

## **LA DETERMINATION MICROSCOPIQUE DES CHAMPIGNONS**

par J ean Lachapelle

### **Introduction**

La détermination des champignons implique en premier lieu une reconnaissance des caractères apparents, dits macroscopiques. Ces détails remarquables sont visibles à l'œil nu, ou demandent éventuellement le secours d'une loupe de poche : leur reconnaissance nécessite un sens de l'observation aiguisé et entraîné. Il est recommandable à un débutant d'apprendre d'abord à reconnaître ces caractères : une observation fine et attentive permet à elle seule de déterminer beaucoup d'espèces. Il va de soi que sur le terrain, ces éléments sont les seuls, lorsqu'on les a mémorisés, auxquels on peut se référer pour nommer un champignon, autrement dit un sporophore. Des données environnementales sont également observables : le substrat, l'arbre avec lequel le champignon vit ou est inféodé, le biotope ... ; enfin, les propriétés organoleptiques, telles que l'odeur et la saveur de la chair, sont parfois décisives...

La structure interne du champignon révèle d'autres caractères ; ils sont nombreux et souvent ont le grand mérite d'être précis, voire signalétiques. La combinaison des particularités macroscopiques et microscopiques est celle qui donne les plus grandes chances de nommer correctement un champignon, exercice souvent difficile, mais particulièrement excitant pour l'esprit.

Afin d'aider les mycologues débutants, nous nous proposons de présenter des articles déjà parus dans la feuille de contact du Cercle de Mycologie de Bruxelles, d'y ajouter le texte d'un exposé présenté lors d'une séance d'étude de pratique de la microscopie, ainsi qu'un article sur les aspects physico-chimiques de la microscopie des champignons, surtout agaricoïdes.

Le premier article est dû au défunt professeur Paul HEINEMANN, mycologue et botaniste professionnel, membre fondateur et Président du Cercle de Mycologie Bruxelles pendant de nombreuses années. Faut-il préciser qu'il était un excellent microscopiste ? Cet article a paru d'abord en 1945 dans la revue des Naturalistes belges et a été reproduit dans la feuille de contact du Cercle en 1992.

Le deuxième article est un exposé que nous avons commis devant quelques membres du Cercle de Bruxelles qui possédaient déjà une belle expérience de la mycologie et qui souhaitaient approfondir la pratique de la microscopie. Cet exposé accompagnait une présentation du matériel microscopique et une démonstration de son utilisation.

Le troisième article, largement inspiré par l'ouvrage de LANGERON, exposera de manière synthétique les notions et phénomènes physico-chimiques mis en œuvre lors de la microscopie des champignons. Il fournira également des renseignements sur les principaux produits auxquels les mycologues ont recours.

Un dernier article est dû au défunt Dr. Fodor, membre actif du Cercle de Bruxelles, spécialisé dans les champignons de la famille des Aphylophorales, plus particulièrement les polypores. Il a été publié en 1987. Cet article concerne cette famille particulière de champignons lignicoles.

#### **Source de documentation sur la microscopie**

- Jossierand, M., 1952, « *La description des champignons supérieurs* », Encyclopédie Mycologique, XXI, P. Lechevalier, Paris.  
Bien qu'il ait un peu vieilli, cet ouvrage reste le livre de chevet des mycologues. Une fois son contenu maîtrisé, le mycologue amateur n'a plus éventuellement qu'à se perfectionner dans l'un ou l'autre domaine qui l'intéresse particulièrement. Cet ouvrage expose magistralement (quasi) toutes les notions de macroscopie et de microscopie.
- Locquin et Langeron, 1978, « *Manuel de microscopie* », Masson.  
De grande réputation, cet ouvrage expose d'une manière approfondie et systématique toutes les notions de physique et de chimie impliquées dans l'emploi du matériel et la conduite des travaux de microscopie. Il concerne toutes les branches de la biologie et pas seulement la mycologie.
- La Société Mycologique du Poitou dont le siège social est situé 165, allée de le Morinière, 86130 à Dissay, a publié trois bulletins spéciaux qui, à eux seuls, exposent toutes les notions utiles aux mycologues amateurs :
  - 1/ « *L'examen des champignons, étude de leurs caractères avant tout recours au microscope* », Dr Z. de Izarra, Bulletin spécial n°6, 96 pages.
  - 2/ « *Le Microscope, constitution, fonctionnement, emploi en mycologie* », A. Ayel et A. Moïnard, 2<sup>e</sup> édition, octobre 1992, Bulletin spécial 3a, 200 pages.
  - 3/ « *Introduction à l'étude microscopique des champignons* », Dr Z. de Izarra, Bulletin spécial n°5, 80 pages.Ces publications sont très bien conçues et destinées à des débutants soucieux de progresser, en respectant notamment une terminologie précise et codifiée. Elles exposent d'une part, la théorie du microscope, en particulier son usage et ses exigences en mycologie et, d'autre part, les aspects macroscopiques et microscopiques de l'étude des champignons.
- La plupart des ouvrages généraux de mycologie présentent une introduction plus ou moins développée, visant à initier le mycologue amateur. Les monographies traitant d'un genre particulier présentent souvent les aspects macroscopiques et microscopiques spécifiques aux champignons qu'on y rencontre.
- Enfin, il ne faudrait pas perdre de vue que la communauté des mycologues a pour philosophie d'aider ceux qui veulent s'initier ou approfondir la mycologie pour la promouvoir : rien de tel souvent que le conseil d'un collègue plus avancé ! Il ne faut pas hésiter non plus à consulter les sites Internet spécialisés : ils sont nombreux, conviviaux et... gratuits.

