

Carmin acétique *Chlorure de fer III*

1. NATURE DU REACTIF :

Le carmin naturel est extrait du corps d'une cochenille (Hémiptère parasite) qui se fixe sur une cactée mexicaine. Cet insecte, *Coccus cacti*, vit soudé à son hôte, et à l'abri d'une carapace qui l'isole parfaitement des prédateurs. Ce produit rouge, pulvérulent, ne se trouve que dans le corps graisseux des femelles ... et dans le vitellus des œufs (Langeron).

Le produit commercialisé est une combinaison d'acide carminique avec de l'alumine, de la chaux et des albuminoïdes. C'est peut-être le colorant le plus connu des cytologistes, et le plus ancien (on l'utilisait déjà en 1849 – Göppert & Cohn). C'est aussi un des plus chers (plus de 12,00 €/g).

2. PREPARATION :

Carmin acétique de Semichon :

Acide acétique cristallisable :	50 ml
Eau bidistillée :	50 ml
Carmin :	4 g

Mélanger en quantités égales l'acide acétique cristallisable et l'eau bidistillée dans un ballon, puis saturer de carmin au bain marie bouillant. Le contenu du ballon ne doit pas bouillir ! Surveiller en permanence la température et la maintenir aux alentours de 90°.

Laisser refroidir, puis décanter et filtrer.

La coloration est encore plus intense lorsqu'on y ajoute de l'acétate ferrique de manière extemporanée (formule de Belling, modifiée par Horowitz & Saez), ou du chlorure de fer III (perchlorure de fer).

L'acide acétique à 45 ou 50 % quasi bouillant, est la solution qui dissout la plus grande quantité de carmin ; ce dernier tend à précipiter dès que la concentration change et les préparations réalisées avec cette solution concentrée, s'altèrent.

Carmin acétique selon Zirkel (1940)

Acide acétique cristallisable :	45 ml
Eau bidistillée :	55 ml
Carmin :	1 g

Faire chauffer sous hotte à ébullition douce durant 5 heures

Filtrer.

Carmin acétique de Schneider

Acide acétique cristallisable :	45 ml
Eau bidistillée :	100 ml
Carmin :	10 g

- Dissoudre à saturation du carmin dans de l'acide acétique à 45 %, bouillant, dans un ballon. Laisser refroidir, puis décanté et filtrer sur papier.
- Le papier filtre est retiré de l'entonnoir, étalé à plat et mis à sécher.
- C'est ce filtrat qui va être utilisé.
- Après séchage, recueillir soigneusement le résidu de carmin laissé sur le papier.
- L'utiliser dans la préparation suivante :

résidu de Carmin acétique :	0,5 g
Eau bidistillée :	100 ml
Alun :	5 g

Mélanger le carmin et l'alun puis dissoudre dans l'eau chaude et ajouter 2 ou 3 grains de phénol.

Cette solution diluée à 0,5 % colore lentement ; elle peut être utilisée comme colorant vital (sur objet vivant) et donne une coloration nucléaire pure, qui ne persiste pas sur des préparations permanentes.

3. UTILISATION :

Par sa double action de fixateur et de colorant, le carmin acétique de Sémichon est utilisé pour l'observation des noyaux et le comptage des chromosomes, qui sont fortement mais finement colorés. L'acétate de fer rend la coloration rouge intense noirâtre.

La coloration des noyaux par le carmin acétique est une caractéristique du genre *Geopora*. Cette coloration est également possible sur des exsiccata.

Elle permet aussi de colorer les noyaux des cellules de certaines espèces des genres *Collybia*, *Clitocybe*, *Mycena* et *Tricholoma* (R. Kühner), et, plus spécifiquement, de mettre en évidence les granulations carminophiles des *Lyophylloideae* (réaction propre à cette sous-famille) rendant de la sorte de nombreux services en permettant d'effectuer un tri au sein de la grande famille que forment les *Tricholomataceae* (séparation des genres *Lyophyllum*, *Tephrocybe* et *Calocybe* des autres “ *Tricholomoïdes* “).

