillus mêlés (*Carpinus*, *Quercus* et *Populus tremula*) : pas de *Fraxinus excelsior* à proximité, même lointaine ; en bord de route dans une berme amendée fréquemment par dans entretiens réguliers ; 15/09/2008

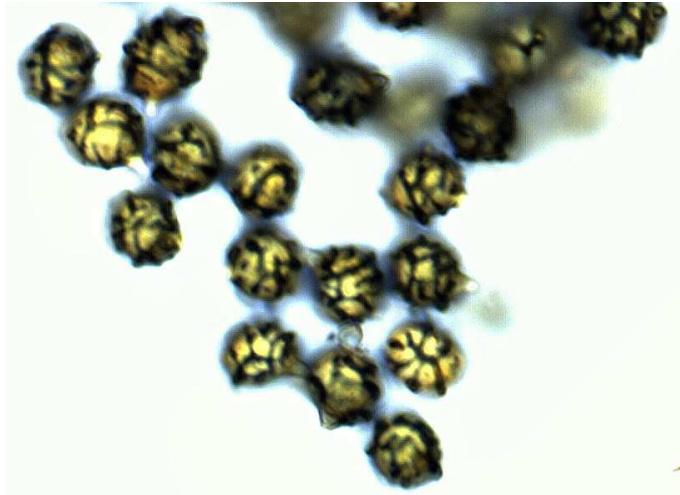
Spores observées dans le réactif de Melzer)
- exemplaires récoltés à Heer-sur-Meuse

= Leg. Dominique Schott, forêt de Haguenau (Alsace, France), 12/10/2008

= Leg. Patrice Tanchaud (Sud de la France) : chapeau 5 cm ; odeur fruitée ; lait âcre, abondant, blanc immuable sur le mouchoir, légèrement olivâtre sur les lames ; 12/06/2008 & 13/06/2010

= Leg. René Chalange, forêt de Sénart (Essonne), France, sous feuillus (charmes, chênes, peupliers, ..) en terrain argileux ou argilo-calcaire ; une douzaine d'exemplaires ; 07/09/2010

= Leg. Marie-Paule Vigneron, forêt de Villefermoy (Seine et Marne), France, terrain argilo-calcaire ; une douzaine d'exemplaires ; 07/09/2010



COMMENTAIRES

Absent de la plupart des ouvrages généraux et même spécialisés dans ce genre, cette espèce semble rare. Camille Mertens, qui l'avait récoltée à Barvaux sur Ourthe, l'avait apportée à Herbeumont où s'est tenue la session 2006 du Congrès de la SMF.

Lactarius fraxineus, créé par HENRI ROMAGNESI (1964 - voir la diagnose ci-dessous) fut probablement mal nommé puisque *Fraxinus excelsior* ne développe pas de mycorhizes (com. pers. de René Chalange). Selon J.P. Maurice, il faut distinguer les ectomycorhizes¹⁸ des endomycorhizes¹⁹. Les frênes ne développent pas d'ectomycorhizes (comme le tilleul et l'if), et que dès lors l'apparition de champignons serait impossible par ce biais. La référence à *F. excelsior* n'est cependant pas tout à fait fortuite car le taxon affectionne les lieux humides où se retrouve volontiers le frêne. Cependant, il n'est pas

¹⁸ Les **ectomycorhizes** sont des associations fréquentes entre les arbres des régions tempérées (comme les Fagacées, les Pinacées ou les Bétulacées) et des champignons comme les Ascomycètes, les Basidiomycètes ou les Zygomycètes. Le champignon s'associe d'abord aux racines fines à croissance déterminée, dépourvues de poils absorbants. Puis, il enveloppe la racine d'un manteau d'hyphes, appelé « manchon mycorhizien ». D'autres hyphes croissent entre les cellules dans la partie externe du parenchyme cortical, formant ainsi l'interface symbiotique ou « réseau de Hartig ». La symbiose modifie la physiologie de la racine mycorhizée : elle se renfle, cesse de croître et peut se ramifier de façon abondante. Les ectomycorhizes ne pénètrent pas à l'intérieur des cellules de la plante, mais entourent simplement les racines, formant un manteau de mycélium et un réseau entre les parois des cellules de la racine.

¹⁹ Les **endomycorhizes** arbusculaires (aussi appelées mycorhizes à vésicules et arbuscules) sont associées avec les plantes herbacées et ligneuses. Elles tirent leur nom des structures formées à l'intérieur des cellules rappelant un petit arbre. Les hyphes traversent la paroi cellulaire, mais ne pénètrent cependant pas la membrane plasmique de la cellule végétale, provoquant une invagination de la membrane de celle-ci. Cela a pour effet d'accroître la surface de contact entre l'hyphes et la cellule de la plante et ainsi faciliter les échanges entre les deux partenaires. Ce type de mycorhize est formé uniquement par des champignons de la division des Gloméromycètes.

tributaire des lieux humides, car on le trouve aussi dans des zones plus sèches. Pour ce qui concerne notre collection, le frêne le plus proche se trouvait à plus de vingt mètres, ce qui exclut toute association directe avec nos champignons.

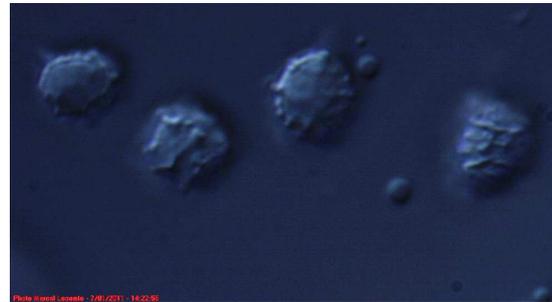
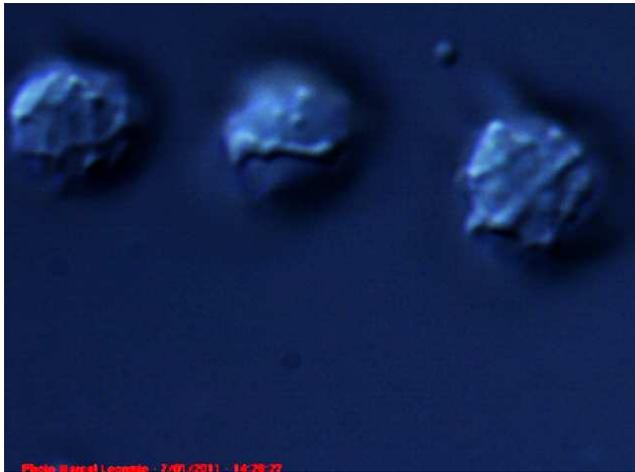
Sur le terrain, ce lactaire est probablement souvent confondu avec *L. quietus* avec lequel il partage plusieurs points communs, comme l'odeur de lierre ou de lessive chaude (même si parfois, elle est assez faible), la présence fréquente d'un « bec de lièvre » sur le bord du chapeau.

Un examen attentif dissipe pourtant toute confusion possible. D'abord et surtout, le chapeau et le stipe de *Lactarius fraxineus* sont visqueux, gras et collants, alors que *L. quietus* est tout à fait sec.

Ensuite, le stipe de ce dernier s'assombrit nettement vers le bas alors qu'ici il est de teinte uniforme. Encore, jusqu'à preuve du contraire, *L. quietus* n'est pas cespiteux cependant que notre espèce présentait cet aspect tant sur la récolte de Massembre que sur les exemplaires de France.

R. Chalange trouve cette espèce dans la forêt de Sénart depuis belle lurette et ce, sur plusieurs stations. Originalité de cette année, les spécimens y avaient poussés en groupes cespiteux de 7 ou 8, à raison de plusieurs "touffes" sur quelques mètres carrés.

Cette année, les exemplaires de la forêt de Villefermoy étaient également cespiteux ; R. Chalange connaît cet endroit depuis longtemps : la photo et la description de l'espèce, qui figurent dans la monographie de Maria Teresa Basso, sont relatives à l'une de ces récoltes ; on trouve souvent l'espèce dans les allées vertes de la forêt, bordées des mêmes arbres qu'à Sénart.



Spores observées en DIC (Zeiss, 100x, 1,30 Neofluar)

DIAGNOSE :

Pileo (3)-5-6,7 cm lato, cyathiformi vel alte infundibuliformi, saepe margine undata, involuta, e rufulo brunneo, in mentem L. quietum multum revocante, obscure zonato, obnubilo, udo, nec glutinoso. Stipite 2-3 x 1-1,7 cm, saepe deorsum attenuato, mox partim vel toto cavo, concolore, levi, pruinoso, circulo albido sub lamellis, raro maculato. Carne crassa, firma, rufula. Odore debili, haud ingrato. Lacte albo, paulum acri, ope KOH non flavesciente. Lamellis stipatis, sed crassiusculis, inaequalibus, saepe furcatis vel inter se connatis prope stipitem, longe decurrentibus, falciformibus, (2,5)-4-5 mm. latis, cremeis, vulneratis e griseo-olivaceis ope lactis. Sporis pallide cremeis. - Sporis 6,5-7,2 x 5,2-5,7 μ , globosis, cristatis reticulatis. Cystidiis fusiformibus, ope SV caerulescentibus, 65-75 x 7-11,5 μ . Cute filamentosa, parum gelata, sine pigmento extracellulari.

Sur Fraxino excelsiore, aestate. - Typus in Herb. Romagnesi, quod tradetur ad Museum Hist. Nat. Paris, n° 62.74.

Description de sa récolte, par P. Tanchaud²⁰:

Chapeau : diamètre 3,8 à 5 cm ; aspect humide et collant (comme les *Pyrogalini*) ; couleur brun rougeâtre vaguement zoné et givré ; forme irrégulière avec aspect « bec de lièvre », rappelant un peu *L. quietus* ; bordure peu régulière.

Lames : régulièrement fourchues-anastomosées près de l'attache au stipe ; présence de lamelles et de lamellules ; couleur carnée devenant orangée avec l'âge. Chair couleur blanc crème, immuable à l'air.

²⁰ Mycologue français : patrice.tanchaud@gmail.com



Montage photo de Patrice Tanchaud

Pied : cylindrique, 2,6 cm de long, rose carné dans la zone d'attache avec le chapeau et devenant brun sale vers la base qui est appointie, uni, concolore au chapeau avec zone blanche au sommet sous les lames.

Ecologie : arbres aux alentours dans un rayon de 10m : chêne, acacias, frênes, châtaigniers et noisetiers.

Lait : blanc abondant, âcre, immuable sur mouchoir, olivâtre grisâtre sur les lames. Odeur fruitée.

Microscopie : spores mesurées dans l'eau 6-7,5(8) x 5-6 µm ; basides 4-sporiques.

RÉGIS COURTECUISSÉ (1994) le range juste à côté de *L. trivialis*.

HEILMANN-CLAUSEN et al. (1998) ne le mentionnent pas dans leur monographie.

Bibliographie

BASSO M.T., 1999 - *Lactarius* Pers. Volume n°7 de Fungi Europaei, Alassio, Mykof Iora, : 103-107

COURTECUISSÉ R., 1994 - Les champignons de France. Ecléctis, n° 1547 : 338

Heilmann-Clausen J., Verbeken M., Vesterholt J., 1998 - The Genus *Lactarius*. Fungi of northern Europe, vol. 2

ROMAGNESI H., « 1963 », publ. 1964 – Une espèce nouvelle de lactaire : *Lactarius fraxineus*. Bull. trim. Soc. mycol. France 79 (4) : 471-475.

VERBEKEN A., FRAITURE A. & WALLEYN R., 2007 – *Lactarius hysginus* en *L. fraxineus* in België (Bijdragen tot de kennis van het genus *Lactarius* in België. (11), *Sterbeeckia* 27 : 43-48.