## GUIDE POUR L'ETUDE MICROSCOPIQUE DES CHAMPIGNONS SUPERIEURS

par Paul Heinemann

N.B. : cet article a paru dans la feuille de contact du 4<sup>e</sup> trimestre 1992 du Cercle de Mycologie de Bruxelles. Il est complété par deux autres articles de Paul HEINEMANN parus dans les feuilles de contact du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> trimestres 1989.

Pour les "jeunes" membres qui se mettent à la microscopie, nous donnons ci-après l'essentiel d'un travail qui a paru dans un Bulletin des Naturalistes Belges (juillet-août 1945 : 7-8).

L'étude anatomique se fera de préférence sur matériel frais ou, à défaut, sur matériel sec regonflé par un séjour de quelques minutes dans l'ammoniaque. Dans ce cas, il est généralement difficile d'obtenir de bonnes coupes dans les lamelles et dans le revêtement.

Voici d'abord la composition des réactifs et colorants les plus usités avec indication de leurs usages principaux :

Ammoniaque : solution commerciale diluée au quart.

Regonflement du matériel d'herbier.

Réactif de Melzer : iode 0,5 g, iodure de potassium 1,5 g, eau 20 c, hydrate de choral 20 g Réactif des membranes. Les spores devenant, au contact du Melzer, gris bleuâtre ou noirâtre sont dites amyloïdes. Les hyphes de certains champignons rougissent fortement.

Lactophénol : phénol 10 g, acide lactique 10 g, glycérine 20 g, eau 10 g. Regonflement du matériel d'herbier (à chaud).

Carmin acétique : saturer de carmin, au bain-marie bouillant, de l'acide acétique pur étendu de son volume d'eau. La solution ne doit pas bouillir. Laisser refroidir, décanter et filtrer. Coloration nucléaire ; usage spécial dans l'étude des basides.

Bleu de crésyl : solution aqueuse à 1% ou plus diluée. Bleu polychrome colorant en rouge violacé certaines membranes (métachromasie).

Fuchsine phéniquée : fuchsine 1 g, alcool 10 g, eau phéniquée à 1% 90 g. Usage spécial dans l'étude du revêtement des Russulacées.

Sulfovanilline (à préparer au moment de l'emploi ; ne se conserve que quelques jours) : dans quelques gouttes d'acide sulfurique pur additionnées d'un peu moins d'eau, dissoudre quelques cristaux de vanilline bien pure. Etude des cystides des Russulacées.

Bleu coton (C4B) : solution à 2 %, aqueuse ou dans l'acide lactique (bleu lactique). Colorant de membranes.

Rouge Congo : solution à 1% dans l'ammoniaque diluée. On peut y ajouter 20 % de glycérine pour empêcher les préparations de sécher. Colorant de membranes.

Les grossissements à employer sont indiqués entre parenthèses. Il s'agit, bien entendu, d'indications non rigoureuses que chacun pourra adapter à ses possibilités.

Nous considérerons successivement les spores, les lamelles, les revêtements du chapeau et du pied, la chair et la localisation des pigments.

### SPORES

L'étude microscopique des spores se fera, de préférence, à partir d'une sporée. A défaut de celle-ci, un fragment de lamelle peut convenir.