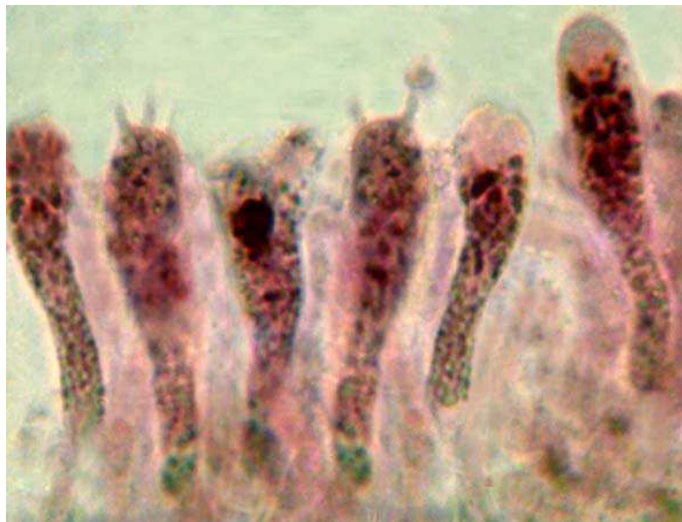
Chez les lépiotes, la coloration de la paroi sporique est variable (d'incolore à rouge foncé) et cela facilite la recherche du pore germinatif.

Il faut savoir que les verrues, granulations, parois et ornements amyloïdes ne se colorent pas par le carmin.

Une manière de procéder qui a fait ses preuves :

- placer une grosse goutte de réactif sur une lame de verre et y placer les coupes (Cependant, c'est beaucoup plus simple dans un verre de montre ou sur une lame porte-objet creuse (avec cavité d'observation, utilisée pour l'étude des organismes vivant dans l'eau : Rotifères, Amibes, etc...)). Cela limite les déplacements du liquide !
- chauffer à la flamme durant quelques secondes jusqu'aux premières bulles
- en même temps, ajouter une gouttelette d'acétate ferrique
OU agiter le carmin acétique avec une aiguille en acier ou un clou rouillés (ce qui provoque la formation d'acétate de fer)
OU y déposer quelques grains de sulfate de fer (M. Chiaffi) continuer à chauffer doucement jusqu'à la fonte des grains de sulfate de fer
- compenser l'évaporation par un apport de carmin, goutte par goutte

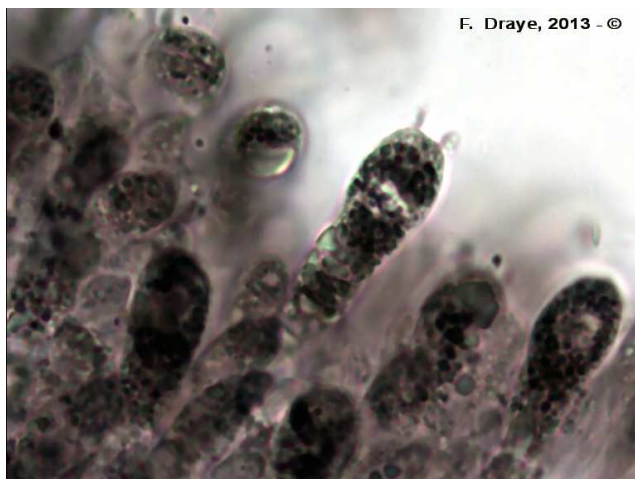
- dès que le carmin acétique vire au rouge bleuâtre, voire noirâtre, et perd sa transparence, refroidir avant la formation d'une pellicule de surface (toute l'opération dure de 60 à 90 secondes)
- placer les pièces colorées dans une nouvelle goutte de carmin acétique, dissocier et observer.



Granulations carminophiles chez *Lyophyllum connatum* (photo Yves Deneayer) et chez *L. decastes* (photos Françoise Draye).

Dans une préparation réussie :

- Pour la coloration des noyaux : le protoplasme est faiblement et uniformément coloré, tandis que les noyaux sont vivement teintés de rouge ou de pourpre noirâtre.
- Pour les granulations carminophiles : les basides sont parsemées de taches noires plus ou moins grandes et nombreuses.

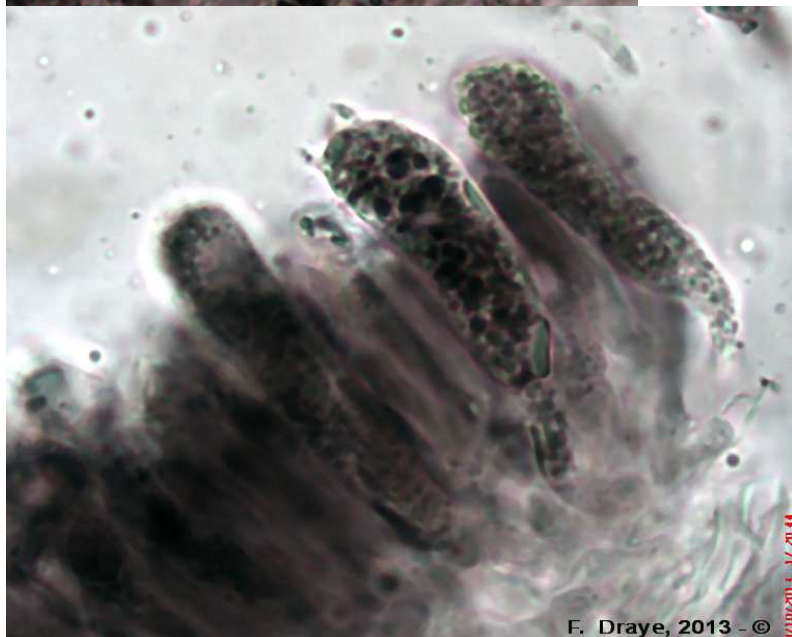


F. Draye, 2013 - ©

Voici comment procède Cléménçon pour mettre en évidence la carminophilie positive des basides !

