

La phloxine B (\pm additionnée de rouge Congo) pour l'étude microscopique des lichens

par Jean-Pierre Gavériaux -
14, résidence les Hirsons, rue Eugène Mordacque, 62800 LIÉVIN
jp.gaveriaux@numericable.fr

Si le montage dans l'eau donne souvent de résultats intéressants, il faut dans la grande majorité des cas utiliser des colorants pour mettre en évidence les structures microscopiques à étudier. Certains produits comme les **réactifs iodés** (Lugol et Melzer), le **bleu coton** ou le **rouge Congo** sont couramment utilisés et suffisent dans la plupart des cas pour faire apparaître les cellules que l'on désire observer. Toutefois, dans certains cas, les cellules sont peu distinctes, on a l'impression qu'elles refusent de se colorer et l'observation microscopique ne nous donne pas les renseignements que l'on pensait y trouver.

Dans ce cas, un colorant très peu utilisé en mycologie et en lichénologie peut vous venir en aide, il s'agit de la phloxine B, un colorant synthétique, fabriqué à partir d'hydrocarbures issus du goudron de houille. Cette substance a des affinités particulières pour le cytoplasme des cellules mortes qu'elle colore en rouge rosâtre \pm violacé sans se fixer sur les parois chitineuses et les cloisons des hyphes.

La phloxine B est soluble dans l'alcool, dans l'ammoniaque et dans l'eau, ce qui nous permet de la préparer de plusieurs façons différentes, en solution alcoolique, ammoniacale ou en solution aqueuse, c'est cette dernière solution que nous privilégions.

Préparation de la solution aqueuse

Dans 100 mL d'eau bidistillée, dissoudre 2 g de phloxine B (qui se présente sous forme d'une poudre rouge \pm violacé) et 1 g de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), une poudre blanche qui agit sur les tensions superficielles facilitant la pénétration de l'eau (et des substances qui y sont dissoutes) dans les cellules afin de les colorer.

Remarque : à la place du SDS on peut aussi utiliser un peu de détergent vaisselle mais ce produit mousse \pm et contient souvent des additifs.

Pour faciliter la dissolution le recours à l'agitateur magnétique bien pratique et une filtration finale permet d'obtenir un colorant parfaitement préparé que l'on conservera en flacon fumé le protégeant de la lumière pour éviter sa dégradation.

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). À vous de faire des essais et de choisir la technique qui vous donne les meilleurs résultats (voir les photos de la page suivante).

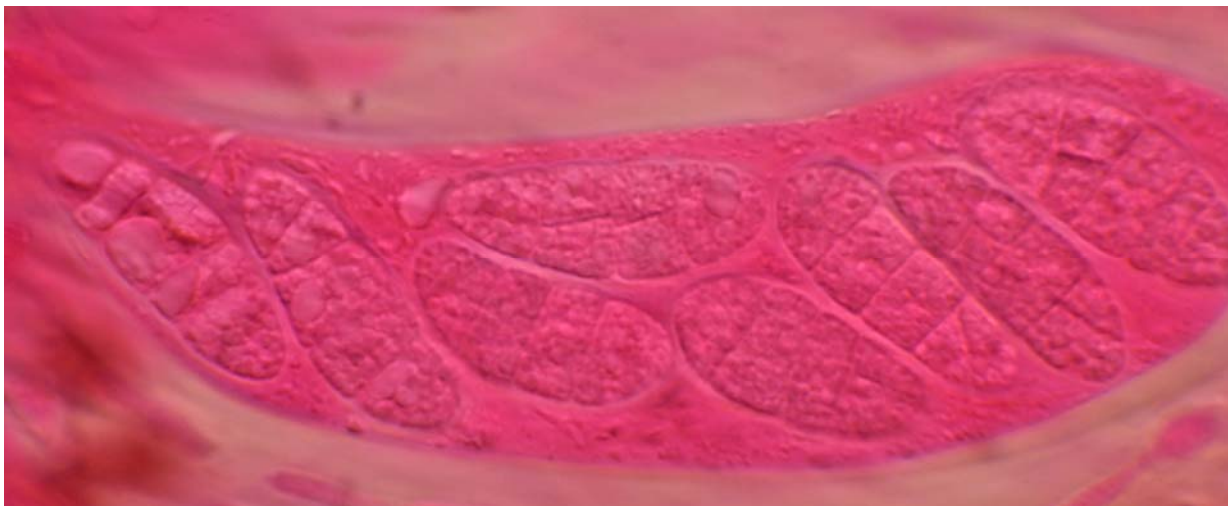
L'eau glycinée

Lors de l'étude microscopique de fragments de lichens montés dans des milieux aqueux, on observe très rapidement le développement de zones de rétraction à partir de la périphérie de la lamelle. On a l'impression que le liquide dans lequel on avait placé la coupe est en train de disparaître. Ce phénomène est provoqué par l'évaporation de l'eau sous l'action de la chaleur émise par l'ampoule du microscope.

Pour remédier à cet inconvénient, plusieurs solutions se présentent.

1. Remettre du liquide en déposant une petite goutte d'eau en bordure de la lamelle ; par capillarité, l'eau va gagner l'espace situé entre la lamelle et la lame et les structures lichéniques vont reprendre rapidement leur aspect initial.
2. Utiliser un microscope ne dégageant pas (ou très peu) de chaleur comme par exemple un microscope muni d'un éclairage à LED.
3. Une troisième solution, peu utilisée et pourtant extrêmement simple et efficace, consiste à placer la coupe dans de l'eau glycinée. Des essais, réalisés par tâtonnements, montrent que l'eau glycinée à 8% donne d'excellents résultats.

Nous espérons que ces petites manipulations vous seront utiles. Dans un prochain bulletin, nous vous donnerons quelques techniques pour faire des préparations microscopiques permanentes susceptibles d'être conservées de nombreuses années.



1. Asque octosporé de *Rhizocarpon reductum* dans la phloxine B [x400]

L'intérieur des cellules (asque et spores) est coloré en rose ; la monochromie de l'image obtenue ne permet pas toujours de différencier nettement les diverses structures observées.



2. Montage dans la phloxine B ; en provoquant une légère dissymétrie dans l'éclairage incident, les contours sont soulignés et les structures mieux différenciées que sur l'image précédente [x400].



3. Ajout de rouge Congo sur le bord de la lamelle précédente ; les parois prennent une coloration rouge ; il y a double coloration [x1000].