Pour obtenir une sporée, c'est-à-dire un dépôt assez épais de spores, il suffit, en principe, de déposer sur une feuille de papier, un champignon dépourvu de son pied, les lamelles regardant vers le bas (donc dans leur position naturelle) (fig. 1) ; au bout de six à vingt-quatre heures, la sporée est généralement suffisante. Ce procédé convient pour les gros champignons ; les petits se fanent souvent avant l'obtention du dépôt désiré. On prévient cet échec en les faisant sporuler dans une atmosphère confinée humide (boîte ou tube fermé). Un autre procédé consiste à employer des morceaux de papier percés d'un trou par lequel on fait passer le pied du champignon, le tout étant posé sur un verre contenant un peu d'eau de telle façon que la base du pied y trempe (fig. 2).

On emploiera du papier lisse blanc pur afin de pouvoir définir la couleur de la sporée avec le maximum de précision.

Les sporées se conservent facilement en herbier, si on a soin de replier le papier.

Les spores fraîches peuvent s'examiner dans l'eau. Si la sporée a eu le temps de se dessécher, on emploiera l'ammoniaque. Pour les spores roses anguleuses, il est recommandé de les traiter par le lactophénol qu'on laissera agir plusieurs heures avant l'examen ( $\times 600-700$ , à sec ;  $\times 1000-1500$  avec immersion).

Lors de l'examen d'une spore, il faut tenir compte de sa position par rapport au plan optique. Ne doivent retenir l'attention que les spores vues exactement de côté ou exactement de face. Ces deux aspects seuls sont envisagés dans les descriptions. Dans la vue de côté (profil dorsi-ventral), on distingue l'arête interne, l'arête externe (ces deux dénominations dues à JOSSERAND, remplacent celles, ambiguës, d'arête dorsale et d'arête ventrale, précédemment employées), le sommet présentant parfois un pore germinatif et, à la base, l'apicule ou appendice hilare. Dans la vue de face, on tient compte surtout de la forme du contour (fig. 3).

La mesure des spores se fait, soit directement au micromètre oculaire, soit, de préférence, par mesure de dessins exécutés à la chambre claire, à une échelle déterminée. Il faut toujours mesurer un certain nombre de spores, au moins une dizaine, et exprimer les limites observées, par exemple  $5,6-10,3 \times 4,5-6,1 \mu\text{m}$  ( $1 \mu\text{m} = 0,001 \text{ mm}$ ). Fréquemment, les sporées sont plus ou moins hétérogènes et, à

côté de spores normales, on en trouve des plus petites ou (et) des plus grandes ; dans ce cas, on mettra ces dimensions extrêmes entre parenthèses, par exemple (4,9)5,6- 10,3(12,1) x (4,0)4,5- 6,1(6,8)  $\mu\text{m}$ .

Divers réactifs peuvent être utiles dans l'étude des spores :

#### Réactif de Melzer

Les spores amyloïdes prennent, au contact des réactifs iodés et en particulier du réactif de Melzer, une teinte grisâtre plus ou moins intense, soit générale, soit localisée sur les verrues.

Il est parfois difficile de constater cette propriété lorsqu'elle est peu intense, comme chez les Amanites. On peut avoir recours, dans ce cas, à un témoin consistant en spores que l'on sait non amyloïdes, de taille analogue, si possible, mais présentant, dans leur forme, une particularité quelconque permettant de les reconnaître. Par exemple, pour constater la réaction positive des spores globuleuses d'*Amanita citrina* ou peut les comparer, dans une même préparation, avec les spores ovoïdes, non amyloïdes d'*A. muscaria*.

Les spores non amyloïdes donnent parfois, avec le réactif de Melzer, des colorations brun rougeâtre plus ou moins intenses qu'il ne faut pas confondre avec la propriété précédente (chez les Lépiotes notamment).

#### Acide sulfurique concentré

Les spores de Coprins et de Psathyrelles virent, dans ce réactif, du brun au violet.

#### Bleu de crésyl

Ce réactif colore, en tout ou en partie, la membrane de certaines spores. Il permet généralement de distinguer les spores mûres non colorables, des spores non mûres colorables (cette propriété est commune à beaucoup d'autres colorants).

#### Ammoniaque

La solution ordinaire (dilué au quart) produit parfois une intensification de la couleur de certaines spores. L'ammoniaque concentrée dissout les verrues des spores de *Lyophyllum leucophaeatum*.

### **LAMELLES** (Hyménophore).

L'étude des basides et des cystides peut se faire sur un fragment d'hyménium dissocié par percussion. Pour cela, on placera dans une goutte d'eau ou de réactif, entre lame et lamelle, un très petit fragment d'hyménium. Ensuite, on donnera quelques coups sur le couvre-objet, au moyen d'un objet quelconque mais pas trop dur (gomme, ongle, crayon, etc.), jusqu'à dissociation suffisante. Pour obtenir un bon résultat, sans casser le couvre-objet, il faut tenir celui-ci immobile et frapper à l'endroit précis où se trouve le fragment à dissocier.