++ Prélever un fragment de lame (s'il s'agit d'un exsiccatum, hydrater d'abord à l'ammoniaque et tamponner au papier buvard)

++ Mordancer dans une solution de sulfate de fer à 10 % ou de $FeCl_3$ à température ambiante durant 5 à 10 minutes (*le mordantage est l'utilisation d'un mordant, c'est-à-dire une substance qui renforce les colorations et dans cer-*



F. Draye, 2013 - ©

tains cas, les rend possibles ; on n'emploie que des mordants neutres ou acides). On peut dire qu'un mordant est une substance qui sert d'intermédiaire entre le colorant et la pièce à colorer ; il provoque une combinaison chimique entre 2 corps qui n'ont aucune affinité chimique au départ ; il sensibilise le corps à colorer en formant avec lui une combinaison stable. En résumé, il se forme entre le tissu animal ou végétal, le mordant et le colorant, une triple combinaison colorée suffisamment stable pour résister aux décolorants (acides, alcool...)

++ Tamponner le fragment puis le

plonger dans le carmin acétique et faire bouillir ; prendre garde de ne pas carboniser le dit fragment : chauffer jusqu'aux premiers bouillonnements, éteindre la flamme, et dès que les bouillonnements cessent, recommencer à chauffer ; répéter l'opération pendant 1 à 2 minutes ; des précipités noirs se forment dans la solution rouge.

- observer ensuite dans une goutte de chloral hydraté, ou dans le milieu d'Hoyer (voir fiche technique : conservation des préparations microscopiques).
- la carminophilie est positive si des granulations bleu-noir à noires, souvent groupées par 2, apparaissent dans les basides.

Voici comment nous procédons pour une coloration générale de coupe destinée à un montage définitif : (technique de base apprise de **Paul LEROY**)

- placer quelques gouttes de réactif dans un verre de montre et y placer les coupes
- chauffer à la flamme durant quelques secondes et surcolorer
- effectuer la régression dans de l'acide chlorhydrique à 50 % (dans un grand verre de montre) et surveiller attentivement
- lorsque la coloration donne satisfaction, éliminer l'acide par plusieurs bain d'éthanol (ou de méthanol ...)
- placer dans le xylène phénolé pour bloquer la régression
- monter sur lame au Baume du Canada

Après consultation auprès de nombreux mycologues, il apparaît que ces réactions sont difficiles à obtenir et parfois aléatoires (nous avons tous beaucoup souffert pour arriver à les réaliser !)

Alain GERAULT : “ *Mais quel est le but de ces réactions ?* ”

Pour la sidérophilie on recherche la capacité de certains "tissus" à fixer des ions métalliques, ici le fer mais c'est possible avec d'autres "ions" métalliques. Cette réaction serait caractéristique de certains polymères organiques et dans les champignons peut-être des glucanes présents dans certaines basides. Le carmin ne sert qu'à mettre ensuite en évidence les "atomes" de fer fixés (ou mieux des molécules voir des poly-ions)...Le carmin en milieu acétique n'est pas le meilleur réactif du fer !

La fixation du fer (ou d'autres ions) sur des polymères est très dépendante de l'état des tissus et il est bien évident qu'un début de dessiccation peut perturber la réaction de capture des ions de métaux dans les "mailles" de ce polymère... ”

4. DANGERS :

Le carmin acétique est un réactif relativement peu dangereux ; il est un peu irritant pour les voies respiratoires et pour les yeux, par l'acide acétique qu'il contient. Il est préférable d'éviter tout contact avec les yeux. En cas d'accident, laver immédiatement et abondamment.

5. CONSERVATION :

Le carmin acétique, quoique assez instable, peut se conserver plusieurs mois, jusqu'à deux ans en principe, à condition de garder le flacon bien fermé ; le moyen le plus simple de le tester est de recommencer l'expérience de coloration de temps en temps (sur *Lyophyllum decastes* par exemple) ! Il semble même qu'il devienne plus efficace en vieillissant !