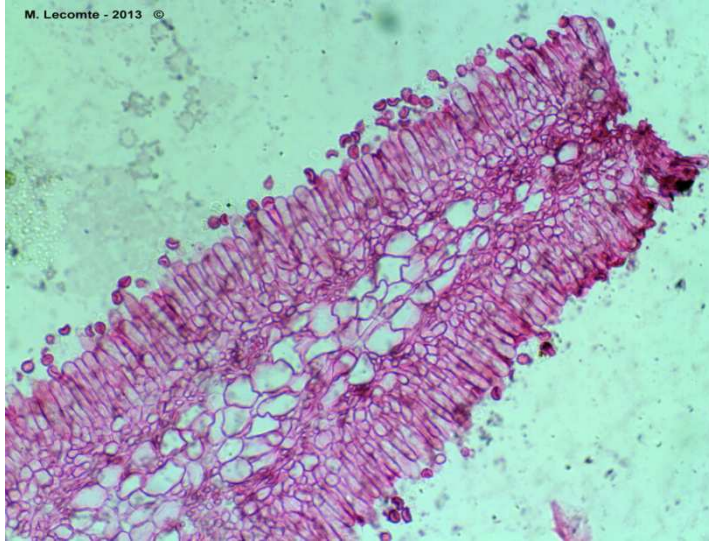


## Les russules

Exposé de Pierre-Arthur Moreau, lors du congrès de Poitiers, à Vouneuil-sur-Vienne, 31/10/2013.  
Synthèse réalisée par Marcel Lecomte, avec ajout de quelques notes résultant d'expérimentations personnelles, et d'une nouvelle technique, employée par H.G. Cléménçon.



### ABRÉVIATIONS UTILISÉES

CF = carbolfuchsin - FdZ : fuchsine phéniquée de Ziehl - HCl = acide chlorhydrique - IAR = incrustations acido-résistantes - LG = lactoglycérol - LPO = lame porte objet - LCO = lame couvre objet - RC = rouge Congo - SBA = sulfobenzaldéhyde - SV = sulfovanilline

◀ Les russules présentent des sphérocytes dans la trame des lamelles, contrairement aux lactaires.

On peut les diviser sommairement en deux groupes :

++ celles provenant d'un ancêtre commun, et présentant des caractères archaïques,

++ celles provenant d'ancêtres dérivés, et présentant des caractères évolutifs.

### Les russules archaïques

- ++ présentent des lamelles,
- ++ ont une chair compacte, épaisse,
- ++ ont très souvent des spores de petite taille,
- ++ n'ont pas de revêtement distinct.

#### 3 sections :

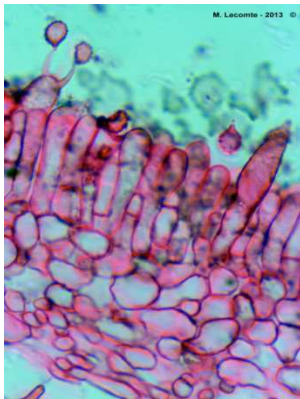
- ++ Les *Plorantes* (groupe de *delica*) : chair blanche, immuable.
- ++ Les *Compactae* (groupe de *nigricans*) : chair rosissante puis noircissante.
- ++ Les *Archaeinae* (*camarophylla*, *farinipes*, *archaeosuberis*) ; cette section a été créée sur base d'une seule récolte de *R. archaea*, réalisée à Madagascar par R. Heim, et qui a été confirmée par des récoltes de B. Buyck, dans la même région entre 2005 et 2010.

Quelques mots à propos de la ballitospore des Basidiomycètes.

Il s'agit de la pression contrôlée exercée par la goutte de Buller sur le cal se trouvant entre le stérigmate et la spore, et qui la détache à maturité ; elle imprime sur celle-ci une empreinte permanente appelée plage supra-apiculaire.

Elle n'existe pas chez les Rouilles et les Charbons. Elle n'existe plus chez les Gastéromycètes.

