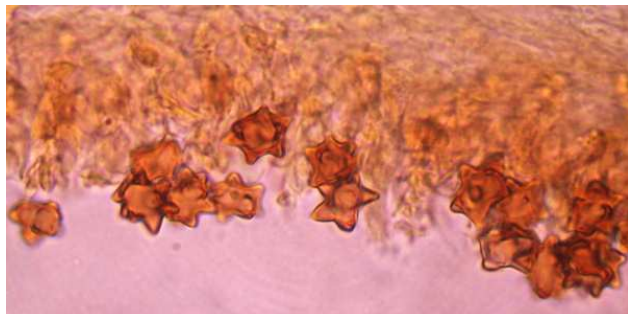


## Rouge Congo ammoniacal (RCA)

### UN PEU D'HISTOIRE :

Le rouge Congo a été découvert en 1884 par un chimiste allemand, BÖTTIGER, et il n'a guère rencontré de succès dans l'industrie car il bleussait dans les solutions acides de l'époque, utilisées pour la coloration des textiles.



Spores d'*Inocybe asterospora* observées dans le RCA (photo Marcel Lecomte)

La firme AGFA s'y intéressa après avoir découvert que dans une solution neutre, il colorait directement le coton, sans traitement intermédiaire ni préparatoire. Ce colorant n'a aucun rapport avec l'ancien Congo belge, mais il se trouve que

cette année là correspondait à la première exploration de cette région africaine par STANLEY et son inventeur se conforma à l'usage courant de cette époque de nommer une nouvelle substance en faisant référence à un événement important.

En histologie, il a été utilisé très vite avec beaucoup de succès pour la coloration des cellules éosinophiles, des dépôts pathologiques de protéines, des cellules des muqueuses gastriques, de la kératine, des os embryonnaires, du ciment des jeunes dents, des parois cellulaires d'algues filamenteuses, des polysaccharides... Contrairement à une certaine opinion, le rouge Congo n'est pas un colorant spécifique de la cellulose ou de la chitine.

En mycologie, c'est un colorant universel convenant spécialement pour les parois.

### 1. NATURE DU RÉACTIF :

Le rouge Congo est un colorant qui fait partie de la catégorie des polyazoïques parce qu'il possède deux chromophores (région de la molécule qui est principalement responsable de la teinte) de type azoïque, c'est-à-dire formés chacun de deux atomes d'azote doublement liés, et diversement substitués.

Le numéro du *Color Index* (C. I., c'est la référence internationale en matière de colorants) du rouge Congo est 22120. C'est un colorant acide, c'est-à-dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques. Il colore particulièrement bien les parois des cellules de champignons ; c'est pour cela qu'il est un des colorants les plus utilisés en mycologie générale.

Sa formule brute est :  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$  ; il est soluble dans l'eau à raison de 25 g/litre.

Cystide à crochet chez *Pluteus cervinus*, observée dans le RCA (photo Didier Baar)



### 2. PRÉPARATION :

Rouge Congo :	0,5 à 1 g
Ammoniaque filtrée (solution commerciale concentrée) :	→ 100 ml
Ou mieux encore, ammoniaque pure de laboratoire...	

Transférer le colorant dans une fiole jaugée de 100 ml et amener au trait de jauge avec l'ammoniaque (il en faut donc à peu près 99 ml). Opérer rapidement et couvrir aussitôt avec un

verre de montre afin de limiter les pertes d'ammoniac. Si la solution n'est pas limpide, plonger le flacon dans un bain-marie et agiter jusqu'à dissolution du colorant, sans (jamais !) dépasser la température de 35 °, sous peine de voir bouillir l'ammoniaque. Laisser alors refroidir quelque peu avant de filtrer dans un entonnoir fermé avec un couvercle de boîte de Pétri. Travailler si possible sous hotte aspirante, ou à défaut dans un endroit très bien ventilé.