L'étude complète de la lamelle nécessite la confection de coupes transversales minces. A priori, de telles coupes paraissent difficiles à réaliser par des moyens simples, or il n'en est rien. Voici comment on y arrive aisément : un fragment de

lamelle est posé sur un porte-objet humecté ; au moyen d'un bout de papier buvard, on enlève l'excès d'eau, ce qui a pour résultat l'adhérence du fragment de lamelle au porte-objet. Ensuite, au moyen d'un scalpel bien tranchant ou d'une lame de rasoir de sûreté, on donne, transversalement, une série de coups très rapprochés, exactement comme si on voulait faire du hachis (fig. 4). Après quelques instants de cette manœuvre, on a généralement réussi plusieurs bonnes coupes. Pour les isoler, il suffit de noyer le tout dans une grosse goutte d'eau ; au moyen d'une pince on écarte les morceaux trop épais. Les bonnes coupes sont examinées, soit dans l'eau, soit dans un réactif approprié. Pour obtenir un bon résultat, il faut surtout veiller à maintenir la bonne direction : les coupes doivent être bien perpendiculaires à l'axe de la lamelle et il faut qu'à chaque coup la totalité du tranchant touche le porte-objet. Le couvre-objet sera toujours posé avec précaution, sans appuyer, afin de ne pas désorganiser le coupes (x 250-500).

La coupe d'une lamelle (fig. 8) montre la structure suivante :

- dans la partie médiane, l'ensemble des hyphes constitue la trame dont on distingue cinq types principaux ayant une grande importance systématique. Ce sont : la trame bilatérale, la trame inversée, la trame régulière, la trame emmêlée, la trame vésiculeuse.- à la périphérie, une couche, généralement continue, de basides, parfois entremêlées de cystides, forme l'hyménium.
- entre l'hyménium et la trame, on distingue une couche plus ou moins individualisée, celluleuse ou plus ou moins filamenteuse : le sous-hyménium

Sur le tranchant de la lamelle, la structure est soit analogue à celle des faces (arête homomorphe), soit différente par la présence de poils de formes variées (cheilocystides) (arête hétéromorphe).

### Basides (fig. 3)

Il est surtout intéressant ici d'observer le nombre de spores par baside ou, ce qui revient au même, le nombre de stérigmates. Pour cela il est parfois avantageux de colorer légèrement la préparation (x 250-500).

Chez les champignons à spores colorées, l'examen à sec et de face, d'un fragment de lamelle, renseigne rapidement sur le nombre de stérigmates (x 100-250).

Les basides portent généralement quatre spores (basides tétrasporiques), parfois deux spores (basides bisporiques), exceptionnellement une ou trois spores (basides mono ou trisporiques).

KÜHNER (1938) a indiqué une réaction très utile pour la systématique des Agaricacées leucosporées. Il s'agit de la présence, dans certaines basides dites carminophiles (ou sidérophiles) de granules très nombreux se colorant fortement par le carmin acéto-férrique. Voici le mode opératoire : un fragment d'hyménium est placé, sur un porte-objet, dans une grosse goutte de carmin acétique ; on chauffe lentement presque à ébullition, en remuant avec une aiguille en fer

jusqu'au moment où le liquide se trouble ; à ce moment, on le remplace par une goutte fraîche et on examine (x 500 à sec ; X 1000 à l'immersion).

### Cystides

L'examen de ces organes ne présente généralement pas de difficulté. Leur répartition se déterminera le mieux sur une coupe transversale de la lamelle.

Lorsque les cystides sont petites ou enfouies dans l'hyménium, il peut être nécessaire de les colorer. Il n'est pas possible d'indiquer un colorant qui convienne dans tous les cas, mais on peut dire que, d'une façon générale, les réactifs agissent différemment sur les cystides et les autres éléments de l'hyménium. On essayera par exemple : le bleu de crésyl (la plupart des cystides sont métachromatiques), le bleu coton, le Melzer, la sulfovanilline (dans le cas des Russulacées), etc.

