

## Principaux produits chimiques utilisés en Lichénologie

par **Jean-Pierre GAVÉRIAUX**  
 14, les Hirsons ; 62800 – LIEVIN  
 E-mail : [Jean-Pierre.Gaveriaux@wanadoo.fr](mailto:Jean-Pierre.Gaveriaux@wanadoo.fr)

L'association algue-champignon permet la synthèse de métabolites secondaires (acides lichéniques et pigments) que l'on recherche habituellement à l'aide de réactifs macrochimiques spécifiques. Toutefois, les méthodes de détermination ne se limitent pas à ces simples réactions colorées thallines, de nombreuses autres techniques d'analyse existent, mais elles nécessitent l'emploi de produits chimiques divers que nous allons présenter.

### 1. Les produits pour les réactions colorées thallines

Ces réactions, connues de tous, sont très utilisées sur le terrain et au laboratoire. Elles apportent des informations indispensables pour progresser dans les clés de détermination. Trois substances (C, K et P) sont principalement utilisées.



a) **L'eau de javel** ou hypochlorite de sodium (notée **C**) : on utilise la solution concentrée du commerce (vendue en berlingots), placée dans un petit flacon compte-gouttes en plastique de quelques mL, facilement transportable sur le terrain (possibilité de récupérer un flacon ayant contenu un produit pharmaceutique). Le réactif est déposé avec l'embout du compte-gouttes sur le cortex, la médulle préalablement dégagée avec une lame de rasoir, le bord de l'apothécie... Instantanément ou dans les quelques secondes qui suivent une coloration se développe (ou non).

Si on désire une réaction plus propre, on peut déposer le réactif à l'aide d'une allumette effilée, d'un cure-dent en bois ou d'un morceau de papier filtre préalablement imprégné de C.

On peut avoir une coloration jaune, orange, rouge, verte... parfois fugace.

Les résultats de ces réactions colorées sont notés C+ suivi du nom de la couleur obtenue (Ex : cortex C+ rouge si on obtient une coloration rouge après avoir déposé C sur le cortex) ou C- lorsqu'il n'y a pas de modification de la teinte.

Quelques exemples de réactions C+ :

Le thalle de *Lecanora expallens* devient orange (acide thiophanique).

La médulle de *Parmelia subrudecta* devient rouge-carmin (acide lécanorique).

Le podétion de *Cladonia strepsilis* devient vert (strepsiline)...

La solution doit être changée fréquemment. Elle se décompose facilement et doit être renouvelée dès que l'odeur caractéristique de javel n'est plus assez perceptible

b) La **potasse** ou hydroxyde de potassium (notée **K**) : en solution aqueuse (10 à 35 %) placée, comme la précédente, dans un petit flacon compte-gouttes et utilisable selon les mêmes modalités.

Quelques exemples de réactions K+ :

Le thalle des *Xanthoria* est K+ rouge-pourpre (pariétine),

Le thalle des *Physcia* K+ jaune, celui de *Phlyctis argena* devient jaune puis rouge avec des petits cristaux (acide norstictique)...

Les apothécies et certaines parties du thalle d'*Ophioparma ventosum* sont K+ bleu-violet (présence d'un pigment la ventosine)...

Cette solution absorbe le dioxyde de carbone atmosphérique (CO<sub>2</sub>), devient progressivement inefficace et doit être remplacée lorsqu'un trouble apparaît. Il est conseillé de posséder une petite réserve de pastilles de potasse (10 grammes suffisent pour de nombreuses années) et de dissoudre quelques pastilles dans un peu d'eau bidistillée afin de renouveler le réactif.

Remarque 1 : certaines réactions notées **KC** ou **CK** nécessitent l'application successive des deux réactifs précédents.

Exemples de réaction KC+ : la médulle et les soralies de *Parmelia arnoldii* deviennent rose-rouge (acide alectoronique) ; les soralies de *Petusaria amara* deviennent violettes (acide picrolichénique)...

La réaction CK est très peu utilisée, elle permet toutefois de déceler la présence d'acide barbatique (coloration rouge) et d'acide diffractique (coloration jaune orangé).

Remarque 2 : certains thalles sont de petite taille ou formé de fins filaments (ex : les *Bryoria*), il suffit de placer quelques fragments sur un petit morceau de papier filtre préalablement imprégné de réactif et attendre que le papier change ou non de coloration. Il est également possible d'extraire les métabolites avec de l'acétone (voir CCM dans la 3<sup>ème</sup> partie), de les déposer ensuite sur un morceau de papier filtre et de faire les tests après évaporation du solvant.

c) La **paraphénylènediamine** (para 1-4 phénylènediamine notée **P**) : préparée au moment de l'emploi en dissolvant dans un verre de montre, un ou deux petits cristaux de paraphénylènediamine dans une goutte d'alcool absolu correctement appelé éthanol anhydre (à défaut prendre de l'alcool à 95). Ce réactif est très toxique, il ne doit être manipulé qu'au laboratoire en évitant tout contact avec la peau, les yeux, la langue. Il faut prendre les cristaux (quelques cg suffisent) avec une petite spatule et prélever le produit dissous dans l'alcool avec une allumette effilée ou un cure dent en bois. L'alcool s'évapore assez rapidement. Il suffit d'ajouter une goutte d'alcool pour disposer à nouveau du réactif.

Les cristaux de paraphénylènediamine doivent être conservés à l'abri de la lumière dans un petit flacon fumé.



La paraphénylènediamine doit être utilisée avec beaucoup de précautions

Les colorations obtenues sont généralement rouge, orange ou jaune ; il faut souvent attendre au moins une minute avant de conclure que la réaction est négative.

Exemple de réaction P+ :

Le thalle de *Cladonia furcata* devient rouge (acide fumarprotocetrarique).

