

Alcool polyvinylique ou PVA

L'intérêt de ce produit nous a été souligné par Antoine AYEL et son utilisation en mycologie a été affinée par Jean-Louis JALLA. Ils ont eu l'extrême amabilité de nous faire part de leur expérience à ce sujet. Paul LEROY l'utilise aussi pour ses remarquables préparations d'Arthropodes : punaises, tiques, poux, puces, et autres parasites des Mammifères ou des Oiseaux.

Nous sommes en train d'expérimenter personnellement les possibilités vraiment intéressantes de cette substance, qui sont offertes tant dans le domaine des coupes que celui du montage définitif des préparations microscopiques. Les résultats obtenus sont assez spectaculaires et très prometteurs !

Il ne s'agit pas d'une découverte ni d'une nouveauté, puisque VAN BRUMMELEN utilisait ce produit il y a quasi 40 ans. Les méthodes a et b de la préparation sont inspirées de sa monographie traitant des genres *Ascobolus* et *Saccolobus* (1967).

1. NATURE DU PRODUIT :

L'alcool polyvinylique $-(CH_2CHOH)_n-$ est obtenu par hydrolyse alcaline (soude, potasse) de l'acétate de polyvinyle $-(CH_2CHOAc)_n-$. L'alcool polyvinylique possède comme tous les polymères une masse molaire moléculaire très importante. L'alcool vinylique n'est pas isolable car il s'isomérisé en acétaldéhyde ou éthanal CH_3CHO (équilibre céto-énolique). Par contre l'acétate de vinyle $CH_2=CHOAc$ est parfaitement isolable et peut polymériser, principalement par une réaction de type radicalaire.

En présence d'alcool polyvinylique et de borate de sodium (à partir du borax $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ dissous dans l'eau), on obtient un gel gluant, visqueux.

L'alcool polyvinylique que nous utilisons se présente sous forme d'une poudre blanche, de consistance particulière et très légère (un flacon de 1 kg fait 17x17x20 cm – sa densité est de 300 kgs par m³). Il est commercialisé en Belgique par la firme MERCK (VWR International).

AVANTAGES :

Paul LEROY : “ ...S'il est intéressant pour le montage d'objets divers, à condition que ceux-ci ne soient pas trop épais, c'est surtout parce qu'il supprime l'emploi de solvants hydrocarbures. Avec les milieux contenant ces solvants, comme du baume du Canada ou d'autres, la déshydratation est impérative. Comme pour le déparaffinage, les cellules des champignons sont très déformées par les alcools forts et le xylène nécessaires à la déshydratation. C'est donc pour cette raison que le PVA est apprécié en mycologie, puisque le solvant est l'eau... ”

2. PREPARATION :

a/ pour l'inclusion :

Eau bidistillée :	100 cc
PVA : (il sature à 40 %)	39 g
phénol en solution à 10 % dans l'eau bidistillée :	1 cc

- Elever la température de l'eau distillée à 80° C au bain marie.
- Dissoudre en incluant le PVA petit à petit, et en mélangeant sans arrêt. Il est important d'effectuer cette opération à chaud afin d'éviter la formation de grumeaux et obtenir une viscosité suffisante.
- Lors du refroidissement, ajouter 1 cm³ de phénol en solution à 10 % afin d'éviter toute formation de bactéries ou de moisissures (c'est vraiment impératif, car ce milieu constitue un milieu de culture idéal ... sauf si vous réalisez les coupes immédiatement).

b/ pour le montage définitif :

Eau bidistillée :	56 cc
PVA % :	23 g
Elever la température de l'eau distillée à 80° C au bain marie.	
Acide lactique : 26,5 g = 22 cc	22 cc
Phénol en solution aqueuse saturée (84 g/L, à 20°C) :	22 cc
Refroidir le PVA sous eau courante froide pour le ramener à 30-35° et mélanger le lactophénol.	

- Mesurer les 56 cc de solution aqueuse et y incorporer le PVA en mélangeant sans arrêt. Il est important d'effectuer cette opération à chaud afin d'éviter la formation de grumeaux et obtenir une viscosité suffisante.
- Dans un autre flacon, dissoudre le phénol dans l'acide lactique qui est proche de la saturation et mélanger longuement. La dissolution du phénol provoque un refroidissement sensible de la solution (quand on travaille sur des quantités de l'ordre de 200 ml...) : on parle de réaction endothermique.
- S'il reste du phénol non dissout, ajouter 5 cc d'acide lactique en partie ou totalement, de manière à obtenir un mélange bien limpide.
- On obtient ainsi du PVA lactophénolé. (nous utiliserons le signe PVAL pour en parler)
→ Paul Leroy l'appelle PVALPh

3. UTILISATION :

A/ pour l'inclusion :

Il s'agit d'une opération qui a pour but d'enfermer l'objet à découper dans une masse qui va l'enrober "intimement" et qui permettra, après durcissement, d'effectuer des coupes très fines au microtome. Jusqu'à présent, on essaie en mycologie d'effectuer des coupes à la lame de rasoir et à main levée, souvent sous binoculaire. Mais nous sommes tous conscients de la difficulté de l'opération. Ce nouveau produit permet l'utilisation d'un petit microtome à main (microtome de Ranvier) et offre la possibilité de coupes fines et régulières.