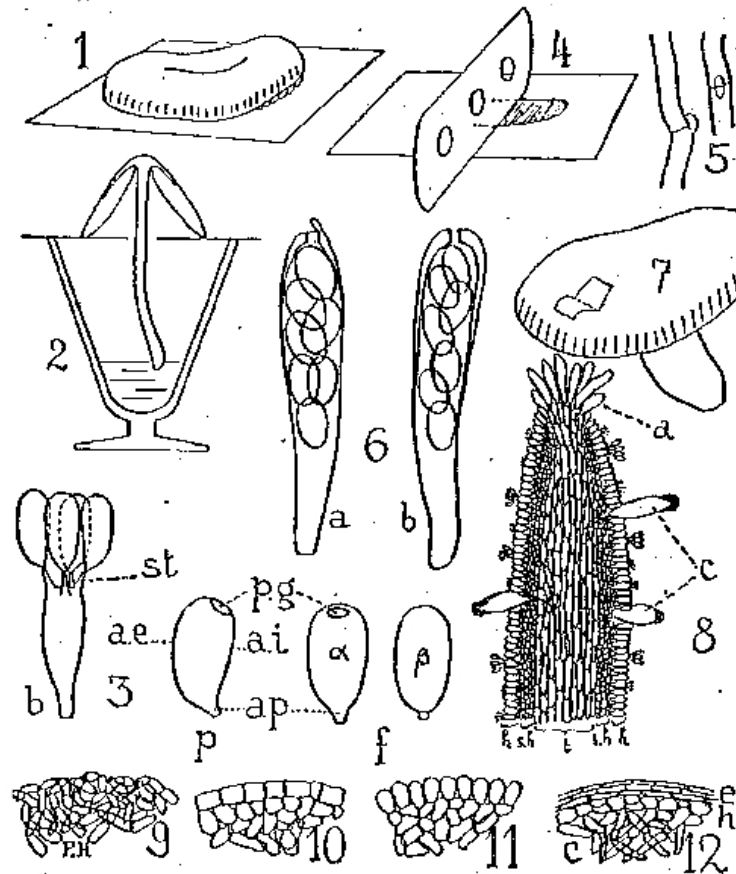


Fig. 1. Dispositif pour obtenir une sporée. - Fig. 2. *Id.* dans le cas de petits champignons. - Fig. 3. b : baside, st : stérigmates, p : spore vue de profil, f : spore vue de face,  $\alpha$  face interne,  $\beta$  : face externe. a.i. : arête interne, a.e. : arête externe, p.g. : pore germinatif, ap : apicule. - Fig. 4. Dispositif pour la

confection de coupes transversales dans les lamelles. - Fig. 5. Anses d'anastomose. - Fig. 6. asque operculé, b : asque inoperculé. - Fig. 7. Préparation d'un lambeau de cuticule. - Fig. 8. Coupe schématique dans une lamelle à trame régulière, t. trame, s.h. sous-hyménium, h. hyménium, a : arête hétéromorphe, c : cystides. - Fig. 9. Revêtement non différencié. - Fig. 10. Revêtement celluleux, - Fig. 11. Revêtement hyméniforme. - Fig. 12. Revêtement filamenteux, e : épicutis h : hypoderme, c : chair.

### REVETEMENT DU CHAPEAU

Signalons d'abord brièvement les divers types de revêtements que l'on peut rencontrer chez les Agaricales :

1° Revêtement non différencié, c'est-à-dire non distinct de la chair du chapeau (fig. 9)

2° Revêtement celluleux, formé de cellules plus ou moins isodiamétriques (fig. 10).

3° Revêtement hyméniforme, formé de cellules plus ou moins claviformes (fig. 11).

4° Revêtement filamenteux (et alors fréquemment séparable) (cuticule). On distingue parfois une couche superficielle (épicutis) et une couche plus profonde à éléments plus gros (hypoderme) (fig. 12).

Le revêtement présente parfois des poils de formes variées. Quand il y a un voile général, il en porte souvent des restes.

L'étude du revêtement nécessite soit une coupe normale, soit une coupe parallèle au revêtement (scalp) ; cette dernière pouvant être remplacée par un lambeau de cuticule lorsque celle-ci est suffisamment différenciée.

Pour effectuer des coupes normales au revêtement, on fendra d'abord le chapeau en deux, selon un diamètre. On exécutera ensuite des coupes, à main levée, dans la région centrale du revêtement. Il est à conseiller d'entamer d'abord la chair et non le revêtement, de façon à obtenir une coupe en biseau très aigu dont une partie au moins sera suffisamment mince.

On peut souvent se dispenser de faire une coupe normale. Dans beaucoup de cas, il suffit de prélever, au scalpel ou au rasoir, un fragment aussi mince que possible (x 250-500) (scalp).