Lactarius tristis : mythe ou réalité ?

Marcel Lecomte, avec la collaboration de Jean-Louis Cheype²¹

Il y a nombre d'années déjà, nous avons eu l'occasion de discuter avec Jean-Louis Cheype d'une de ses trouvailles, qu'il avait appelée *Lactarius tristis*. Elle avait été présentée à une réunion de la F.M.B.D.S. à laquelle assistait Pierre Arthur Moreau, qui l'avait tout de suite reconnue, l'ayant déjà récoltée lui-même.

Suite à cela, nous avons pris contact avec P.A.M., notre référence en matière de systématique des lactaires. Voici sa réponse :

« Je connais ce champignon depuis très (très) longtemps, et je l'appelais aussi *L. tristis*, d'après Bon et Blum. Pour moi, c'est une espèce acidophile liée aux hêtres en milieu humide, typiquement sur les talus. J'ai longtemps pensé à l'appeler *blennius* ou *fluens* ; le 1er à cause des spores, mais la viscosité était trop faible ; le second à cause de la viscosité faible, mais ni la couleur ni la micro ne correspondent... Bref, rien ne marchait ! Toutefois les différences sont maigres pour le différencier de *blennius* d'après mes observations micro ; le seul caractère utilisable était l'épaisseur du gélín, mais que faire en cas de sécheresse ?... »

Je connais deux stations de *L. tristis* :

- dans le Cantal, en fond de vallon le long d'une rivière, sous *Fagus*, alt. 700 m.
- en Savoie, à La Motte-Servolex, sous *Fagus*, dans un parc municipal, alt. 380 m.

Ce n'est pas une espèce montagnarde, peut-être un peu continentale, mais j'en doute. Je pense qu'elle doit se trouver dans toute l'aire du hêtre, en cherchant bien. En tout cas elle est peut-être localisée à peu de stations par rapport à *blennius*, mais elle est sûrement largement répandue.

Je ne l'ai jamais vu à Vallandry, mais nous avons très peu de hêtres. »

Voici également les commentaires qui nous avaient été transmis par J.L. Cheype :

« J'ai le sentiment qu'il s'agit d'une espèce à réhabiliter. Blum la définit comme une espèce ayant le port d'un vietus avec les couleurs d'un *blennius* très délavé. Récolte du 10/10/2003 à Sous-le-Saix (Passy) (MEN 3530D), sur sol argileux sous *Salix caprea*, avec *Fagus* à proximité, au bord d'un chemin très humide.

Chapeau gris-verdâtre à marge plus pâle, peu visqueux, zoné, avec au centre avec un petit mamelon aigu. Lames serrées blanchâtres ; lait blanc devenant gris vert. Pileipellis avec hyphes à pigment incrustant zébrant et en plaques. Spores sub-globuleuses : 7-8 x 6-6,5 μm , bassement créées.

Je pense que cette espèce n'est pas rare et on la classe le plus souvent comme un *L. blennius* « mal foutu », malgré la cuticule beaucoup trop sèche. »



N'ayant jamais rencontré ce champignon, nous prenons contact avec notre ami Paul Pirot, remarquable mycologue de terrain, passionné du genre *Lactarius*, qui déclare n'avoir jamais vu non plus cette espèce, bien qu'ayant bourlingué partout en France et en Belgique, avec les sommités de la mycologie.

²¹ jean-louis.cheype@orange.fr

Un coup d'œil rapide dans les monographies de M.T. BASSO (1999), HEILMANN-CLAUSEN et al. (1998), ne m'apprend rien de plus sur le sujet. Pas de traces non plus dans les « bibles » de A. MARCHAND (1980), R. COURTECUISSÉ (1986, 2000) et M. BON (1988).

Il va me falloir fouiller dans la « Clé monographique du genre *Lactarius* », de M. BON (1980 - voir extrait de la clé ci-dessous), pour enfin retrouver sa trace, ainsi que dans « Les lactaires » de BLUM (1976). Suite à cela, le scepticisme s'installe et ce nom va quitter notre esprit peu à peu, oubliant même de nous intéresser aux *blennius* un peu bizarres.

b) Chapeau gris blanchâtre, livide à isabelle rosâtre avec reflets verdâtres, humide non visqueux, comme un *L. blennius* desséché ou décoloré. Lames blanchâtres à fauve roussâtre puis tachée de gris vert. Stipe allongé, jaunâtre. Chair âcre, inodore. Spores comme *L. vietus* ou un peu plus allongées, 9(10) x 6-7 µm à crêtes et épines un peu plus épaisses et réticule presque complet - Feuillus, charmes (B1.184 - Ico.: Cke.1009=1085-B, Kb.40:26-29). *L. TRISTIS* (Kb) ss. Blum (Nb. à chapeau plus sombre, subvelouté cf. *L. umbrinus* ; *Floccosi* § 3 a)

Et puis, le 19/10/2007, lors du congrès de la Société Mycologique de Strasbourg, à Lucelle (F-68480), en France, à la frontière du Jura suisse, une série de lactaires bizarres sont soumis à Paul Herzog qui, sans hésitation, annonce : *Lactarius tristis*. S'ensuit une discussion très constructive qui nous amène à la conclusion suivante : « enfin, nous avons en main cette espèce qualifiée de fantomatique ! ».

Lactarius tristis, Lucelle, 2007, photo Marcel Lecomte

Et en effet, cela ressemble vraiment beaucoup à *L. blennius* ou à *L. vietus*, surtout avec la cuticule humide.

S'ensuit un examen attentif : exemplaires de taille moyenne, de 5 à 8 cm de diamètre, chapeau avec des nuances gris vert à dominante rosâtre, et de vagues cernes incomplets, nettement creusé au centre. Cuticule un peu brillante, collante aux lèvres, d'apparence humide, mais non réellement visqueuse.



Lames blanchâtres, moyennement serrées, devenant vite rose chair, avec lamelles et lamellules.

Lait âcre, blanc à l'émergence, mais séchant en perles gris verdâtre. Chair blanche, ferme, âcre, inodore. Pied cylindrique, concolore aux lames. Récolte réalisée sous *Fagus*, en terrain lourd et pentu.

Les photos présentées dans cet article n'ont pas été réalisées in situ, à Lucelle.

Lactarius tristis, Lucelle, 2007, photo André Février

Commentaires :

Lorsqu'on a pu manipuler ce champignon, il apparaît comme une évidence qu'il s'agit

d'une espèce à part entière, ni tout à fait *blennius*, ni tout à fait *vietus*.

Bibliographie

BASSO M.T., 1999 - *Lactarius* Pers. Volume n°7 de Fungi Europaei, Alassio, Mykof Iora, : 723-735

BLUM J., 1976 - Etudes Mycologiques III : Les Lactaires. France, Lechevalier : 73-87 et 96-97

BON M., 1988 - Champignons d'Europe occidentale. France, Arthaud : 94-95

BON M., 1980 - Documents Mycologiques : Clé Monographique du Genre *Lactarius*. France, tome 10, fascicule 40 : 13-15

COOKE, planches 1009 - 1085B

COURTECUISSE R., 1986 - Clé de détermination macroscopique des champignons supérieurs des régions du Nord de la France. Société Mycologique du Nord : 160

COURTECUISSE R., DUHEM B., 1994 - Guide des champignons de France et d'Europe. Lausanne, Delachaux & Niestlé : 398-399

COURTECUISSE R., 2000, - Photo-Guide des Champignons d'Europe. Lausanne, Delachaux et Niestlé : 792, n°817

HEILMANN-CLAUSEN J., VERBEKEN A. & VESTERHOLT J., 1998 - The Genus *Lactarius*. Fungi of Northern Europe, Vol. 2 : 248-251

KROMBOLZ, - Atlas t. 40, fig. 26-29

KÜHNER R. & ROMAGNESI H., 1953, reprint 1984 - Flore Analytique des Champignons Supérieurs. France, Masson : 473

LANGE J.E., 1994 - Flora Agaricina Danica. Italie, volume 2 : 534, planche 171

MARCHAND A., 1980 - Champignons du Nord et du Midi. France, SMPM, tome 6 : 6-11

Nos artistes sont à l'œuvre : *Cortinarius obsoletus* — dessin électronique de Jacques Gane



ETALONS CHIMIQUES proposés par Marcel LOCQUIN²² pour les odeurs fongiques

Odeur reconnue	étalon chimique	Espèce
fruitée à dominante de poire	essence de bergamote	<i>Inocybe bongardii</i>
fruitée à dominante de rose	alcool phényl-éthylque	<i>Russula risigallina</i>
fruitée à dominante de lavande	linalol levogyre	<i>Hygrophorus pudorinus</i>
fruitée à dominante d'orange	β méthyl naphtyl cétone	<i>Hebeloma sacchariolens</i>
fruitée à dominante de jasmin	jasmane + acétate de benzyle	<i>Inocybe corydalina</i>
fruitée à dominante de violette – iris	ionone	<i>Lepista irina</i>
bonbons anglais	acétate d'amyle	<i>Russula atrorubens</i>
réglisse	catéchine	<i>Bankera fuligineo-alba</i>
vanille	cinnamate de cinnamyle, vanillal	<i>Pseudocraterellus undulatus</i>
coumarine	coumarone	<i>Tricholoma caligatum</i>
noix de coco	trilauryl glycéride	<i>Lactarius glyciosmus</i>
cannelle	aldéhyde cinnamique	<i>Pholiota apicrea</i>
anis	anéthol + fanon + safrol + estragol	<i>Clitocybe odora</i>
fruitée acidulée	acide acétique dilué + acétate d'amyle	<i>Lactarius citriolens</i>
de chewing gum	acétate d'amyle + traces de cadinène	<i>Entoloma pleopodium</i>
médicamenteuse	salicylate de méthyle + aldéhyde salicylique + traces de cadinène	<i>Sistostrema confluens</i>
cyanique	aldéhyde benzoïque + cyanure de K	<i>Clitocybe nebularis</i>
miel	paraméthylquinoléine	<i>Inocybe cookei</i>
pain d'épices	diméthylhydroquinone	<i>Russula melliolens</i>
cire	acide phénylacétique	<i>Lactarius hygginus</i>
thérébentine	pinène	<i>Ischnoderma benzoïnum</i>
géranium – pélargonium	acétate de géranol	<i>Lactarius decipiens</i>
persil	sparassol	<i>Cortinarius venetus</i>
concombre	carvacrol	<i>Macrocystidia cucumis</i>
beurre frais	diacéthyle	<i>Lentinus tigrinus</i>
farine	heptylate de phényl-éthyle + acétate nonylique + isobutyle quinoléine	<i>Clitopilus prunulus</i>
spermatique	pipéridine	<i>Inocybe geophylla</i>
beurre rance	acide butyrique	<i>Collybia butyracea</i>
farine rance	heptylate de phényl-éthyle + acétate nonylique + traces alcool butylique	<i>Tephroclybe rancida</i>
suif rance	acide sébacique + sébaçate d'éthyle	<i>Mycena inclinata</i>
savon	stéarate de sodium	<i>Tricholoma saponaceum</i>
musc	mucone + acétate de linalyle + traces de butyrate de linalyle	<i>Tuber melanosporum</i>
iodée	vapeurs d'iode	<i>Mycena metata</i>
caoutchouc	isoprène	<i>Russula pectinatoides</i>
vireuse	phellandrène + cadinène	<i>Amanita phalloides</i>
raphanoïde (de rave)	isothiocyanate d'allyle	<i>Amanita citrina</i>
ail	bisulfure d'allyle	<i>Marasmius alliaceus</i>
crustacés - marée	triméthylamine	<i>Russula xerampelina</i>
ammoniaque	ammoniaque	<i>Mycena stipata</i>
chou pourri	sulfure d'hydrogène	<i>Micromphale perforans</i>
mentholée	menthol	<i>Russula lepida</i>

²² « Mycologie Générale et Structurale », de M. Locquin, 339-346, Masson, 1984

chlore	eau de Javel	<i>Entoloma nidorosum</i>
camphrée	camphre	<i>Cortinarius subtortus</i>
phéniquée, encre	phénol	<i>Agaricus xanthoderma</i>
corne brûlée	acide valérianique	<i>Cortinarius camphoratus</i>
poivrée	pipérine	<i>Tricholoma atroscamosum</i>
vinaigre	acide acétique	<i>Collybia peronata</i>
fétide	indole	<i>Russula foetens</i>
gaz	acétylène	<i>Tricholoma sulfureum</i>

Nous vous convions fortement à visiter ce lien :

http://www.mycodb.fr/guide_odeur.php qui dresse une liste impressionnante d'espèces, référencées selon 103 odeurs différentes.