### Les russules dérivées, ou évoluées



- ++ Apparition d'une cuticule séparable.
- ++ Présence d'une zone amyloïde au niveau de la plage supra-apiculaire (au-dessus de l'apicule).
- ++ Perte des lamelles.
- ++ Augmentation significative de la taille des spores, dans nombre de cas.

MAIS *cyanoxantha* a des lamelles ; *amoena* & *virescens* ont une structure de lactaires *Plinthogali*.

La section des *Ingratae* comprend les russules les plus archaïques parmi les évoluées, caractérisées par un chapeau strié cannelé, visqueux et à odeurs fortes.

→ Les *Foetentinae*, jaunâtres et charnues.

→ Les *Pectinatinae*, grisâtres, de taille petite à moyenne.

→ *insignis* est une espèce particulière, qui présente un voile général.

Saveur	Sporée claire (de blanc à crème)	Sporée sombre (ocre à jaune)
Douce	<i>Indolentinae, Amoeninae, Heterophyllinae, Griseinae, Roseinae, Lilacinae, Lepidinae</i>	<i>Integrinae, Tenellae, Viridantinae, Olivaceinae</i>
Acre	<i>Emeticinae, Atropurpurinae, Violaceinae</i>	<i>Sardoninae, Maculatinae, Urentinae</i>

**Pour aller plus loin, il est nécessaire de faire appel à la MICROSCOPIE, et étudier**

### LES SPORES

- ++ Les spores de russules sont amyloïdes : elles réagissent au réactif de Melzer (iodo-ioduré).
- ++ Pour mesurer les crêtes, il faut choisir des spores qui ont l'apicule de côté.
- ++ Les crêtes et les connectifs (réseau) s'observent sur la partie avant de la spore.
- ++ Les mesures de la spore se prennent avec l'apicule de côté, et sans compter la longueur des crêtes.

**Mais l'étude de la structure de LA CUTICULE est essentielle.**

### Pour voir tous les éléments de l'épicutis :

- + décaper le scalp à l'eau de Javel durant 30 secondes,
  - + rincer à l'eau,
  - + colorer au RC ammoniacal (pour un exsiccatum) ou au RC SDS (pour du matériel frais).
- ATTENTION ! cette pratique permet de rendre la préparation plus lisible, et plus facile à dessiner ou à photographier, MAIS il n'est plus possible après ce traitement, de diagnostiquer une réaction SBA ou de mettre en évidence des incrustations.

Il faut bien reconnaître que la détermination des russules à l'aide de clés qui utilisent des caractères microscopiques ne constitue pas une évidence et a découragé plus d'un mycophile.

Nous allons tenter de vous familiariser avec une technique d'approche des russules qui permet d'entrer assez facilement dans les clés de détermination de Marcel Bon et par extension, dans quasi toutes les autres clés (Sarnari, Romagnesi), car elles sont basées sur la même démarche.

Il faut savoir que la partie du champignon la plus importante pour commencer la détermination d'une russule, va être le revêtement cuticulaire, et non les spores comme on serait tenté de le croire.

Une coupe radiale dans le chapeau d'un sporophore laisse apparaître au microscope 3 zones ou couches importantes :

- La couche profonde, qui est la chair proprement dite et est composée de sphérocytes.
- La couche médiane est composée d'hyphes connectives entremêlées, dont les inférieures sont en contact avec les sphérocytes et dont les supérieures se redressent ; elle est appelée hypoderme (Schaeffer), médiocutis (Sarnari), cutis (Romagnesi), subpellis (P.A. Moreau).
- La couche supérieure prête à confusion car elle est parfois divisée en deux parties par certains auteurs, qui différencient le corps et les terminaisons des hyphes : appelons-la épicutis (Sarnari, Romagnesi) ou suprapellis (P.A. Moreau).

### Le suprapellis nous intéresse tout particulièrement !

C'est pourquoi on étudiera le revêtement, non pas sur coupe radiale, mais sur scalp (coupe tangentielle mince), pour pouvoir observer une surface importante de suprapellis.