Si le chapeau présente une cuticule bien différenciée, on peut facilement en examiner un lambeau de face. Voici comment on procédera : au moyen d'un scalpel, on découpe les trois côtés d'un rectangle, que l'on rabat autour du quatrième côté (fig. 7). On racle ensuite la face inférieure du lambeau rabattu, de façon à éliminer la chair qui y adhère. On peut alors le séparer, et, en ayant soin de bien l'orienter, l'examiner dans une goutte d'eau ou de réactif (x 250-500). L'emploi de colorants est parfois utile. Notons, dans le cas des Russulacées, la fuchsine phéniquée et la sulfovanilline.



### Fuchsine phéniquée

La cuticule des Russules est souvent épaisse, ce qui la rend obscure et difficile à déchiffrer. MELZER a préconisé le procédé suivant qui donne de bons résultats : traiter le lambeau de cuticule, préparée comme ci-dessus, pendant cinq minutes par la fuchsine phéniquée ; laver à l'eau ; différencier pendant une minute dans l'acide chlorhydrique (4 %) ; laver à l'eau et examiner (x 500-700).

### Sulfovanilline

Ce réactif permet de déceler facilement certaines cystides du revêtement chez les Russulacées.

Lorsque le chapeau présente des verrues (provenant souvent du voile général), il est utile de les étudier. Le plus simple est d'en dissocier une partie par percussion (voir hyménium) ou d'essayer d'y pratiquer au scalpel, une coupe même grossière. Il faut examiner séparément les verrues du centre et celles de la périphérie du chapeau (x 250-500).

Dans le cas de champignons petits ou fragiles, il est pratiquement impossible de faire une coupe convenable, à main levée, selon le procédé ordinaire. On s'adressera alors à de jeunes carpophores fermés qu'on traitera ainsi : décapiter le sommet du chapeau par une section perpendiculaire à l'axe du pied, puis enlever des tranches aussi minces que possible, en coupant un peu obliquement de préférence. On obtiendra, de cette façon, en plus de la coupe du revêtement, d'excellentes coupes dans les lamelles (tenir compte du fait que se sont de jeunes lamelles dont les éléments anatomiques n'ont probablement pas atteint leur taille normale). Ce procédé convient notamment pour l'étude des petits Coprins (J OSSERAND). Certaines Agaricacées de très petite taille, dont le chapeau n'atteint que 2 mm de diamètre, ne se prêtent que très difficilement aux opérations décrites ci-dessus. Dans ce cas, un moyen très simple consiste à examiner le carpophore entier à sec, sans couvre-objet (x 100). Cet examen permet de localiser rapidement les divers éléments anatomiques qui seront ensuite observés, à un plus fort grossissement, dans une préparation ordinaire obtenue par dilacération et dissociation dans un milieu liquide.

## **REVETEMENT DU PIED**

Les hyphes très fines du revêtement du pied conviennent particulièrement pour la recherche des anses d'anastomose. On observera aussi fréquemment des poils (caulocystides).

### Anses (fig. 5)

Rappelons que les boucles ou anses d'anastomose caractérisent les hyphes diploïdes (c'est-à-dire contenant deux noyaux). mais on rencontre des hyphes diploïdes non bouclées et aussi des hyphes haploïdes. Précisons que toutes les hyphes d'un carpophore sont soit diploïdes, soit haploïdes. Ces caractères ont une grande valeur systématique.

Pour la recherche des boucles, on arrachera de la surface du pied, au moyen d'une pince fine, un peu de tissu superficiel que l'on dilacérera dans l'eau au moyen d'aiguilles. Les anses d'anastomose s'observent le mieux sur les hyphes les plus minces (x 500-1000).

L'usage d'un colorant est généralement superflu. A remarquer qu'il est parfois très difficile de conclure à la présence ou à l'absence de boucles. Elles sont souvent rares et difficiles à voir : un examen très minutieux s'impose donc.

### **CHAIR**

On peut étudier la chair sur des coupes fines faites dans la partie centrale du chapeau. La forme des hyphes, la présence éventuelle d'hyphes oléifères ou laticifères et la localisation des pigments sont les caractères les plus utiles à observer (x 250-500).

### **LOCALISATION DES PIGMENTS**

On appelle pigments les substances qui donnent leurs couleurs aux diverses parties du carpophore. Lors de l'étude microscopique, il est intéressant de les localiser et de les caractériser. Ils sont surtout répandus dans les revêtements. On en distingue trois grands groupes :

#### **1. Pigments vacuolaires**

Ils sont dissous dans la vacuole. Il ne faut pas les confondre avec les pigments de membrane dont on peut les distinguer en faisant l'examen dans une solution saline concentrée. Il y a plasmolyse : la vacuole devient plus petite et on peut facilement constater si elle est seule colorée. Plus simplement en observant les bords de la préparation, dans le cas de pigment vacuolaire, les cellules brisées, vidées de leur contenu, sont incolores. Dans quelques cas, le suc vacuolaire contient des cristaux du pigment.