Certaines fragrances sont subtiles et demandent un entraînement certain pour être reconnues. Qui n'a pas prononcé cette phrase : « je connais cette odeur, mais je n'arrive pas à lui mettre un nom ! » Cette base de données mérite toute votre attention.

Nos artistes sont à l'œuvre : *Cortinarius cephalixus*, var. *cephalixus* — dessin électronique de Jacques Gane



le 22 octobre 1998
sous de vieux épicéas (40 ans)
coté orienté N-E
parc. 65 (250 m)
en bordure, dans la mousse
Forêt Domaniale de Hémilly
près de F-57 ARRIANCE

Cortinarius cephalixus
var. *cephalixus* (Secr.) Mos.

Une trouvaille intéressante : *Pholiotina aeruginosa*

Françoise Draye

Conocybe aeruginosa Romagnesi, « 1968 », publi. 1969 = *Pholiotina aeruginosa* (Romagnesi) Moser, 1978 = *Conocybe vert-de-gris* ; ordre des Cortinariales, famille des Bolbitiaceae, espèces ochrospores.

Lieu de récolte : Beez (B-5000, Namur) : 08/10/2010, à la lisière de feuillus calcaires ubiquistes.



Description : chapeau de 2,2 à 3,4 cm, un peu visqueux au toucher, légèrement ridulé, présentant un vert bleuâtre assez particulier, qu'on peut effectivement assimiler à du vert-de-gris (oxydation particulière au cuivre) ; il est cerclé par une marge décolorante ochracée et striée, qui lui donne une allure hygrophane. Pied couvert de fibrilles soyeuses, de couleur blanchâtre, avec un bulbe, menu mais évident, à la base. Lames de couleur rouille, peu serrées, avec lamelles et lamellules, devenant brunes en vieillissant. Odeur un peu fruitée et saveur douce.

Microscopie : spores brun jaunâtre, amygdaliformes, à paroi nettement épaisse, avec un petit pore germinatif ; mesures dans l'eau : 9-10,5 x 5,2-6,1 µm ; sporée rouille foncé. Basides 4-sporiques. Cheilocystides fusiformes.

Commentaires : nous avons le sentiment que cette espèce est rare dans le Namurois, car c'est la 1^{ère} fois que nous le rencontrons dans des biotopes qui sont visités très fréquemment, depuis près de 20 ans. R. COURTECUISSÉ renseigne cette espèce comme rare à très rare en Europe ; pour BREITENBACH & KRÄNZLIN, elle est très rare en Suisse.

La confusion avec d'autres espèces n'est guère possible. Signalons que dans la section des *Cyanopoda*, à laquelle appartient *P. aeruginosa*, on rencontre une autre espèce, *P. cyanopus*, qui présente des tonalités vertes uniquement sur le pied, et non sur le chapeau.

Littérature consultée :

COURTECUISSÉ R., DUHEM B., 1994 – Guide des champignons de France et d'Europe. Lausanne, Delachaux & Niestlé : 346-347

BREITENBACH J. & KRÄNZLIN F., 1995 – Champignons de Suisse. Tome 4, Luzern, Mykologia : 312

Quelques réactifs en mycologie

Partie 1 : Introduction et généralités

Didier Baar²³ & Marcel Lecomte

Note du rédacteur en chef : cet article est un condensé d'un travail original du regretté Didier Baar, dont vous retrouverez l'intégralité, y compris les photos originales, sur notre site : voir <http://www.amfb.eu/>, dans la rubrique « Publications ».

Nous avons sciemment supprimé ici les développements de formules chimiques, et les démonstrations de réactions ; les photos en N/B ont été remplacées par des photos semblables mais plus actuelles ; des addenda d'actualisation ont été ajoutés et figurent en notes de bas de page.

Vous trouverez également de larges compléments d'information sur les fiches techniques des colorants et réactifs présents ou non repris dans cet article, sur le site <http://www.champignons-passion.be>

L'éventail des méthodes mises en œuvre lors de l'étude des champignons est chaque jour plus étendu. Continuellement, de nouvelles techniques, découvertes généralement dans d'autres disciplines, sont adaptées à la mycologie. C'est le cas, notamment, de la génétique (séquençage des gènes, par exemple), de l'immunologie (étude des maladies cryptogamiques), de la paléontologie (établissement de l'arbre phylogénétique des mycètes²⁴) [de nos jours, la classification phylogénétique se base surtout sur les résultats des études moléculaires (analyse de l'ADN), traités par les méthodes de la cladistique] et de la biochimie (analyse des protéines et autres métabolites des champignons).

L'identification des champignons, dans le cadre de la taxonomie, a de tous temps été délicate.



Deux causes sont à la source de cette complexité : la variabilité typique des champignons, et la subjectivité à laquelle sont livrées la définition et la limitation des taxons. Ces deux causes rendent la taxonomie quelque peu empirique. C'est pourquoi, ici aussi, on multiplie le nombre de techniques d'étude. En effet, celles-ci permettent d'accéder à des caractères nouveaux, toujours plus objectifs, en vue de rendre davantage cartésienne cette partie essentielle de la mycologie.

C'est dans cette optique que la microchimie et la microscopie ont pris place dans l'éventail des techniques mycologiques. Ces deux grandes méthodes ont maintenant fait leurs preuves dans une large mesure. Toutes deux ont recours – pour ne pas dire qu'elles sont basées dessus - à une large panoplie de réactifs chimiques. Nous nous proposons, après un rappel sommaire des

notions élémentaires (mais combien indispensables) de la chimie, d'étudier les plus importants d'entre eux.

Notions élémentaires de chimie (voir ce chapitre technique sur notre site)

Généralités

On utilise en mycologie une multitude de produits différents. Nous en avons sélectionné une vingtaine parmi les plus communs. La première distinction qui puisse être faite entre ces réactifs est relative à l'usage auquel ils sont destinés : macrochimie ou microscopie. Il n'est pas rare toutefois que des produits servent à des applications aussi bien macrochimiques que microscopiques : nous les qualifierons alors de mixtes.

Une autre manière de classer les innombrables produits utilisés est d'isoler les réactifs véritables du reste. On parlera de réactif lorsqu'un produit conduit à une réaction *a priori* inattendue. Tel est le cas du sulfate de fer, qui est vert mais donne souvent des réactions orange ou rose. Le rouge Congo ammoniacal, quant à lui, n'est pas un réactif parce qu'il colore en rouge les éléments qu'on y plonge. Quoi de plus



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

²⁴ Voir l'article de J.-M. PIRLOT sur les champignons fossiles (*Mycos*, fascicule 2, 1999, pages 35-38).

normal ? Il y a cependant ici aussi des cas discutables, en ce sens que certains produits, qui ne sont en général pas des réactifs, peuvent à l'occasion se comporter comme tels. C'est justement le cas du rouge Congo ammoniacal, car on peut dire de certaines structures qu'elles sont congophiles si elles fixent le rouge Congo de manière spectaculaire²⁵. C'est la raison qui nous a poussés à utiliser indifféremment les termes « réactif » et « produit » dans la suite de cet exposé.

1. Réactifs macrochimiques

Toutes les substances à usage macrochimique sont des réactifs à proprement parler. Ils sont le plus souvent stockés dans des flacons présentant une petite tige (fichée dans le capuchon) terminée par une palette, normalement destinée à l'application de produits pharmaceutiques (sur les cors, les verrues et autres joyeusetés)²⁶.

Sur le terrain, on a intérêt à n'emporter que le minimum de flacons, afin de limiter l'encombrement. Pour l'utilisation, il suffit de déposer, grâce à la tige, une petite goutte du réactif sur la partie du champignon à tester. Le sulfate de fer, lui, sera appliqué en frottant la surface du champignon avec le cristal. L'ammoniaque, enfin, est le seul réactif qu'on peut utiliser sans provoquer de contact direct entre la substance et le champignon : les vapeurs peuvent être suffisantes.



Réaction du sulfate de fer sur une russule de la section des *Viridentes* - photo M. Lecomte

Pour réaliser des réactions macrochimiques dans des conditions idéales, il faut choisir des spécimens adultes mais pas trop vieux, et bien frais mais non gorgés d'eau. De même, les réactifs utilisés doivent être en bon état pour fournir des résultats reproductibles. La plupart se conservent longtemps, mais pas tous. Une réaction positive se traduit par un changement de couleur de la zone testée.

Plusieurs facteurs doivent être pris en compte pour une utilisation rationnelle et optimale des réactifs macrochimiques (OTJACQUES, 1995) : la partie du champignon sur laquelle le réactif a été appliqué, l'intensité de la réaction, le temps nécessaire à la réaction, et enfin la subjectivité de l'opérateur. En effet, les réactions seront souvent différentes selon que le réactif a été déposé sur la cuticule du chapeau ou sur la chair du stipe, par exemple. Au niveau de l'intensité de la réaction, on distingue souvent par - ou 0 une réaction négative, par + une réaction positive mais faible, par ++ une réaction plus nette, et par +++ une réaction forte. On se contente de ces quatre niveaux parce qu'il est difficile de quantifier précisément l'intensité de la réaction.

De même, on distingue des réactions instantanées, des réactions rapides (quelques secondes), des réactions normales (autour d'une minute), des réactions lentes (entre deux minutes et un quart d'heure) et des réactions tardives (de l'ordre de la demi-heure ou plus). Enfin, la subjectivité du manipulateur entre aussi en ligne de compte, car chacun voit les couleurs avec une teinte et une intensité propres. Ainsi, un ocre sera plutôt jaune pour certains, et plutôt brun pour d'autres...

2. Réactifs pour la microscopie

En microscopie, on utilise aussi bien des réactifs véritables, comme le réactif de Melzer, que des milieux d'observation inertes (ou qui peuvent être considérés comme tels).

Le choix d'un milieu d'observation dépend essentiellement de trois facteurs : le groupe auquel appartient le champignon à observer, le type de cellules à mettre en évidence et la destination de la préparation.

²⁵ Il en est de même pour le bleu de méthyle (les structures sont alors dites cyanophiles), et le bleu de crésyl qui, chez les Macrolépiotes, est utilisé pour une coloration métachromatique (la paroi des spores devient rouge alors que le colorant est bleu).

²⁶ On parlera de flacons coricides

Le groupe auquel appartient le champignon est essentiel : il est inutile, par exemple, d'observer des spores de *Clitocybe* dans le réactif de Melzer, car elles sont iodo-négatives chez toutes les espèces du genre. De même, il est plus intéressant d'observer des spores d'ascomycètes dans le bleu coton au lactophénol que dans le rouge Congo ammoniacal, parce que le bleu coton se fixe très bien sur l'ornementation des spores de nombreux ascomycètes, ce qui n'est pas nécessairement le cas du rouge Congo.

