**REMARQUES SUR LA TECHNIQUE
ET LA VALEUR DE LA COLORATION DE HOTCHKISS
MAC MANUS EN MYCOLOGIE MÉDICALE**

Par C.-W. BOTTGER (*)

Introduction

La mise en évidence des champignons dans les tissus par les méthodes usuelles de coloration est généralement difficile. Depuis quelques années, divers auteurs ont signalé les résultats favorables obtenus par la technique de Hotchkiss-Mac Manus (H-McM), ou la technique inversée dite « Reverse technic ». Ces deux techniques seraient même supérieures pour l'examen des squames et des ongles à la méthode classique d'éclaircissement par la potasse caustique.

Le principe de la technique de H-McM repose essentiellement sur une hydrolyse par l'acide périodique, suivie d'une coloration par le réactif de Schiff. R. D. Hotchkiss (7) a montré que cette coloration est spécifique pour les hydrates de carbone renfermant un ou deux groupes glycol non substitués ou pour des corps de structure similaire dans lesquels les groupes OH sont remplacés par des groupes aminés ou alkyl-aminés. L'hydrolyse produite par l'acide périodique transforme ces groupes en 1-2 aldéhydes qui, en présence de réactif de Schiff, prennent une couleur allant du rose au rouge foncé. Dans les tissus, il n'y a pratiquement que les polysaccharides — entre autres, le glycogène, la mucine et l'acide hyaluronique — qui se colorent par cette réaction. Dans la membrane cellulaire des champignons, les polysaccharides existent sous forme de chitine et de cellulose ; la chitine réagit violemment en présence de réactif de Schiff. Celui-ci n'est autre chose que de la fuchsine basique déco-

(*) Médecin-assistant du Service dermatologique du Dr M. K. Polano de l'hôpital municipal, La Haye (Hollande). Nous remercions le Dr Vanbreuseghem qui nous a donné l'idée de ce travail et nous a guidé dans son exécution. Nos remerciements vont également à M. Van Santen, chimiste du laboratoire de la clinique Léopold II, pour son aide et ses conseils durant la préparation des divers réactifs.

lorée par l'acide sulfureux ; en présence d'aldéhyde, la coloration rouge de la fuchsine réapparaît. On peut en faire la démonstration pratique en ajoutant une goutte de formol du commerce au réactif de Schiff qui aussitôt d'incolore devient rouge vineux.

La technique de Hotchkiss Mac Manus

Nous nous sommes proposé, après d'autres, de vérifier la valeur de ces deux techniques pour la mycologie médicale. La technique de Hotchkiss-Mac Manus a été appliquée de la façon suivante à la coloration des squames, des fragments d'ongles, des cheveux et des frottis :

1. Fixation avec de l'alcool éthylique à 70° durant 2 minutes.
2. Rincage à l'eau distillée.
3. Immersion durant 5 minutes dans l'acide periodique à 1 %.
4. Lavage à l'eau courante durant 15 minutes.
5. Immersion dans le réactif de Schiff durant 10 à 15 minutes.
6. Sans laver, immerger deux fois de suite, durant 5 minutes chaque fois, dans de l'eau sulfureuse dont voici la formule :

Bisulfite de soude 10 %	5 ml.
Acide chlorhydrique N	5 ml.
Eau distillée	90 ml.

7. Rincage à l'eau courante durant 10 minutes.

Le réactif de Schiff est une solution aqueuse à 0,5 p. 100 de fuchsine basique. Il doit être incolore ou jaune paille. La clarification peut s'obtenir en le traitant par du noir animal ou par de l'acide chlorhydrique et du bisulfite de soude.

Les squames et les cheveux sont d'abord fixés au porte-objet par une solution diluée d'albumine de Mayer ou par de l'agar-agar liquéfié.

Les coupes histologiques sont déparaffinées avec du xylol durant deux fois 5 minutes, puis traitées par de l'alcool absolu, de l'alcool à 95°, de l'alcool à 60° et enfin de l'eau distillée.

La méthode des auteurs précités est approximativement celle que nous venons d'exposer. J. Gadrat et coll. (3) ont employé l'acide periodique à 0,5 p. 100 durant 10 minutes. A. M. Kligman et coll. (1, 2) emploient du bisulfite de potasse et terminent la coloration par un colorant de contraste (vert lumière).

Le gros inconvénient de cette méthode est l'instabilité du réactif de Schiff. A l'air libre, il rougit rapidement. En flacons hermétiques, cette altération se fait en quelques semaines. D'où la nécessité de le préparer fréquemment, ce qui prend assez bien de temps.

La reverse technic

P. Arzac (8) démontra qu'on pouvait arriver au même résultat avec de la fuchsine non décolorée qui, comme on sait, est stable. Les préparations sont ensuite traitées par une solution de bisulfite de soude et d'acide tartrique qui décolore les tissus, mais laisse les champignons colorés en rouge. Cette technique, dite « reverse technic », a été employée par Kligman (4, 5) et par Loffgren et Batt's (6).