#### **2. Pigments membranaires**

La membrane elle-même est colorée. Il ne faut pas confondre ce cas avec le précédent.

#### **3. Pigments figurés**

Ils s'observent, sous formes de granules ou de gouttelettes, soit dans les hyphes (pigments intracellulaires), soit entre les hyphes (pigments intercellulaires).

L'étude des pigments nécessite du matériel frais. Par la dessiccation, les pigments dissous précipitent. Par la conservation dans les liquides, les pigments peuvent se dissoudre ou au contraire s'insolubiliser selon leur nature.

### **Addenda**

#### **I.- Autres groupes de grands champignons**

Pour l'étude des autres groupes de grands champignons, on peut s'inspirer de ce qui a été dit plus haut. Voyons cependant quelques cas particuliers.

### Boletacées

L'étude de l'hyménium très mou est difficile. Il faut s'adresser à des carpophores plutôt jeunes et effectuer les coupes, à main levée, avec un rasoir bien tranchant ou faire les coupes à partir d'exsiccata non regonflés.

### Polyporacées (et autres groupes à chair dure ou élastique).

Le regonflement nécessite un réactif plus énergique que l'ammoniaque. On utilise la potasse caustique à 20 % et on chauffe. Les coupes peuvent se pratiquer sur matériel sec et être regonflées ensuite.

### Ascomycètes

Dans l'étude de l'asque, il est indispensable de constater si cet organe est operculé ou non (fig. 6). L'examen doit se faire dans le Melzer ou dans tout autre liquide iodé, les asques présentant souvent, dans la région de l'ostiole, une zone amyloïde.

Les spores sont fréquemment ornées de ponctuations ou de réseaux qui peuvent être mis en évidence par le bleu lactique.

## **II.- Examen de la trame de l'hyménophore des Agaricales**

N.B. : reproduction de l'article paru dans la feuille de contact n° 2, 1989.

La trame est d'une importance primordiale dans la définition des genres d'Agaricales. Parmi les cas les plus remarquables, citons la trame bilatérale des Amanites et la trame inversée des Pluteus et des Volvaires. La plupart des autres genres ont une trame régulière ou emmêlée. Malheureusement l'examen de la trame est souvent malaisé et beaucoup d'amateurs, et même des professionnels éprouvent des difficultés pour réussir des coupes convenables.

Heureusement beaucoup de champignons se reconnaissent sans qu'il faille recourir à l'examen de la trame. Mais dans les cas difficiles, il faut y passer : selon le jargon de nos politiciens, c'est une nécessité incontournable. Voyons donc comment il faut s'y prendre. Nous envisagerons deux cas faciles :

### 1. Coupes dans des lamelles d'un champignon frais

Par exemple : Amanite, Hygrophore, Russule.... La méthode la plus efficace est celle que j'ai préconisée dès 1945 (Bull. des Nat. Belges n° 7-8).

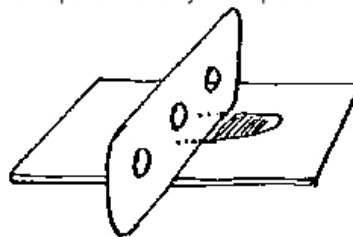
Un fragment de lamelle ou une lamelle, est posé sur une lame porte-objet humectée ; au moyen d'un bout de papier filtre on enlève l'excès d'eau ce qui a pour effet de "coller" la lamelle de champignon à la plaque de verre. Ensuite, au moyen d'un scalpel bien tranchant ou d'une lame de rasoir de sûreté, on donne transversalement une série de coups très rapprochés, exactement comme si on voulait faire du hachis (fig. ci-dessous). Après quelques instants de cette manœuvre, on a réussi plusieurs bonnes coupes. Pour les isoler, il suffit de noyer le tout dans une grosse goutte d'eau ; au moyen d'une pince ou d'une aiguille, on écarte les morceaux trop épais et on pose un couvre-objet après avoir

éventuellement ajouté un réactif approprié. Pour obtenir un bon résultat, il faut surtout veiller à maintenir la bonne direction ; les coupes doivent être bien perpendiculaires à l'axe de la lamelle et il faut qu'à chaque coup le tranchant soit en contact avec le porte-objet. Le couvre-objet sera toujours posé avec précaution, sans appuyer, afin de ne pas désorganiser les coupes. On utilisera un objectif moyen pour l'observation.