Le type de cellules à mettre en évidence n'est pas non plus sans importance. Par exemple, on a en général avantage à observer les asques dans le réactif de Melzer, tandis que les paraphyses y sont fort peu visibles. Enfin, la destination de la préparation doit être prise en compte. Une préparation extemporanée sera idéalement réalisée dans un milieu très fluide (ammoniacal, rouge Congo ammoniacal, potasse, etc.) qui facilite la dissociation. Au contraire, si on désire conserver la préparation quelque temps, on aura intérêt à la monter dans un liquide visqueux, stable et peu volatil (bleu coton au lactophénol, acide lactique concentré, lactophénol, chloral lactophénol, etc.). De la même manière, les préparations vouées à la photographie seront avantageusement montées dans des milieux visqueux, qui limitent le déplacement des objets au cours de l'exposition (qui dure parfois plusieurs secondes).

Pour l'utilisation des milieux de montage en microscopie (BAAR, 1996), on dépose une goutte du liquide choisi sur une lame porte-objet, on y transfère le fragment de champignon à observer et on retourne délicatement sur le tout une lamelle couvre-objet sur laquelle une toute petite goutte du milieu de montage aura été déposée, et ce pour éviter l'emprisonnement de bulles d'air. Le fragment à observer peut être une coupe fine, faite en général à la lame de rasoir, ou bien un petit morceau de champignon prélevé à l'aide de pincettes ou d'un scalpel. Dans ce dernier cas, il est nécessaire, pour voir quelque chose, de dissocier le prélèvement dans le liquide d'observation. Pour ce faire, on tapote la surface de la lamelle à l'aide de l'extrémité molle et arrondie d'un stylo Bic, par exemple. Dans tous les cas, l'objet destiné à l'observation doit être de très petites dimensions.

3. Réactifs mixtes



Réaction de la sulfovanilline sur *Russula aurora* - photo M. Lecomte

Dans cette catégorie de réactifs ne sont classés, en fait, que l'acide sulfurique et la vanilline (les deux composants de la sulfovanilline), l'ammoniacal et la potasse à 10% dans l'eau bidistillée.

Il est à remarquer que les réactifs dont l'utilisation la plus courante est de loin macrochimique ont été regroupés avec les réactifs typiquement macrochimiques (c'est le cas du sulfoformol). De même, les réactifs qui, bien que pouvant occasionnellement être utilisés en macrochimie, sont surtout destinés à la microscopie, ont été regroupés avec les réactifs purement microscopiques (le réactif de Melzer en est un bon exemple).

Remarque : dans chaque catégorie, nous avons classé les réactifs par ordre alphabétique, même si, parfois, cela peut paraître illogique.

Partie 2 : Réactifs pour la macrochimie et réactifs mixtes

La description de chaque réactif est structurée selon quatre rubriques. D'abord, les caractéristiques les plus remarquables du produit sont exposées dans l'introduction. Celle-ci est suivie d'un point important, consacré aux utilisations mycologiques qui sont faites du réactif. La troisième rubrique met en exergue les dangers que présentent le réactif ou ses composants, tandis que dans la quatrième, des conseils relatifs à la conservation sont prodigués.

Réactifs pour la macrochimie

1. Formol pur

Ce que l'on appelle communément « formol » est en réalité une solution concentrée d'un gaz : le méthanal, ou aldéhyde formique, ou encore formaldéhyde. Le méthanal est le plus simple aldéhyde pos-

sible, car il ne possède qu'un seul atome de carbone. Il a une odeur peu marquée, mais fortement irritante et a tendance, en solution aqueuse, à polymériser²⁷, ce qui se traduit par l'apparition de fines lamelles blanches au fond des vieilles solutions.

La solution commerciale contient généralement 35-40% de méthanal et est habituellement stabilisée par 10-15% de méthanol. Le méthanal, au fil du temps, a tendance à s'oxyder en acide formique.

• UTILISATION :

Le formol est utilisé dans plusieurs groupes de champignons, et notamment dans la détermination des espèces au sein du genre *Leccinum*. Il provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration rougeâtre sur la chair de *Leccinum scabrum* (d'après BATAILLE, 1969). D'autre part, le formol entre dans la composition de différents réactifs, et, entre autres, du sulfoformol, qui est un réactif sulfoaldéhydique qu'on peut utiliser non seulement en macrochimie, mais aussi en microscopie, quoi que cette dernière application du sulfoformol soit tombée en désuétude depuis un certain nombre d'années.

• DANGERS :

Le méthanal est un gaz fortement irritant, non seulement pour les voies respiratoires, mais également pour les yeux. D'autre part, il est toxique et même corrosif. Il convient donc d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux et, surtout, d'éviter de respirer les vapeurs.

• CONSERVATION :

La polymérisation du méthanal est accélérée par le froid et, dès lors, il faut conserver le formol à température ordinaire, et non pas au réfrigérateur, comme il serait préférable de le faire pour de nombreux autres produits²⁸. Pour éviter au méthanal, qui est un gaz, de s'échapper de la solution (dont la concentration diminuerait si cela arrivait), il est important de garder le formol dans un flacon hermétiquement fermé. Cette précaution permet, de plus, de limiter l'oxydation du méthanal en acide formique par l'oxygène atmosphérique.

2. Phénol à 3% dans l'eau bidistillée

Réaction du phénol sur *Russula olivacea* - photo M. Lecomte

Le phénol est un des premiers termes de la grande famille des composés aromatiques, qui sont des molécules organiques (c'est-à-dire contenant du carbone), cycliques, et dont l'odeur est souvent assez remarquable, d'où leur nom. Sa structure de base est en effet un cycle à six atomes de carbone liés entre eux alternativement par une liaison simple et par une liaison double : le phénol dérive du benzène. Chacun des atomes de carbone supporte, de plus, un atome d'hydrogène.

Le phénol se présente sous forme de petits cristaux blancs, ou légèrement roses s'il est quelque peu impur (même très peu) ; son odeur est forte, caractéristique. Il est assez soluble dans l'eau (à peu près 6%), et est hygroscopique, c'est-à-dire qu'il a tendance à absorber la vapeur d'eau de l'atmosphère.

Anciennement, on désignait le phénol sous le nom d'acide phénique, parce que, mis en présence d'une base forte, il a un comportement semblable à celui des acides (les phénols ont un caractère acide plus marqué que les alcools).



²⁷ La polymérisation est une classe de réactions chimiques qui, d'une manière générale, conduisent à la formation de molécules immenses (les polymères) à partir d'un grand nombre (souvent des milliers) de petites molécules (les monomères), le plus souvent toutes semblables, ou alors de deux types différents. Il existe toutefois de petits polymères, que l'on appelle des oligomères s'ils résultent de l'association de moins d'une dizaine de monomères. Le trioxyméthylène, qui provient de trois molécules de méthanal seulement, est un oligomère.

²⁸ Il est préférable, dans pratiquement tous les cas, de conserver les produits chimiques dans des flacons en verre brun, qui les protègent des rayons ultraviolets. Ces derniers ont en effet la propriété de détruire les molécules organiques, et particulièrement celles qui comptent beaucoup de liaisons doubles (comme les colorants, par exemple). Le verre est l'un des matériaux les plus résistants qui soient au point de vue chimique. Les flacons seront, à quelques exceptions près, conservés à l'abri de la lumière, et dans un endroit frais.

• UTILISATION :

En solution aqueuse simple, le phénol n'est utilisé qu'en macrochimie. Il provoque en général, sur la chair des champignons, des réactions brunâtres et lentes. L'absence de réaction est, avec le phénol, au moins aussi intéressante que la réaction elle-même, qui est trop banale. Le phénol provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration rouge vineux sur le pied d'*Amanita crocea*. Par ailleurs, le phénol entre dans la composition de plusieurs autres réactifs macrochimiques, tels que la phénolaniline. En microscopie, on utilise le phénol en association avec d'autres produits (acide lactique, hydrate de chloral, glycérine, etc.), et parfois avec des colorants, comme ingrédient dans de nombreux milieux de montage de grande qualité (lactophénol, chloral-lactophénol, chloral-phénol, bleu coton au lactophénol, etc.).

• DANGERS :

Le phénol est corrosif et toxique. Pur, c'est un produit dangereux dont il faut se méfier. En solution à 3%, les dangers sont plus réduits, mais il est cependant préférable d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux, et d'éviter de respirer les vapeurs.

• CONSERVATION :

La conservation du phénol, en solution ou non, exige certaines précautions. En effet, la présence de trois liaisons doubles dans la molécule de phénol la rend sensible aux radiations ultraviolettes²⁹. Il convient donc de conserver le phénol à l'abri de la lumière. D'autre part, l'exposition à l'air doit être évitée pour deux raisons : d'abord le phénol est hygroscopique (mais cela n'est vrai que pour les cristaux), et ensuite l'oxygène de l'air le détruit. Aussi, veiller à ce que le flacon soit bien fermé.

3. Résine de gaïac à 10% dans l'alcool à 80°

La base de ce réactif est une résine extraite d'arbres d'origine américaine : *Guaiacum officinale* et *Guaiacum sanctum*. Ces deux espèces font partie de la famille des *Zygophyllaceae*. La résine est un mélange complexe contenant principalement (à raison d'environ 70%) les acides α - et β -gaïaconique, mais aussi de l'acide gaïacinique, de la vanilline, etc. On utilisait autrefois la solution de résine de gaïac dans différents tests biochimiques permettant de déceler la présence de sang dans les fèces.



Réaction du gaïac sur *Russula cicatricata* - photo M. Paquay

La résine de gaïac commerciale peut être plus ou moins pure et se présenter sous différentes formes : poudre brune homogène, masses vitreuses rouge-noires ou blocs brunâtres. Elle contient même souvent des restes de bois (fibres, morceaux d'écorce, etc.), qui ne nuisent en rien à la qualité du réactif. Il est d'ailleurs possible d'utiliser le bois de gaïac lui-même, mais

l'inconvénient est alors relatif au dosage. La nomenclature pharmaceutique voudrait qu'on appelle soluté le réactif obtenu à partir de la résine pure, et teinture celui qu'on obtient par macération du bois dans l'alcool.

• UTILISATION :

La solution alcoolique de résine de gaïac est l'un des réactifs macrochimiques les plus utilisés. C'est sans doute celui qui donne les réactions les plus spectaculaires. D'une manière générale, la teinte obtenue est bleue ou turquoise, mais ce qui importe ici est la vitesse et l'intensité de la réaction. Il arrive qu'elle n'ait pas lieu du tout, ou qu'elle donne une coloration jaunâtre. La solution classique (gaïac à 10% dans l'alcool à 80°³⁰) provoque, par exemple, l'apparition rapide d'une coloration bleue intense sur le stipe de *Russula ochroleuca*.

²⁹ Une bonne solution de protection consiste à entourer le flacon d'un papier alu, imperméable aux rayons lumineux.

³⁰ Attention ! ne pas oublier que la dissolution de l'alcool pur ne répond pas à une règle arithmétique simple ; il faut de référer aux tables de Gay-Lussac (appelées aussi « Tables de mouillage de l'alcool ») ; ainsi, pour transformer de l'éthanol à 96° en éthanol à 80°, il faut y ajouter 22,45 g d'eau pur e.

D'un point de vue biochimique, la résine de gaïac met en évidence les phénoloxydases³¹. Il existe de nombreux autres réactifs des phénoloxydases, qui donnent des produits diversement colorés : amidopyrine, gaïacol, α -naphthol, etc.

• DANGERS :

L'alcool que contient le réactif est inflammable, mais c'est là le seul danger que présente le soluté de résine de gaïac.

