

Fixateurs à base d'acide picrique et de formol

Le nombre figurant à côté du nom du fixateur est sa date de création.

1. NATURE DES FIXATEURS :

Il s'agit de fixateurs à base d'acide picrique. Celui-ci, seul et en solution saturée aqueuse ou alcoolique, n'est pas un bon fixateur malgré son grand pouvoir de pénétration et de précipitation.

Quelques mots de l'acide picrique, de formule $C_6H_3O_7N_3$, qu'on appelle aussi trinitrophénol ou trinitro 2-4-6 phénol. Il est aussi appelé amer de Welter, jaune amer, amer d'indigo. Le mot « amer » fait référence à sa grande amertume. Comme d'autres phénols, il est appelé « acide » à tort... Sous sa forme cristallisée, il est de couleur jaune clair.

Ils ont tous en commun le fait qu'après la fixation, il ne faut pas laver la pièce fixée : passer directement dans l'alcool absolu pour déshydrater.

La durée du temps de fixation est donnée à titre indicatif pour des pièces de 2 mm d'épaisseur maximum. Cela signifie que si on effectue des coupes minces à main levée ou encore mieux au microtome, on peut ne laisser agir le fixateur que durant 30 minutes à une heure.

2. PREPARATION :

Fixateur de Bouin (1897)

| | |
|---|-------|
| Eau bidistillée saturée d'acide picrique (1,4 g/100 ml) : | 75 ml |
| Formol à 40 % : | 25 ml |
| Acide acétique glacial : | 5 ml |

- ce fixateur est à utiliser de manière extemporanée : il est conseillé d'ajouter l'acide acétique au moment de l'emploi
- durée de fixation pour des fragments de 2 mm d'épaisseur maximum : 6 à 8 heures

Fixateur de Duboscq-Brasil (ou fixateur de Bouin alcoolique - 1905)

| | |
|---------------------------------|---------------------------|
| Acide acétique cristallisable : | 15 ml |
| Formol à 40 % : | 60 ml |
| Trinitrophénol : | 4 g |
| Alcool à 80° : | soit 2,66 g/100 ml 150 ml |

- ce fixateur est à utiliser de manière extemporanée : il est bon de le préparer au moment de l'emploi en mélangeant les 3 composants indiqués ci-dessus et en ayant la solution alcoolique d'acide picrique en réserve à 1 goutte d'acide acétique + 4 gouttes de formol + 10 gouttes d'acide picrique alcoolique mélangés dans une coupelle où on placera l'élément à fixer.
- durée de fixation pour des fragments de 1 mm d'épaisseur maximum : 30 minutes.
- Il est plus pénétrant que le Bouin et convient mieux pour les structures fines.

Fixateur d' Allen (1916)

| | |
|---------------------|--------|
| Fixateur de Bouin : | 100 ml |
| Urée : | 1 g |

- durée de fixation pour des fragments de 2 mm d'épaisseur maximum : 6 à 8 heures

Fixateur de Hollande (ou micro-formol cuprique – 1918)

| | |
|---------------------------------|--------|
| Acide acétique cristallisable : | 1,5 ml |
| Eau bidistillée : | 100 ml |
| Acétate neutre de cuivre : | 2,5 g |
| Trinitrophénol : | 4 g |
| Formol à 40 % : | 10 ml |

- Mélanger les composants dans l'ordre strictement indiqué : cela permet d'éviter l'usage du mortier.
- L'acétate de cuivre accroît la solubilité de l'acide picrique (trinitrophénol) et permet d'en dissoudre jusqu'à 5 % à froid, alors que sa solubilité normale est de l'ordre de 0,6 à 0,75 % dans l'eau distillée.
- Il a aussi pour effet de diminuer la concentration ionique et de diminuer l'effet direct de cette ionisation à savoir un excès de gonflement du matériel à fixer ; en dernier, il empêche la précipitation lors de l'ajout du formol.
- durée de fixation pour des fragments de 2 mm d'épaisseur maximum : 6 à 8 heures

Fixateur de Gendre (1937)

| | |
|--|----------|
| Ethanol absolu : | 100 ml |
| Eau bidistillée : on obtient ainsi de l'éthanol à 90° ensuite | 13,25 ml |
| Ethanol à 90 ° : | 85 ml |
| Trinitrophénol à saturation : | +/- 8 g |
| Formol à 40 % : | 10 ml |
| Acide acétique glacial : | 5 ml |

- durée de fixation pour des fragments de 2 mm d'épaisseur maximum : 4 à 6 heures au frigo (0 à 4° C) ; 30 minutes à 1 heure pour des coupes réalisées au microtome...

Fixateur de Halmi

aussi appelé fixateur formopicromercurotrichloracétique.