Un examen au microscope va permettre d'y reconnaître 3 éléments essentiels :

a/ **des hyphes terminales** constituant la « base » de la structure piléique, qui sont des poils non différenciés, avec de rares cellules vides, et qui sont de petite taille (poils du cheveu).

b/ des éléments très grands (souvent 100  $\mu$ ) à nombre de cloisons variable, souvent renflés à l'extrémité, et remplis d'une substance huileuse dense (noircissant dans les réactifs sulfo-aldéhydiques) : ce sont **les dermatocystides, ou piléocystides**.

c/ **des hyphes primordiales**, de grande taille, cylindracées, à nombreuses cloisons et paroi souvent épaissie, mais à contenu peu visible et inerte dans les réactifs sulfo-aldéhydiques.

**La recherche des IAR**

### PRÉALABLE

La FZ s'utilise dans le cadre d'une technique opératoire appelée **coloration régressive** et nécessite des coupes très minces et bien uniformes. En pratique, on surcolore l'objet à examiner et on le décolore ensuite petit à petit par un décolorant approprié, appelé différenciateur.

Le but final à atteindre est d'obtenir une préparation où les parties qu'on désire mettre en évidence s'affichent nettement colorées sur un fond uniformément décoloré. La différenciation s'effectue généralement avec de l'alcool très titré, voire absolu, ou de l'acide chlorhydrique ; la grosse difficulté de cette régression réside dans le dosage de la décoloration qui, si elle n'est pas arrêtée à temps, se termine par une décoloration totale.

#### PRÉPARATION DU MATÉRIEL

Comment procéder !

Cette technique demande du soin et de la méticulosité, si on souhaite obtenir des préparations spectaculaires ; elle est rarement réussie au 1<sup>er</sup> essai ... surtout, pas de découragement !

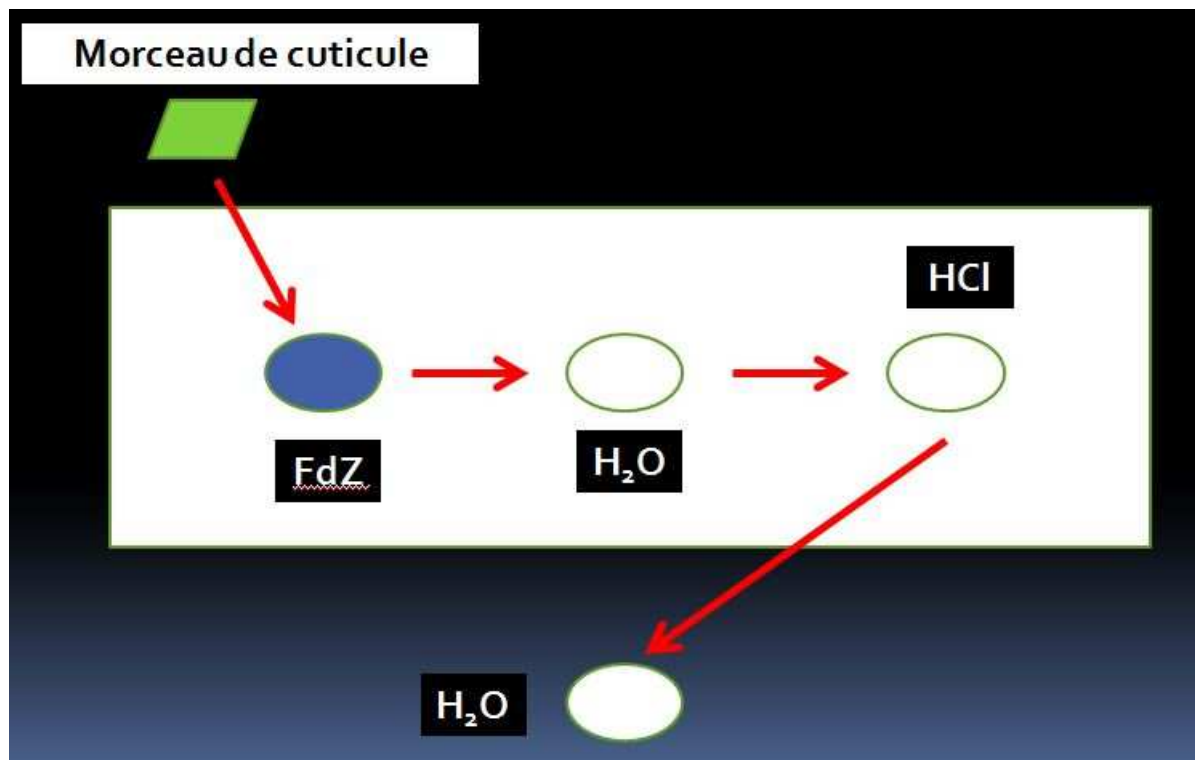
→ Réaliser un scalp assez épais à la lame de rasoir ; il nous apparaît plus facile de "peler" le champignon en enlevant une "épluchure" d' ½ cm de large ; il en résulte un fragment de scalp qui va en s'amenuisant et l'extrémité est quasi prête à l'emploi (prélever la cuticule à l'endroit où elle est la moins sollicitée, ni au bord, ni au centre).

