

Protocole n° 69

Coloration de Grocott

Principe :

Application à la détection des champignons de la méthode de Gomori à l'argent-méthénamine. Le principe général de la réaction est le suivant : les groupements réactifs de la composante glucidique des mycéliums et corolles des champignons sont oxydés par l'acide chromique et les aldéhydes libérés sont mis en évidence par réduction d'un complexe d'argent-méthénamine (ou hexaméthylène-tétramine).

Produits nécessaires à la coloration :

CryoRAL, aérosol pour congélation instantanée de pièces anatomiques Réf. 361405-	0300 ou 0500 g
Formol à 10% tamponné Réf. 320720-	2500 ou 5000 mL
Vert lumière haute pureté Réf. 320770-	0025 g
HistoRAL, milieu de montage Réf. 361210-	0500 mL

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Nitrate d'argent - Hexaméthylènetétramine - Borax - Acide acétique - Acide chromique - Bisulfite de sodium - Chlorure d'Or - Etuve

Préparation des échantillons :

Les échantillons doivent être préparés conformément aux méthodes en vigueur dans le laboratoire, en l'application de l'Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, J.O. n°287 du 11 décembre 1999.

Préparation des solutions :

Solution d'argent-méthénamine :

- Solution-mère : mélanger 100 mL d'une solution aqueuse à 3% d'hexaméthylènetétramine + 5 mL d'une solution aqueuse à 5% de nitrate d'argent. Il se forme un précipité blanc qui se dissout immédiatement par agitation. Cette solution se conserve des mois au réfrigérateur.

- Solution de travail : juste avant l'emploi, mélanger 2 mL d'une solution aqueuse à 5% de borax + 25 mL d'eau distillée. Après dissolution, ajouter 25 mL de solution-mère.

Solution d'acide chromique : Préparer une solution aqueuse à 5% d'acide chromique.

Solution de Bisulfite de sodium : Préparer une solution aqueuse à 1% de Bisulfite de sodium.

Solution de Chlorure d'Or : Préparer une solution aqueuse à 0,1% de chlorure d'or.

Solution d'hyposulfite de sodium : Préparer une solution aqueuse à 2% d'hyposulfite de sodium.

Solution de Vert lumière :

- Solution-mère : Mélanger 0,2 g de Vert lumière haute pureté + 0,2 mL d'acide acétique glacial dans 100 mL d'eau distillée.
- Solution de travail : mélanger 10 mL de solution-mère dans 50 mL d'eau distillée.

Mode opératoire :

Veillez lire attentivement l'intégralité des informations qui suivent avant d'utiliser le produit.

Les pièces sont fixées dans le Formol à 10% tamponné, la méthode est également applicable à des coupes à congélation.

- Déparaffiner puis hydrater la coupe à l'eau distillée.
- Oxyder dans la solution d'acide chromique pendant 1 heure.
- Rincer à l'eau courante pendant quelques secondes.
- Rincer dans la solution de bisulfite de sodium pendant 1 minute.
- Rincer à l'eau courante pendant 5 à 10 minutes.
- Rincer dans 3 ou 4 bains d'eau distillée.
- Placer dans la solution d'argent-méthénamine, à l'étuve à 58°C, jusqu'à ce que la coupe ait pris une coloration brun jaunâtre pendant 30 à 60 minutes.
- Retirer la préparation de cette solution en utilisant une pince paraffinée et la plonger dans l'eau distillée. Vérifier au microscope si l'imprégnation est suffisante (les champignons doivent être colorés en brun foncé).
- Rincer dans 6 bains successifs d'eau distillée.
- Virer dans la solution de chlorure d'or pendant 2 à 5 minutes.
- Rincer à l'eau distillée.
- Eliminer l'argent non réduit en passant dans la solution d'hyposulfite de sodium pendant 2 à 5 minutes.
- Rincer énergiquement à l'eau.
- Colorer le fond par la solution de Vert lumière pendant 30 à 45 secondes.
- Déshydrater successivement la coupe dans les alcools de degré croissant jusqu'à l'alcool absolu.



- Passer dans le toluène ou xylène.
- Monter avec un milieu de montage adapté à base de toluène/xylène.

Résultats :

Champignons : noir intense (partie interne des *mycelia* et hyphes : rose)

Fond : vert pâle

Mucines : gris foncé

Recommandations et/ou notes d'utilisation :

Produit destiné à un usage exclusivement professionnel pour le Diagnostic in vitro.
L'enlèvement et le traitement des déchets chimiques et biologiques doivent être effectués par une entreprise spécialisée et agréée.

Stockage : 15 - 25 °C.

La réussite de l'imprégnation argentique nécessite le respect scrupuleux d'un certain nombre de règles :

- N'employer que des produits chimiquement purs.
- Utiliser de l'eau bidistillée, et non simplement distillée.
- Eviter les poussières, qui altèrent les solutions.
- Se servir d'une verrerie d'une très rigoureuse propreté.
- Ne jamais mettre un objet métallique au contact des solutions.

Références Bibliographiques :

GANTER P., JOLLES G., *Histochimie normale et pathologique*, éd. GAUTHIER-VILLARS, vol. 2, 1970, p. 1472.