Le thalle de *Cladonia cariosa* devient jaune (atranorine).

Le thalle de *Parmelia saxatilis* devient orange (acide salazinique)...

La solution alcoolique s'oxyde très rapidement, elle devient brune et ne peut plus être utilisée après quelques heures. Il est possible de stabiliser le réactif pour quelques mois en utilisant les proportions suivantes (que l'on peut diviser selon ses besoins).

paraphénylènediamine .....	1 g
sulfite de sodium .....	10 g
détergent .....	1 mL
Eau bidistillée .....	100 mL
(valeurs à diviser par 10 ou par 5 pour un usage individuel peu intensif)	

Une autre formule mise au point par JACQUES (1988) permet une stabilisation plus longue :

Acide éthylènediaminetétracétique ou	
E.D.T.A. ....	10 g
métabisulfite de sodium .....	5 g
paraphénylènediamine .....	5 g
Eau bidistillée .....	12 g
Ethanol anhydre pour compléter à .....	100 mL

Cette solution ne s'oxydera pas trop rapidement si elle est conservée dans un flacon fumé et remplie au maximum de son volume ; il est donc très important de remettre de l'alcool dans le flacon afin de réajuster le niveau.

Réactions colorées		Un exemple de substance présente			
K+	K+ violet .....	pariétine			
		acide fumarprotocétrarique			
	K+ jaune ou orange	P+ jaune .....	atranorine		
		P+ rouge brique .....	acide physodalique		
		P+ orange .....	acide stictique		
	K+ jaune puis rouge	P+ jaune pâle .....	acide hyostictique		
P+ rouge .....		acide salazinique			
K-	C+	C+ rouge .....		acide gyrophorique	
		C+ rose .....		acide olivétorique	
	C-	KC+	KC+ jaune .....		acide usnique
			KC+ rouge .....		acide lobarique
			KC+ jaune orange .....		acide barbatique
			KC+ rose .....		norlobaridone
	KC-	P+ rouge .....		acide alectorique	
		P+ jaune soufre .....		acide psoromique	

Ex. d'utilisation de réactifs macrochimiques dans la recherche de substances lichéniques d'après JA Elix (1992) - *Lichen chemistry - Flora of Australia* **54**, 23-29 (simplifié)

#### d) Autres réactifs :

Les 3 réactifs macrochimiques précédemment cités permettent d'utiliser la très grande majorité des clés de détermination proposées par les auteurs. Seuls quelques cas particuliers font appel à d'autres réactifs comme l'iode et l'acide nitrique.

- Une solution iodée, le **Lugol** (noté **I**), un réactif surtout utilisé en microscopie, dont la préparation est donnée dans la 2<sup>ème</sup> partie. Cette solution est indispensable pour caractériser par exemple *Porpidia tuberculosa* à médulle I+ violet, *Sphaerophorus globosus* à médulle I+ bleu, l'hyménium I+ rouge de certains *Arthonia*...

- L'**acide nitrique** (noté **N**) : solution aqueuse à 50 % permettra de confirmer certaines déterminations en donnant des colorations rouge-pourpre avec les pigments de structures liées aux apothécies (ex : épithécium de *Lecanora crenulata* N+ rose pâle, épithécium de *Lecidea turgidula* N+ rougeâtre, thalle et épithécium d'*Aspicilia coronata* N+ vert...). Ce produit extrêmement corrosif sera utilisé avec beaucoup de précautions et conservé dans un flacon dont il faut changer assez régulièrement le bouchon.

- L'**acide chlorhydrique** (noté **HCl**), est rarement utilisé par les lichénologues pour faire des tests colorés mais il est souvent utilisé sur le terrain pour mettre en évidence la présence de calcaire dans le substrat. On utilise une solution diluée contenant 10 à 20 % d'HCl.

## 2. Les produits pour la microscopie

Pour déterminer les taxons (familles, genres, espèces...) l'observation des lichens à différents grossissements du microscope est indispensable. Ce sont principalement les caractères microscopiques de l'appareil reproducteur du champignon (pratiquement toujours un ascomycète) qui sont étudiés : coupes d'apothécies (lécidéine, lécanorine, lirelline...), coupes de périthèces, asques et tholus, paraphyses, spores.

C'est surtout la spore qui peut être observée lors de séances d'initiation, il faut noter sa couleur (brune ou incolore), sa forme (sphérique, ovoïde, fusiforme, aciculaire...), sa septation (nombre et disposition des cloisons), son ornementation (présence de verrues...), sa guttulation (présence de petites gouttelettes de graisse dans le cytoplasme) et ses dimensions évaluées à l'aide d'un micromètre oculaire.

Si certaines de ces observations peuvent se faire dans l'eau, il est clair que de nombreuses structures ne seront décelées qu'en présence de produits chimiques correctement choisis. Ces différents milieux d'observation, colorants, réactifs microchimiques, milieux de montage seront conservés dans des petits flacons compte-gouttes en verre fumé, au sec, à l'abri de la lumière et de la chaleur.

Rappel de quelques définitions concernant les milieux de montage des préparations

Milieu d'observation : produit dans lequel on monte la coupe pour observation sans qu'il y ait modification de couleur (la coupe peut être préalablement colorée). Le plus simple est l'eau mais il existe d'autres milieux comme le lactophénol, le chloral hydraté, le chloral - lactophénol, les bases fortes...

Plus l'indice de réfraction d'un milieu de montage se rapproche de 1,515 (indice de réfraction du verre), plus ce milieu est éclaircissant.

Le lactophénol a un indice de réfraction de 1,44

le chloral - lactophénol a un indice de réfraction de 1,49

Le chloral hydraté a un indice de réfraction de 1,510

Les éléments observés dans le lactophénol ou le chloral hydraté ne sont pas déformés (tailles mesurées avec précision) et les préparations sont bien transparentes. Ils donnent toutefois un mauvais contraste et sont employés le plus souvent en association avec, ou après action, d'un colorant ou d'un réactif microchimique.