• CONSERVATION :

Il est une précaution à prendre pour que la teinture de gaïac garde son efficacité le plus longtemps possible, c'est de la conserver dans un flacon hermétiquement fermé. En effet, si la réaction d'oxydation de l'acide β -gaïaconique se fait très rapidement grâce à la catalyse par les phénoloxydases des champignons, elle se fait aussi, quoique beaucoup plus lentement, sous l'action directe de l'oxygène de l'air, sans aucune catalyse. D'autre part, l'alcool est volatil.

L'efficacité du réactif peut être évaluée en l'essayant sur *Russula ochroleuca* : la réaction bleue doit être immédiate et très intense. Sur *Russula fellea*, il doit donner une réaction faible et très lente. Ce dernier test, très précieux, permet de s'assurer que la concentration du réactif en résine de gaïac n'est pas trop élevée. Dans tous les cas, il est préférable de renouveler la solution tous les ans.

4. Soude à 10% dans l'eau bidistillée

« Soude » est le terme courant pour désigner l'hydroxyde de sodium, qui se présente sous forme de pastilles blanches. La soude, tout comme la potasse d'ailleurs, est fortement hygroscopique et est une base forte. Exposées à l'air, les pastilles de soude, après un certain temps, deviennent liquides tant elles ont capté de vapeur d'eau.

Réaction de la soude sur *Cortinarius fulvoincarnatus* - photo J.P. Legros

• UTILISATION :

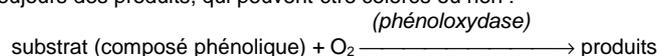
La soude (NaOH) à 10% et la potasse (KOH) à 10% sont des réactifs très proches, et les réactions qu'elles provoquent sont souvent assez similaires. Il est néanmoins des cas où l'une doit être utilisée et pas l'autre. La soude est employée dans plusieurs genres de champignons, mais c'est sans doute lors de la détermination des impénétrables cortinaires qu'on y a le plus souvent recours. La soude provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration noire sur le stipe de *Cortinarius semisanguineus* (d'après BATAILLE, 1969). Certains auteurs conseillent d'employer la soude à une concentration de 40% plutôt que de 10%. C'est pourtant la solution à 10% qui donne les résultats les plus nets, car la solution à 40%, lors des réactions, digère autant la chair des champignons qu'elle ne la colore. Enfin, la soude est utilisée à différentes concentrations (généralement 10%, 5% ou 2%) en microscopie, en tant que succédané de la potasse. C'est un assez bon milieu de montage.



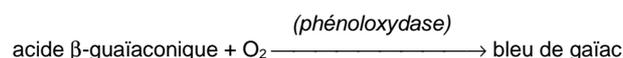
• DANGERS :

Les propriétés basiques de la soude la rendent corrosive, malgré la dilution importante. Il convient donc d'éviter tout contact avec la peau, et surtout avec les yeux.

³¹ Celles-ci sont des enzymes qui ont la propriété d'oxyder les composés phénoliques grâce à l'oxygène de l'air (O₂). Si on soumet à l'action d'une phénoloxydase (d'origine fongique) un composé phénolique (dit substrat vis-à-vis de l'enzyme) qui lui est adapté, alors on obtient toujours des produits, qui peuvent être colorés ou non :



Si les produits de la réaction sont colorés, alors la substance phénolique est susceptible d'être utilisée comme réactif macrochimique, puisque son application sur la chair d'un champignon qui possède une phénoloxydase adaptée provoquera l'apparition d'une coloration (qui est donc celle des produits de l'oxydation). Dans la résine de gaïac, le composé phénolique responsable de la réaction est l'acide β -guaïaconique, qui, sous l'action des phénoloxydases fongiques, donne un produit coloré en bleu, le bleu de gaïac :



- CONSERVATION :

La seule règle à observer pour que la soude reste efficace le plus longtemps possible est de la conserver dans un flacon bien fermé, qu'on ouvre le moins souvent et le moins longtemps possible. En effet, le CO₂ atmosphérique réagit avec la soude pour donner du carbonate de sodium (Na₂CO₃), qui précipite au pH alcalin de la solution, ce qui se traduit par l'apparition de cristaux brillants.

5. Sulfate de fer, cristal

Il existe deux « variétés » de sulfate de fer : le sulfate ferreux, ou sulfate de fer (II), dont la formule est FeSO₄, et le sulfate de fer (III), ou sulfate ferrique, qui répond à la formule Fe₂(SO₄)₃. C'est l'état d'oxydation³² de l'atome de fer qui est responsable des différentes variétés³³. C'est le sulfate ferreux que l'on utilise en mycologie. Celui-ci peut être soit anhydre (libre de toute molécule d'eau), soit hydraté. C'est la forme hydratée, que l'on appelle aussi cristallisée, qui est la plus employée. En effet chaque molécule de sulfate de fer (II), en cristallisant, capture sept molécules d'eau : on parle de sulfate ferreux heptahydraté (FeSO₄.7H₂O). Ce corps est susceptible, avec le temps, de perdre ses molécules d'eau et donc de se déshydrater : c'est l'efflorescence des cristaux.



Réaction en orange-rose du sulfate de fer sur *Russula heterophylla* - photo M. Lecomte

- UTILISATION :

Pour l'utilisation, il suffit de frotter le cristal sur la partie du champignon à tester. Certains auteurs conseillent l'utilisation de la solution à 10% de sulfate de fer. Les réactions que provoque cette solution sont généralement beaucoup plus rapides et plus vives que celles que provoque le cristal, mais la solution ne se conserve que peu de temps³⁴ ; c'est pourquoi, d'une manière générale, le cristal lui est préféré. Le sulfate de fer est surtout employé lors de la détermination des russules, chez lesquelles il provoque des réactions variées ; par exemple chez

Russula nigricans, dont la chair vire au vert sombre suite à l'application du sulfate de fer (réaction assez lente).

- DANGERS :

Le cristal de sulfate de fer est vraiment un réactif peu dangereux. Eviter toutefois un contact prolongé avec la peau, en raison de l'acide sulfurique qu'il contient (en très faible quantité), suite à sa préparation.

- CONSERVATION :

L'ion fer II a tendance à s'oxyder, avec le temps, en fer III. C'est pourquoi il faut conserver le cristal de sulfate de fer dans un flacon bien fermé, à l'abri de l'oxygène, de l'humidité et de la lumière. Une autre raison de tenir le flacon hermétiquement fermé est l'efflorescence du cristal : il perd son eau en vieillissant. Il faut donc absolument le garder à l'écart de tout agent desséchant. On peut, pour limiter encore l'oxydation et l'efflorescence du cristal, enduire celui-ci d'une couche d'huile (d'après CHARBONNEL, 1995). De même, les vapeurs ammoniacales lui sont fortement nuisibles. Enfin, le cristal est assez fragile, aussi faut-il éviter les chocs.

³² L'état (ou étage, ou nombre) d'oxydation d'un atome correspond, *grosso modo*, au nombre d'électrons qu'il a perdus ou gagnés lors de sa transformation (réversible !) en ion. L'atome neutre a toujours un état d'oxydation égal à zéro.

³³ Dans le FeSO₄, le fer est à l'état +2 (Fe²⁺ ; ion ferreux), c'est-à-dire qu'il a perdu deux électrons, tandis que dans le Fe₂(SO₄)₃, il en a perdu trois ; le fer est alors à l'état +3 (Fe³⁺ ; ion ferrique).

³⁴ Cet inconvénient du sulfate de fer aqueux a été solutionné ; en effet, suivant les conseils de Philippe Dufour, nous avons réussi à stabiliser la solution aqueuse, par addition d'une quantité précise d'acide sulfurique ; le produit obtenu est stable et ne s'oxyde pas durant des années.

6. Sulfoformol

Le sulfoformol est un liquide incolore à l'odeur irritante. Il fait partie de la famille des réactifs sulfoaldéhydiques, qui résultent de la dissolution d'un aldéhyde dans l'acide sulfurique. Le formol est le plus simple des aldéhydes parce qu'il ne possède qu'un seul atome de carbone. Le benzaldéhyde, l'anisaldéhyde, le pipéronal et la vanilline sont également des aldéhydes, plus complexes. Dissous dans l'acide sulfurique, ils donnent respectivement le sulfobenzaldéhyde, le sulfoanisaldéhyde, le sulfopipéronal et la sulfovanilline.

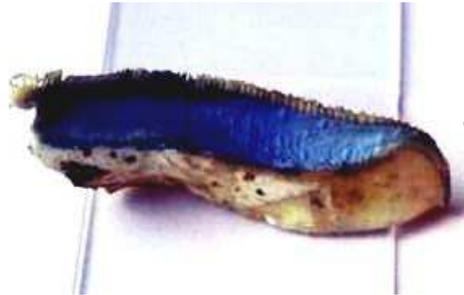
- UTILISATION :

On utilise le sulfoformol pour l'étude de différents genres, et notamment *Lactarius*, *Russula* et *Tricholoma*. Le sulfoformol provoque, par exemple, l'apparition d'une coloration bleue sur la chair de *Lactarius pergamenus* (d'après MARCHAND, 1980). C'est le plus utilisé des sulfoaldéhydiques pour la macrochimie. Il a aussi eu quelques applications microscopiques, mais la tendance actuelle, à ce niveau, est en faveur de la sulfovanilline.

Réaction en bleu des mers du Sud, avec le sulfoformol, sur *Lactarius pergamenus* - photo M. Lecomte

- DANGERS :

Le sulfoformol est un réactif dangereux. Il contient de l'acide sulfurique qui, même dilué, reste extrêmement corrosif, et du formol, dont les vapeurs sont irritantes et toxiques. Eviter donc tout contact avec la peau ou les yeux, et éviter de respirer les vapeurs. Prendre des précautions particulières lors de la préparation de ce réactif, car l'élévation de température due à la dilution de l'acide sulfurique favorise l'évaporation du méthanal. D'autre part, il faut garder présent à l'esprit que la moindre goutte d'acide sulfurique, même sensiblement dilué, qui tombe sur un vêtement, provoque à coup sûr l'apparition d'un trou.



- CONSERVATION :

L'acide sulfurique, même dilué par le formol, reste hygroscopique, c'est-à-dire qu'il a tendance à absorber la vapeur d'eau contenue dans l'atmosphère. Il convient donc de conserver le flacon bien fermé, et à température ambiante (non pas au réfrigérateur), car la polymérisation du formol est favorisée par le froid. Il est préférable de tenir le sulfoformol à l'écart de toutes vapeurs ammoniacales³⁵. Dans tous les cas, il est conseillé de renouveler chaque année ce réactif³⁶.

Réactifs mixtes

1. Acide sulfurique dilué 2x

L'acide sulfurique (H_2SO_4) est un liquide dense et épais à température ambiante. Celui du commerce contient généralement 95-98% de H_2SO_4 . Dilué deux fois, il en contient donc un peu moins de 50%. C'est un acide fort.

Dermatocystides, vues dans le sulfobenzaldéhyde, chez *Russula luteotacta* - photo M. Lecomte

- UTILISATION :

L'acide sulfurique est essentiellement utilisé sous forme de sulfovanilline, qui est un réactif aussi bien macrochimique que microscopique. La sulfovanilline, au même titre que le sulfopipéronal, le sulfoformol (voir paragraphe 3.6), le sulfobenzaldéhyde ou le sulfoanisaldéhyde, fait partie des réactifs sulfoaldéhydiques, qui résultent de la dissolution d'un aldéhyde (vanilline, pipéronal, formol, benzaldéhyde ou anisaldéhyde) dans l'acide sulfurique. La sulfovanilline est le plus utilisé des réactifs sulfoaldéhydiques. On la prépare de la manière suivante : dissoudre extemporanément quelques cristaux de vanilline dans une grosse goutte d'acide sulfurique dilué deux fois en mélangeant avec une aiguille en verre. La solution obtenue est jaune clair et s'altère



³⁵ Avec l'ammoniaque, l'acide sulfurique réagit pour donner de l'hydrogénosulfate d'ammonium (NH_4HSO_4), puis du sulfate d'ammonium - (NH_4)₂SO₄ -, ce qui pollue le réactif.