→ Il faut savoir :

Paul LEROY : " Je dois apporter ici une précision. le PVA ne coagule pas en masse comme la paraffine ou la gélatine où, quel que soit l'état, le volume reste le même. La solution de PVA à 15 %, placée dans un moule rempli à ras bord, ne donnera pas un bloc de même volume. Après évaporation de l'eau, il ne restera qu'une mince pellicule de produit solide sur les bords et le fond du récipient. L'objet sera quand même inclus dans cette gangue qui aura plus ou moins l'épaisseur d'un " Bristol ". Peut-être qu'une solution plus concentrée aurait plus

d'épaisseur, mais je n'ai pas essayé. ...Pour pratiquer des coupes sur cette inclusion à l'aide d'un microtome à main du type "Ranvier", je ne vois pas d'autre solution que de l'insérer dans la moelle de sureau...."

→ Nous avons expérimenté depuis cette correspondance avec Paul LEROY, une solution beaucoup plus concentrée, de 35 à 39 g/litre d'eau, qui est proche du seuil de saturation situé à 40 g/L. Cela permet d'obtenir des blocs d'inclusion plus épais.

Mode opératoire :

- utiliser le ramollisseur de Cléménçon lorsqu'on souhaite travailler sur des échantillons d'herbier (exsiccata). → laisser agir de 2 à 6 heures !
L'eau nature (de source) donnerait le même résultat (P. Leroy).
- regonfler les tissus avec du chloral lactophénol, en chauffant la lame de verre durant quelques secondes.

A partir de maintenant, l'opération est la même pour du matériel frais ou un échantillon ramolli et regonflé !

- fixer le matériel à l'aide de fixateur de Hollande durant au moins 24 heures (plus si l'échantillon est important !). Nous fixons le fragment de sporophore qui servira pour les coupes en bloc (cela évite de devoir refixer coupe par coupe) et puis nous effectuons l'inclusion au PVA !
- NB :
→ la fixation est préférable pour les Basidiomycètes et pour les Discomycètes, mais facultative pour les Pyrénomycètes (P. Leroy).
→ le fragment à inclure ne doit pas dépasser 2 mm d'épaisseur ni mesurer plus d' 1/2 à 1 cm²
- IMPORTANT : laver ensuite à l'eau distillée 2 ou 3 fois ; ne pas utiliser d'alcool avec le fixateur de Bouin-Hollande, pour laver.
→ L'alcool absolu ou dénaturé est à déconseiller vivement pour les montages au PVAL, de même que le xylène.
- éponger le fragment avec du papier essuie-tout
- placer l'objet à inclure dans un petit moule adapté à sa taille (verre de montre, boîte à lames couvre objet...), verser le PVA et laisser durcir 24 à 48 heures.
- effectuer les coupes dans de la moelle de sureau (ou un produit similaire, comme le polystyrène extrudé, facile à trouver) au microtome de Ranvier, puis commencer les opérations de coloration sélective.

J.L. JALLA : " Pour les coupes de Discomycètes, les observations se font de manière plus rapide :

- Inclusion de matériel frais sans traitement préalable
- La lame est placée sur un plateau réglé à 50° C (plaque chauffante, étuve ou plateau chauffant d'un agitateur magnétique) pour environ 4 heures, ce qui réduit fortement le temps d'attente avant étude (séchage de l'inclusion)... .. "

B/ pour la conservation définitive des coupes :

Lorsqu'on a passé parfois beaucoup de temps à préparer et colorer soigneusement des coupes et que le résultat présente un intérêt réel, il paraît normal et évident de vouloir conserver ces coupes pour permettre des observations postérieures.

L'utilisation du PVA semble ouvrir des perspectives intéressantes, parallèlement au Baume du Canada, qui, malgré ses immenses qualités, présente au moins deux désavantages certains : son prix, et son appartenance aux dérivés du benzène !

- Placer une goutte de PVAL sur la préparation et une gouttelette sur la lamelle, retourner vivement celle-ci pour avoir une goutte en suspension et la poser délicatement sur la lame porte-objet, de manière à éviter des bulles d'air éventuelles.
- poser des compresseurs (fabrication personnelle ou pince à linge " fatiguée ")
- Laisser sécher durant 3 jours, éliminer soigneusement le surplus de débordement qui subsisterait et luter avec du vernis à ongle incolore (nous pensons, à l'usage, que cela n'est pas nécessaire !).
- Ne pas oublier de noter la lame (n° de référence vers un carnet de notes) ou encore mieux, inscriptions directes sur celle-ci (petite étiquette autocollante), car le carnet peut se perdre... la double annotation étant parfaite !
- Enduire l'étiquette éventuelle de vernis à ongle incolore de manière à pouvoir nettoyer la lame à l'alcool, sans problèmes avec l'encre

ATTENTION !