→ Le retourner sur l'ongle et gratter délicatement toute la chair avec la lame de rasoir (en cuisine, "émincer" ! → c'est une manipulation délicate qui demande du soin) ; diviser le scalp obtenu en deux parties (la seconde partie sera utilisée pour la recherche des dermatocystides SB+).

→ ATTENTION ! ne pas oublier de replacer le fragment préparé à l'endroit.

### LA RECHERCHE DES INCRUSTATIONS PEUT S'EFFECTUER SELON TROIS TECHNIQUES

#### 1. La méthode différentielle de MELZER



#### MODE OPÉRATOIRE

+++ Déposer sur la partie gauche d'une LPO une goutte de FdZ ; préparer au centre une goutte d'eau de rinçage et à droite une goutte d'HCl dilué à 5 %.

+++ Déposer le morceau résultant du grattage dans la FdZ et y laisser le scalp durant 3 à 5 minutes.

+++ Faire glisser le scalp dans l'eau et rincer.

+++ Faire glisser le scalp dans HCl (durant 30") \*\*\*.

+++ Faire glisser le scalp dans l'eau et rincer.

+++ Placer la LCO et observer :

→ Les incrustations apparaissent comme des petites masses bleu mauve réparties autour de la dermatocystide. Sur une préparation bien faite, les incrustations sont les seuls éléments non décolorés par l'acide.



(\*\*\*) Si on observe dans l'acide, on ne bloque pas la régression et la décoloration continue, ce qui nécessite une observation rapide, valable pour la routine ou un contrôle rapide.

S'il s'agit de réaliser de plus longues observations et de prendre des photos, il vaut mieux passer de l'acide dans une goutte d'eau, avant de poser la LCO.