L'ajout de NH<sub>4</sub>OH dans le rouge Congo est une " mode " répandue en mycologie ; elle a 2 raisons :

- être certain que la solution ne s'acidifie pas (le rouge C. devient bleu en solution acide)
- permettre un ramollissement et un regonflement conjugués à une éventuelle coloration, sur des fragments d'exsiccata
- cela engendre une conséquence désagréable → instabilité de la solution à long terme, avec formation d'un précipité qui s'accroît au fil du temps

### **3. UTILISATION :**



Macrocytiste fusiforme d'un Basidiomycète observée dans le RCA (photo Didier Baar)

Le rouge Congo ammoniacal est un excellent milieu pour toutes les observations courantes. Il a les mêmes qualités regonflantes et ramollissantes que l'ammoniaque, et a l'avantage supplémentaire de colorer la paroi de la plupart des hyphes, ce qui augmente le contraste et facilite ainsi l'observation et l'interprétation. Il convient parfaitement lors de la recherche des anses d'anastomose, qu'il met admirablement en évidence. On a grand intérêt, et particulièrement lors de la photomicrographie, à laver dans l'ammoniaque diluée deux fois les préparations montées dans le rouge Congo ammoniacal. Par cette opération, le fond se décolore et le contraste se trouve encore augmenté. L'ammoniaque diluée deux fois a l'avantage sur l'ammoniaque concentrée de ne dissoudre que le colorant non fixé sur les structures fongiques. L'ammoniaque concentrée, au contraire, dissout assez facilement le rouge Congo, même fixé, et fait donc

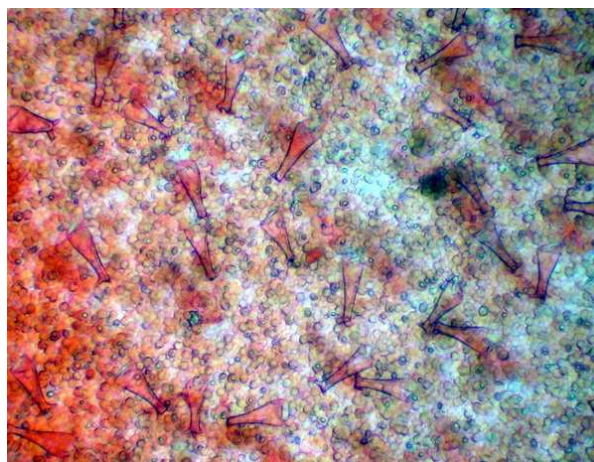
pâlir les éléments observés. L'eau convient moins bien parce que le colorant n'y est que peu soluble, et qu'elle a tendance à provoquer sa cristallisation.

Cystides à crochet chez *Pluteus cervinus*, observées dans le RCA (photo Marcel Lecomte, 20x)

Il permet aussi de colorer l'endospore de certaines spores (notamment chez *Volvaria* et *Pluteus*) ; chez toutes les espèces des genres *Hypholoma*, *Stropharia* et affines ; on peut aussi utiliser le rouge Congo ammoniacal au lieu d'ammoniaque pour l'étude des chrysocystides (qui sont des cellules stériles dont le contenu vire au jaune d'or au contact des bases), car le rouge Congo ne masque pas la réaction.

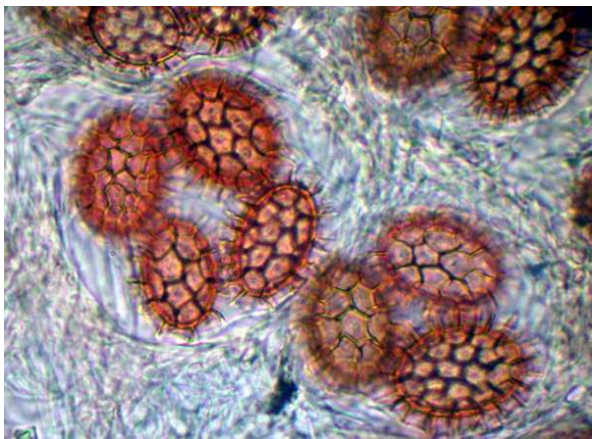
Très intéressant également pour traiter les cystides couronnées des *Inocybe* : en effet, les cristaux qui garnissent les cystides vont prendre une très belle couleur opaline verdâtre.

Mais le rouge Congo ammoniacal a les défauts de l'ammoniaque : il est très volatil et la préparation se dessèche au cours de l'observation. Plutôt que d'ajouter du colorant pour maintenir la préparation humide, on a intérêt à ajouter de l'ammoniaque diluée deux fois pour les raisons évoquées précédemment. Par ailleurs, il faut savoir que l'ammoniaque dissout certains éléments comme les incrustations acido-résistantes de la cuticule des russules.





