

J'ai testé le PVA pour le montage des Arthropodes

Olivier Levoux¹

Il faut rappeler que le PVA est connu depuis longtemps, même si son usage ne s'est guère répandu en microscopie (voir l'extrait de texte ci-dessous).

250

N.Z. Science Congress, 1947.

NEW METHODS IN MICROSCOPY FOR THE STUDY OF SMALL INSECTS AND ARTHROPODS

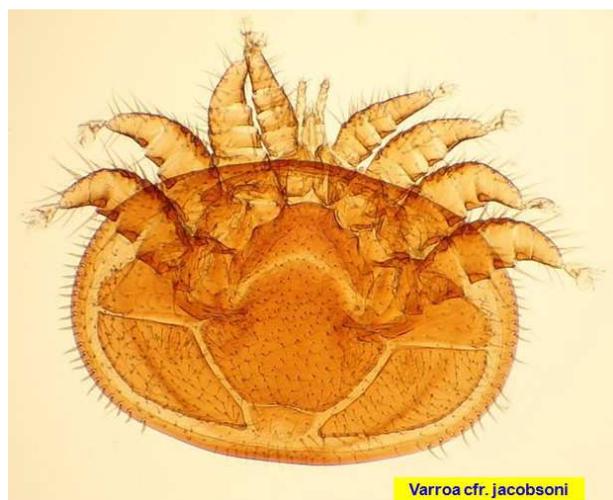
By J. T. SALMON, Dominion Museum.

THE main purpose of this paper is to introduce to you some new mounting media for microscopy based on the use of polyvinyl alcohol; but, before dwelling in detail on these I should like to make some general observations on media and methods generally advised in standard texts on microbiology.

When making a taxonomic study of small Arthropods under the microscope it is necessary, in order to be able to see the outlines of fine setae or hairs and the structure of delicate sense organs etc., to select a mounting medium of relatively low refractive index. On account of its rather high refractive index, slow rate of setting and the necessity for thorough dehydration Canada Balsam has long been regarded by taxonomists as unsuitable and resort has generally been made to gum arabic-chloral hydrate mixtures, such as the well-known Berlese's Fluid. These media invariably suffer from the disadvantage that

Since taking up the study of Collembola I have, for several years, been experimenting with mounting methods in an endeavour to perfect a technique capable of giving a preparation which, under the microscope, would render the finest structural details clearly visible without suffering from the bugbear of crystallisation and which, at the same time, would be less time consuming than conventional methods. Although the reduction of time spent in the preparation of a mount to half-an-hour is a great advantage the potash technique is always tedious and fraught with a certain amount of risk to the specimen, particularly when the latter are of the order of 0.1 mm. long. I was rather interested, therefore, in an article which appeared in *Science* some time ago advocating the use of polyvinyl alcohols as mounting media. Later, I learned from Mr. H. Womersley, of Adelaide, that he had used a medium prepared from medium viscosity polyvinyl alcohol with great success as a mountant following treatment with potash. I was fortunate in securing some

Après avoir monté nombre de sujets dans le baume du Canada (BC), selon la technique préconisée par P. Leroy & M. Lecomte, nous nous sommes tournés vers ce médium afin d'éliminer les manipulations d'alcools forts ou de xylol.



Nous avons choisi d'utiliser ce milieu de montage pour nombre de petits arthropodes : acariens, tiques, araignées, insectes (puces, collemboles, mouches), crustacés (copépodes, cladocères, daphnies). Tous ont des points communs : très petite taille, fragilité des appendices et téguments, squelette composé de chitine, nécessité de visualiser de fins détails afin d'identifier l'espèce. Nous l'avons également testé sur des spores, des grains de pollen, des nématodes... Et tout cela avec un succès certain !

Rappelons simplement que le PVA lactophénolé (PVALPh) est un mélange d'alcool polyvinylique (liant), d'eau (solvant), d'acide lactique (éclaircissant et conservateur) et de phénol (anti-

septique et antifongique).

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser les proportions conseillées par J.T. Salmon (1947) qui avait constaté que le n pouvait varier de 1,438 à 1,469 selon le dosage d'eau, d'acide lactique et de phénol (voir tableau, page suivante).

¹Olivier Levoux, 29, rue du Petit Marais - F-35510 CESSON-SEVIGNE – olivier.levoux@orange.fr ; Olivier a participé au séminaire de microscopie, à Massembré, en 2009 et 2012 ; il a été un élève assidu de Paul Leroy durant toute la semaine, et depuis cette époque, il s'est passionné pour le montage des Arthropodes.