Contrairement à l'eau qui s'évapore rapidement, ces milieux de montage visqueux permettent la réalisation de préparations qui se conservent plusieurs semaines (préparations semi-permanentes).

Colorant : substance chimique colorée capable de transmettre sa coloration à d'autres corps (le colorant transmet par diffusion ou diffraction les radiations complémentaires de celles qu'il absorbe). Ex : le rouge Congo, le bleu coton...

Réactif microchimique : substance qui donne une réaction chimique avec les tissus en leur donnant une coloration différente de leur couleur propre. Ex : les réactifs iodo-iodurés...

Milieu de conservation : est un mélange (contenant la coupe préalablement colorée) qui durcit progressivement et permet la conservation des préparations (préparations permanentes). Ex : liquide de Hoyer, baume du Canada, alcool polyvinylique, résine de synthèse type Eukitt...

a) La **potasse** ou hydroxyde de potassium (notée **K**) : en solution aqueuse à 10% (déjà utilisée comme réactif macrochimique et se dégradant progressivement de la même manière). Les coupes difficiles à dissocier par tapotement sur la lamelle seront placées quelques minutes (1 à 3) dans ce milieu de montage de manière à désagréger les tissus et permettre la libération des spores. La potasse est ensuite éliminée à l'aide d'un papier filtre (ou d'une lamelle placée au bord de la solution puis progressivement éloignée en entraînant avec elle K). D'autres colorants pourront alors être utilisés.

Cette étape préliminaire peut être passée si les asques se séparent facilement des tissus environnants ou si l'observation n'est qu'une simple observation de routine ne nécessitant pas une étude précise de l'appareil apical.

KOH à 10% ne modifie pratiquement pas la taille des cellules et le montage dans KOH à 10% est recommandé pour mesurer avec précision les asques, spores, renflement des paraphyses...

b) Le **Lugol ou eau iodée** (notée **I**) est le réactif microscopique le plus utilisé en lichénologie. Il est utilisé comme milieu de montage plus ou moins universel mais colore principalement, plus ou moins intensément, les structures apicales et permet l'observation du tholus. Cette réaction colorée est connue depuis très longtemps et joue un rôle fondamental dans l'identification et la classification des familles, genres et espèces de lichens.

Ce réactif peu réfringent n'est pas éclaircissant mais donne des images à contours bien nets. Il colore en brun acajou le glycogène ; cette coloration tranche avec la teinte jaune brunâtre que prennent les parties non glycogéniques. Le lugol met également en évidence l'amyloïdité, la dextrinoïdité (voir caractéristiques ci-dessous).

Composition du réactif :

Iode .....	0,5 g
Iodure de potassium .....	1,5 g
Eau bidistillée .....	100 mL

Préparation : dissoudre dans 20 ml d'eau bidistillée, 1,5 g d'iodure de potassium (IK) puis 0,5 g d'iode (I) ; compléter avec de l'eau bidistillée jusqu'à 100 mL.

Cette solution concentrée se conserve bien en flacon de verre (mais détruit plus ou moins les embouts en plastique des compte-gouttes qui doivent être changés au bout de quelques années).

Parfois la coloration est très forte et les détails ne sont pas visibles. Il faut recommencer la préparation en diluant quelques gouttes de lugol dans un verre de montre, dans une ou deux gouttes d'eau. Cette solution diluée ne se conserve pas longtemps.

Autre technique possible recommandée par plusieurs auteurs : Faire agir successivement – KOH (dissociation partielle des cellules) – L'eau pour éliminer KOH – Le lugol (ou lugol dilué) – L'eau pour diminuer l'intensité de la coloration – Placer ensuite la lamelle, la potasse ayant partiellement désagréé les tissus il suffit d'appuyer légèrement sur la lamelle pour dissocier les structures à observer.

Remarque : La coloration du tholus dépend de la concentration de la solution iodée mais également de l'intensité du prétraitement à la potasse ; l'expérience et l'intuition du préparateur jouent un rôle important dans le résultat final. L'étude des asques et du tholus est particulièrement utile pour identifier avec certitude des genres comme les *Apicilia*, *Lecidea*, *Lecidella*... très semblables par leurs autres caractères.

c) Le **réactif de Melzer** est une solution proche du lugol mais contenant en plus du chloral hydraté qui est un éclaircissant et un regonflant (étude des exsiccata).

## Composition du réactif :

Iode .....	0,5 g
Iodure de potassium .....	1,5 g
Chloral hydraté .....	20,0 g
Eau bidistillée .....	20 mL

Préparation : dissoudre dans 20 ml d'eau bidistillée : 1,5 g d'iodure de potassium (IK) - 0,5 g d'iode - 20 g de chloral hydraté (d'après Erb et Matheis - Pilz Mikroskopie - 1983).

C'est le réactif le plus utilisé en mycologie générale. Il met en évidence :

- L'amyloïdité : coloration bleu noirâtre de certains polymères glucidiques (amidon).
- La dextrinoïdité (= pseudo-amyloïdité) : coloration brune à brun rougeâtre des dextrines (produits issus de la dégradation incomplète de l'amidon).
- Lorsque les structures ne présentent pas l'amyloïdité ou la dextrinoïdité, le melzer se comporte comme un simple colorant et leur donne une teinte jaune brunâtre. Dans ce cas, les structures sont notées I- (iodo-négatives).