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Formol | 11 ml |
| Acide picrique aqueux saturé : | 6 ml |
| Acide trichloracétique cristallisé : | 1,1 g |
| Chlorure de mercure : | 2,45 g |
| Chlorure de sodium : | 0,27 g |
| Eau bidistillée : | 42,9 ml |

| | |
|--------------------------|-------|
| Acide acétique glacial : | 32 ml |
|--------------------------|-------|

La précision de formulation des quantités rend cette formule difficile à préparer, car on ne dispose pas nécessairement d'une balance précise à 0,01 g près.

Didier Baar l'utilisait beaucoup en histologie animale en raison de sa rapidité d'action sur coupes effectuées au microtome et du manque d'effets secondaires ; ce fixateur facilite énormément la pénétration des colorants.

Fixateur formopicromercurique (Mélange de Mann - 1898)

| | |
|----------------------------|--------|
| bichlorure de mercure | 2,5 g |
| Eau bidistillée bouillante | 100 ml |
| après dissolution, ajouter | |
| Trinitrophénol | 1 g |

- au moment de l'utilisation, ajouter extemporanément du formol pur à raison de 1 goutte de formol pour 5 gouttes de fixateur
- Ce mélange permet de fixer des pièces assez importantes, du moment qu'elles restent minces (selon la taille, laisser dans le bain de 12 heures à 4 jours)
- Il est impératif de laver ensuite à l'alcool iodé pour éliminer le sublimé de mercure et l'acide picrique

2. UTILISATION :

La fixation est une technique microscopique qui a pour but de tuer des cellules vivantes, en les conservant autant que possible, dans l'état qu'elles affichaient en étant en vie. Le fixateur idéal doit donc immobiliser la cellule sans faire apparaître des détails de structure artificiels, causés par la fixation. Malheureusement, l'idéal n'existe pas et certaines modifications secondaires apparaissent. Un fixateur agit en solidifiant par coagulation et précipitation.

L'usage d'un fixateur s'avère très intéressant par exemple pour la séparation des **Stichobasidiés** et **Chiastobasidiés** (voir R. Kühner "Les Hyménomycètes agaricoïdes" pages 662 et suivantes).

Schématiquement, le fuseau de la division est en effet +/- longitudinal et au milieu de la baside pour le premier et +/- transversal et au sommet de la baside pour le second. En réalité, c'est surtout la position des fuseaux des divisions dans la baside qui détermine les deux types.

Voici une technique rappelée dernièrement par Maxime CHIAFFI sur Mycologia Europaea (forum de discussion) : « ...

- Immersion dans l'alcool éthylique absolu pendant 24 heures (j'ai fait des essais en réduisant ce temps pour pouvoir faire les observations dans la même journée, sans inconvénient).
- Fixation dans le Picroformol de Duboscq Brasil (1 à 2 heures) beaucoup plus rapide que le Picroformol de Bouin ou le liquide de Hollande
- Lavage dans l'eau.
- Immersion dans le Carmin acétique pendant 1 heure (on peut réduire selon les préparations)
- Procéder comme pour la mise en évidence des granulations sidérophiles (faire bouillir dans le carmin, agitant avec un fil de fer - pour ma part, j'utilise quelques petits grains de vieux sulfate de fer qui tombe en poussière -- dilacérer et monter dans le Carmin acétique). Les noyaux sont plus ou moins rouges. ... »

Personnellement, nous ne voyons pas l'utilité de placer la coupe dans l'alcool absolu, car en laissant celle-ci dans le mélange de Duboscq-Brasil durant 24 heures, le résultat obtenu sera semblable.

4. DANGERS :

L'acide picrique cristallisé est très sensible aux chocs et au feu. Ne JAMAIS le mélanger à de la glycérine car il donne un produit hautement explosif : la trinitroglycérine (dynamite). Sa molécule hydrocarbonée contient beaucoup d'oxygène ce qui permet une éventuelle auto-combustion avec explosion, mais moins violente que dans la dynamite.

En solution aqueuse, il tache fortement la peau et les vêtements (les taches faites sur le coton, la laine et la soie, sont indélébiles). Sous cette forme, il n'est plus explosif ; il se révèle toxique per os, sous n'importe quelle forme.

5. CONSERVATION :

De longue durée pour l'acide picrique, à condition de le placer dans des flacons bien fermés, à l'abri du feu et protégé des chocs.

Le fixateur de Hollande se conserve indéfiniment.

Le mélange de Duboscq-Brasil doit se présenter sous 3 flacons séparés à mélanger de manière extemporanée, car il se conserve peu de temps (1 à 2 mois... à expérimenter pour de plus longues durées !)

Le fixateur de Halmi se conserve 1 à 2 ans.

Le mélange de Mann se conserve très bien également.