³⁶ Nous émettons beaucoup plus de réserves à ce sujet, car ce mélange est très instable et polymérise presque toujours après quelques jours.

rapidement. Certains auteurs préfèrent préparer la sulfovanilline à partir d'acide sulfurique concentré, plutôt que dilué deux fois.

Au point de vue macrochimique, la sulfovanilline est surtout destinée à l'étude des russules, sur la chair desquelles elle provoque couramment de belles réactions rose-rouge vif (chez *Russula integra*, par exemple, d'après BATAILLE, 1969). L'acide sulfurique est également utilisé pur en macrochimie : concentré (95-98%), il provoque par exemple une réaction lilas-violet pâle sur les lames d'*Amanita phalloides* (d'après CHARBONNEL, 1995) ; il est aussi employé dans d'autres genres. De plus, il entre dans la composition de différents réactifs macrochimiques, tels que la phénolaniline.

Pour la microscopie, on n'utilise l'acide sulfurique que sous forme de réactifs sulfoaldéhydiques. La sulfovanilline colore en gris ardoise le contenu des laticifères et des cystides (on parle alors de gloeocystides) de nombreux lactaires et russules, ce qui permet de les déceler et de les étudier. Ce réactif est très précieux, notamment, pour la recherche des dermatocystides, qui passent facilement inaperçues dans les autres liquides d'observation. On observe également des gloeocystides chez certains cortices, tels que *Peniophora* (Jean-Marie PIRLOT). On n'utilise pas l'acide sulfurique seul comme milieu de montage parce qu'il détruit les hyphes et donne de très mauvaises préparations.



Mise en évidence des dermatocystides, grâce au sulfobenzaldéhyde, chez *Russula parazurea* - photo M. Lecomte

• DANGERS :

L'acide sulfurique, même dilué, est un réactif extrêmement dangereux car, étant très corrosif, très oxydant et fortement déshydratant, il détruit la plupart des matières organiques. De nombreux plastiques sont attaqués par lui. Il faut donc absolument éviter tout contact avec la peau et, *a fortiori*, avec les yeux ou la bouche. Garder présent à l'esprit que la moindre goutte d'acide sulfurique, même sensiblement dilué, qui tombe sur un vêtement, provoque à coup sûr l'apparition d'un trou. En ce qui

concerne la dilution, il faut savoir que le mélange de l'acide sulfurique avec l'eau s'accompagne d'un important dégagement de chaleur. Aussi, il existe une règle d'or qu'il faut observer lors de la dilution de l'acide sulfurique : verser l'acide dans l'eau (et par petites quantités, en agitant) et non pas l'inverse ; on risquerait de voir l'eau bouillir et l'acide jaillir de tous côtés³⁷. Enfin, il faut éviter de mélanger l'acide sulfurique avec des bases (ammoniaque, soude, potasse), car la réaction pourrait être assez violente.

• CONSERVATION :

L'acide sulfurique doit être conservé dans un flacon en verre, muni d'un bouchon en plastique résistant. Dilué, il reste hygroscopique. Il convient donc de garder le flacon bien fermé.

Réaction en mauve violet aux vapeurs d'ammoniac chez *Lactarius necator* - photo M. Lecomte



2. Ammoniaque concentrée

L'ammoniaque est une solution aqueuse concentrée d'ammoniac (NH_3), qui est un gaz à l'odeur extrêmement irritante. Les solutions commerciales contiennent généralement entre 20 et 30% de ce gaz³⁸.

³⁷ Nous vous conseillons fortement d'effectuer cette opération sur un bain de glace et de travailler avec des flacons résistants à la chaleur (pyrex).

³⁸ Les solutions commerciales contiennent beaucoup d'impuretés ; il est de loin préférable de travailler avec de l'ammoniaque très pur, de laboratoire.

• UTILISATION :

On peut, pour son utilisation en macrochimie, déposer une petite goutte d'ammoniaque sur la partie du champignon à tester, ou bien exposer celle-ci aux vapeurs qui se dégagent du flacon, quoique cette dernière méthode soit moins efficace et moins couramment employée. L'ammoniaque donne, par exemple, une belle réaction rose violacé sur les tubes de *Daedaleopsis confragosa*³⁹. On l'utilise également pour l'étude des *Xerocomus*, ainsi que pour de nombreux autres genres.



Réaction en mauve violet aux vapeurs d'ammoniac chez *Haplophilus rutilans* - photo M. Paquay

Du côté de la microscopie, l'ammoniaque concentrée a le pouvoir de ramollir les hyphes de champignons frais et de regonfler les exsiccata. C'est, de plus, le solvant de colorants tels que le rouge Congo ou, anciennement, le vert d'anthracène.

L'ammoniaque est très volatile, aussi faut-il en ajouter souvent lors de l'observation d'une préparation microscopique. C'est en général un très bon milieu de montage, mais il faut savoir qu'il dissout certains éléments comme les incrustations acido-résistantes de la cuticule des russules, et qu'il altère quelquefois la couleur des pigments. On l'utilise d'autre part pour l'étude des chrysocystides (cystides dont le contenu vire au jaune sous l'action des bases) dans des genres comme *Hypholoma* ou *Stropharia*, notamment. De même, les cystides de certains *Inocybe* jaunissent dans l'ammoniaque à des degrés divers, ce qui est intéressant pour leur identification (Jean-Marie PIRLOT, communication orale). Enfin, certains auteurs préfèrent diluer deux fois l'ammoniaque, car son action sur les hyphes est alors moins drastique,

et elle peut dès lors être appliquée au montage d'objets plus délicats.

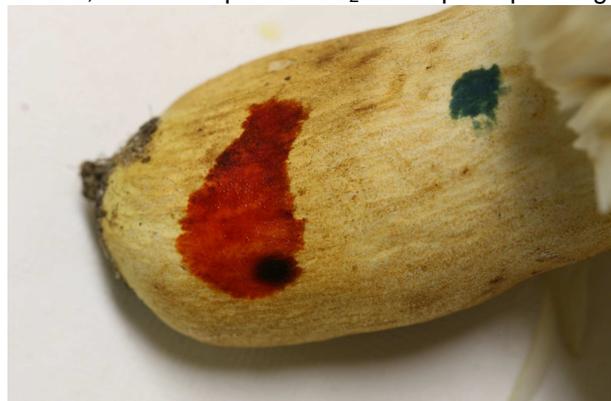
• DANGERS :

L'ammoniaque n'est pas à proprement parler un produit dangereux. Toutefois, étant très volatile, elle 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, car il a aussi des propriétés suffocantes. 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 l'ammoniaque reste efficace le plus longtemps possible, de la 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.

Réaction rougeâtre de la potasse à 10 %, à la base du pied de *Russula insignis* - photo M. Lecomte



3. Potasse à 10% dans l'eau bidistillée

La potasse (KOH), en vérité hydroxyde de potassium, se présente sous forme de pastilles blanches, tout comme la soude. Les propriétés de ces deux corps sont d'ailleurs pratiquement identiques.

³⁹ C'est très spectaculaire également sur *Lactarius necator*.

• UTILISATION :

Les utilisations macrochimiques de la potasse sont elles aussi semblables à celles de la soude. La potasse fait par exemple virer au rouge violacé la chair de *Cortinarius violaceus* (d'après BATAILLE, 1969). Certains auteurs préfèrent la solution de potasse à 40% - avec l'inconvénient que l'on sait.

Du point de vue de la microscopie, la concentration en potasse la plus utilisée est, en fait, non pas de 10% mais de 5%. La solution à 5% convient bien pour la plupart des observations. A 10%, on utilise la potasse pour l'étude des champignons très durs, tels que les polypores et les croûtes, qui peuvent résister très longtemps à la dissociation dans la potasse à 5%. Plus concentrée, la solution à 10% exerce une action beaucoup plus rapide. Mais elle présente, d'un autre côté, le désavantage d'être très agressive et de dissoudre certains éléments, tels que l'ornementation des spores de certains ascomycètes. Il ne faut donc l'utiliser que pour les polypores et les croûtes, quoiqu'elle puisse être intéressante lors de l'observation des champignons gélatineux (*Auricularia*, *Tremella*), parce que la potasse concentrée liquéfie les mucilages, ce qui est d'un grand secours lors de la dissociation.



Réaction jaune citron vif de la potasse à 10 %, sur la cuticule de *Amanita virosa* - photo M. Lecomte

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. On utilise aussi, quelquefois, une solution à 2% qui est encore plus douce que la solution à 5%.

• DANGERS ET CONSERVATION :

La potasse présente les mêmes dangers que la soude. Les recommandations relatives à sa conservation

sont les mêmes que pour la soude. Le sel qui précipite suite à la réaction entre l'hydroxyde de potassium et le gaz carbonique est le carbonate de potassium (K_2CO_3).

4. Vanilline



Dermatocystides de *Russula luteotacta* observées dans la sulfovanilline - photo M. Lecomte

La vanilline est une poudre blanche à la forte odeur de vanille. Elle fait partie de ce que l'on appelle les composés aromatiques parce que sa structure de base est une chaîne hydrocarbonée cyclique à six carbones : la vanilline dérive du benzène.

- UTILISATION :

Elle est essentiellement utilisée sous forme de sulfovanilline (qui a été traitée avec l'acide sulfurique). Si on dissout la vanilline dans l'acide chlorhydrique, on obtient de la chlorovanilline, qui est un réactif macrochimique peu utilisé.

- DANGERS :

Additif alimentaire des plus banals, la vanilline n'est pas un produit dangereux ; elle est cependant un peu nocive. Il est préférable d'éviter le contact avec les mains, non pas à cause d'un danger quelconque, mais bien parce que son odeur forte et tenace masque tous les autres parfums, et notamment ceux des champignons. La sulfovanilline, quant à elle, contient de l'acide sulfurique, avec tous les dangers que cela comporte.

- CONSERVATION :

La vanilline, dont la structure de base est un cycle benzénique, comprend plusieurs liaisons doubles entre atomes, ce qui la rend sensible aux radiations ultraviolettes. Il est donc impératif de la conserver à l'obscurité, et de préférence dans un flacon bien fermé, pour la protéger de l'action oxydante de l'oxygène de l'air.

Partie 3 : Réactifs pour la microscopie.

1. Acide lactique concentré

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).

- UTILISATION :

C'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) dans le colorant dit « bleu coton lactique ».

- 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).

2. Ammoniaque diluée 2x

Les propriétés de l'ammoniaque ont déjà été décrites. 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.

- UTILISATION :

Les utilisations de l'ammoniaque diluée deux fois sont, en ce qui concerne la microscopie, semblables à celles de l'ammoniaque concentrée. 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

déliçats. 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 :

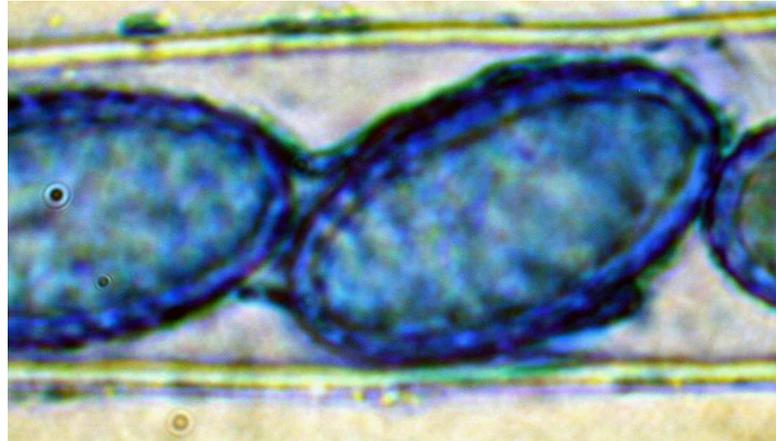
Les dangers que présente l'ammoniaque diluée deux fois sont les mêmes que pour la solution concentrée, même si le facteur de dilution les atténue quelque peu. Les conseils relatifs à la conservation sont identiques, également, pour les deux solutions (toujours au facteur de dilution près).