En plus de la réaction iodée ou de la coloration, la présence de chloral hydraté donne au melzer un bon pouvoir éclaircissant pratique pour l'examen de certaines structures. Pour certains genres de lichens à spores septées comme les *Graphis*, *Opegrapha*, *Phaeographis*... il permet de bien mettre en évidence les cloisons.

d) Le **Rouge Congo** est largement utilisée en microscopie mycologique comme colorant universel. Il colore en rose ± rougeâtre les parois des hyphes fongiques. Utilisable sur matériel frais et exsiccata, ce colorant montre bien les hyphes, les cloisons, les boucles et plus particulièrement la forme et la disposition des paraphyses.

Sur matériel frais on utilise la solution aqueuse, sur matériel sec, la solution ammoniacale (l'ammoniaque permet le ramollissement et le regonflement des cellules). En lichénologie on gagne beaucoup à le faire agir après action de la potasse.

## Composition du rouge Congo ammoniacal :

Rouge Congo .....	1 g
Ammoniaque .....	99 mL à 30%

Préparation : Sous une hotte aspirante, dans un erlenmeyer à col étroit, mettre 1 g de rouge congo. Introduire rapidement 99 mL de la solution commerciale d'ammonique (à 30% généralement) et placer aussitôt un verre de montre sur l'erlenmeyer pour limiter l'évaporation de l'ammoniac qui est un gaz extrêmement irritant. Agiter avec l'agitateur magnétique et, éventuellement, chauffer pour faciliter la dissolution du colorant (sans excès car l'ammoniaque passe à l'état de gaz à partir de 35°C). Laisser refroidir puis filtrer en plaçant un couvercle sur l'entonnoir (d'après Erb et Matheis - Pilz Mikroskopie - 1983).

Remarque 1 : Ne pas passer son nez au dessus du flacon !

Remarque 2 : Ne laisser pas le flacon ouvert inutilement ! Cela évite l'odeur désagréable mais empêche aussi le contact avec le CO<sub>2</sub> atmosphérique qui forme avec l'ammoniaque du carbonate d'ammonium responsable de la cristallisation du colorant ; la solution devient progressivement inefficace. Il est possible de prolonger son action en ajoutant un peu d'ammoniaque dans le flacon mais lorsque la concentration devient insuffisante, le Rouge Congo forme des dépôts et devient inutilisable au bout de 2 à 3 années.

## Composition du rouge Congo aqueux (seulement 0,5 % d'ammoniaque) :

Rouge Congo .....	3 g
Eau bidistillée .....	98 mL
Ammoniaque .....	2 mL à 25%

Préparation : dissoudre les 3 g de Rouge Congo dans 98 mL d'eau bidistillée, ajouter ensuite 2 mL d'ammoniaque (d'après Erb et Matheis - Pilz Mikroskopie - 1983) afin de faciliter l'action du colorant.

Remarque : une autre composition a été imaginée par M. Monod, qui ne met pas d'ammoniaque mais ajoute 1 g de Sodium dodécyl sulfate (SDS), un agent tensio-actif anionique qui rend la solution plus mouillante. Le SDS ne doit toutefois pas être utilisé en présence de KOH (formation de précipités).

Composition du rouge Congo SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) :

Rouge Congo .....	1 g
Eau bidistillée .....	99 mL
SDS .....	1 g

e) Le **Bleu coton au lactophénol** (= BCL) : ce colorant est le meilleur bleu d'aniline utilisable en mycologie générale. Il est spécifique de la chitine, de la callose et du collagène. Il colore principalement la chitine présente dans les parois des hyphes. Chez de nombreux Ascomycètes il met également en évidence l'ornementation sporale (qualifiée alors de cyanophile) souvent caractéristique des espèces. L'acide lactique préserve les structures fongiques. L'apport de phénol permet de tuer les micro-organismes éventuellement présents, il y a ainsi désactivation de l'activité lytique des enzymes cellulaires ce qui permet une bonne conservation de la préparation.

Composition du réactif :

Bleu de méthyle (= bleu coton C4B) .....	0,1 g
Eau bidistillée .....	20 mL
Acide lactique (S.G. 1.21) .....	20 g
Glycérol .....	40 g
Phénol .....	20 g

Préparation : dissoudre 0,1 g de bleu de méthyle dans 20 g d'acide lactique officinal (specific Gravity 1.21) ajouter les 20 mL d'eau, les 40 g de glycérol puis les 20 g de phénol (produit très toxique à manipuler avec précautions).

Parfois, la coloration est très lente à se développer (jusque 12 heures). Il est possible d'accélérer le processus en plaçant la préparation quelques temps sur une plaque chauffante afin de rendre la solution plus fluide (attention toutefois à ne pas porter à ébullition afin d'éviter la déformation des cellules).

Remarque 1 : Le matériel monté dans le Bleu coton au lactophénol peut être conservé en lutant la préparation. Il suffit de déposer un peu de vernis à ongle tout autour de la lamelle afin d'assurer l'isolement des structures et l'adhésion de la lamelle sur la lame ; deux couches de vernis sont généralement nécessaires (la 2<sup>ème</sup> après durcissement de la 1<sup>ère</sup>).

Remarque 2 : Après coloration au bleu coton lactophénolé, une teinte bleuâtre peut envelopper l'ensemble du champ. Il suffit alors de monter la préparation colorée dans du lactophénol. Seuls les éléments colorés restent nettement visibles, le contraste devient plus important ce qui facilite l'observation ou la photomicrographie.

Remarque 3 : Si on ne désire pas garder les préparations, il est inutile de mettre de la glycérine et du phénol. Il suffit alors de préparer du **bleu lactique** en ajoutant tout simplement le bleu de méthyle dans un peu d'acide lactique additionné de son volume d'eau.



Composition du bleu lactique :

Bleu de méthyle (= bleu coton) .....	0,1 g
Eau bidistillée .....	20 mL
Acide lactique (S.G. 1.21) .....	20 mL

Ce milieu plus fluide pénètre plus facilement les éléments à colorer mais il possède toutefois un pouvoir regonflant très important et les dimensions des structures ne peuvent être mesurées précisément dans ce milieu de montage.