Voici le détail de la « reverse technic » telle que nous l'avons appliquée :

A. *Coloration des squames et des cheveux* (après fixation par de l'albumine de Mayer diluée) de frottis et de cultures sur lames.

1. Immersion dans l'alcool à 95° durant 1 minute.
2. Immersion dans l'acide periodique à 5 % durant 5 minutes.
3. Lavage dans l'eau durant 2 minutes.
4. Couvrir la préparation avec le colorant suivant :

Fuchsine basique	0 gr. 1
Alcool à 95°	5 ml.

Après dissolution de la fuchsine dans l'alcool, ajouter 95 ml. d'eau distillée.

5. Rinçage à l'eau courante durant 2 minutes.
 6. Immersion dans la solution suivante :
Bisulfite de soude	1 gr.
Acide tartrique	0 gr. 5
Eau distillée	99 ml.
7. Laver à l'eau durant 1 minute.
 8. Immerger dans une solution saturée d'acide picrique durant deux minutes.
 9. Laver à l'eau courante durant 2 minutes.
 10. Ajouter quelques gouttes de glycérine et couvrir d'un porte-objet.

Pour les préparations permanentes, passer par les alcools (de 70° à l'alcool absolu), deux fois dans le xylol, et enfin couvrir de baume du Canada.

B. *Coloration des coupes*.

1. Déparaffiner au xylol durant deux fois 5 minutes et passer, chaque fois durant 5 minutes, dans les alcools absolus, à 95°, à 70°, et enfin dans l'eau distillée.
2. Immerger dans l'acide periodique à 1 % durant 2 minutes.
3. Laver à l'eau courante durant 2 minutes.
4. Couvrir de fuchsine basique durant 2 minutes (comme dans A).
5. Laver à l'eau courante durant 2 minutes.

6. Immerger durant 10 à 30 minutes dans le mélange bisulfite de soude-acide tartrique.
7. Laver à l'eau courante durant 1 minute.
8. Recouvrir de la solution saturée d'acide picrique durant 2 minutes.
9. Laver à l'eau courante durant 2 minutes.
10. Déshydrater et couvrir de baume du Canada.

La technique de Loffgren et Batt's était quelque peu différente de celle rapportée ci-dessus, qui se rapproche de celle décrite par Kligman. Ces auteurs, en effet, colorent 5 minutes avec la solution de fuchsine basique et ne décolorent que durant 5 minutes avec la solution de bisulfite-acide tartrique. De plus, ils négligent la coloration de fond à l'acide picrique.

Kligman utilise l'hydrosulfite de zinc. Ce produit nous faisant défaut, nous l'avons remplacé par l'hydrosulfite de soude.

Tous les produits utilisés dans la « reverse technic » se conservent longtemps. Toutefois, le mélange bisulfite de soude-acide tartrique se détériore par libération de SO_2 . Ce n'est pas un grand mal, car la solution se prépare facilement et rapidement.

Fixation sur le porte-objet

Un grand nombre de colorations fut réalisé avec ces deux techniques, sur des frottis, des coupes, des cheveux, des squames et des fragments d'ongle. La coloration des frottis et des coupes ne présente pas de difficulté. Par contre, la coloration des cheveux, des squames et des fragments d'ongle en présente plusieurs, dont la plus sérieuse réside dans la fixation de ces objets sur le porte-objet. Chose curieuse, aucun auteur n'en fait mention et pourtant ils n'ont pu faire sans la rencontrer.

Remarquons d'abord que la fixation des squames sur le porte-objet avec une solution d'albumine de Mayer diluée à 1/20, suivant la description de M. Langeron (9), aboutit le plus souvent à un échec. La plupart des squames, même les plus fines, qu'on recueille dans les cas de *Pityriasis versicolor*, se détachent du porte-objet au cours des manipulations ultérieures. La fixation réalisée avec de l'albumine de Mayer non diluée est excellente, malheureusement elle ne permet pas au colorant d'agir, et mycélium et spores restent invisibles. De plus, l'albumine elle-même prend une coloration rouge assez accusée. De nombreux essais nous ont montré qu'on pouvait réaliser une bonne fixation en diluant l'albumine de Mayer au 1/8 ; dans ces conditions, la plupart des squames restent fixées au porte-objet et la coloration des éléments fungiques est très satisfaisante.

La fixation à la gélatine suivant le procédé de Masson (10) ne donne pas de bons résultats, même en utilisant de fortes concentrations de gélatine.

Nous avons tenté de fixer les squames avec le mélange de collodion, d'alcool absolu et d'éther, dans les proportions respectives de 1-2-3, suivant le procédé utilisé par Rivalier (11) pour la fixation des cultures sur lames ; mais, au cours de la coloration, les squames se détachent en même temps que la pellicule de collodion qui les maintenait au porte-objet.