## 2. La méthode directe de BLUM

### MODE OPÉRATOIRE

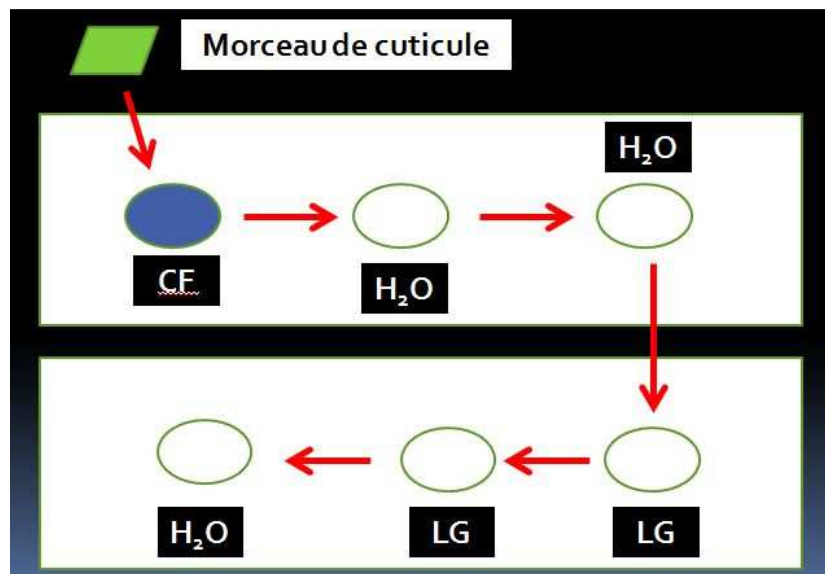
+++ Déposer sur la partie gauche d'une lame porte-objet une goutte de FZ et la diluer avec une goutte d'eau (= FZ à 50 %).

+++ Déposer le morceau résultant du grattage dans la solution de FZ et y laisser le scalp durant 5 à 10 minutes.

+++ Faire glisser la scalp dans l'eau ; placer la LCO et observer.

→ les incrustations apparaissent comme des petites masses bleu mauve réparties comme une chaussette autour de la dermatocystide, mais non contrastées avec le fond, qui est seulement plus clair. Méthode valable uniquement sur du matériel frais, et avec des résultats très mitigés, voire peu convaincants.

## 3. La méthode différentielle de CLEMENCON



### MODE OPÉRATOIRE

+++ Pour du matériel sec, laisser macérer d'abord dans de l'ammoniaque à 5 % durant 5 minutes, puis aspirer le liquide.

+++ Immerger le bout de scalp dans une grosse goutte de carbolfuchsin, durant 4 à 5 minutes (l'idéal est de travailler dans une lame avec une dépression, si on réalise des séries d'observations).

+++ Rincer 2x à l'eau.

+++ Transférer la pièce dans une goutte de lactoglycérol, durant 1 minute.

+++ Répéter l'opération 2 ou 3 fois, jusqu'à ce que plus aucune trace de colorant ne se manifeste dans la goutte : c'est ici que se produit la régression de coloration !

+++ Bloquer la régression en passant dans une goutte d'eau.

+++ Couvrir d'une LCO et observer à l'immersion.

### Quelques REMARQUES

++ Les incrustations acido-résistantes peuvent se trouver sur les dermatocystides et sur les hyphes primordiales.

++ ATTENTION de ne pas confondre les incrustations acido résistantes qui se trouvent à l'extérieur des cystides, avec des granulations internes des cystides qui sont parfois aussi vivement colorées (il s'agit alors de contenus vacuolaires).

++ Selon B. Buyck, il serait possible d'observer des incrustations métachromatiques sur les poils du chevelu (observer dans le bleu de crésyl) → notamment sur *cyanoxantha – cutefracta – langei*.

++ Il n'y a pas de métachromatie chez *insignis* & *ochroleuca*.

### Quelques ASTUCES

++ Quand une russule est âcre, elle n'a pas d'incrustations (sauf *R. rubra* qui est rouge à odeur de miel, *R. rutila* qui est rouge à sporée foncée et *R. ochroleuca*).

++ Les russules "incrustées" ont une cuticule généralement mate et souvent une marge pruineuse ; cependant, *R. badia* est pruineuse et non incrustée tandis que *R. integra* est incrustée et non pruineuse (c'est assez amusant, du fait qu'elles sont quasi des sosies).

## Observation des dermatocystides

Henri Romagnesi a montré, en son temps, toute l'importance qu'il faut attacher, dans le genre *Russula*, à l'observation de trois éléments du revêtement cuticulaire : les dermatocystides, les hyphes primordiales et les poils du chevelu. Il ne voyait pas de difficultés majeures dans l'observation de ces poils ; en revanche, il a souligné le fait que "*des mycologues expérimentés n'ont pas perçu des dermatocystides épicuticulaires là où elles existaient pourtant*". Ces dermatocystides, selon lui, sont "*essentiellement caractérisées par la présence de corps noircissants dans les réactifs sulfoaldéhydiques*".