#### f) Autres colorants :

- Le **Bleu de toluidine** en solution à 1% dans l'eau bidistillée a été utilisé par GRUBE (1993) pour étudier les asques et les hyphes végétatives des thalles lichéniques.

- Le **Bleu de crésyl** en solution à 0,1 –1% dans l'eau est utilisée par BARAL (1992 – Etude d'ascomycètes non lichénisés) et ROUX (1994-1995 - Etude de champignons lichénicoles non lichénisés).

Ces solutions sont également utilisées en mycologie pour mettre en évidence :

- la métachromasie de certaines spores, la spore est bordée de bleu, l'exospore reste incolore et l'endospore est pourpre (utilisé chez les lépiotes).

- les corps lipidiques : après coloration au bleu de crésyl, l'addition d'ammoniaque provoque une décoloration, seuls les corps lipidiques apparaissent colorés en jaune.

Bleu coton lactique	Colorant universel, colore surtout le contenu des cellules fongiques et les ornements des spores.
Bleu coton au lactophénol	Colorant universel, colore surtout le contenu des cellules fongiques et les ornements des spores. Milieu de conservation.
Eau	Milieu de montage, observation des couleurs et des formes des cellules et tissus.
Hoyer (Liquide de)	Milieu de conservation (préparations permanentes).
KOH 10% ou 5%	Dissociation des cellules, éclaircissement des préparations.
Chloral - Lactophénol	Excellent milieu d'observation (de structures qui peuvent être préalablement colorées).
Lugol	Observation des asques, tholus, spores... recherche de l'amyloïdité et de la dextrinoïdité (produit souvent utilisé après action de la potasse KOH).
Melzer (Réactif de)	Observation des cloisons des spores.
Phloxine B	Colorant cytoplasmique.
Rouge Congo ammoniacal	Colorant universel, convient particulièrement pour les exsiccata, colore les parois des hyphes.
Rouge Congo aqueux	Colorant universel, colore particulièrement les parois des hyphes. A utiliser avec du matériel frais.
Soudan III lactophénolé	Coloration des guttules (inclusions lipidiques localisées dans le cytoplasme des ascospores).

#### Principaux produits utilisés en microscopie et leurs rôles

Deux autres colorants, peu utilisés par les lichénologues, donnent également des colorations spécifiques intéressantes :

- La **phloxine B** : est un colorant synthétique, fabriqué à partir d'hydrocarbures issus du goudron de houille. En solution aqueuse à 2%, la phloxine B colore le cytoplasme en rouge, sans colorer les parois des hyphes et les cloisons.

La phloxine B peut être utilisée en mélange avec d'autres colorants. En association avec le rouge Congo elle permet la double coloration. Déposer sur une lame une petite goutte de Congo puis à proximité une petite goutte de phloxine ; mélanger avec une épingle et y placer la coupe à colorer. Mettre une lamelle et dissocier par tapotements successifs. Il y a ainsi coloration des parois des hyphes par le Congo et du contenu des cellules par la phloxine. L'introduction de potasse à 5% permet, si nécessaire, d'éclaircir la préparation pour faciliter les observations. (il n'est toutefois pas possible de prolonger l'observation très longtemps car la phloxine devient rapidement noirâtre en présence de KOH).

Composition de la Phloxine :

Phloxine B .....	2 g
Eau bidistillée .....	100 mL
SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) .....	1 g

Préparation : dissoudre en agitant 2 g de phloxine B dans 100 mL d'eau bidistillée ; ajouter 1 g de Sodium dodécyl sulfate (SDS), un agent tensio-actif anionique qui facilite la pénétration de la phloxine dans le cytoplasme. Le SDS ne doit toutefois pas être utilisé en présence de KOH (formation de précipités).



Les principaux produits chimiques indispensables à l'étude microscopique des lichens sont disponibles auprès de l'AFL pour les membres de l'Association

- Le **soudan III** permet de colorer les inclusions lipidiques (guttules) trouvées fréquemment dans les ascospores. Le soudan III est soluble dans des solvants de type white spirite mais n'est pas facilement miscible à l'eau ; son utilisation en mycologie/lichénologie pose donc des problèmes, l'eau étant le principal constituant des êtres vivants. On peut utiliser le soudan III en solution alcoolique saturée mais l'éthanol provoque un rétrécissement important des structures cellulaires.

Préparation selon Erb et Mattheis : Faire une solution saturée de soudan III dans un mélange à part égales d'eau et de chloral hydraté. Pour atteindre la concentration nécessaire de 0,1 à

0,2% de soudan III, il faut placer le flacon contenant le mélange pendant au moins 2 jours sur l'agitateur magnétique (la dissolution est très lente) ; faire ensuite une filtration.

Préparation selon M. Langeron : Faire bouillir dans un erlenmeyer à col étroit, un excès de soudan III dans du lactophénol ; filtrer après refroidissement.

Composition et préparation du Soudan III dans le lactophénol :

- Préparer le lactophénol dans un ballon avec l'agitateur magnétique.

Eau bidistillée ..... 20 mL

Glycérine ..... 40 g (33,3 mL)

Acide lactique ..... 20 g (16,6 mL)

Phénol ..... 20 g

-----

- Quand l'ensemble est homogène et transparent, ajouter le colorant en excès.

Soudan III ..... 1 g

- Couvrir l'erlenmeyer d'un verre de montre.

- Agiter jusqu'à intégration du colorant au lactophénol.

- Porter à ébullition douce quelques minutes.

- Laisser refroidir et filtrer.

g) Le **Chloral - Lactophénol** est très certainement l'un des meilleurs milieux d'observation actuellement disponible. Il présente plusieurs avantages :

- Une bonne viscosité qui empêche l'évaporation avec la chaleur des lampes ce qui évite de remettre du liquide de montage en cas d'observation prolongée.