Cette méthode convient à presque tous les champignons à lamelles. Elle peut être aussi utilisée sur exsiccatum mais alors le résultat est souvent moins bon. Il faut évidemment faire regonfler la lamelle avant de procéder aux coupes, et même, éventuellement, la chauffer (sur lame, à ébullition) pour chasser l'air qui reste accroché entre les hyphes de la trame. La méthode ne convient pas aux bolets (voir ci-après).

## 2. Coupe dans l'hyménophore d'un bolet sec

Il est très difficile de pratiquer des coupes dans l'hyménophore d'un bolet frais. Par contre, la chose est souvent très facile sur du matériel sec. On fera d'abord une coupe de l'exsiccatum pour voir les tubes longitudinalement ; il suffit alors, avec un scalpel bien coupant, de raboter la surface ainsi obtenue : on formera des copeaux qui, placés dans une goutte de réactif, par exemple, du rouge Congo ammoniacal, se dérouleront rapidement. Comme pour les autres coupes on éliminera les trop gros morceaux avant de placer, avec beaucoup de douceur, le couvre-objet. On peut remplacer le scalpel par une lame de rasoir, celle-ci pouvant même être montée sur un manche approprié ; on travaille alors comme si on voulait raser la coupe dans l'hyménophore.



### **III.- Les pleurocystides chez les Psalliotes (Agaricus)**

N.B. : reproduction de l'article paru dans la feuille de contact n° 1, 1989.

Les pleurocystides se trouvent sur les faces des lamelles. On peut les opposer aux cheilocystides qui garnissent l'arête des lamelles. Les unes et les autres peuvent être semblables ou très différentes.

Chez les *Agaricus*, certaines espèces comme *A. campester* n'ont aucune cystide ; d'autres, nombreuses, ont des cheilocystides et ce n'est qu'un tout petit nombre d'espèces qui ont des cheilo- et des pleurocystides. La présence de ces dernières est donc un caractère très important.

Pour observer les cystides, le mieux est de faire des coupes fines et

nombreuses dans les lamelles. On peut alors observer tout à la fois la position et la forme de ces éléments. Mais nous savons que la confection de coupes rebute beaucoup d'amateurs... et de professionnels. Il y a heureusement moyen de tourner la difficulté !

Pour les cheilocystides, il suffit d'observer une bande de lamelle, aussi étroite que possible, et comportant l'arête. On peut alors voir facilement si l'arête présente des cystides ou si elle en est dépourvue ; dans ce dernier cas, on doit normalement voir des basides sur l'arête qui peut donc être qualifiée de fertile. Cette première préparation se fait sans appuyer sur le couvre-objet et permet de voir les éléments en place, notamment de constater, par exemple, que les cheilocystides sont en touffes. Après ces constatations, on peut dilacérer l'arête en tapant sur la préparation à l'endroit où se trouve le morceau d'arête et en empêchant de l'autre main tout glissement latéral du couvre-objet. Si le morceau à dilacérer est petit et les coups bien centrés, on pourra voir des cheilocystides isolées.

Les pleurocystides sont beaucoup plus difficiles à trouver car elles sont, dans les rares cas où elles existent, très peu nombreuses. Pour rechercher leur présence, on peut prendre un morceau de lamelle de 3-4 mm de côté et on en fera une préparation sans appuyer sur le couvre-objet : on verra donc l'hyménium de face et s'il y a des pleurocystides, on les détectera assez facilement à un grossissement pas trop élevé (300 x par ex.) en éclairant fortement la préparation par le dessous. Cet examen permettra donc de savoir s'il y a des pleurocystides et, dans ce cas, on en connaîtra le diamètre, mais pas la forme ! A partir d'un autre morceau de lamelle, débarrassé de l'arête pour qu'il n'y ait pas de confusion entre pleuro- et cheilocystides, on fera une dilacération aussi poussée que possible au moyen d'une aiguille lancéolée ou d'un scalpel. Après la pose du couvre-objet, on achèvera la dilacération en tapotant ce dernier. Avec un peu de chance, on verra les pleurocystides de profil et on pourra les dessiner et les mesurer.

Une seule espèce européenne, *Agaricus vaporarius* Vitt., a "officiellement" des pleurocystides, encore qu'on ne le sache que depuis 1976 et que les flores l'ignorent très généralement.