3. Bleu coton au lactophénol

Coloration des ascospores de *Peziza vesiculosa* au bleu coton lactophénolé - photo M. Lecomte

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 42780.

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, sur lequel le bleu coton se fixe avec une intensité remarquable (Jean-Marie PIRLOT, communication orale).



Chrysocystides de *Pholiota lenta* colorées au bleu coton lactophénolé - photo M. Lecomte

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 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 :

C'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 ; 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).

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 est un solide blanc, très soluble dans l'eau et à l'odeur forte, caractéristique. Le phénol et l'acide lactique 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. 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, 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.

- CONSERVATION :

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

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 impureté⁴⁰. En théorie, son pH est de 7.

⁴⁰ 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.

Spores de *Tuber indicum* observées dans l'eau - photo M. Lecomte

• UTILISATION :

Elle 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 lisibles. 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 (CO_2) et la formation subséquente d'acide carbonique (H_2CO_3). 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.

6. Lactophénol

Le lactophénol est un liquide visqueux et incolore, à l'odeur de phénol. C'est un mélange de plusieurs constituants : phénol, acide lactique, glycérine et eau bidistillée.

• 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 quelque 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. Les dangers et les recommandations relatives à la conservation sont les mêmes.

7. Potasse à 5% dans l'eau bidistillée

Les propriétés de la potasse ont déjà été décrites.

- UTILISATION :

On l'utilise, en microscopie, 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 exciccata 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.

- DANGERS ET CONSERVATION :

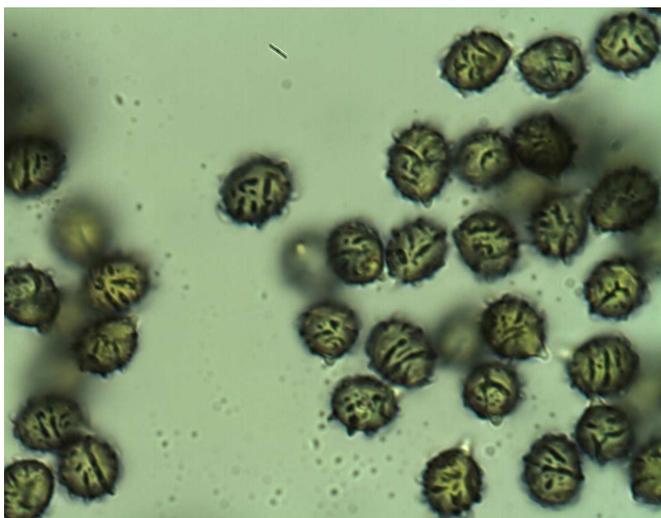
Les consignes de sécurité et de conservation sont les mêmes, à la dilution près, que pour la potasse à 10%.

8. Potasse à 2% dans l'eau bidistillée

La solution de potasse à 5% 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.

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.



Ornementation sporale de *Lactarius pyrogalus* mise en évidence par le réactif de Melzer - photo M. Lecomte

- 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 amyloïdes ou 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 dextrines.

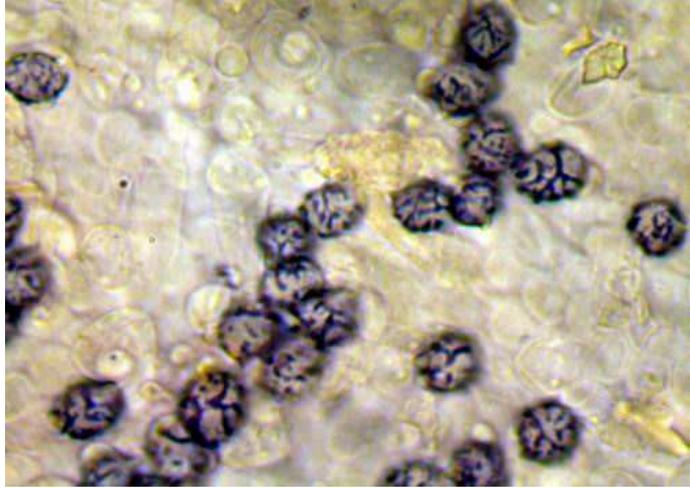
Ainsi, le réactif de Melzer est utilisé dans de nombreux genres, aussi bien chez les Basidiomycètes que chez les Ascomycètes. Il permet de savoir si les spores, notamment chez *Amanita* et *Mycena*, ainsi que chez de nombreux Aphyllophorales, sont amyloïdes ou non, et si, chez les lépiotes *lato sen-*

su, 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.

Ornementation sporale de *Lactarius luridus* mise en évidence par le Melzer - photo M. Lecomte

• 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. 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, mais ce procédé présente un risque de décoloration du tissu).



• CONSERVATION :

Il 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.

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 22120. C'est un colorant acide, c'est-à-dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques. Il 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.

Cystides métuloïdes chez *Inocybe lacera*, colorées au rouge Congo ammoniacal - photo M. Lecomte

• 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, 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 anses d'anastomose, 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 ammoniacal⁴¹. 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.

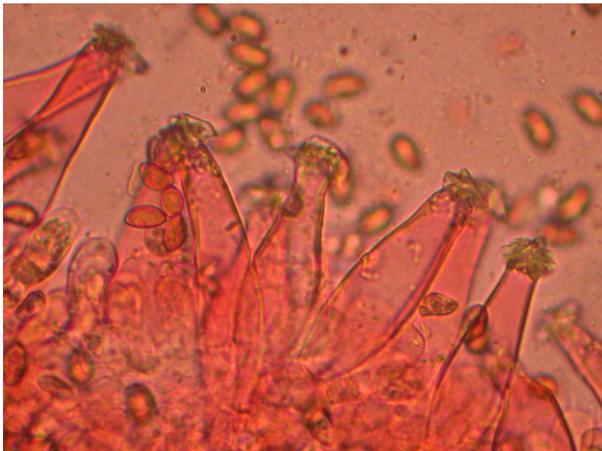


Cystide métuloïde chez *Inocybe margaritispora*, colorées au rouge Congo SDS - photo M. Lecomte

Mais le rouge Congo ammoniacal a les défauts de l'ammoniaque : il est très volatil et la préparation se dessèche au cours de l'observation⁴². 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.

Pour plus de détails sur le rouge Congo SDS, consulter CLÉMENÇON H., : 1999 - Vom Umgang mit Kongorot. - Du (bon) usage du (bon) rouge Congo. Schweiz. Z. Pilzkunde 77 : 247-252.



Cystides métuloïdes chez *Inocybe godeyi*, colorées au rouge Congo SDS ; la photo de gauche a été réalisée au départ d'une préparation non lavée : le contraste est quasi nul ; la préparation de droite a été rincée à l'eau - photos M. Lecomte

• 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.

• 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.

⁴¹ Nous insistons fortement sur cette technique de rinçage des préparations, qui peut se faire également avec de l'eau bidistillée : c'est un peu moins efficace, mais beaucoup moins agressif pour les sinus.

⁴² Nous utilisons maintenant le rouge Congo SDS (le Sodium Dodécyl Sulfate est un détergent industriel très puissant) mis au point par H. Cléménçon. Il s'agit d'une solution aqueuse, à utiliser sur du matériel frais : son pouvoir colorant est nettement supérieur au rouge Congo ammoniacal, que nous réservons au matériel sec, en raison de ses capacités regonflantes.

Voir à ce sujet la fiche complète sur le site <http://www.champignons-passion.be>

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 pour donner du carbonate d'ammonium, qui précipite au pH alcalin de la solution, ce qui se traduit par l'apparition de cristaux brillants.

Éléments remarquables de la cuticule de *Ripartites* sp., colorés au rouge Congo SDS - photo F. Draye

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.



Bibliographie

- ARNAUD P.**, 1996 - Chimie organique. 16^{ème} édition, Dunod
- AYEL A. & MOINARD A.**, - Microscope. Constitution, fonctionnement, emploi en mycologie. Bulletin spécial numéro 3a de la Société mycologique du Poitou
- BAAR D.**, 1996 - Les préparations microscopiques par dissociation, MYCO', fasc. 3
- BATAILLE F.**, 1969 - Les réactions macrochimiques chez les champignons. Cramer
- BON M.**, 1998 - Champignons de France et d'Europe occidentale. Arthaud
- BOULLARD B.**, 1997 - Dictionnaire des plantes & des champignons. Estem
- BREITENBACH J. & KRÄNZLIN F.**, 1986 - Les champignons de Suisse. Tome 2 : Champignons sans lames. Hétérobasidiomycètes, Aphylophorales, Gastéromycètes. Mykologia
- CHARBONNEL J.**, 1995 - Les réactifs mycologiques. Tome 1 : Les réactifs macrochimiques. Edité à cpte d'auteur
- COURTECUISSIE R. & DUHEM B.**, 1994 - Guide des champignons de France et d'Europe. Delachaux et Niestlé
- DE IZARRA Z.**, - Introduction à l'étude microscopique des champignons. Bulletin spécial n°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 n°6 de la Société mycologique du Poitou
- EHRMANN E.**, 1922 - Traité des matières organiques colorantes et de leurs diverses applications. Dunod
- KÜHNER R. & ROMAGNESI H.** : 1984 - Flore analytique des champignons supérieurs. Agarics, bolets, chanterelles. Masson
- LAROCHE G. & LAROCHE C.** : 1949 - Examens de laboratoire du médecin praticien. 5^{ème} édition, Masson
- LOCQUIN, M.** : 1984 - Mycologie générale et structurale. Masson
- LOCQUIN M. & LANGERON M.** : 1978 - Manuel de microscopie. Masson
- 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. & ROCK D. P. A.** : 1992 - Chimie générale. Troisième édition. De Boek
- MERCK** : 1996 - Réactifs, produits chimiques, diagnostica. Catalogue Merck
- MERCK** : 1989 - The Merck Index. Eleventh edition, Merck
- MEYBECK J.** : 1963 - Les colorants. Troisième édition, Presses Universitaires de France
- OTJACQUES P.** : 1955 - Les réactions macrochimiques du genre *Russula* Bulletin du C.M.L.B. (2) : 6-13.
- RAWN J. D.** : 1990 - Traité de biochimie. De Boek
- SÉGUY E.** : Le microscope. Emploi et applications. Lechevalier.
- Tome 1. 1951.
- Tome 2. 1949.
- TONNEAU J.** : 1991 - Tables de chimie. Un mémento pour le laboratoire. De Boek
- UCB** : 1995 - Chimie. Produits pour le laboratoire et l'industrie. Catalogue UCB
- VOLLHARDT K. P. C. & SCHORE N. E.** : Traité de chimie organique. Deuxième édition, De Boek

Les Myxomycètes

Marcel Lecomte

Les champignons ne sont ni végétaux ni animaux... Ils forment un règne à part entière !