**Pierre-Arthur MOREAU** : “ Un "petit truc" pour confirmer rapidement *Mycena abramsii* : il y a beaucoup de grosses hyphes oléifères dans la trame du pied ; sur une coupe, elles apparaissent très nettement dans le rouge Congo ammoniacal (comme chez *M. galopus*). Elles sont beaucoup plus rares et discrètes chez *M. leptcephala*, *stipata*, *caliginosa*, *niveipes* et autres confusions "habituelles" ; mais ça ne doit pas empêcher de vérifier que les hyphes corticales du pied ont bien les petits diverticules épars caractéristiques d'*abramsii*.... ”



Ascospores chez *Tuber maculatum*, observées dans le RCA (photo Marcel Lecomte, 63x)

**Jean-Marie PIRLOT** applique un procédé de double coloration pour l'étude des Polypores. Voici comment il pratique :

- placer la coupe dans du KOH à 5 % pour re-gonfler
  - déposer une goutte de rouge Congo ammoniacal
  - déposer une goutte de phloxine
  - mélanger, y faire glisser la coupe, couvrir d'une lamelle et dissocier par tapotement si nécessaire
- introduire ensuite du KOH 5 % par le côté de la lamelle afin d'éclaircir la préparation
  - → les parois sont teintées par le Congo et le contenu des hyphes, basides et cystides, par la phloxine

**Alain GERAULT**, (13/10/2003) « *Le rouge Congo ammoniacal est une solution saturée de rouge Congo, de ce fait comme toutes les solutions saturées il peut y avoir des précipitations de certains sels qui forment alors des microcristaux plus ou moins en fougère ou arborescents. Il est difficile de savoir de quels sels il s'agit, les plus fréquents (et les plus beaux !) sont donnés avec des stérols mais il y en a aussi avec des protéines, de l'urée, des lipides, etc. Parfois même le rouge Congo ammoniacal peut donner des cristaux seul ! (Je pense qu'il s'agit de carbonate d'ammonium mais je n'en suis pas certain). Il est donc parfois très difficile de faire la part entre les cristaux attendus dans l'ammoniaque avec certains Conocybes, Galères etc. et des cristaux qui ne sont que des artefacts.* »

Chrysocystides chez *Stropharia aeruginea*, observées dans le RCA (photo Marcel Lecomte, 60x)



#### **4. DANGERS :**

Tous les dangers que présente le rouge Congo ammoniacal sont dus à l'ammoniaque, sauf le risque de tacher irrémédiablement les vêtements, qui, lui, incombe au colorant. L'ammoniaque, étant très volatile, libère le gaz ammoniac, qui est fortement irritant. Ses propriétés basiques la rendent corrosive, donc, éviter le contact avec la peau et surtout avec les yeux, et éviter de respirer les vapeurs. D'autre part, il est bon de savoir que l'ammoniaque, au contact de l'iode, provoque des réactions à caractère explosif.

Il faut savoir qu'à l'état pur, le rouge Congo :

- est toxique par contact avec la peau
- provoque des brûlures

- est toxique par ingestion et mortel à dose élevée de produit pur évidemment : le RC est létal à 1,43 g/kg de poids humain
- après contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment avec une solution à 1 % de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ )

## **5. CONSERVATION :**

Il convient, pour que le rouge Congo ammoniacal reste efficace le plus longtemps possible, de le conserver dans un petit flacon bien fermé, qu'on ouvre le moins souvent et le moins longtemps possible. Cela pour deux raisons : d'une part l'ammoniac se dégage de la solution, et d'autre part le  $\text{CO}_2$  atmosphérique réagit avec l'hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) pour donner du carbonate d'ammonium ( $\text{NH}_4$ ) $_2\text{CO}_3$ , qui précipite au pH alcalin de la solution, ce qui se traduit par l'apparition de cristaux brillants. Ces deux phénomènes ont pour résultat d'abaisser le titre (concentration) de la solution. Comme la concentration en ammoniac diminue, la solubilité du rouge Congo diminue également, et il finit par précipiter lui aussi.

Même en prenant toutes ces précautions, la solution de rouge Congo dans  $\text{NH}_4\text{OH}$  est instable, avec formation d'un précipité ou d'un dépôt qui s'accroît au fil du temps et pollue le flacon !

Nous préconisons de le changer chaque année.