- Il apparaît impératif de fixer les coupes avant de les colorer
- Si on n'a pas utilisé de fixateur, la coloration disparaît en quelques heures
- une coupe colorée au rouge Congo (aqueux ou SDS) devient bleu noir en quelques secondes au contact du PVAL, et n'est plus lisible (en effet, le rouge Congo est un révélateur en bleu-noir des milieux acides) ; si le rouge Congo est indispensable, il vaut mieux alors utiliser le Conservateur de HOYER.
- Il faut savoir que, malheureusement, la coloration finit par disparaître au fil du temps, à cause du phénol (sauf si elle est effectuée avec de l'encre bleue pour stylo → dixit Christian LECHAT).

C/ pour la conservation définitive des sporées :

Le PVAL est recommandé pour des spores naturellement colorées de manière forte (Coprins, Psathyrelles, Agarics, certains Bolets...).

Nous pouvons vous dire maintenant, par expérimentation personnelle, que les colorations au Melzer ou au bleu coton lactophénol ne tiennent pas avec ce produit (sauf rares exceptions comme les chlamydospores de *Nyctalis* ...) : elles disparaissent en 3 ou 4 semaines, parfois moins !

- récolter une sporée colorée sur lame de verre (lame porte-objet)
- préparer un frottis sur une autre lame mouillable
→ y déposer une goutte d'eau albuminée dans laquelle on place un peu des spores récoltées
→ bien étaler (réaliser un frottis)
→ laisser sécher complètement (ne pas chauffer)
- Notre technique : placer une grosse goutte de PVAL sur la lamelle, la retourner vivement pour avoir une goutte en suspension et la poser délicatement sur la lame porte-objet, de manière à éviter des bulles d'air éventuelles.
- Notre ami, Paul LEROY, pratique en sens inverse : poser la goutte de PVAL sur le frottis et poser la lame couvre objet en biais

REMARQUES :

→ nous utilisons, pour les sporées, des lames couvre objet de 22 x 40 mm afin de couvrir un champ de frottis plus grand.

→ pour des spores qui nécessitent une coloration (Melzer, rouge Congo, bleu coton, ou autres), nous utilisons maintenant l'Aquatex (milieu de montage définitif : c'est une résine qui polymérise rapidement, mais dont le solvant est l'eau).

NB : la décoloration des spores (en cas de montage dans le baume du Canada) ne constitue pas un problème pour ceux qui ont la chance de disposer d'un microscope équipé d'un contraste de phase, d'un contraste interférentiel de Nomarski ou d'un éclairage en fond noir.

D/ pour la conservation définitive de petits insectes :

Nous utilisons une technique qui nous a été enseignée par Paul LEROY, véritable maître en la matière, et excellent pédagogue :

- placer l'insecte dans un bain de KOH (potasse) à 30 % durant quelques minutes, dans un verre de montre
- rincer dans un bain d'acide pour bloquer l'action de la potasse
- rincer à l'eau pour éliminer l'acide
- placer l'insecte sur lame de verre (lame porte-objet) dans une goutte d'eau
- à l'aide d'une seconde lame, l'aplatir et bien mettre en évidence les appendices importants au binoculaire (pattes, palpes labiaux ou trompe, élytre, aile, armature génitale...)
- Placer une grosse goutte de PVAL sur la lamelle, la retourner vivement pour avoir une goutte en suspension et la poser délicatement sur la lame porte-objet, de manière à éviter des bulles d'air éventuelles
- après quelques jours, les téguments s'éclaircissent et deviennent translucides et ce qui facilite l'observation par transparence

4. DANGERS :



Le danger provient surtout du phénol, qui est toxique. Travailler dans un endroit bien aéré ou mieux, sous hotte aspirante pour préparer les produits.

Le PVA en lui-même n'est pas toxique, et encore moins la solution ; il est cependant recommandé de ne pas l'ingérer sous sa forme pure.

5. CONSERVATION :

- La préparation du produit d'inclusion se fait extemporanément, pour la quantité souhaitée ; conserver le PVA en poudre, au sec.
- Nous ne connaissons pas actuellement la durée de conservation du PVAL, avant utilisation (au moins 7 ans en ce qui me concerne, car nous gardons un flacon test depuis 2004...) ; le conserver dans des flacons bien fermés afin d'empêcher tout contact avec l'air.
- Paul LEROY nous confirme qu'il n'y a pas de problèmes de conservation : il dispose de flacons préparés depuis plusieurs années, et la qualité est toujours parfaite... Même si l'utilisation du PVA aux fins proposées est connue depuis quasi 1/2 siècle, nous n'en avons pas trouvé trace dans divers précis de microscopie pourtant célèbres (Langeron, Seguy, Deflandre). Locquin le mentionne, mais sans explications techniques.