Personnellement, nous nous demandons si les amateurs de russules ne se sont pas trop focalisés sur la prétendue difficulté d'observation des dermatocystides et du coup n'ont pas osé les observer dans un milieu autre que les réactifs sulfoaldéhydiques.

Nous vous proposons ci-après un mode opératoire relativement simple d'application, et qui donne généralement des résultats d'une excellente lisibilité. Dans un premier temps, il ne nous paraît pas indispensable d'utiliser ces réactifs sulfoaldéhydiques, qui sont d'un maniement délicat, voire dangereux, car ils impliquent la mise en œuvre d'acide sulfurique à haute concentration, avec les risques de manipulation que cela comporte : brûlures graves ou dégradation de l'objectif du microscope. Notre expérience personnelle nous conduit à penser que ces derniers réactifs sont à réserver à de rares cas "récalcitrants".

### Les conditions à remplir pour arriver à une bonne mise en évidence des dermatocystides

++ Comme le souligne quasi impérativement Romagnesi : travailler sur des sujets frais.

++ Réaliser un scalp bien en biais, dans une partie du revêtement cuticulaire médian (entre le centre du chapeau et la marge).

++ Utiliser un colorant adéquat.

**Le RC SDS**, selon la formule de Cléménçon, révèle en général extrêmement bien les dermatocystides, mais aussi les poils de la cuticule (il est important de le souligner).

Comme l'a très bien exposé Bart Buyck (2007), **le bleu de crésyl de Cléménçon** aboutit souvent à un aussi bon résultat, à condition que l'échantillon observé soit suffisamment petit.

Il présente en outre deux grands avantages.

++ Quoique moins lumineux que le RC, ce colorant révèle aussi, et très bien, les laticifères et les incrustations notamment des hyphes primordiales, ... sans parler de ses propriétés métachromatiques.

++ La réaction est indifférente à l'état du champignon (frais, exsiccatum, jeune, vieux, conditions climatiques).

En suivant minutieusement la méthode décrite ci-dessous, il est rare de rencontrer un échec ; si c'est le cas, il faut alors s'interroger sur la cause du problème et chercher l'erreur de manipulation ; nous conseillons vivement d'effectuer quelques manipulations à titre d'entraînement sur des espèces bien connues, où la présence de poils cuticulaires et de dermatocystides est évidente ; et surtout, plus pragmatiquement, ne pas craindre d'effectuer une nouvelle préparation.

Éventuellement, utiliser un autre colorant.