- Un indice de réfraction élevé ( $n = 1,49$ ) permettant d'exploiter avec succès les objectifs et condenseurs corrigés pour les aberrations géométriques et chromatiques.

- Une bonne lisibilité de la coupe en donnant des contours précis ce qui facilite les mesures.

- L'hydrate de chloral ramollit les structures, ce qui rend la dissociation plus facile que dans le lactophénol (dont l'indice de réfraction n'est que de 1,44).

Préparation du Chloral - Lactophénol :

Hydrate de chloral ..... 40 g

Phénol ..... 20 g

Acide lactique ..... 80 g (66,6 mL)

Place sur l'agitateur magnétique jusqu'à obtention d'un milieu incolore et transparent. Conserver dans des flacons fumés (le phénol est sensible à certaines radiations) bien fermés (limiter l'oxydation et l'absorption de vapeur d'eau qui entraînerait une dilution du milieu).

h) Le **liquide de Hoyer** est un mélange qui permet de conserver les préparations montées en milieu aqueux. Une goutte de liquide est placée sur la lame, on y introduit la coupe (préalablement colorée) à conserver. La coupe est délicatement placée en utilisant sous la loupe binoculaire des minuties (épingles très fines utilisées par les collectionneurs de papillons). On place la lamelle qui étale tout doucement le liquide (ne pas appuyer immédiatement). Au bout de quelques jours, la préparation est bordée avec du vernis à ongles (incolore).

Composition du liquide de Hoyer :

Eau bidistillée .....	50 mL
Gomme arabique .....	30 g
Chloral hydraté .....	200 g
Glycérine .....	16 mL

Préparation : mélanger les 30 g de gomme arabique avec l'eau en agitant. Il faut ensuite attendre plusieurs jours pour avoir passage de la gomme arabique en solution. Dissoudre les 200 g de chloral hydraté (attendre également la dissolution totale). Ajouter finalement la glycérine.

La conservation des préparations est illimitée et ne nécessite pas de déshydratation par l'alcool comme c'est le cas lors d'un montage au baume du Canada ou dans une résine de synthèse de type Eukitt.

#### i) L'huile à immersion :

L'immersion est une technique de microscopie optique permettant d'augmenter le pouvoir résolvant des objectifs en plaçant entre la lentille frontale de l'objectif à immersion et la lamelle couvre-objet, une goutte d'huile (huile à immersion) dont l'indice de réfraction est égal à celui du verre ( $n = 1,515$ ).

- Autrefois on utilisait la résine de cèdre ou huile de cèdre ( $n = 1,52$ ) mais lorsque celle-ci n'était pas essuyée correctement en fin de séance, elle durcissait et lors du nettoyage, il y avait risque de détérioration de l'objectif à immersion qui est très onéreux.

- Actuellement on utilise des **huiles de synthèse** non résinifiables, à indice de réfraction  $n = 1,518$ . Ces huiles ne durcissent pas et il n'est pas nécessaire de nettoyer avec minutie l'objectif après chaque utilisation du microscope ; il suffit d'essuyer l'objectif avec le doigt. Ces huiles de synthèse sont disponibles en différentes viscosités ; pour les utilisations de platines microscopiques en position verticale elles sont très visqueuses, pour les utilisations en ambiance froide, elles sont très fluides. En lichénologie on utilise uniquement l'huile de viscosité normale.

Remarque : Certaines substances comme l'**anisol** (indice de réfraction  $n = 1,517$ ), peuvent dans certains cas remplacer l'huile à immersion. L'anisol est un éther fluide qui s'évapore assez rapidement sans laisser de traces sur l'objectif et la lamelle. Pour l'observation de préparations permanentes c'est un avantage puisqu'il n'est pas nécessaire de nettoyer la lamelle avant de ranger la préparation. Ce produit est moins onéreux et moins contraignant que l'huile mais il ne doit être utilisé que dans une salle bien ventilée. L'anisol est un produit irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires ; c'est un produit inflammable qui doit être manipulé à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles.