N (indice de réfraction)	PVA	Eau	lactophéno ²
1,438	2,5 g	10 cc	15 cc
1,447	2,5 g	15 cc	25 cc
1,458	2,5 g	10 cc	25 cc
1,469	2,5 g	6 cc	30 cc

Milieu d'observation	Indice de réfraction moyen
Air	1
Eau distillée	1,33
Lactophéno ²	1,44
Acide lactique	1,44
Glycérine	1,47
PVALactophéno ²	1,44 à 1,47
Huile de cèdre	1,51
Chloral phéno ²	1,52
Verre	1,52 (bleu-vert)
Baume du Canada	1,53

Une des particularités qui nous intéresse le plus dans le PVALPh est la valeur de l'indice de réfraction, qu'il est intéressant de faire tendre le plus possible vers celui du BC.

La préparation des objets

Cela peut se résumer en quelques mots : « Rien à faire, ou presque ! ». On peut monter directement une pièce séjournant dans l'eau ou l'acide lactique. Aucune manipulation à fin de déshydratation.

Attention aux âmes anthropomorphiques : on peut monter à vif de petits spécimens, afin de préserver les appendices fragiles.

Cependant, si le sujet est opaque et épais, il est nécessaire de l'éclaircir et de le ramollir, car l'épaisseur est l'ennemi n° 1. On peut envisager également une coloration.

L'éclaircissement

++ Méthode rapide, avec de la potasse (ou de la soude) de 5 à 20 % ; mais c'est très agressif et les fibres musculaires sont détruites, ce qui fragilise le sujet.

++ Notre méthode préférée, même si elle demande du temps et de la patience consiste en une solution faible d'acide lactique, qui préserve les tissus musculaires.

++ Pour les parasites hématophages, qui s'avèrent très résistants, se tourner vers le percarbonate de sodium ou l'eau oxygénée.

Fibres musculaires dans les pattes d'une tique – inversion des couleurs, avec traitement d'images – photo Olivier Levoux



La coloration

Retenez que le phéno² détruit la plupart des colorations, sauf :

- si le PVA est coloré dans la masse (avec fuchsine acide, bleu d'aniline, bleu de méthyle, noir de chlorazol (particulièrement indiqué pour la chitine))
- si on supprime le phéno² (PVA + glycérine) ou qu'on le remplace par de l'iode³ (quelques gouttes de lugol par exemple).

On peut aussi utiliser du rouge Congo, mais il faut alors éliminer l'acide lactique, car ce colorant noircit quand il se trouve dans un milieu acide.

² A partir du phéno² aqueux (formule ML)

Eau bidistillée :	100 cc
Phéno ² en cristaux :	3 g

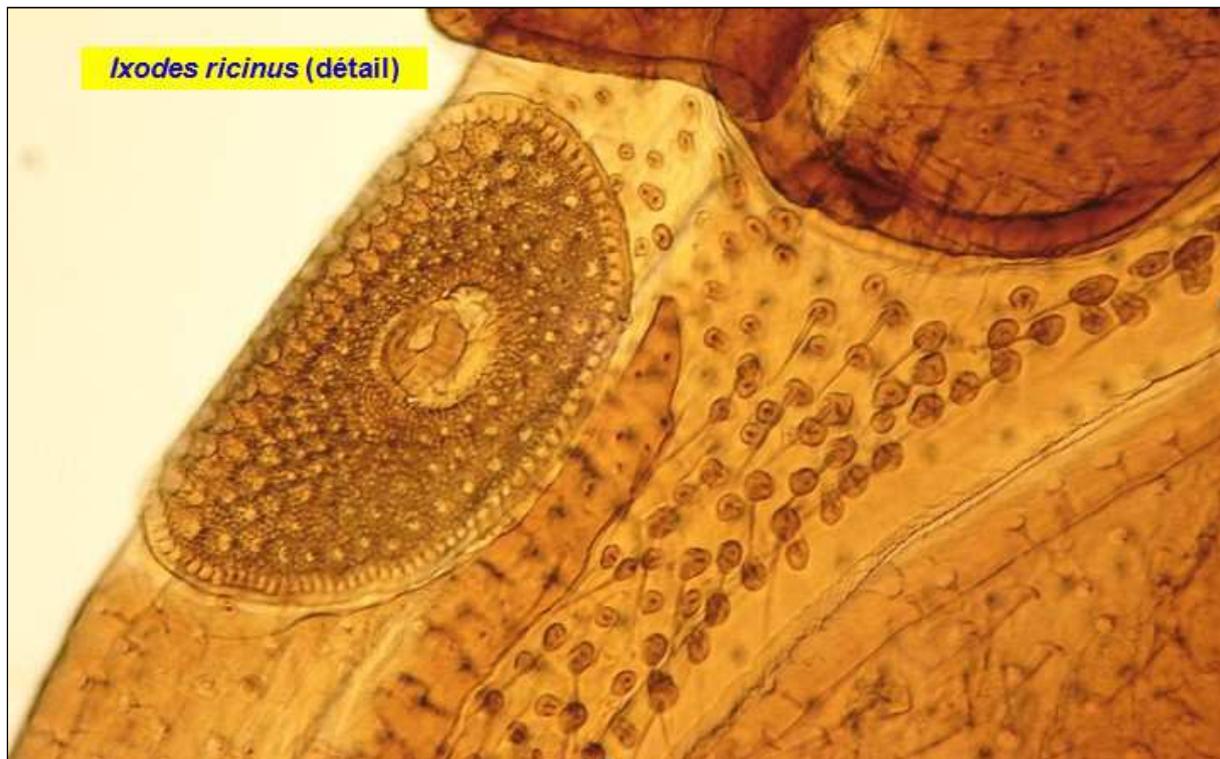
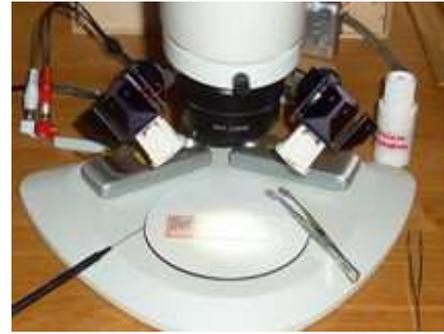
Préparer d'abord le phéno² aqueux et agiter énergiquement jusqu'à dissolution complète. Ensuite, effectuer le mélange suivant :