## 1. La méthode de Jean LACHAPPELLE

### MODE OPÉRATOIRE

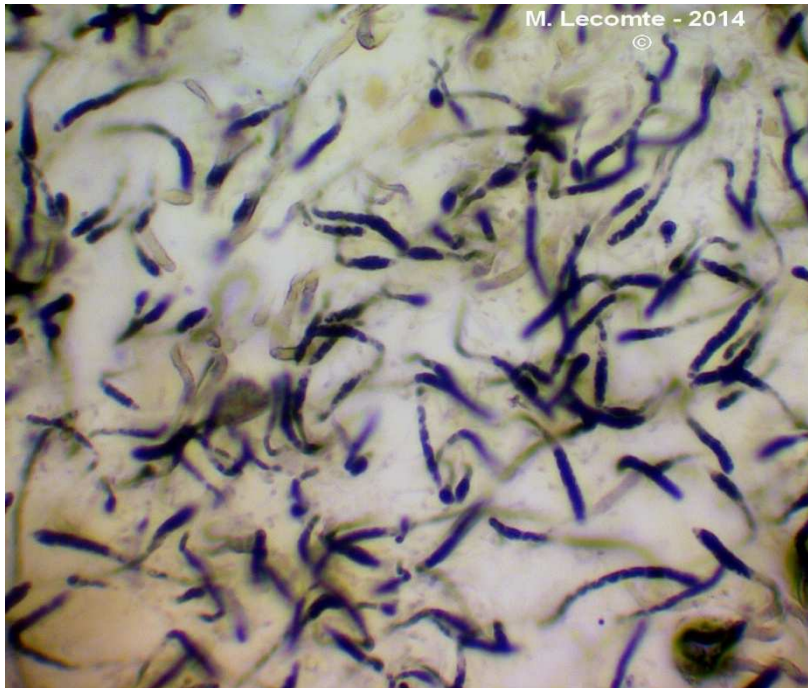
- ++ Prélever un scalp de quelques millimètres sur une zone +/- proéminente (pincer si nécessaire) située près du centre du chapeau, approximativement au 1/3 du rayon, en prenant soin de biaiser aussi finement que possible.
- ++ Déposer le scalp dans l'eau, le retourner et éponger.
- ++ Sous la loupe stéréoscopique (à défaut, sous une loupe quelconque et sous un bon éclairage), découper l'étroit pourtour biaisé (le bord du bord !) ; le débiter en quelques très petits morceaux qui doivent ressembler à des lambeaux de dentelle ; les transporter "par voie d'eau" dans le bleu de cré-syl.
- ++ Laisser agir le colorant durant 2 à 3 minutes ; poser la LCO ; écraser doucement d'un mouvement vertical (et non de translation) de manière à avoir une dispersion centrifuge (en bouquet) qui révèle mieux le « chevelu ».
- ++ Si l'observation à sec (40 ou 60x) suffit généralement, elle est tout de même meilleure sous les objectifs à immersion (63x ou 100x). Ne pas oublier de retirer l'éventuel filtre bleu du microscope.
- ++ Si le manque de résultats se confirme et qu'après cela, vous n'arrivez pas à mettre en évidence les dermatocystides, il est temps maintenant d'avoir recours aux réactifs sulfoaldéhydiques.

## 2. La méthode préconisée par Pierre-Arthur MOREAU

### MODE OPÉRATOIRE

basé sur une méthode de grattage, qui est une trouvaille de Christian DAGRON.

- Déposer sur la partie gauche d'une lame porte-objet une goutte d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) dilué au maximum à 50 % ainsi qu'une goutte de benzaldéhyde (plus généralement, n'importe quel aldéhyde) et mélanger les deux. Il est évident que la réaction est beaucoup plus vive et plus nette avec de l'acide sulfurique à 80 %.
- Réaliser un scalp à la lame de rasoir.
- Le retourner sur l'ongle et gratter délicatement toute la chair avec la lame de rasoir. SURTOUT, ne pas oublier de retourner à nouveau le scalp pour le replacer à l'endroit ; déposer un des deux morceaux dans le SBA durant 10 à 30 secondes, selon la dilution de votre acide sulfurique.
- Placer une goutte d'eau au centre de la lame.
- Y faire glisser la scalp, placer la lamelle couvre objet et observer : les dermatocystides apparaissent comme des « têtards » dont la couleur varie du gris bleu au noir. On dit alors qu'elles sont SBA+.



◀ Dermatocystides chez *Russula sanguinea*

#### Une autre astuce de Dagron :

- ++ appliquer une double coloration : rouge congo + bleu coton
  - ++ décolorer à l'eau de Javel durant +/- 30 secondes
- Cette décoloration épargne le contenu des éléments à paroi épaisse

#### Une autre astuce de PAM :

- ++ prélever un scalp, sec ou non
- ++ placer dans l'eau de Javel durant 30 sec. à 1 min. maximum
- ++ rincer
- ++ colorer au RC (ammoniacal si on travaille sur du matériel

sec)

- les poils du chevelu sont colorés en rouge
- les piléocystides ne sont pas colorées, mais la paroi est réfringente et jaunâtre dans le RC  $NH_3$
- on trouve un contenu granuleux dans les dermatocystides
- le contenu des hyphes primordiales n'est pas granuleux

## Quelques REMARQUES

++ Il faut savoir que les *Compactae* (*R. nigricans*), les *Delicineae* (*R. delica*) et les *Foetentineae* (*R. foetens*) ont des dermatocystides grêles, parfois difficiles à observer, ainsi que quelques ochrosporées douces : *R. romellii*, *R. curtipes*, *R. rubroalba*, qui peuvent paraître acystidiées en première observation (elles sont seulement beaucoup moins abondantes chez ces espèces).