Nous avons essayé d'utiliser comme fixateur de la gélose à 2 p. 100 dans l'eau courante, liquéfiée au moment de l'emploi par chauffage. Après liquéfaction, une goutte de cette gélose est déposée sur les squames, les fragments d'ongle ou les cheveux placés sur le porte-objet. L'expérience nous a montré que cette méthode est excellente et, quoique la gélose soit colorée en rouge par le Hotchkiss-Mac Manus, particulièrement dans la « reverse technic », la coloration des éléments fungiques se fait parfaitement bien.

Préparation des squames et des fragments d'ongle

Une seconde difficulté, déjà signalée par Kligman, réside dans l'épaisseur des squames et des fragments d'ongle. A cause de cette épaisseur, le mycélium dans les préparations colorées est rarement visible, à moins qu'on ait affaire à des objets très minces. Pourtant, dans plusieurs cas, d'abondants éléments fungiques furent démontrés dans ces squames en les traitant, après coloration, par de la potasse caustique ; ce traitement, notons-le, fait disparaître la coloration.

Nous nous sommes efforcé, par diverses méthodes, d'obtenir des squames plus minces. L'emploi de la lame de rasoir donne bien des fragments plus petits, mais l'épaisseur en reste généralement identique. Si l'on traite les squames par de la potasse (à 5 p. 100), puis par de l'eau, avant de pratiquer la coloration, on n'améliore guère le résultat, d'autant plus que, sous l'influence de ce traitement, l'albumine de Mayer utilisée comme fixateur se gonfle et retient mal les squames déposées sur le porte-objet. Nous avons obtenu un meilleur résultat en chauffant les squames avant de les fixer au porte-objet simplement dans de l'eau distillée. Il en résulte un ramollissement des squames, une meilleure transparence et, au total, cette méthode donne plus aisément un résultat positif que les précédentes.

Pour obtenir de fins fragments d'ongle, nous avons pensé à les frotter sur du papier de verre. Cette méthode donne quelques résul-

tats, surtout si l'on utilise du papier très fin, mais néanmoins les cristaux de silicate sont un sérieux obstacle. Nous avons tenté d'améliorer cette technique en faisant tomber le produit du raclage sur papier de verre dans un verre de montre, en l'additionnant d'eau distillée et en recueillant sur un porte-objet la partie la plus superficielle du liquide. Par cette technique, il nous a été possible, dans quelques cas, de mettre en évidence des filaments mycéliens. Il n'en reste pas moins que, jusqu'à présent, aucune méthode ne nous a paru satisfaisante et ne nous a paru remplacer, pour les squames et les fragments d'ongle, le traitement par la potasse caustique.

Résultats

Voici quelques remarques que nous avons faites sur l'application du H-McM ou de la « reverse technic » à divers produits pathologiques :

1) COLORATION DE CHEVEUX TEIGNEUX fixés au porte-objet par de l'albumine de Mayer diluée à 1/8. Les spores sont très nettement colorées. La « reverse technic » se montre légèrement supérieure à la technique directe (H-McM).

2) COLORATION DES SQUAMES. Le mycélium n'est bien coloré que dans les squames très minces. La reverse-technic donne en général un mycélium beaucoup mieux coloré que la technique de H-McM.

Nous recommandons de chauffer les squames dans l'eau avant la fixation : elles deviennent nettement plus transparentes lorsqu'elles sont ainsi traitées. Pour des raisons qui ne nous sont pas apparentes, les préparations colorées par le H-McM nous ont toujours paru plus fortement colorées 24 heures après la coloration que lorsqu'elles sont examinées immédiatement après la coloration. On obtient le même résultat si, après la coloration, on place les préparations dans de l'oxygène ou dans de l'acide carbonique. Les squames elles-mêmes, et non seulement le mycélium, deviennent plus rouges. Ce rougissement provient sans doute du réactif de Schiff qui n'a pas été éliminé. Nous n'avons pas observé ce phénomène avec la « reverse technic ». Il ne nous a semblé d'aucun intérêt d'appliquer une coloration de fond au vert lumière.

3) D'une manière générale, les FRAGMENTS D'ONGLE sont très mal colorés et ne montrent que peu ou pas de filaments mycéliens.

4) Des COUPES HISTOLOGIQUES provenant de cas de *chromoblastomycose* sont parfaitement colorées par l'une et l'autre méthode. Il

n'en va pas de même des éléments parasitaires dus à *Histoplasma duboisii* dans une coupe de testicule de cobaye.