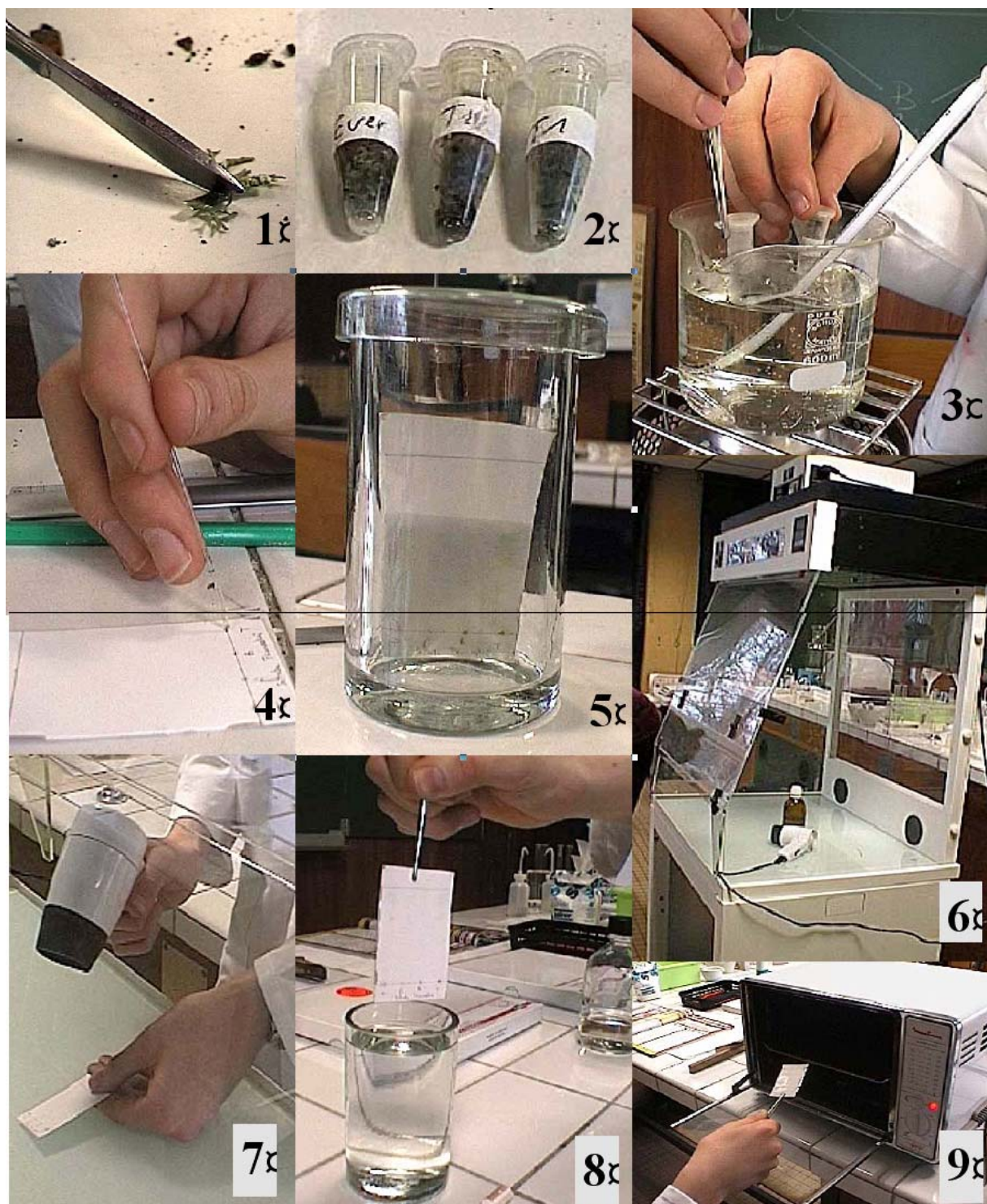
---

### **3. Les produits pour la chromatographie couche mince (CCM) :**

---

La chromatographie est une technique qui permet de mettre en évidence certains métabolites secondaires contenus dans les lichens en faisant passer un solvant par ascension. Plus les pigments et acides lichéniques sont solubles dans la phase mobile, plus ils sont déplacés. Cette technique permet après observation aux UV ou révélation chimique de mettre en évidence un certain nombre de constituants caractéristiques de certaines espèces qu'il est alors possible d'identifier avec plus de précision.





(1) Fragmentation du thalle lichénique ; (2) Les morceaux sont placés dans des micro-tubes (Eppendorf) avec de l'acétone ; (3) Extraction à chaud à l'aide d'un bain-marie à 60°C ; (4) L'acétone contenant les extraits lichéniques est déposé sur la plaque en gel de silice sur support aluminium ; (5) Ascension de l'éluant entraînant les différents pigments et acides lichéniques à des vitesses variables ; (6) Les diverses opérations sont réalisées sous une hotte pour éviter de respirer les produits chimiques utilisés ; (7) Après ascension les plaques sont séchées pour éliminer l'éluant ; (8) Passage rapide de la plaque séchée dans l'acide sulfurique à 10% ; (9) Les plaques sont placées 10 à 15 minutes à 100-110°C pour faire apparaître les taches caractéristiques de chaque lichen (Photos prises au caméscope lors d'une séance de travaux pratiques en lycée - Photos : Jean-Pierre Gavériaux).

a) **L'acétone** : permet l'extraction des substances lichéniques à rechercher. Un fragment de thalle est coupé en menus morceaux placés dans un micro-tube de type Eppendorf ; on ajoute quelques gouttes d'acétone et on place le tube dans un bain-marie à 60°C pendant quelques minutes. Les substances passent ainsi dans l'acétone.

Les microgouttes d'acétone contenant les substances lichéniques sont déposées sur des plaques au gel de silice sur support en aluminium rigide. De chaque côté de la plaque, deux témoins sont déposés, l'acide norstictique (Rf 4) et l'atanorine (Rf 7), obtenus à partir d'un mélange de 2 lichens : *Parmelia acetabulum* et *Physcia tenella* dont les Rf sont connus pour les éluants utilisés.

### B) Les mélanges de solvants

Ils permettent la migration des substances sur la plaque. Les substances ne migrant pas à la même vitesse, sont séparées. Plus la substance présente d'affinité pour le solvant plus son ascension est rapide. La plaque est retirée dès que les solvants atteignent le trait supérieur fixé à 10 cm pour simplifier les calculs.

Diverses compositions sont proposées par les spécialistes.

- L'une des plus courantes, des plus stables et des plus utilisées est celle de Culberson & Ammann 1979 (notée TDA ou éluant A): **Toluène** (180 mL) / 1,4 **dioxane** (60 mL) / **acide acétique** (8 mL).

Lors du stage de chromatographie organisé au laboratoire de Fontainebleau par Jean-Claude Boissière en octobre 1990, 2 autres éluants avaient été proposés :

- **Hexane** 130 mL / **éther éthylique** (diéthyléther) 100 mL / **acide formique** (= acide méthanoïque) 20 mL (composition notée HEF ou éluant B)

- **Toluène** 200 mL / **acide acétique** 30 mL (composition notée TA ou éluant C).

Avant de placer la plaque dans ces 2 derniers éluants, le récipient qui les contient doit être mis en atmosphère saturée pendant 5 minutes.

Attention : certains de ces produits (en particulier le dioxane) sont toxiques, ils ne doivent pas être inhalés. Ils doivent être manipulés à l'air libre ou en salle sous une hotte reliée à l'extérieur.