Pour qu'un organisme appartienne au règne des Fungi, il doit réunir les sept critères suivants :
ETRE

- Eucaryote : il y a un (des) noyau(x) bien individualisé(s) dans les cellules.
- Hétérotrophe vis-à-vis du carbone (matières organiques) car pas de pigments assimilateurs.
- Absorbotrophe (par opposition aux animaux qui pratiquent l'ingestion, et aux végétaux qui pratiquent l'assimilation) : sorte de digestion extracellulaire suivie de l'absorption des nutriments.
- Thallophyte : appareil végétatif ramifié, diffus et tubulaire car constitué de filaments (thalle).
- Cryptogame : reproduction par des spores.

POSSEDER

- Des spores non flagellées (ou exceptionnellement uniflagellées), en tous cas jamais biflagellées.
- Une paroi cellulaire chitineuse (et non cellulosique)

Les Myxomycètes ont été longtemps considérés comme des champignons (ex *Gymnomycota*) ; ensuite, il y a quelques années, ils ont été classés dans le règne des *Protoctista* (***Mycetozoa***), famille des ***Myxostelidae***. Car, bien que se reproduisant au moyen de spores (comme les champignons), ils ne répondent pas complètement aux conditions énumérées ci-dessus.

Cependant, la situation évolue très vite ! A ce jour (2010), la classification des *Protoctista* n'a plus de réalité systématique. Les Myxomycètes et apparentés peuvent être classés dans le règne des *Amoebozoa* (Amoebozoaires), embranchement des *Mycetozoa*. Certains auteurs considèrent les *Mycetozoa* comme règne autonome. Le rang à accorder à ces « unités phylogénétiques » est auréolé d'un certain flou.

A l'heure actuelle, les travaux de FIORE-DONNO et al (2008) constituent la meilleure référence, car l'équipe de Sandra Baldauf travaille depuis très longtemps sur la systématique moléculaire des organismes unicellulaires.

Leur exclusion du règne des Fungi se justifie par les raisons suivantes :

- ils ne possèdent pas de mycélium
- ils sont capables dans leur phase végétative de se déplacer (comme des amibes) par le biais d'un plasmode mou et non cloisonné
- à ce stade, ils n'ont pas de paroi cellulaire rigide et donc pas de chitine : il s'agit d'une seule cellule non segmentée, dans laquelle baignent de nombreux noyaux
- lors de la phase de reproduction, des membranes vont apparaître entre les noyaux, mais elles sont de nature cellulosique
- ils digèrent par phagocytose les substances nécessaires à leur développement : il s'agit donc d'ingestion par « enrobage », et non d'absorption
- quand les spores sont flagellées, elles sont biflagellées

Le cycle vital des Myxomycètes peut être résumé ainsi :

1.- **Les spores germent** et produisent une à quatre **zoospores** munies de flagelles et donc capables de se déplacer (un peu comme des spermatozoïdes).

2.- **Les myxamibes se multiplient**, et celles qui sont compatibles fusionnent par paires. Il en résulte un organisme appelé plasmode, qui va progressivement grandir par multiplication du nombre de noyaux. Il pourrait être comparé à une amibe géante, sauf qu'une amibe vraie ne possède jamais qu'un noyau. Toutefois le plasmode constitue, jusqu'à la fin de sa vie, une seule et unique cellule, sans paroi rigide, possédant de multiples noyaux (alors que les animaux, par exemple, sont constitués de plusieurs cellules, chacune possédant un seul noyau). C'est à ce stade plasmodien que le Myxomycète peut se déplacer sur le support (plusieurs cm par heure) et digérer de nombreuses substances (bactéries, champignons, même de grande taille). Le plasmode est souvent incrusté de carbonate de calcium granuleux ou cristallisé ; en outre, il renferme fréquemment des morceaux de bois mort et d'autres matières qu'il incorpore mécaniquement dans sa locomotion amiboïde.

On ne peut pas, à l'heure actuelle, identifier les Myxomycètes selon l'aspect du plasmode.

3.- **Le plasmode**, dans un environnement idéal (conditions atmosphériques, humidité, nourriture, etc.), **donne naissance à l'appareil producteur de spores** (le **sporocarpe**), parfois pédicellé, et aspect définitif du Myxomycète, qui permet de le repérer dans la nature et de l'identifier. Les spores (en très grand nombre) seront alors souvent emprisonnées dans un réseau de fins filaments appelé capillitium.

4.- Si les conditions sont défavorables, les états mobiles (myxamibes ou plasmode) peuvent se transformer en formes de résistance (**microkystes, sclérotés**) et attendre le retour de conditions favorables à leur développement.

Les amateurs de nature les côtoient partout, souvent sans pouvoir les reconnaître. Le monde des Myxomycètes est très surprenant, certainement parce qu'il est très méconnu. Ils ne sont absolument pas spécifiques : en fait tout ce qui peut servir à la nutrition et à la multiplication des bactéries dont ils se nourrissent principalement, va leur servir de support. On va les trouver à la face infère des bois morts, sur les litières résiduelles humides (brindilles, aiguilles de conifères ou feuilles), les composts, les déchets ménagers, les mousses mortes, ... On peut même trouver des espèces nivales dans les flaques d'eau de fonte des neiges après un hiver de près de 3 mois. En résumé, ils se rencontrent sur tous les substrats de nature végétale.

Espèces les plus fréquentes : *Mucilago crustacea* sur pelouse (Crachat de sorcière) ; *Lycogala epidendron* (Lait de loup), *Fuligo septica* (Fleur de tan), *Enteridium lycoperdon*, *Stemonitis axifera* (très spectaculaire)

D'autres genres : *Arcyria*, *Lamproderma*, *Badhamia*, *Ceratomyxia*, *Physarium*, *Leiocarpus*, *Myxarium*, *Trichia* ...

Bibliographie

ANNA MARIA FIORE-DONNO A.M., NIKOLAEV S.I., NELSON M., PAWLOWSKI J., CAVALIER-SMITH T. & BALDAUF S.L., : 2008 - Deep Phylogeny and Evolution of Slime Moulds (Mycetozoa). *Protist* 161 (1): 55-70.

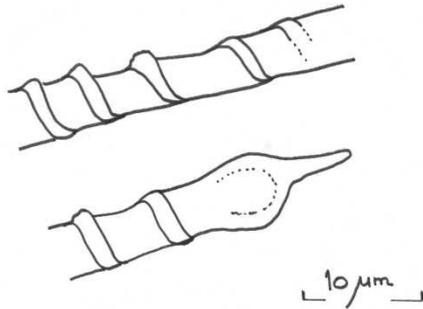
Trichia varia (Pers.) Pers., 1794

Jacques Finger⁴³

Les Myxomycètes ne sont pas des champignons. Pas plus des animaux, ni des végétaux. Ce sont des amibes. Les amateurs de nature les côtoient partout, souvent sans pouvoir les reconnaître. Ici, nous présentons une espèce commune et facile à identifier.

Description

Sporocarpes : sporanges sessiles, quelques-uns courtement stipités, sphériques ou obovales, beige jaune, ou olivâtres, diamètre 0,6 à 1 mm, isolés ou plus ou moins serrés.



Elatères

Masse sporale jaune un peu orangé.

Spores sphériques, ocre jaune, finement verruqueuses, 12 à 14 μm, parfois belle guttule lipidique.

Péridium luisant, persistant, se déchirant à maturité.

Hypothalle commun à plusieurs sporanges, brun, parcheminé.

Elatères 3 à 5 μm de diamètre, jaune ocre, décorées de deux spirales irrégulières, montrant quelques renflements peu marqués, extrémité courte.

Plasmode et jeunes sporanges blanc ivoire.

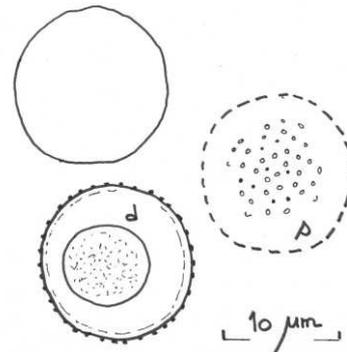
Cette espèce, d'aspect très variable (i.n.)⁴⁴ se trouve en forêt, sur le bois en décomposition, durant les périodes fraîches, de l'automne au printemps.

Spores

d : vue diamétrale,

p : vue de la face supérieure

A l'oeil nu, *Trichia varia* peut se confondre avec d'autres espèces du genre mais l'observation à fort grossissement des élatères lèvera le doute.



Lexique

Elatère, s.f. : filament ; chez certaines Trichiales, des élatères sont mêlées aux spores.

Hypothalle, s.m. : couche plus ou moins visible à la base des sporocarpes.

Péridium, s.m. : enveloppe externe des sporocarpes.

Plasmode, s.m. : masse gélatineuse amiboforme, précédant la fructification.

Sporange, s.m. : sporocarpe isolé, sphérique ou cylindrique.

Sporocarpe, s.m. : nom donné à la fructification des Myxomycètes.

Références

ING : 1999 - The Myxomycetes of Britain and Ireland. The Richmond Publishing : 151-152

LISTER : 1925 - A Monograph of the Mycetozoa. British Museum, 3rd ed. : 207-208

MARTIN & ALEXOPOULOS : 1969 - Myxomycetes. The University of Iowa : 164-165, pl. XI, fig. 111

NANNENGA-BREMAKAMP : 1991 - A guide to temperate Myxomycetes. Biopress : 126-127, pl. 164 a-c

NEUBERT, NOWOTNY & BAUMANN : 1993 - Die Myxomyceten. Karlheinz Baumann ed., Band 1 : 272-275

POULAIN et al. : Les Myxomycètes. A paraître

STEPHENSON & STEMPEN : 1994 - Myxomycetes, A Handbook of Slime Molds. Timber Press : 158-159

⁴³ jacques.finger@bluewin.ch - Jacques Finger, Avenue de Beaulieu 41, CH-1004 LAUSANNE

⁴⁴ Inde nomen, littéralement : « d'où le nom »



Sporocarpes de *Trichia varia* vus à divers grossissements et stades de maturité

Vous avez la possibilité de vous abonner à l'Association des Mycologues Francophones de Belgique (AMFB).

Pour 2011, nous avons malheureusement dû porter le montant de la cotisation à 7,00 € par an, car nous avons perdu notre sponsor qui imprimait gratuitement notre revue (revue comprise si nous pouvons vous la remettre en mains propres),

à verser pour la Belgique sur le compte 068-2486436-62, à l'adresse suivante :

A.M.F.B.
rue Basse Chaussée, 117
B-5022 COGNELEE/NAMUR (Belgique)

Pour des virements internationaux simplifiés :
code IBAN : BE51 0682 4864 3662, code BIC : GKCCBEBB

Afin de favoriser une dépense minimale, nous avons choisi de moduler la cotisation de différentes manières :

Le bulletin 2008/01 compte 79 pages (7 €)

Le bulletin 2009/02 compte 71 pages (7 €)

Le bulletin 2010/03 compte 76 pages (7 €)

- *Si vous les recevez de main à main (lors d'un congrès ou autre activité), ils vous coûteront le prix indiqué ci-dessus.*
- *Pour un envoi en Belgique, supplément de 7,00 € (frais postaux)*
- *Pour un envoi en Europe, supplément de 11,00 € (frais postaux)*

Vous avez aussi la possibilité de faire l'acquisition d'un fascicule de 110 pages, consacré à la microscopie, et qui a été publié à l'occasion du séminaire organisé en mars 2009. Il est abondamment illustré de photos en couleurs.

- *Si vous le recevez de main à main (lors d'un congrès ou autre activité), il vous coûtera 15,00 €*
- *Pour les frais postaux, voir rubrique précédente.*



Notre partenaire, Hainaut Développement, continue à nous soutenir pour l'organisation des Journées Européennes des Cortinaires en 2011.

Editeur responsable : A.M.F.B. (Association des Mycologues Francophones de Belgique)
Rédacteur en chef : Marcel Lecomte
Publié le 15 mars 2011