++ Après application du réactif SBA, on voit généralement apparaître des corpuscules gris-noirâtres dans les dermatocystides positives de la cuticule des russules.

++ Chez *Russula albonigra*, ces corps noirâtres sont remplacés par une grande inclusion jaunâtre, tant dans les dermatocystides que dans les cystides hyméniales.

++ La réaction est toujours très nette sur le frais, mais parfois peu sensible sur matériel sec. Autant que possible, observer ce caractère avant de mettre en herbier (si c'est indispensable, mélanger une goutte d'acide sulfurique à 80 % avec 1 goutte de benzaldéhyde, sur lame de verre, et y placer le morceau d'exsiccatum).

++ Il est préférable d'utiliser ces réactifs en préparation extemporanée, car les solutions acides s'avèrent instables, polymérisent et ne se conservent pas.

++ Dans la pratique, si on ne souhaite pas multiplier les produits, notre préférence va au SBA et à la SV, qui donnent entière satisfaction dans quasiment tous les cas.

++ Une trop grande concentration d'acide rend les coupes plus difficiles à déchiffrer (surtout, ne pas utiliser d'acide sulfurique pur), et ne facilite pas obligatoirement la réactivité, suite au mauvais pouvoir pénétrant de la solution dans les cellules .

++ Pour l'observation du scalp après réaction, nous conseillons fortement d'utiliser de l'eau bidistillée, et non de l'eau du robinet. Lorsqu'on passe à l'eau après réaction dans le SBA, on peut voir apparaître un précipité blanchâtre, qui personnellement ne nous dérange pas et ne fausse pas l'observation. Cependant, il est possible d'éviter ces petits inconvénients en transférant la pièce à observer dans la glycérine.

++ **Si on observe dans l'acide**, il faut se montrer très prudent lors de l'observation à l'immersion, afin de ne pas placer l'objectif 100x en contact avec l'acide sulfurique, suite à une mauvaise manœuvre (débordement ou bris de lame)...!

++ **Ordre de sensibilité** des réactifs SB (du – au +) : la SV, le SBA, le SP (sulfopipéronal), mais ce dernier est absolument introuvable dans le commerce.

## Des renseignements hétéroclites

++ Chez *R. cyanoxantha*, on trouve des lamelles

++ *R. amoena* & *virescens* ont une structure (une trame) semblable aux lactaires *Plinthogali*, avec des hyphes

++ Caractères que peut présenter une russule selon R. Maire :

= ixocutis gélinifé avec des hyphes minces (poils du chevelu)

= présence de laticifères dans la chair, avec des éléments émergents à contenu dense

= des piléocystides SBA+ à cloisons étranglées et paroi épaissie (le terme « dermatocystide » regroupe 2 mots : → piléocystide, qu'on trouve sur la cuticule → caulocystide, qu'on trouve sur le pied)

= des hyphes primordiales étroites, cloisonnées, à contenu granuleux, à paroi épaisse, non SBA+, à cloisons non étranglées

++ Dans les Russulales, on trouve aussi les *Stereum*, *Auriscalpium*, *Heterobasidion*

++ *R. ochroleuca*, *atropurpurea* (dont le nom est invalide = *bresadolae*), *pumilla*, *viscida* ont du jaune brun à la base du pied, une cuticule visqueuse, et des poils à paroi basale épaisse

++ On peut faire facilement la différence entre *densifolia*, *acrifolia* et *clementinae* en observant la forme des piléocystides et leur épaississement basal