Phéno ² aqueux :	22 g
Glycérine :	40 g
Acide lactique (commercial concentré) :	20 g
Eau bidistillée :	9 cc

³ (ML) : l'iode n'est bien soluble dans l'eau qu'en présence d'une quantité double d'iodure de potassium.

Le montage de la lame

- + Travailler sous la loupe binoculaire (impératif pour obtenir un bon résultat).
- + Déposer la « bonne » quantité de PVALPh, afin d'anticiper l'importante rétraction⁴ du milieu.
- + Enlever ou écarter impuretés et bulles avec une pince, ou une aiguille montée.
- + « Égoutter » l'objet, avant de le poser, pour ne pas ramener d'impuretés.
- + Ensevelir l'objet pour qu'il ne flotte pas et ne dérive pas à la pose de la LCO.
- + A nouveau enlever ou écarter impuretés et bulles amenées par l'objet.
- + Donner la meilleure attitude possible (alignement des appendices).
- + Pose très délicate de la LCO, à la pince.
 - C'est à ce moment que le risque d'amener des bulles est le plus important.
 - Ne jamais laisser tomber la LCO !



Séchage, nettoyage et lutage de la préparation

- + Laisser sécher à température ambiante (l'usage de l'étuve, suivant température, peut générer des bulles).
- + Si l'objet est épais, le milieu va se rétracter, du côté où la LCO est la plus soulevée : il faut remettre du PVALPh sans emprisonner de bulles... surveillance requise, tout un art !
- + Laisser sécher à l'horizontale : risque de dérive de la LCO et perte de l'alignement des bords de lame.
- + Laisser sécher à l'abri de la poussière (le PVALPh est collant) et pas dans une pièce de vie (toxicité du phénol dégagé)
- + Nettoyer soigneusement la préparation après séchage, car elle est normalement couverte de micro cristaux de phénol.
- + Luter impérativement du fait de la solvabilité du médium à l'eau ou à l'alcool (recommandation : attendre au moins 2 mois de séchage avant de luter, afin qu'il n'y ait plus de risque de rétraction).

Le séchage du PVALPh entraîne une compression de l'objet, qui contribue à la faible profondeur de champ, recherchée en microscopie.