5) Dans des frottis, les cellules et les filaments de LEVURES (*Candida albicans*) sont très nettement colorés. Il en est de même de frottis préparés à partir de CULTURES de *Candida albicans*. Des frottis préparés à partir de cerveaux de souris inoculées avec *Torulopsis (Cryptococcus) neoformans* montrent, après coloration, des cellules de levure très nettement colorées en rouge, tandis que la capsule est légèrement rosée. Les deux techniques ont donné des résultats comparables.

6) Les CULTURES SUR LAMES, faites suivant la technique de Rivallier-Seydel (12), ont été colorées suivant les deux techniques. L'emploi de la « reverse technic » exige une décoloration prolongée par la solution de bisulfite de soude, parce que l'agar-agar se colore intensément en rouge par la fuchsine basique. Le résultat obtenu est satisfaisant. Cependant, il nous a paru que les résultats étaient meilleurs lorsqu'on employait la coloration au bleu-coton pour des cultures sur lames de *Ctenomyces interdigitalis*, de *Trichophyton rubrum*, de *Sabouraudites canis*, d'*Epidermophyton floccosum* et de *Langeronia soudanensis*.

Des cultures sur lames de diverses souches de *Candida* colorées par le H-McM sont parfaitement colorées, qu'il s'agisse du pseudo-mycélium ou des éléments de levure. La « reverse technic » donne des résultats moins favorables à cause de la coloration intense de l'agar-agar.

7) Des CULTURES SUR CHEVEUX faites suivant la technique de Vanbreuseghem montrent, après coloration, les filaments mycéliens le long du cheveu. A l'intérieur du cheveu, on ne trouve aucun élément mycélien. Les organes perforateurs ne sont pas colorés, mais sont très nettement visibles. Il est recommandable de chauffer très légèrement l'albumine de Mayer diluée, dans laquelle on a placé le cheveu, pour le rendre plus transparent. L'emploi de la « reverse technic » donne, dans ce cas, des résultats supérieurs au H-McM.

8) Nous avons accordé une attention particulière à la recherche du *mosaic fungus*. On ne le trouve ni dans les préparations colorées, ni dans les préparations décolorées. Par contre, on le trouvait aisément dans des préparations de même origine traitées par KOH. Ces constatations ne sont certes pas en faveur de l'origine fungique du *mosaic fungus*. En traitant par du KOH des préparations colorées, négatives au point de vue *mosaic fungus*, on pouvait en constater la présence.

Conclusions

La préparation et la coloration de squames, de fragments d'ongle, de cheveux, par la technique de Hotchkiss-Mac Manus ou par la « reverse technic », prend beaucoup de temps. La préparation du réactif de Schiff est longue et ce réactif est instable.

L'examen des squames et des fragments d'ongle par la potasse caustique (ou par le chlorallactophénol dans le cas de *Pityriasis versicolor*) est beaucoup plus rapide et, selon nous, donne des résultats plus constants.

Toutefois, on peut recommander la méthode de Hotchkiss-Mac Manus pour la coloration des frottis et des coupes dans des cas suspects de moniliase, de torulose, d'histoplasmose, etc...

BIBLIOGRAPHIE

1. KLIGMAN (A. M.) et MESCON (H.). — The periodic-acid-Schiff stain for demonstration of fungi in animal tissue. *Jl. Bact.*, 1950, 60, 415.
2. KLIGMAN (A. M.), MESCON (H.) et DELAMATER (E. D.). — The Hotchkiss MacManus stain for the histopathologic diagnosis of fungus diseases. *Am. Jl. Clin. Path.*, 1951, 21, 86.
3. GADRAT (J.), BAZET (A.) et DUPRÉ (A.). — La réaction d'Hotchkiss-MacManus comme méthode courante de détection des mycoses en dermatologie. *Bull. Soc. Franç. Derm. et Syph.*, juillet-oct. 1952, 375.
4. KLIGMAN (A. M.), PILSBURG (D. M.) et MESCON (H.). — Improved technic for diagnosing ringworm infections and moniliasis. *J.A.M.A.*, 1951, 146, 1563.
5. KLIGMAN (A. M.). — The diagnosis of fungus infections with particular reference to staining methods.
6. LOFFGREN et BATT'S. — *Stanford Med. Bull.*, 10-2-1952.
7. HOTCHKISS (R. D.). — A micro-chemical reaction resulting in the staining of the polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, 1948, 16, 131.
8. ARZAC (P.). — A simple histochemical reaction for aldehydes. *Stain technol.*, 1950, 25, 187.
- 9-10. LANGERON (M.). — *Précis de Microscopie*, Masson, Paris, 7^e édit., 1949.
- 11-12-13. LANGERON (M.) et VANBREUSEGHEM (R.). — *Précis de Mycologie*, Masson, Paris, 2^e édit. 1952.

(Travail effectué au Laboratoire de Mycologie médicale
du D^r R. Vanbreuseghem, à l'Institut de Médecine Tropicale
à Anvers. Directeur : Prof. A. Dubois).