C) L'**acide sulfurique** (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) permet de visualiser les taches après leur ascension.

La plaque est retirée de la cuve à chromatographie, séchée sous la hotte pour éliminer les solvants précédents, plongée pendant 2 secondes dans une solution d'acide sulfurique à 10 % puis placée dans une étuve à 100-110°C. Au bout de dix à quinze minutes, les taches apparaissent. La mesure de leur Rf, distance parcourue en cm divisée par 10 (la distance entre les 2 traits de dépôt et d'arrivée étant de 10 cm), permet de trouver dans les tableaux de White et James (1985) l'acide lichénique ou le pigment correspondant.

Compléments :

- (1) La technique détaillée de la CCM et les tableaux d'identification des substances lichéniques ont été publiés dans le bulletin 16(1) de 1991 de l'AFL par BOISSIERE.

- (2) La liste des pigments et acides lichéniques présents dans chaque espèce est donnée avec la description de l'espèce dans la flore de Purvis (voir Bibliographie).

- (3) D'autres éluants et agents de visualisation des taches colorées existent et sont publiés dans la brochure de Orange, James et White « *Microchemical methods for the identification of lichens* » (voir Bibliographie).

---

## **4. Les produits pour les microcristallisation**

---

Pour traquer les substances lichéniques dans les thalles des espèces à identifier, le lichénologue dispose d'une méthode peu connue (et donc peu utilisée), l'observation au microscope des substances pour lesquelles certains chercheurs ont réussi à induire la formation de cristaux présentant des formes caractéristiques.

Cette technique permet, dans quelques cas particuliers, de distinguer des espèces morphologiquement proches sans avoir recours à la technique lourde de la CCM.

**Principe d'obtention des microcristaux :** Extraire les substances avec de l'acétone. Faire cristalliser ces substances dans des solutions de cristallisation appelées GAW ou GE en fonction de leur composition. Examiner les cristaux au microscope optique à fond clair à des grossissements compris entre 200 et 500.

### **Protocole expérimental :**

1. Placer quelques fragments de thalle dans un petit tube (de type Eppendorf) ou dans un verre de montre.
2. Ajouter 1 ou 2 gouttes d'acétone (on peut éventuellement placer le tube dans un bain-marie à 60°C pendant quelques minutes pour faciliter le passage des substances dans l'acétone).
3. Placer une lame (propre) sur une surface chaude (une petite plaque chauffante à 50-60°C).
4. Les microgouttes d'acétone contenant les substances lichéniques sont transférées sur la lame avec un tube capillaire ou une petite seringue (dans le cas d'une seringue de récupération ne pas oublier de la rincer préalablement avec de l'acétone). Attendre que la microgoutte soit évaporée avant de déposer la suivante. Répéter l'opération jusqu'à ce qu'un léger dépôt apparaisse.
5. Avec une lame de rasoir (propre), gratter le dépôt pour regrouper les fragments sur la lame.
6. Déposer sur une lamelle une très petite goutte de solution de cristallisation et retourner la lamelle sur la lame afin de placer les substances lichéniques dans le liquide. Il est conseillé d'utiliser des petites lamelles (10x10) lorsque la quantité de substances est faible.
7. Placer la préparation sur la plaque chauffante sans jamais porter à ébullition pour éviter une température trop élevée.
8. Enlever la préparation de la plaque chauffante, attendre la formation des cristaux par refroidissement et observer au microscope. Les cristaux commencent à apparaître au bout de 10 à 15 minutes (certaines cristallisations sont beaucoup plus lentes et il ne faut pas hésiter à regarder le montage le lendemain).

### **Composition des deux milieux de cristallisation GAW et GE**

GAW = Glycérol (1 mL) - Ethanol (1 mL) - Eau (1 mL)

GE = Glycérol (1 mL) - Acide acétique glacial (3 mL)

Certains milieux de cristallisation ne nécessitent pas de chauffage comme par exemple :

An = Aniline (1 mL) - Glycérol (2 mL) - Ethanol (2 mL)

Le but de cet article d'initiation n'était pas de faire un inventaire exhaustif des produits chimiques utilisés en lichénologie, mais de présenter les produits classiques rencontrés dans

les diverses pratiques de terrain ou de laboratoire, chaque lichénologue gardant à ce sujet ses préférences et ses habitudes.

Ces données techniques permettront aussi, en particulier aux débutants, de disposer d'une documentation dispersée dans de nombreux livres, pas toujours très accessibles et, peut-être (nous l'espérons), de sauter le pas et de passer à l'utilisation du microscope ou à la pratique de la CCM qui vous aideront dans la découverte de ce monde passionnant des lichens.

### **Bibliographie utilisée**

- Boissiere J.C. (1991). Chromatographie des substances lichéniques : notions de base, *Bull. Inform. Ass. Fr. Lichénologie* **16**(1), 11-20.
- Erb B., Matheis W. (1983). *Pilzmikroskopie : Präparation und Untersuchung von Pilzen*. Frankh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 168 p.
- Locquin M., Langeron M. (1978). *Manuel de microscopie*. Masson, Paris. 352 p.
- Malcolm W.M., Galloway D.J. (1997). *New Zealand Lichens: Checklist, Key and Glossary*. Museum New Zealand Te Papa Tongarewa, 192p.
- Orange A. (1992). A key to the *Cladonia chlorophaea* group in Europe, using microcrystal test. *British Lichen Society Bulletin*, **70**, 36-42.
- Orange A., James P.W., White F.J. (2001). Microchemical methods for the identification of lichens, *British Lichen Society Bulletin*, 101 p.
- Purvis O.W., Coppins B.J., Hawksworth D.L., James P.W., Moore D.M. (1992). *The lichen flora of Great Britain and Ireland*. Natural History Museum - British Lichen Society, London. 710p.