Comparaison entre PVALPh et BC

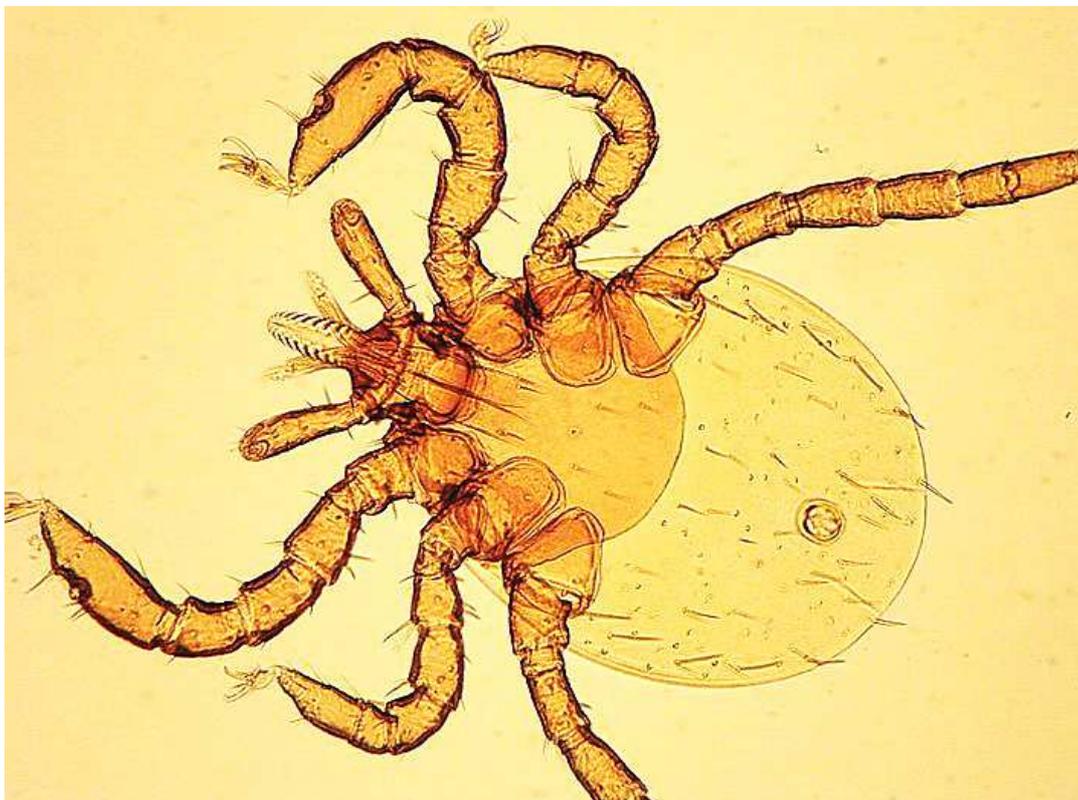
⁴ (ML) : nous avons expérimenté des concentrations beaucoup plus importantes de PVA (39 %), avec comme avantage une rétraction souvent minime, et même inexistante pour des objets de faible épaisseur.

Caractère comparé	Baume du Canada	PVALPh
Toxicité	Xylène	Phénol
Bulles	Presqu'aucun problème	Gros problème
Rétraction	Infime	Importante (voir rf. 75)
Compression	Nécessaire au montage	Auto compression
Temps de séchage	Très, très long	Long
Lut	Superflu	Nécessaire
Difficulté de préparation de l'objet	Elevée (déshydratation)	Faible
Difficulté de montage	Idem PVALPh	Idem baume
Tenue dans le temps	Légendaire	Elevée, des décennies pour les bons montages
Contraste des détails pour les micro-arthropodes	Inférieur au PVALPh	Supérieur au baume
Risque d'attaque fongique	Nul, à cause du xylène	Nul grâce au phénol

Les causes possibles d'échec

- + Un « tombé de LCO » qui apporte son cortège de bulles indélogeables⁵.
- + Un passage exagéré de la préparation à l'étuve, qui peut générer des bulles irrécupérables, après polymérisation.
- + Un mauvais dosage du PVALPh (dans le pire des cas, ceci peut provoquer, suite à la mise sous tension et puis le relâchement de la LCO, un appel d'air jusqu'au centre de la préparation).
- + Un objet trop épais.
- + Un nettoyage avant séchage parfait du PVALPh, ou un oubli du lut.
- + Un PVALPh de mauvaise qualité : certains ont plus d'aptitude à générer des bulles.

Mais, si cela peut vous rassurer, il y a aussi des échecs avec le BC.



Larve de tique (le stade larvaire est aisément reconnaissable, car elle n'a pour l'instant que 6 pattes).

⁵ (ML) Il est possible d'éliminer facilement les bulles en utilisant la technique suivante :

- + Chauffer la préparation sur un réchaud à alcool pur, jusqu'aux premiers bouillons.
- + Déposer le plus rapidement possible la préparation sur une surface froide (une plaque de verre par exemple), et les bulles vont migrer vers l'extérieur de la LCO, et disparaître, comme par magie.